

Pyrosequencing

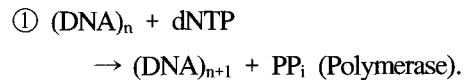
이 상 규 (경북대 생명공학부)

Sequencing 기술은 현재 여러 가지 방법이 알려져 있다. Sequencing 기술을 결정할 때는 작업시간, read-length, 그리고 정확성 등이 고려된다. 통상적으로 가장 빈번히 쓰이는 Sanger method는 상당히 자동화되어 있고 500-1000bp의 sequencing이 가능하다. 그러나 polymerization 후에 전기영동으로 단편의 크기를 확인하는 등 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다. Maxam-Gilbert sequencing은 500bp 정도의 DNA를 sequencing 할 수 있고, 여기서는 방사선 동위원소로 표지된 말단을 가지는 단편들이 나오므로 특별한 관리가 필요하다. 그 때문에 작은 스케일의 작업에 적합하다. 또한, Sequencing by hybridization(SBH) 방법이 있는데, 이것은 표지된(labeled) sequencing 주형가닥(template)을 고정되어 있는 여러 oligonucleotide에 혼성화(hybridize)시키는 방법으로, 정확성과 신뢰도면에서는 우수하지만 작업시간이 오래 걸린다는 단점이 있다. 앞서 소개된 기술들에 비해 Pyrosequencing은 read-length에 제약이 있으나 sequencing의 정확도가 높고 작업시간이 빨라 SNP detection, 박테리아나 바이러스의 genotyping 등에 효과적으로 사용되고 있다.

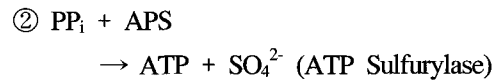
Pyrosequencing의 원리를 간단히 살펴보면, Pyrosequencing

시스템에 필요한 효소는 Klenow DNA Polymerase, ATP sulfurylase, Luciferase 그리고 Apyrase가 있다. 그리고 반응시키기 위한 혼합물에는 효소 기질(substrate)인 adenosine phosphosulfate (APS), D-luciferin 그리고 sequencing template가 포함된다. 4종류의 nucleotide를 넣고 반복적으로 수행하면, 단일주형가닥에 상보적인 염기가 하나씩 결합되고 그 때 발생하는 빛을 CCD(Charge Coupled Device) 카메라가 감지하게 된다.

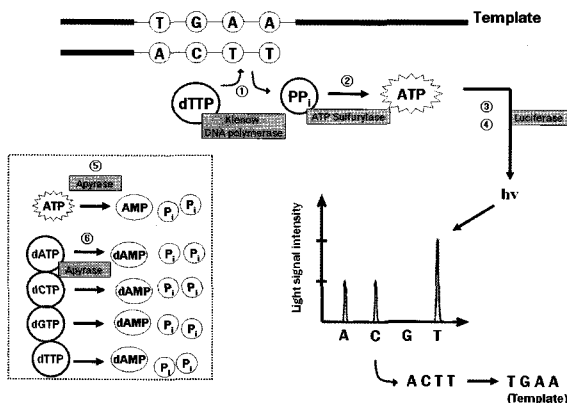
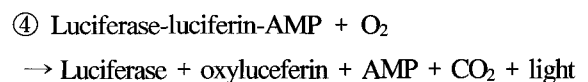
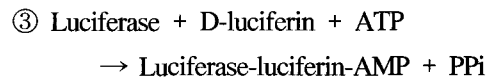
Pyrosequencing 기술에 이용되는 효소 반응은 다음과 같다. 첫 번째 반응은 DNA polymerization인데 추가된 nucleotide가 sequencing template와 상보적인 염기쌍을 이루어 DNA가닥이 신장되는 것이다.



Pyrophosphate(PP_i)가 Klenow DNA polymerase에 의해 떨어져 나오면서 ATP sulfurylase의 기질로 작용하여 ATP를 생산한다.



세 번째, 네 번째 반응을 통해, ATP는 Luciferase에 의해 빛 에너지로 변환되고 이 신호를 감지한다. 단, 여기서 적합한 nucleotide가 첨가되었을 경우에만 빛이 나타난다.



Apyrase는 다른 염기가 첨가되기 전에 결합되지 못한 nucleotides와 ATP를 제거한다.

⑤ $ATP \rightarrow AMP + 2P_i$ (Apyrase)

⑥ $dNTP \rightarrow dNMP + 2P_i$ (Apyrase)

Apyrase에 의한 분해 반응을 수행하지 않으면, 앞서 수행된 첨가 반응 후 남아있는 ATP나 dNTP에 의해 다음에 나타나는 빛 신호가 불명확해진다.

Pyrosequencing 기술은 적어도 20bp를 알아낼 수 있으므로 polymorphic position을 알아내거나 미생물의 genotyping, tag sequencing 등 여러 가지 경우에 적용된다. 이미 알려진 sequence상의 돌연변이(mutation)을 확인하기 위해서는 보통 sequencing을 한 번 더 (re-sequencing) 수행하는데 이 방법으로 돌연변이를 정량할 수 있고, 이종 암세포 물질(heterogeneous tumor material)의 경우 10~20% 정도의 낮은 돌연변이 신호 (mutation signal)도 감지할 수도 있다. 또한, SNP처럼 polymorphic position을 이미 알고 있다면 sequencing해야 할 염기가 4~10bp를 넘지 않으므로 pyrosequencing을 사용하기가 매우 유용하다.

미생물의 genotyping에서는 매우 가깝게 연관된 종의 형질을 구분하기 어려우므로 read-length를 늘이기 위해 그룹 특이적 primer pool을 사용하거나 PCR primer를 pyrosequencing primer로 사용하는 등의 노력이 진행되었다. 그러나 template의 불특정 증폭, 또는 sequence 피크의 섞임 등의 문제점이 있었다.

현재 Pyrosequencing 기술에는 96이나 384의 판 (plate)를 사용하는데, 효율을 높이기 위해서는 분석 가능한 sample 량 (sample capacity)을 높일 필요가 있

다. 그러기 위한 방법 중 하나는 micromachined filter-chamber array를 사용하여 실시간 모니터링을 가능하게 하는 것이다. 이는 작은 DNA 단편이 각각의 chamber안에 있는 bead에 고정함으로써 동시에 여러 chamber에서의 반응을 수집할 수 있다. 용액을 chamber 안으로 주입하여 효소들이 chamber를 통과 하면서 빛을 내는 데, 빛의 감지는 출구에서만 이루어지므로 한 번에 한 가지 분석밖에 할 수 없고 신호가 약하다는 단점이 있었다. 이 문제는 luciferase를 DNA binding domain(Klenow 또는 SSB)과 융합하여 DNA를 통해 bead에 고정시킴으로써 이를 해결하였다. 이 시스템은 nano-liter filter chamber나 DNA microarray와 같이 최소화된 포맷에 사용가능하다.

최근에 454 Life Science에서 소개된 microfluidic format은 pyrosequencing chemistry와 PicoTiter Plate의 pico-liter well을 사용한 시스템에서는 10Mbp까지 sequencing 가능하다.

참고문헌

1. Ahmadian A. et al., 2006. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. Clin Chim Acta, 83-94.
2. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. Science 1998; 281: 363, 365.
3. P. Nyren, Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity, Anal Biochem 167 (1987), pp. 235-238.
4. E.D. Hyman, A new method of sequencing DNA, Anal Biochem 174 (1988), pp. 423-436.