

DNA유전자칩을 이용한 인체오염 바이오마커 탐색기법

Development of Biomarker for toxic Chemicals using cDNA Microarray

박건구

파마코제네칩스

2001년 2월 사람의 genome sequence가 해독되어 발표된 것은 독성학적으로도 역사적인 사건이다. 약 29.1억 base pair로 이루어진 사람의 전체 유전자 염기서열 중 단지 1.1%에 해당하는 부분만이 exon에 해당하는 염기서열 이었고, 24%가 intron에 해당하는 부분이었으며, 나머지 75%는 유전자의 사이에 위치하는 부분이었다. 특이한 결과는 단백질을 coding하는 유전자가 26,000개 정도에 불과하다는 것과 single-nucleotide polymorphism (SNP)가 1250 bp마다 1개씩 존재한다는 사실이다. 이러한 사실은 SNP와 유전자의 발현 패턴이 독성 현상의 발현에 매우 중요하다는 것을 암시한다. 개개인마다 같은 독성 물질에 대한 감수성이 다른 것은 SNP 때문일 것이고, 한 사람에게 노출된 같은 독성 물질이라도 장기마다 독성이 다른 것은 각 장기마다 유전자의 발현 패턴이 다르기 때문일 것이다. 여러 가지 독성 물질이 같은 사람 같은 장기에 독성이 다르게 나타나는 것은 각 독성물질에 의하여 유전자의 발현 패턴이 다르게 나타나기 때문이라고 유추 할 수 있다.

사람의 전체 유전자 수가 생각보다 훨씬 적은 것은 어떤 독성 물질에 1가지 유전자만 관여하여 독성이 나타나지 않을 것이란 추측을 하게 한다. 이제는 한가지 독성물질에 의하여 변화되는 유전자가 수백개이든 수천개이든 High-Throughput Screening (HTS)로 검색하는 방법이 일반화되고 있다. 기존의 방법으로 수백 년 걸리던 일이 단 며칠만에 분석이 가능하게 되었다. 이 방법 중에 한가지가 microarray이다. microarray는 크게 oligonucleotide microarray와 cDNA microarray로 대별 할 수 있다. 전자는 주로 염기서열의 변화를 측정할 수 있고, 후자는 유전자의 발현을 측정한다. 독성물질에 의한 돌연변이나, SNP차이에 의한 독성물질에 대한 감수성의 차이는 oligonucleotide microarray를 사용하고, 유전자 발현의 패턴 변화는 cDNA microarray를 주로 사용한다. 이론적으로 모든 독성물질에 대한 각 조직에서의 모든 유전자 발현 패턴을 분석해서 Data Base를 구축하는 것이 가능하다. 이렇게 되면 유전자 발현 패턴의 변화 자체가 마커가 될 수 있다. 이러한 다수의 유전자를 조합하여 독성을 평가함으로써 보다 정확한 마커를 기대 할 수 있다.

독성물질에 대한 마커로 유전자 발현패턴의 변화를 이용하려면 cDNA microarray를 만들어야 한다. cDNA microarray를 제작하는데는 우선 각각의 유전자를 PCR하고 정제하여 특수하게 coating된 slide glass에 pin방식이나 ink-jet방식으로 고정화 한다. 지름이 약 150 um의 크기로 각각의 유전자를 22mm x 22mm 영역에 1만개 정도까지 배열 할 수 있다. 이중 독성물질의 노출에 의하여 변화되는 유전자를 측정하려면 대조군과 독성물질을 처리한 측정군에서 mRNA를 정제하고 대조군을 Cy3 그리고 측정군을 Cy5로 labelling한다. 이 두가지 probe를 혼합하여 hybridization하고 각각의 유전자에 대한 두가지 형광의 양을 측정하고 상대적인 비율을 산출하여 독성물질에 의한 발현의 증감을 측정하고, 다수의 유전자를 동시에 분석하여 다음의 발현 패턴을 도출 할 수 있다. 1. signal은 있지만 독성물질에 의하여 전혀 발현에 영향이 없는 유전자 2. 발현이 감소되는 유전자 (이 유전자의 기능이 없어져서 독성이 발현됨) 3. 발현이 증가되는 유전자 (이 유전자의 기능이 증강됨으로써 독성이 발현됨) 4. signal이 없는 전혀 발현이 되지 않는 유전자. 즉 위의 4가지 경우의 수를 1000개의 유전자를 동시에 분석해 조합하면 4^{1000} 가지의 경우의 수가 나온다. 이론적으로 모든 독성물질에 대하여 서로 다른 발현 패턴을 대응 시킬 수 있다.

<책임연구자>

성 명: 박 건 구

주 소: 강원도 춘천시 후평동 198-53 생물산업벤처기업지원센터 305호

연 락 처: 전화 (033-258-6777), 팩스 (033-258-6776), E-mail (kkpark@pharmacogenechips.com)

DNA 유전자칩을 이용한 인체오염 바이오마커 탐색기법

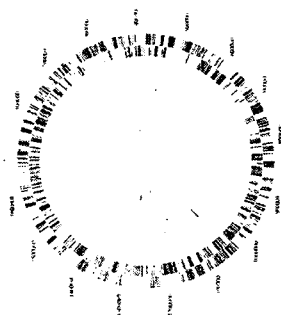
박진구
파마코제네칩스

A Pioneer in Drug Development using Functional Genomics
in DNA Chip Services
in Gene Expression Analysis

유전자체 연구가 진행된 주요 생물 (2001. 10)

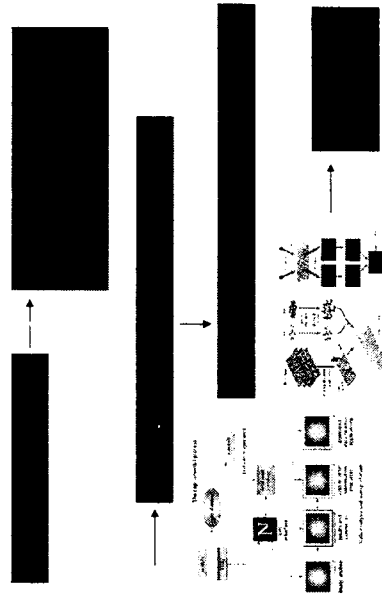
시간	2001년 10월
종류	2002년 3월 예정 1998년 3월
식물	2005년 3월 예정
미생물	<산원미생물> Saccharomyces cerevisiae (주) <주> Bacillus subtilis (주) <주> <진균류> Haloquadratum walsbyi (주) <주> Mycobacterium tuberculosis (주) <주> Haemophilus influenzae (주) <주> Mycoplasma genitalium (주) <주> Staphylococcus aureus (주) <주> <동물류> Methanobacterium thermoautotrophicum (주) <주> Pyrococcus horikoshii (주) <주> Thermotoga maritima (주) <주> <원생동물> 광합성 미생물(Synechocystis SP.) (주) <주>

H. Pylori Genome Sequence

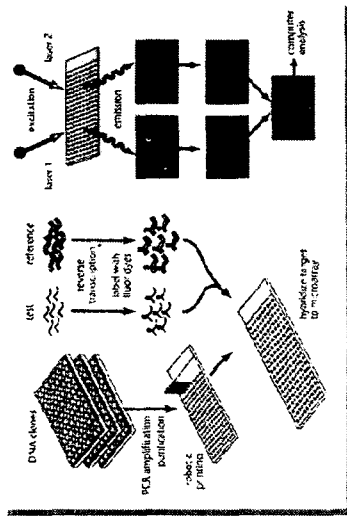


A circular representation of the *H. pylori* chromosome illustrating the location of each predicted coding region. Coding regions in the outer circle are transcribed on the + strand while non coding regions in the next inner circle are transcribed on the - strand.

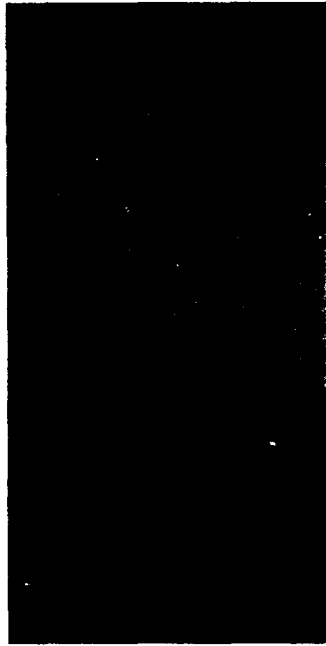
인간게놈프로젝트



유전자칩 원리 및 유전자칩 제작



유전자칩 실험 과정



유전자칩 제작기술 분류

DNA chip 제작기술	특징	칩종류	DNA chip 제작회사
pin microarray	핀을 이용한 micro dotting (surface contact)	cDNA & oligonucleotide	Hyseq Incyte Pharmaceuticals
Inkjet	Inkjet 원리를 이용한 micro dropping	cDNA & oligonucleotide	Incyte Pharmaceuticals
Photolithography	Photolithography를 이용한 oligonucleotide 직접 합성	oligonucleotide	Affymetrix
Electronic array	전기를 이용한 oligonucleotide addressing	oligonucleotide	clinical Micro Sensors Nanogen

Microarray Robot (Pin 박진)

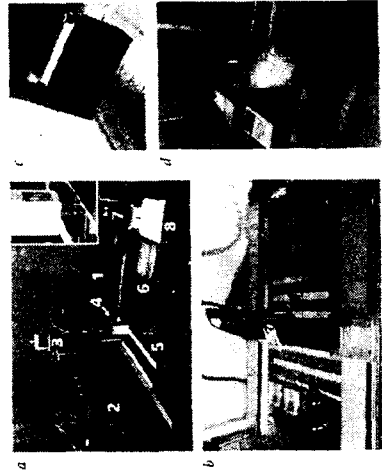
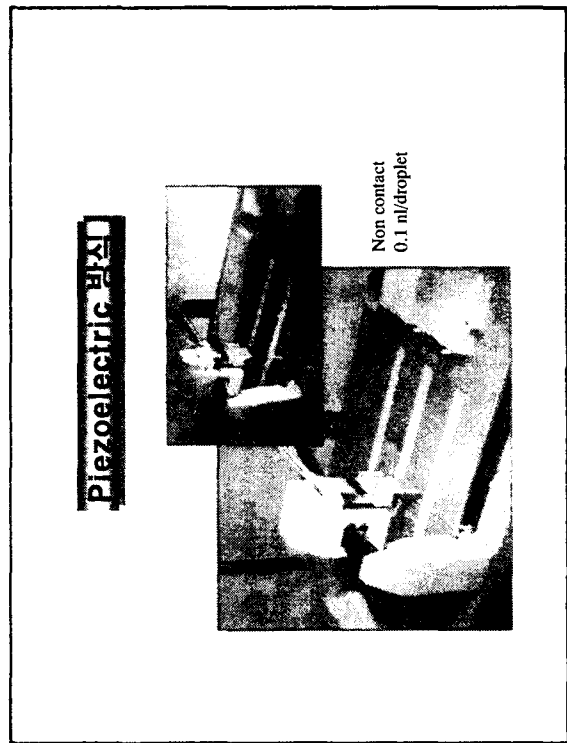
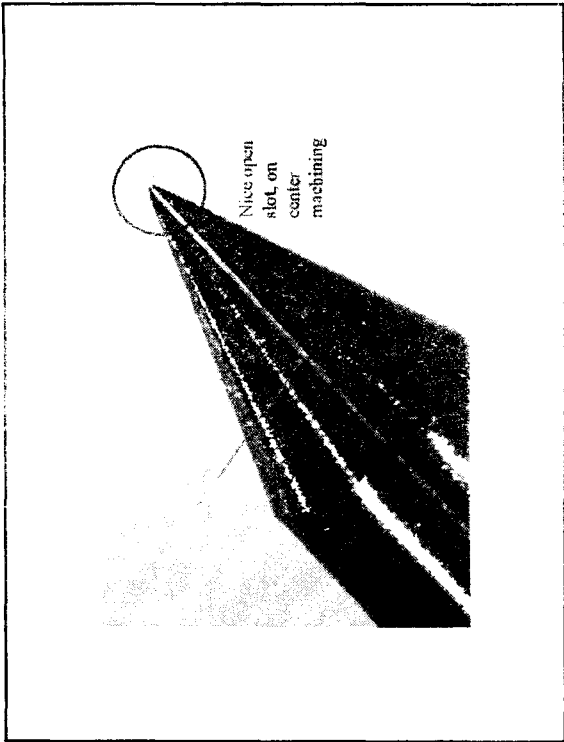


Fig. 1-4 Pin microarray robot. The X, Y, Z, axes are labeled 1, 2, and 3, respectively. The key components of the robot are: (1) the robot's main body, (2) the robot's base, (3) the robot's control panel, (4) the robot's pin array, (5) the robot's pin array, (6) the robot's pin array, (7) the robot's pin array, (8) the robot's pin array. The robot is used for the fabrication of DNA microarrays.



Operating Principles of the Piezoelectric Micropipettes

The above schematic diagram is for the sake of simplicity only.

The nozzles of the Piezoelectric Micropipettes

Light directed oligonucleotide synthesis

REAGENT	CONCENTRATION	TIME	TEMPERATURE
1. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
2. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
3. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
4. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
5. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
6. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
7. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
8. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
9. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
10. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
11. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
12. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
13. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
14. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
15. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
16. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
17. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
18. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
19. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
20. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
21. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
22. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
23. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
24. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
25. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
26. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
27. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
28. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
29. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
30. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
31. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
32. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
33. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
34. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
35. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
36. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
37. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
38. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
39. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
40. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
41. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
42. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
43. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
44. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
45. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
46. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
47. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
48. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
49. 10% NaOH	10%	1 min	25°C
50. 10% NaOH	10%	1 min	25°C

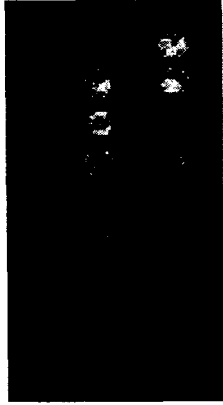
Fig. 1. Light directed oligonucleotide synthesis. A solid support is derivatized with a photolabile protecting group. Light is directed through a mask onto the support. The process is repeated, activating different sets of sites and coupling different bases, allowing arbitrary DNA probes to be constructed at each site. A schematic illustration of the lamp, mask, and array.

Hybridization

Scanning Sensitivity

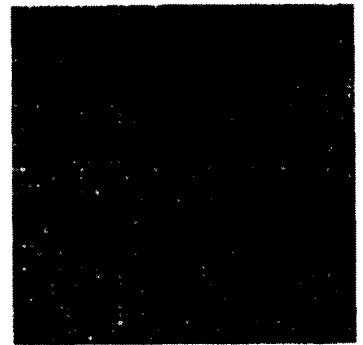


Sensitivity serial
dilution detecting
better than < 0.1
fluorescent
molecules μm
The faintest spot
represents 0.01
fluorescent
molecules μm



Mutation detection. Shown are scanned images of
oligonucleotide microarrays printed with TeleChem's
ChipMaker 3TM Micro-spotting device

cDNA microarray Data



Data Analysis

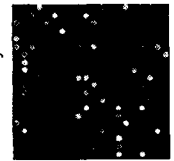
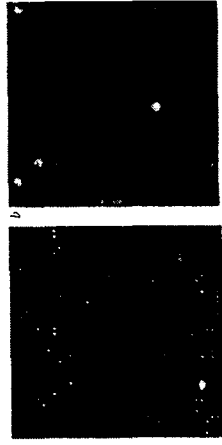
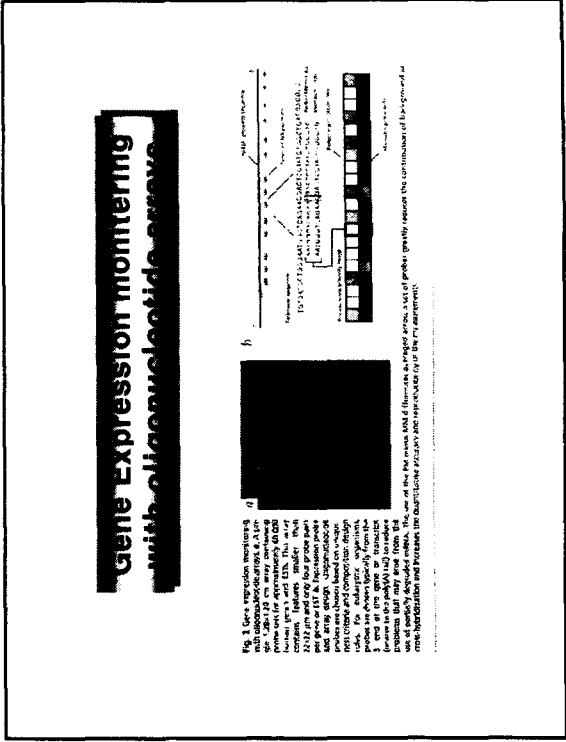
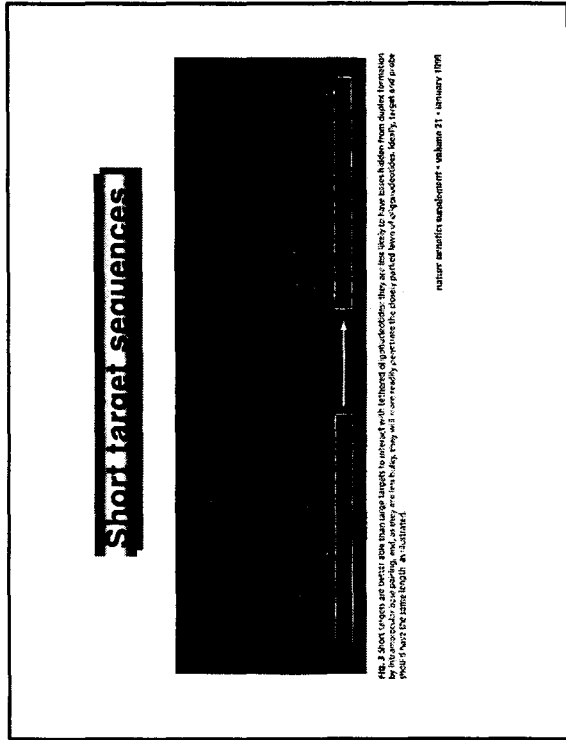
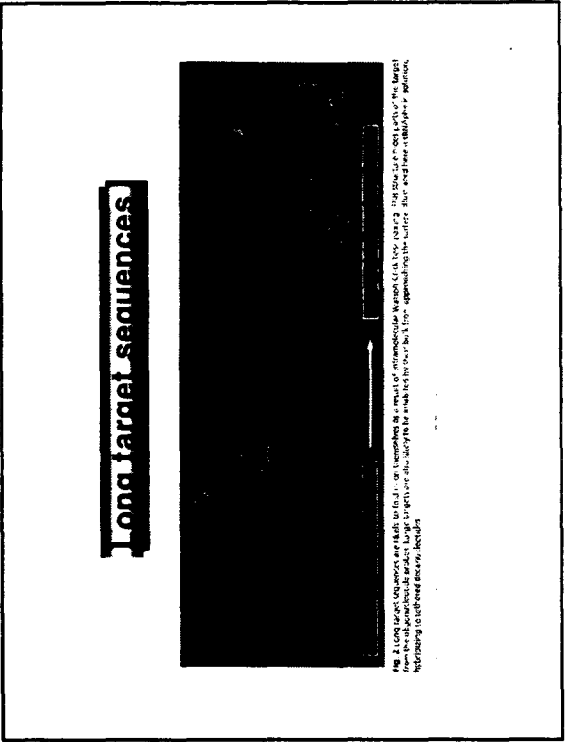
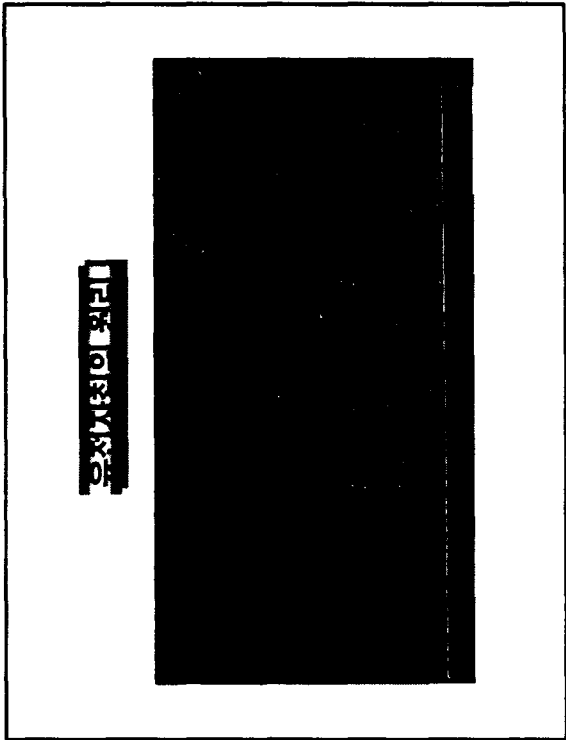


Fig. 3. A. An hybridized microarray printed by the AECOM robot. A 10000 spot array of oligonucleotides has printed and hybridized to Cy3-labeled and Cy5-labeled probes from the same gene. The image was scanned and merged using the AECOM software. B. An image of the same array after a 1000 fold dilution of the probes. C. An image of the same array after a 1000 fold dilution of the probes. D. An image of the same array after a 1000 fold dilution of the probes.





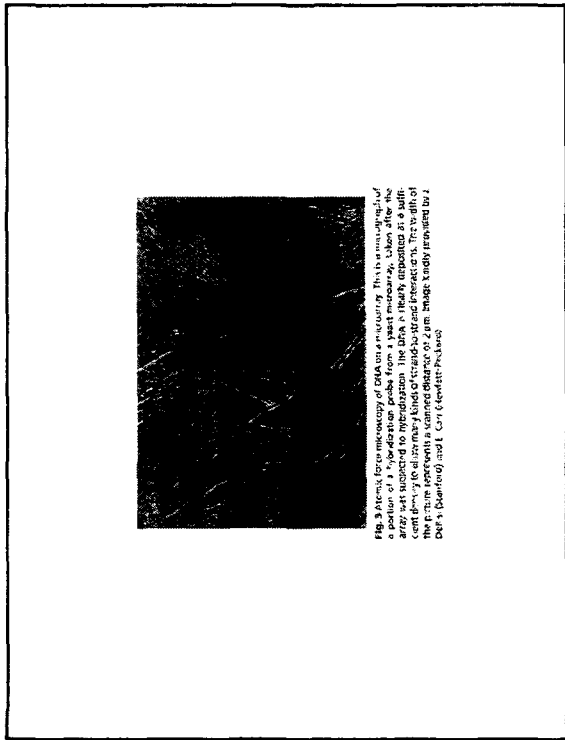


Fig. 3. A typical fluorescence microscopy image of a DNA microarray. The image shows a grid of spots, each representing a different gene or protein. The spots are arranged in a regular pattern, and their fluorescence intensity is measured to determine gene expression levels.

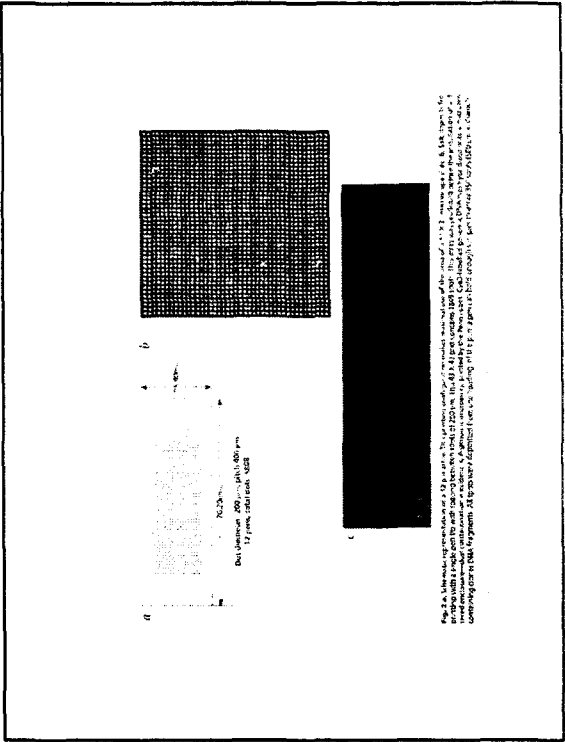


Fig. 4. A typical fluorescence microscopy image of a DNA microarray. The image shows a grid of spots, each representing a different gene or protein. The spots are arranged in a regular pattern, and their fluorescence intensity is measured to determine gene expression levels. A scale bar is provided for reference.

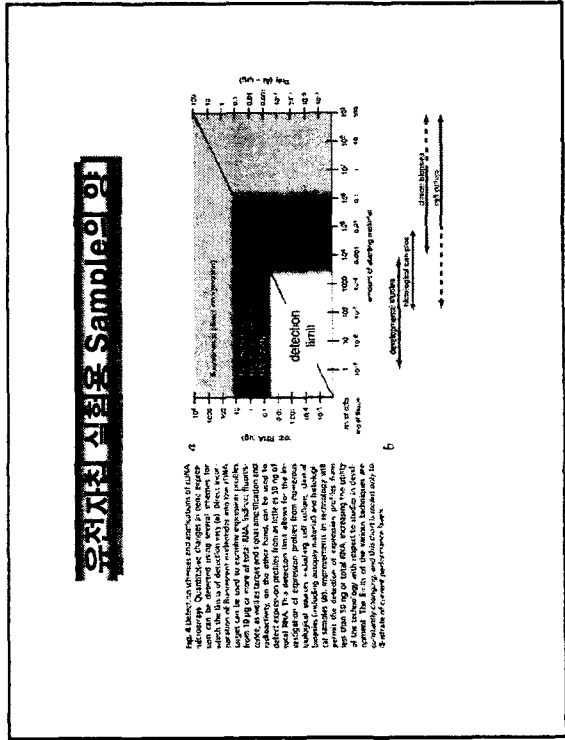
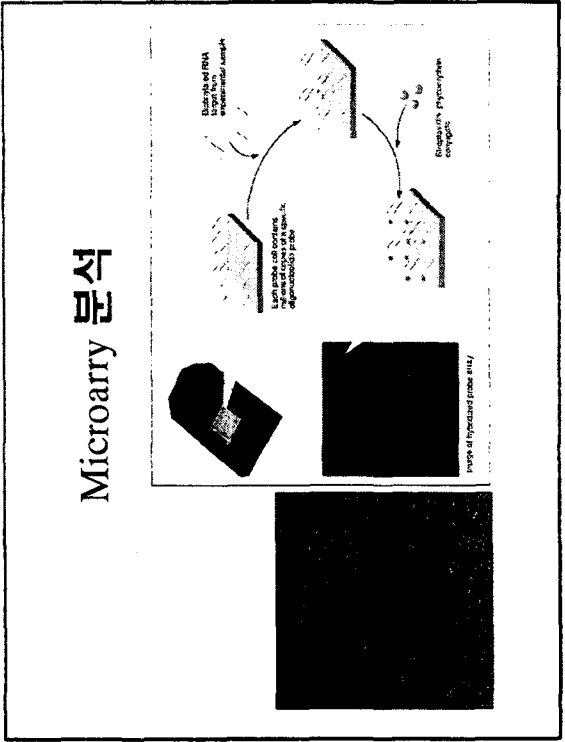
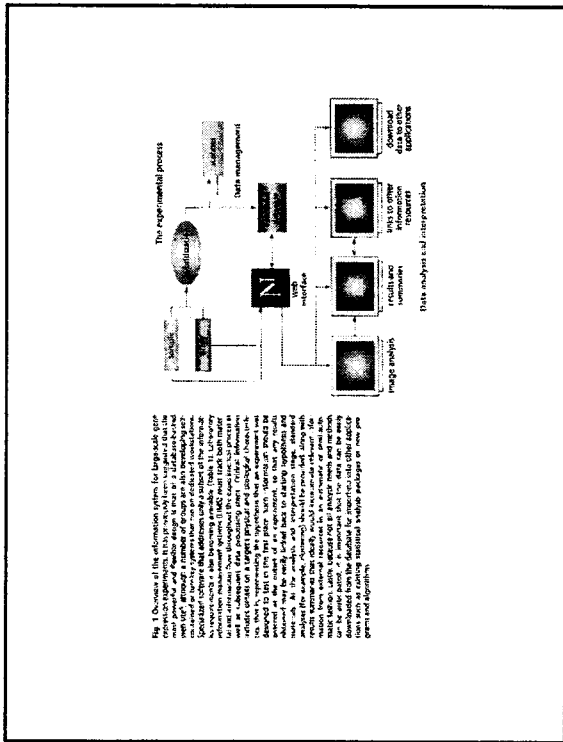
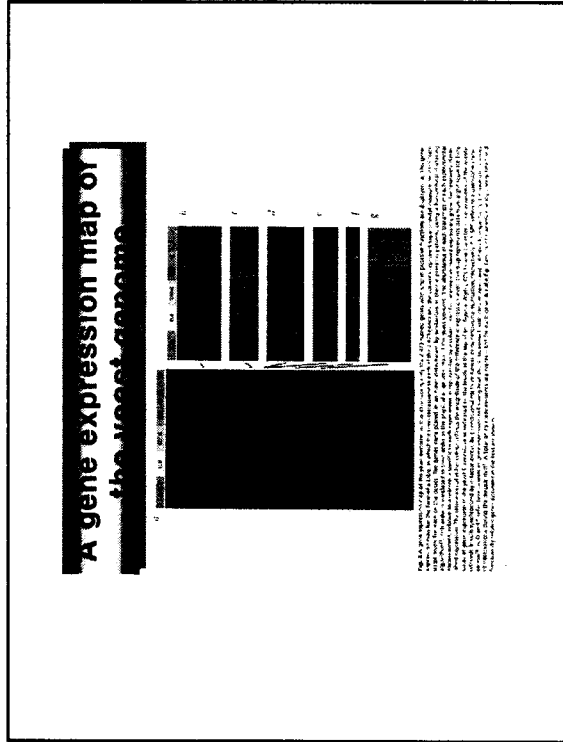
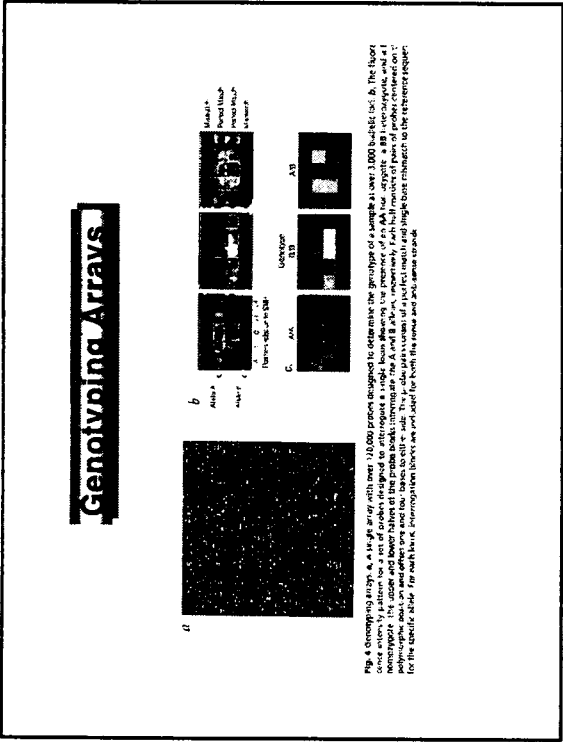
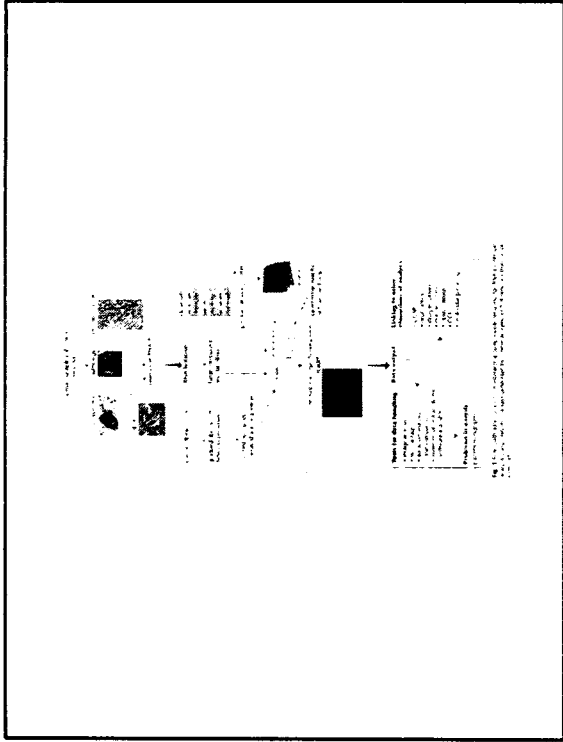


Fig. 4. Relationship between the number of spots and the detection limit. The graph shows that as the number of spots increases, the detection limit also increases. The detection limit is defined as the minimum number of spots required to detect a given gene or protein.



Microarray 분석



The Molecular Biology Database Collection

- ☆ Genomic Database
[MITOMAP](http://www.gen.umcnj.edu/mitomap.html)
<http://www.gen.umcnj.edu/mitomap.html>
 Human mitochondrial genome
- ☆ Intermolecular Interactions
 DIP
<http://dip.doc.mbi.ucsb.edu/>
 Catalog of protein-protein interactions
- ☆ Metabolic Pathways and Cellular Regulation
 UM-BBD
<http://www.lhmed.umcn.edu/umbbd/>
 Microbial biocatalytic reactions and biodegradation pathways primarily for xenobiotic, Chemical compounds
- ☆ Mutation Databases
 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>
 Catalog of human genetic and genomic disorders
- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology
<http://www.infobiogen.fr/science/chromosome/>
 Chromosomal abnormalities in cancer
- dbSNP
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbSNP>
 Single nucleotide polymorphisms

- ☆ Major sequence Repositories
 GenBank
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Trac/Genbank>
 All known nucleotide and protein sequences, International Nucleotide Sequence Database Collaboration
- ☆ Comparative Genomics
 Clusters of Orthologous Groups (COG)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>
 Phylogenetic classification of proteins from 21 complete genomes
- ☆ Gene Expression
 Gene Expression Database (GXD)
<http://www.informatics.fhcrc.org/gxd/index.html>
 Mouse gene expression and genomics
- Kidney Development Database
<http://www.ana.edu.ac.uk/anatomy/databases/kidbase/kidhome.html>
 Kidney development and gene expression
- ☆ Gene Identification and Structure
 TRRD
<http://www.wggs.himel.nrc.nrc.ca/databases/trrd/>
 Regulatory regions of eukaryotic genes
- ☆ Genetic Maps
 GenAtlas
<http://www.cit2.fr/GENATLAS/>
 Human genes, markers and phenotypes

DNA chip 기술분야

- cDNA chip 활용 가능 분야
 - 인체 유전자 기능 분석 연구
 - 신약용 유전자 재조합 동식물 및 미생물 연구
 - 실험용 동식물 모델 연구
 - 암 및 질병관련 유전자 진단
 - 유전자 지도
 - 임상 병리학
 - 동식물 환경
 - 환경변화에 따른 생태학 연구
 - 식물 안전성 검사
 - 신약 개발
- oligonucleotide chip 활용분야
 - 암관련 유전자 돌연변이 검색진단
 - 유전병관련 유전자 돌연변이 검색진단
 - 약제내성 검색진단
 - DNA 염기서열 분석
 - 유전자 변이 가계도 작성
 - 장기 이식 가능 조직 검사
 - 병원성 미생물 동정
 - 법의학(증거자 확인, 친자 확인 등)
 - DNA 고고학