

어류 rhabdovirus의 신속 진단을 위한 Oligonucleotide chip의 개발

2. Oligonucleotide chip을 위한 기반 조건 구축

김영주 · 강지희 · 임재성* · 김상봉* · 이명숙
부경대학교 미생물학과, *부경대학교 기계공학부

서론

Microarray를 해석하는데 있어서 방해가 되는 요인에는 여러 가지가 있을 수 있다. 예를 들면 probe DNA의 농도, spotting 시의 습도, spot의 크기 및 모양, slide blocking 과정, labeling technique, hybridization 온도와 시간 그리고 background signal 등이 그것이다(Hegde *et al.*, 2000). 본 연구에서는 전보에서 선정된 rhabdovirus의 96개 probe로 실제 oligonucleotide chip을 만들어 spot의 모양이나 크기에 관계되는 spotting 조건을 확립하고, slide blocking과 slide washing에 따른 background signal을 낮추기 위한 과정을 도입하였다. 또한 만들어진 microarray의 형광강도 분석을 통해 hybridization에 관계되는 온도, 시간 그리고 labeled DNA의 양 등 최적의 hybridization 조건을 탐색한 실험결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

전보에서 특이성이 검증된 96개의 probe DNA를 합성하였고(Bioneer Co.), Kim *et al.*(2002)에 의해 제작된 microarray를 이용하여 oligonucleotide chip을 제작하였다. 이 oligonucleotide chip에 결합하게 될 target DNA는 EPC cell line에 접종한 rhabdovirus strain의 total RNA를 분리한 다음 RT-PCR을 실시하였다. 이때 Cy3, Cy5를 첨가하여 형광물질이 표지된 cDNA를 제작하였고, 이 cDNA 30 μ l를 oligonucleotide chip에 얹고 chamber에 넣어 적정한 온도에서 hybridization 시켰다. 일정한 시간 동안 반응시킨 microarray를 washing solution으로 씻고, 건조한 후 스캐닝을 하였다. 이 때 hybridization을 위한 온도와 시간 그리고 blocking 조건 등에 변화를 주면서 최적의 hybridization 조건을 검토하였다.

결과 및 요약

Microarray는 한 slide glass에 96개의 spot이 배열되었으며, 이를 가지고 실험하였다. 비특이적인 형광강도를 낮추기 위한 slide blocking은 실시하지 않았을 때보다 하였을 때 비특이적 형광강도가 낮았다. Hybridization 온도는 37°C와 42°C에서 반응한 결과, 42°C일 때 형광강도가 더 정확하였다. Hybridization 최적 시간을 조사해 본 결과, 9~12시간일 경우 가장 signal이 정확하였으며, 6시간일 경우 형광강도가 정확하지 않았고, 15시간 이상 반응하였을 때는 target DNA의 건조를 초래하여 강도를 정확하게 볼 수 없었다. 즉, slide blocking을 실시하고, 42°C에서 12시간 동안 hybridization 하였을 때 가장 형광 강도가 정확하였다.



Fig. 1. Microarray hybridization of in vitro transcribed RNAs to oligonucleotide chip.

참고문헌

- Hegde, P., R. Qi, K. Abernathy, C. Gay, S. Dharap, J. E. Gaspard, E. Snesrud, N. LEE and J. Quackenbush. 2000. A Coucise Guide to cDNA Microarray. *BioTechniques* 29: 548-562.
- Kim S. B., N. S. Jeong, S. Y. Kim and M. S. Lee. 2002. Development of Microarrayer for DNA Chips. *J. Fish. Sci. Tech.* 5(1): 36-42.