

DNA Chip using Single Stranded Large Circular DNA: Low Background and Stronger Signal Intensity

Jong-Gu Park^{1,2†}

¹Department of Medical Genetic Engineering, Keimyung University School of Medicine
Dongsan Medical Center, 194 Dongsandong, Joonggu, Daegu, 700-712, Korea

²WelGENE Inc., 71B-4L, Hightech Sector 2, Sungseo Industrial Park 3,
Dalseogu, Daegu, 704-230, Korea

Massive identification of differentially expressed patterns has been used as a tool to detect genes that are involved in disease related process. We employed circular single stranded sense molecules as probe DNA for a DNA chip. The circular single stranded DNAs derived from 1,152 unigene cDNA clones were purified in a high throughput mode from the culture supernatant of bacterial transformants containing recombinant phagemids and arrayed onto silanized slide glasses. The DNA chip was examined for its utility in detection of differential expression profile by using cDNA hybridization. Hybridization of the single stranded probe DNA were performed with Cy3- or Cy5-labeled target cDNA preparations at 60°C. Dot scanning performed with the hybridized slide showed 29 up-regulated and 6 down-regulated genes in a cancerous liver tissue when compared to those of adjacent noncancerous liver tissue. These results indicate that the circular single stranded sense molecules can be employed as probe DNA of arrays in order to obtain a precious panel of differentially expressed genes.

Key Words: DNA chip, Large circular (LC-) sense molecule, Probe DNA, Differential gene expression, Recombinant phagemids

서 론

세포의 생리학적 또는 병리학적 기능 변화는 유전자 발현 양상의 변이와 연관성을 갖는다. 예를 들면, 악성 종양은 암화 유전자 (oncogene)의 과발현과 암 억제 유전자 (tumor suppressor gene)의 발현 감소로 인하여 발달할 수 있다. 따라서, 유전자 발현 변이의 확인은 질병 관련 유전자를 탐색하기 위한 하나의 도구로서 활용되어 왔다. 기존에는 차별적으로 발현하는 유전자들을 탐색하기 위하여 northern blot analysis¹, S1 nuclease protection analysis², differential display^{3,4}, cDNA library sequencing^{5,6}, SAGE (serial analysis of gene expression)^{7,8}, RDA (representational difference analysis)^{9,10} 등을 이용하였다. 그러나, 이러한 방법들은 한 번의 실험으로 얻을 수 있는 데이터의 양에 한계가 있고, 결과 획득까지 많은

시간을 요구한다.

최근 30억 개의 염기서열을 분석한 인간 지놈 프로젝트가 완료된 후, 유전자의 기능을 대규모로 해석하기 위한 대표적인 기술로서 DNA 칩 (DNA chip)이 대두되고 있다. 또한, 지금까지 밝혀진 암이나 기타 질병과 관련된 수백 개의 유전자 돌연변이도 계속 증가되고 있는 추세이기 때문에, DNA 칩의 중요성은 더욱 커지고 있는 실정이다. 급속히 발달한 DNA 칩 기술은 수많은 세포 전사체들의 발현 변이를 일시에 관찰할 수 있도록 해 주었다¹¹⁻¹³. 기존의 DNA 칩은 기관 상에 고정화되는 탐침 DNA (probe DNA)의 종류에 따라 cDNA 칩과 올리고 칩 (oligo chip)의 두 가지 형태로 나뉘어진다. 올리고 칩은 20 내지 25 mer의 올리고뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 (peptide nucleic acid; PNA)을 염기 하나씩 합성하여 기관 상에 고정화시킨 것으로서, 질병의 진단 혹은 SNP의 연구 등에 많이 응용되고 있다. 이 경우, 미리 알고 있는 DNA 염기서열을 합성하여 일일이 붙이게 되므로, 고밀도로 집적할 수 있고, 분석이 정확한 편이다. 그러나, 유전자 별로 번거로운 목표부위 검색 (target site search) 과정을 거쳐야 하며, 단일 탐침 DNA로 얻어진 결과의 신뢰성 부족으로 동일 유전자에 대하여 복수의 것을 사용해야 하므로 합성시

*논문 접수: 2004년 4월 8일

수정재접수: 2004년 5월 11일

†별책 요청 저자: 박종구, (우) 700-712 대구광역시 중구 동산동 194, 동산의료원 내 계명대학교 의과대학 의학유전공학교실
Tel: 053-250-7854, Fax: 053-250-7854
e-mail: jonggu@kmu.ac.kr

간과 비용이 많이 드는 단점을 가진다. 한편, cDNA 칩은 500 내지 5,000 bp 크기의 증폭된 cDNA를 poly L-lysine, amine 또는 aldehyde를 코팅한 기관 위에 고정화한 것으로서, 주로 유전자 발현의 차별성 (differential gene expression)을 연구하기 위해 이용된다. 유전자 발현을 정확하게 조사하기 위해서는 탐침 DNA의 양이 target cDNA 보다 약 10배 이상 유지되어야 하므로, cDNA를 PCR법으로 증폭하여 조제하여야 한다. 따라서, 플라스미드 정제, PCR 수행, PCR 산물의 정제, 취합 및 변성 (denaturation) 등 고비용과 결과의 왜곡을 수반하는 번거로운 과정들을 거쳐야 한다. 또한, 탐침 DNA로서 소량 생산만 가능하므로 생산된 DNA의 개별적 정량에 따른 균일한 양의 사용이 어렵다.

M13 박테리오페이지 등은 단가닥 (single stranded)의 환형 분자를 지놈으로 가지므로, 지금까지 돌연변이 연구 및 DNA 염기서열 분석 등에 주로 활용되어 왔다. 재조합 페이지미드 (recombinant phagemid)를 숙주세포에 형질전환한 후 헬퍼 박테리오페이지 (helper bacteriophage)를 superinfection하면, 배양 상층액에 존재하는 재조합 박테리오페이지로부터 단가닥 형태의 large circular (LC-) sense DNA를 정제할 수 있다. 이때, M13 페이지미드는 LC-DNA가 특정 유전자의 sense 서열을 함유할 수 있게 재조합될 수 있다. 이러한 LC-sense DNA는 단가닥이고 길이가 긴 분자 구조상 target cDNA와의 높은 결합 가능성 (higher binding probability), 변성과정의 생략으로 기관위에서의 안정성 증가가 기대된다. 더불어 높은 서열 충실도 (high sequence fidelity), 번거로운 목표부위 검색의 불필요성 등 DNA 칩 용 탐침 DNA로서 다양한 장점들을 가질 수 있다. 또한 조제를 위해 대장균 숙주세포의 배양을 이용하므로, 저비용으로 대량 생산할 수 있다.

본 연구에서는 상기의 장점들을 가지는 LC-sense DNA가 칩 제작용 탐침 DNA로서 유용성을 가지는지를 검증하기 위하여, 1,152개 유니진 cDNA 유래의 LC-sense DNA로 칩을 제작한 후 간암 조직에서 그 발현이 상향 또는 하향조절되는 유전자를 검색하였다. 또한 LC-sense DNA의 감도 (sensitivity)를 기존의 증폭된 cDNA를 탐침 DNA로 사용하였을 경우와 비교해 보았다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

WI38VA13 (lung normal cell line)과 A549 (lung cancer cell line) 세포를 한국세포주은행으로부터 분양 받았다. 세포주들을 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 함유한 RPMI 1640 또는 DMEM 배지 (JBI, Korea)로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 각각 배양하였다.

2. LC-sense DNA의 소량 정제

확보한 human unigene clone set (Incyte, USA) 중 1,152개의 클론을 발체하여 재조합 페이지미드를 정제한 후 대장균 (*E. coli*) XL-10 GOLD (Stratagene, USA)에 형질전환하였다. 이때, 헬퍼 페이지 M13K07 (NEB nucleic acid, USA)을 미리 감염해 놓은 숙주 대장균을 사용하였다¹⁴). 다음날, 96-웰 플레이트에 암피실린 (최종농도 50 µg/ml)과 테트라사이클린 (최종농도 70 µg/ml)이 함유된 2× YT 액체배지 (tryptone 16 g, yeast extract 10 g, NaCl 10 g/1000 ml)를 웰당 1.4 ml씩 분주한 후 transformant들을 접종하여, 37°C에서 250 rpm 조건으로 16시간 동안 진탕 배양하였다. 충분한 양의 large circular (LC-) sense DNA를 얻기 위해, 배양은 3배수로 한 후 모아서 사용하였다. 배양 상등액 3 ml를 PEG/NaCl (20% PEG 8000, 2.5 M NaCl) 용액과 혼합한 다음, DNA 정제 키트 (QIAprep 96 M13 Kit, QIAGEN, German)를 사용하여 LC-sense 분자들을 정제하였다. 조제한 LC-sense DNA들을 ethanol 침전법으로 농축하였다. 최종농도는 0.35 µg/µl로 조정하면서, 10 µl의 3× SSC (standard saline citrate) 용액으로 용해하였다. 농축한 LC-sense DNA들의 양 및 순도를 1% 아가로스 겔 전기영동 및 OD_{260/280nm} 측정법을 통하여 확인하였다.

3. LC-sense 칩 제작

OmniGrid Microarrayer (Gene Machines, USA) 또는 Affymetrix 417 Arrayer (Takara Shuzo, Japan)를 이용하여 LC-sense DNA들을 amino-silane 또는 poly-L-lysine이 코팅된 슬라이드 글래스 (Corning, USA)의 표면에 점적하였다. 제작한 칩을 cross-linker (Stratagene, USA)를 사용하여 300 mJ의 단파장으로 조사한 후, 사용하기 전까지 desiccator에 보관하였다.

4. Tm_{1/2} 값 측정

LC-sense DNA의 Tm_{1/2} (melting temperature) 값을 측정하기 위해, CD44 antigen 유전자의 서열을 포함하는 LC-sense DNA 및 재조합 페이지미드를 용액 (100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM sodium PIPES) 속에서 열변성하였다. 각 DNA를 95°C까지 가열한 후 상온까지 서냉하였다. 온도 가열은 0.5°C/3분의 속도로 하였고, Tm_{1/2} 값의 측정은 peltier temperature controller가 부착된 diode array spectrophotometer (Hewlett Packard, USA)로 하였다.

5. RNA 조제

간암 및 정상 간 조직을 PBS (phosphate-buffered saline) 용액으로 세척한 후 잘게 절개하고 적정량의 트리졸 시약 (TRIzol Reagent, GibcoBRL, USA)에 넣어 10분 동안 균질화 (homogenization)하였다. 이러한 조직 및 배양세포로부터 제

조사의 지침에 따라 total RNA를 분리하였다. Poly(A) Quick mRNA Isolation Kit (Stratagene, USA)를 사용하여 poly(A)⁺ mRNA를 정제한 후 target cDNA의 표식을 위한 주형으로 사용하였다.

6. Target cDNA 조제 및 hybridization

Target cDNA 조제 및 hybridization 실험은 Patrick O' Brown 박사 연구실의 protocol (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown>)에 따라 하였다. 정제한 2 µg의 poly(A)⁺ mRNA를 각각 Cy3-dUTP 또는 Cy5-dUTP의 존재하에서 oligo-dT primer (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTVN-3')로 역전사하였다. 표식한 cDNA를 칼럼 (microcon-30 column)으로 정제한 후 80 µl의 hybridization 용액 (3× SSC, 0.3% SDS)으로 재용해하였다. 표식한 target cDNA를 100°C에서 2분간 열변성하여 DNA 칩에 올려 놓은 후 60°C 또는 65°C 조건의 습윤기 (humidified chamber) 내에서 16시간 동안 hybridization하였다. 그 다음, LC-sense 칩을 2× SSC 용액으로 2분, 0.1× SSC, 0.1% SDS 용액으로 5분, 0.1× SSC 용액으로 5분간 각 1회씩 세정하여 건조한 후 스캐닝에 사용하였다.

7. 데이터 수집 및 분석

칩에 결합된 형광 강도를 GenePix 4000B scanner (Axon instruments, USA) 또는 Affymetrix 428 Array Scanner (Takara Shuzo, Japan)로 측정하였고, 수집한 이미지들을 software로 분석하였다. 시그널 강도 (signal intensity value)는 각 spot의 강도 중간값 (median intensity value)에서 배경 중간값 (median background value)을 제하여 결정하였다. 발현 수치 (ex-

pression value)는 하나의 multiplicative normalization factor로 정상화하였고, 이를 모든 Cy5/Cy3 비율에 적용하였기에 median normalized Cy5/Cy3 값은 1.0이 되었다.

8. LC-sense DNA의 대량 정제

확보한 human unigene clone set (Resgene Genetics, USA) 중 204개의 클론을 발취하였다. 헬퍼 페이지 M13K07을 미리 감염해 놓은 숙주 대장균에 재조합 페이지미드를 형질전환한 후, 암피실린 (최종농도 50 µg/ml)을 함유한 고체배지로 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 다음날, 형성된 single colony를 100 ml의 LB 액체배지 (50 µg/ml 암피실린, 70 µg/ml 카나마이신 함유)에 접종하고, 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 배양액을 6,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 얻어진 약 100 ml의 배양 상청액에 20 ml의 PEG/NaCl (20% PEG 8000, 2.5 M NaCl)을 첨가하고 상온에서 10분간 배양하였다. 이후 자체적으로 개발한 반자동 정제 장치를 사용하여 LC-sense DNA를 대량 정제하였다. 정제한 LC-sense DNA들을 ethanol 침전으로 농축한 후 양 및 순도를 확인하기 위해 1% 아가로스 겔 전기영동 및 OD_{260/280nm} 측정법을 수행하였다.

결 과

1. 재조합 박테리오페이지 시스템을 이용한 LC-sense DNA의 소량 조제 및 LC-sense 칩 제작

M13 페이지미드는 F1 복제개시점 (replication origin)을 가져, 이를 헬퍼 페이지와 동시에 대장균 숙주세포에 감염하여

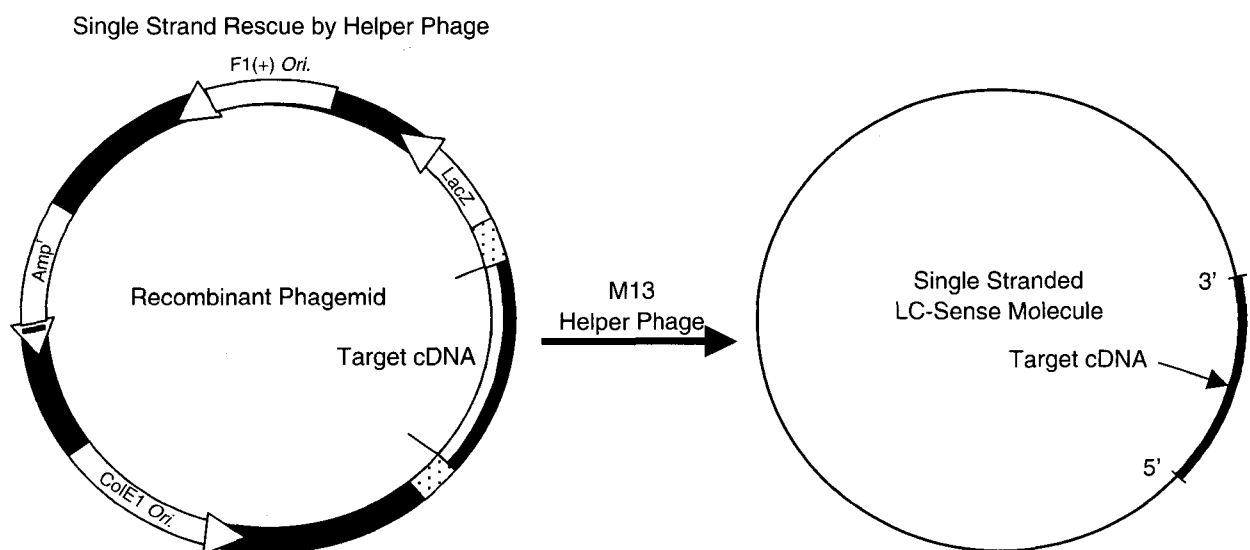


Fig. 1. A schematic diagram for production of single stranded LC-sense DNA. A cDNA of target gene is cloned into the multiple cloning site of a M13 phagemid vector. This construct allows the rescue of a single stranded LC-sense DNA of the target gene when superinfected with a M13 helper phage, M13K07.

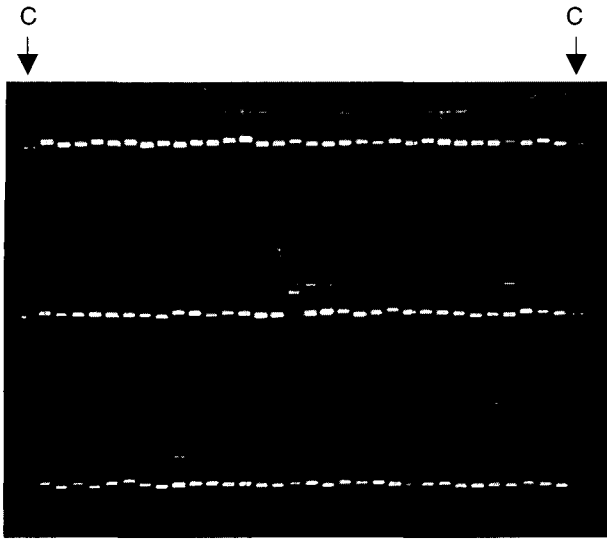


Fig. 2. High-throughput production of LC-sense DNA in a small quantity. 1,152 transformants with recombinant phagemids were incubated and infected with M13 helper bacteriophages in a 96-well format for large-scale production of LC-sense molecules in a small quantity. After purification, LC-sense molecules were run on a 1% agarose gel to test their quantity and quality. C; control LC-sense DNA without insert sequence.

배양하면, 배양 상청액에 존재하는 M13 박테리오파지로부터 LC-sense DNA를 정제할 수 있다 (Fig. 1). LC-sense 분자의 경우, 단가닥 구조를 형성하므로 상보적 핵산체에 높은 결합 친화력을 가지며, 대장균 숙주세포의 배양을 통해 저비용으로 생산될 수 있다. 이러한 측면들은 LC-sense 분자를 DNA 칩 제작용 probe DNA로 이용함에 있어 장점으로 작용할 수 있을 것으로 기대하였다. 그 유용성을 검증하기 위하여 먼저, F1(+) origin을 가지는 M13 페이지미드 벡터에 인간 cDNA가 cloning되어 있는 1,152개의 unigene clone들을 선별한 후 LC-sense DNA를 조제하였다. 이를 위하여, 재조합 페이지미드를 헬퍼 페이지가 미리 감염된 대장균 숙주세포에 형질전환하였다. 획득한 transformant들을 96-웰 플레이트의 각 웰에 분주해 놓은 액체배지에 접종한 후 종양 배양하였다. 배양 상청액으로부터 LC-sense DNA를 96개 단위로 정제한 후 칩 제작을 위해 최종농도가 0.35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 가 되도록 조정하였다. 농축한 LC-sense DNA들을 아가로스 겔 전기영동을 통하여 확인하였다 (Fig. 2). Microarrayer를 사용하여 1,152 종류의 LC-sense DNA들을 silane을 코팅한 glass slide의 표면에 점적 (spotting)함으로써 LC-sense 칩을 제작하였다.

2. $T_{m1/2}$ 값 측정에 의한 LC-sense DNA의 단가닥 구조 확인

LC-sense DNA의 적정 혼성화 온도 (optimal hybridization temperature)를 예측하기 위하여 $T_{m1/2}$ 값을 측정하였다. 이

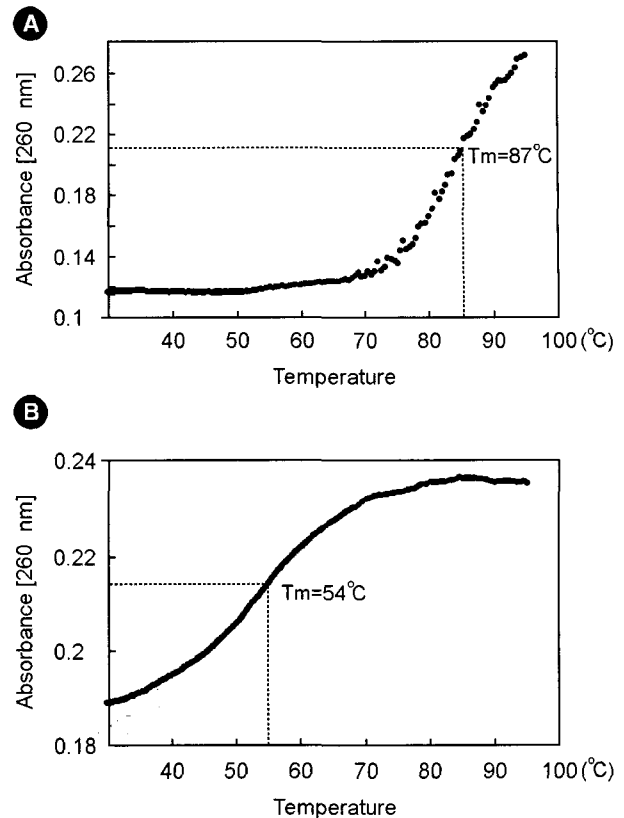


Fig. 3. Melting temperature profiles for double stranded phagemid molecules and LC-sense molecule. Absorbance was monitored at every 0.5°C increment in a 3 min interval while temperature was raised from 30°C to 95°C. A. $T_{m1/2}$ profile of double stranded phagemid containing the CD44 antigen insert. B. $T_{m1/2}$ profile of LC-sense molecule, containing the CD44 antigen sense insert sequence.

를 위하여 CD44 antigen 유전자 서열을 함유하는 LC-sense DNA 및 대조군으로서 상보적 이중나선 구조를 가지는 재조합 페이지미드를 이용하였다. 서서히 온도를 올리면서 260 nm에서의 흡광도를 측정된 결과, 이중나선 형태의 재조합 페이지미드의 경우 87°C 부근에서 변성에 의해 흡광도 변화 (chromatic change)를 나타내었고 (Fig. 3A), LC-sense DNA는 54°C 부근에서부터 완만한 경사를 나타내는 흡광도 변화를 보였다 (Fig. 3B). 이러한 $T_{m1/2}$ 값의 감소는 LC-sense DNA가 단지 짧은 영역에서 분자내 두가닥 (intramolecular duplex)을 형성하는 단가닥의 환형 분자임을 나타낸다. 본 결과를 기초로, 제작한 LC-sense DNA가 단가닥의 phage genomic DNA임을 확인하였으며 나아가 적정 혼성화 온도범위의 설정에 지침이 되었다.

3. LC-sense 칩을 이용한 간암 조직에서의 차별적 유전자 발현 프로파일 조사

DNA 칩 실험에 있어, 정제한 RNA의 순도는 우수한 결

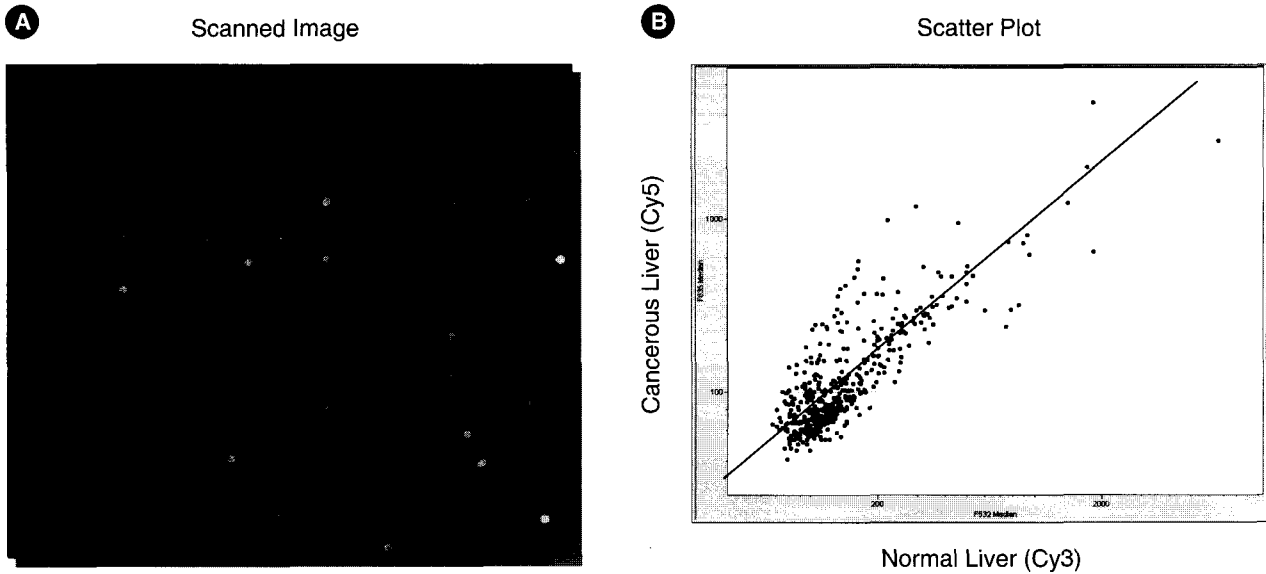


Fig. 4. Differential gene expression profile between a pair of liver cancer and normal tissue. Cy3-dUTP or Cy5-dUTP-labeled target cDNAs were mixed together and hybridized to a LC-sense chip. After hybridization, the chip was washed, scanned by scanner, and analyzed by software. The data were then scatter-plotted. **A:** Scanned image of the LC-sense chip. PMT value for Cy3 and Cy5 was 450 and 500, respectively. **B:** Scatter-plot for expression profile. Expression profile is shown as bivariate scatter plot from a LC-sense array tested. Each spot was scatter-plotted after log₂ transformation according to their intensities.

과의 획득여부를 결정할 수 있는 중요한 요소이다. 따라서, LC-sense 칩을 이용하여 차별적 유전자 발현 프로파일 (differential gene expression profile)을 얻기에 앞서, 조제한 간 정상 및 간암 조직 유래 poly(A)⁺ mRNA의 순도를 먼저 확인하였다. 이를 위하여, 상용 cDNA chip (Genomic Tree Inc., Korea)을 사용하였다. 간 정상 및 간암 조직으로부터 조제한 poly(A)⁺ mRNA로부터 Cy3-dUTP 또는 Cy5-dUTP 표식 cDNA를 각각 합성하여 혼합한 후, 65°C에서 cDNA 칩과 hybridization하였다 (결과 미제시). 본 실험을 통하여 깨끗한 스캐닝 이미지를 얻을 수 있었기에, 조제한 RNA의 순도에는 문제가 없음을 확인할 수 있었다. 다음으로, 제작한 LC-sense 칩을 사용하여 간 정상조직에 비해 간암 조직에서 차별적 발현을 나타내는 유전자 프로파일을 조사하였다. 간 정상 및 간암 조직 유래 poly(A)⁺ mRNA로부터 target cDNA를 조제한 후 LC-sense DNA 칩과 60°C 조건에서 hybridization 하였다. 그 다음 LC-sense DNA 칩을 스캐닝한 후 소프트웨어로 분석하였고 (Fig. 4A), 획득한 데이터는 log₂ 변형 (transformation) 후 스캐터 플롯 (scatter-plot)을 하였다 (Fig. 4B). 중간값 총계가 200 이하인 유전자들은 후속 데이터 프로세싱에서 제외하였다. 그 결과, 1,152개의 유전자 중 29개 (약 2.5%)가 간암 조직에서 상향조절 (up-regulation)되고 있음을 알 수 있었다 (Table 1). 이 중, CD44 antigen¹⁵⁾, IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2¹⁶⁾, Multiple endocrine neoplasia I¹⁷⁾ 등은 이미 간암 관련 유전자로 보고된 바 있다. 이와 반대로 간암 조직에서 하향조절 (down-regulation)되는 6개 (약

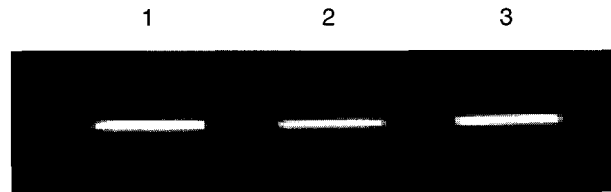


Fig. 5. An example of production of a LC-sense molecule in a large quantity. A transformant with a recombinant phagemid was seeded in 100 ml of 2× LB liquid media and then cultured for 14 h at 37°C with constant agitation. The LC-sense molecule was obtained from 100 ml of the culture supernatant containing recombinant bacteriophages using a specially designed semi-automatic purification instrument. After preparation, LC-sense molecules were run on a 1% agarose gel and photographed under UV light for their quantitation and quantification. Lane 1, LC-sense molecule produced in a large quantity (40 ng), lane 2, LC-sense molecule produced in a large quantity (30 ng), and lane 3, LC-sense molecule produced in a small quantity (32 ng).

0.5%)의 유전자 또한 탐색할 수 있었으며 (Table 2), 이들 중 Fibrinogen-like 1 유전자는 ATL (adult T cell leukemia) 세포에서 하향조절되는 것으로 보고되었다¹⁸⁾. 이러한 결과들은 LC-sense 분자가 대규모 유전자의 차별적 발현 프로파일을 얻기 위한 칩 제작용 probe DNA로서 유용성을 가짐을 증명해 주었다.

4. LC-sense DNA의 대량 정제

DNA 칩을 양산하기 위해서는 탐침 DNA의 대규모 대량 정제 공법이 수립되어야 한다. 이를 위하여 반자동 정제 장

Table 1. 간암 조직에서 상향조절 (2배 이상)된 유전자 목록

Gene Name	Accession No.	Ratio of Median
CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	X66733	6.3
Cytochrome P450, subfamily IIE (ethanol-inducible)	J02843	6.1
Transcription elongation factor A (SII), 1		5.8
IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	J04208	5.5
ESTs, Weakly similar to KIAA0206 [H.sapiens]	AI193075	5.6
Human skeletal muscle 1.3 kb mRNA for tropomyosin	AI797037	4.8
KIAA0701 protein	AI797037	4.8
mRNA for transcription elongation factor S-II, hS-II-T1	NM_003195	5.2
Deafness, autosomal dominant 5	AF073308	5.1
KIAA1037 protein	AI383628	4.8
KIAA0375 gene product	U0002373	4.5
Prefoldin 5	AA287397	4.2
KIAA0710 gene product	AB014610	4.1
Paired-like homeodomain transcription factor 1	U70370	4.3
Retinal outer segment membrane protein 1	U007894	4.4
ESTs	Z39419	3.8
MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor)	M94046	3.6
Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	AJ000519	4.1
Novel human gene mapping to chromosome 1	AL040438	3.9
Homo sapiens clone 24421 mRNA sequence	AF070641	3.9
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp566J2146	AL050081	3.5
Chromosome condensation 1-like	NM_001268	3.5
KIAA0902 protein	AB020709	2.9
Multiple endocrine neoplasia I	Y12338	2.7
Protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein)	AI188660	2.6
ESTs, Weakly similar to ORF YOR150w [<i>S. cerevisiae</i>]	AI129433	2.4
Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2	AW327285	2.4
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	AI026833	2.4
Cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 9	AA665998	2.1

치를 자체적으로 개발한 후, LC-sense DNA의 대량 정제를 시도하였다. 본 장치는 크게 96개-정제 칼럼, 최대 30 ml 또는 100 ml 용량의 분주기, vacuum manifold 부분으로 고안하였다. 재조합 페이지미드를 숙주 대장균에 형질전환한 후, 형성된 single colony를 100 ml의 LB 액체배지에서 배양하였다. 정제 장치를 사용하여 배양 상청액으로부터 LC-sense DNA를 대량 정제한 후 1% 아가로스 겔 전기영동 및 OD 값 측정을 통하여 양 및 순도를 확인하였다 (Fig. 5). 그 결과 100 ml의 배양 상청액으로부터 200 µg의 LC-sense DNA

를 얻을 수 있었다.

5. LC-sense DNA와 증폭된 cDNA의 감도 비교

DNA 칩 제작용 탐침 DNA로서 LC-sense 분자는 단가닥 환형 구조를 가지므로, 두 가닥의 cDNA보다 높은 반응 감도를 가질 것으로 예상하였다. 이를 확인하기 위하여, 동일한 204개의 유전자들에 대한 LC-sense DNA 및 cDNA가 동일한 실험조건에서 나타내는 시그널 강도 (signal intensity)를 비교해 보았다. 먼저, 상기의 과정과 같이 배양 상청액으로

Table 2. 간암 조직에서 하향조절 (2배 이상)된 유전자 목록

Gene Name	Accession No.	Ratio of Median
Transmembrane protease, serine 2	U75329	0.48
Fibrinogen-like 1	N92944	0.42
Human gene isolated from PAC 272L16, chromosome 1	AL023754	0.35
CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	AA811130	0.35
Ariadne hom	AL040708	0.35
NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein	AW250734	0.29

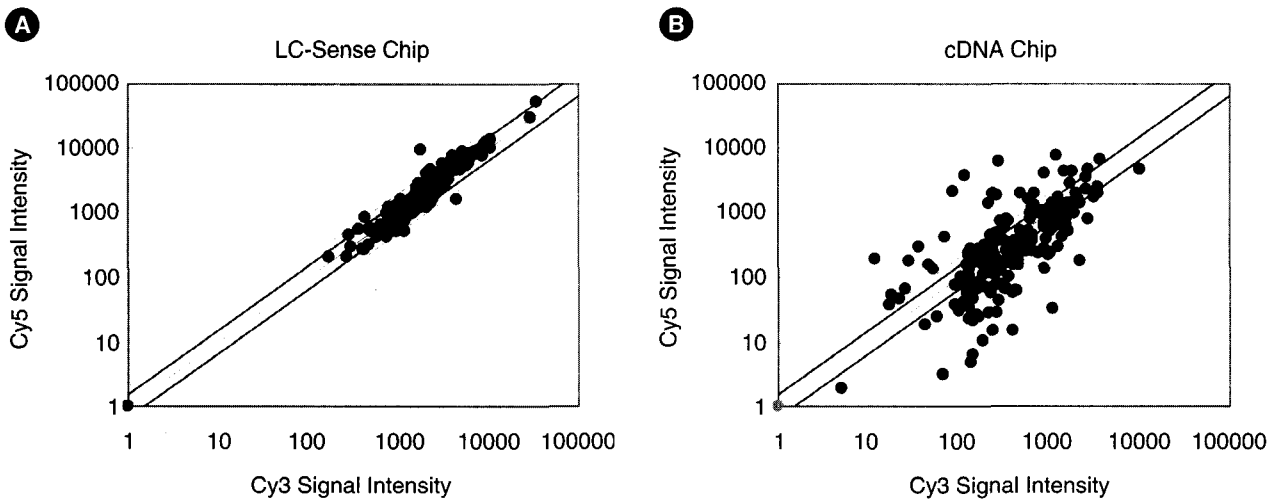


Fig. 6. Comparison of signal intensities of LC-sense DNA with amplified cDNA products. Cy3-dUTP or Cy5-dUTP-labeled target cDNAs were mixed together and hybridized to a LC-sense chip (A) or a cDNA chip (B). After hybridization, the chips were washed and scanned by scanner and analyzed by software. Each spot was scatter-plotted after log₂ transformation according to their intensities.

부터 LC-sense DNA를 96개 단위로 대량 정제한 후 ethanol 농축을 하였고, 칩 제작을 위해 최종농도가 0.35 µg/µl가 되도록 조정하였다. Microarrayer를 사용하여 204종류의 LC-sense DNA들을 poly-L-lysine을 코팅한 glass slide의 표면에 점적함으로써 LC-sense chip을 제작하고, 동일한 유전자들에 대한 cDNA들이 동일한 농도로 점적되어 있는 Takara Shuzo사의 상용 cDNA 칩 (IntelliGene Human Cancer Chip Version 4.0, 890종 유전자)을 준비하였다. WI38VA13 (폐 정상 세포주) 및 A549 (폐암 세포주) 유래 total RNA로부터 target cDNA를 조제하여 혼합한 후, LC-sense 칩 및 cDNA 칩과 65°C 조건에서 hybridization하였다. 두 종류의 칩을 스캐닝한 후 동일한 204개의 유전자에 대하여 스캐터 플롯 분석을 한 결과, LC-sense DNA들이 cDNA에 비해서 높은 시그널 강도를 가짐을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 이 결과는 단가닥 구조의 LC-sense DNA가 두 가닥의 cDNA 보다 높은 반응 특이성을 가진다는 사실을 암시해 준다.

고찰

DNA 칩 기술을 이용한 유전자 발현 프로파일의 대량 분석은 세포 생리의 체계적 분석을 위한 선도 기술로 대두되었다¹⁹⁾. 본 기술은 현재 유전자 발굴²⁰⁾, 질병 진단²¹⁾, 약제 개발²²⁾, 독성 연구²³⁾ 등의 다양한 목적에 응용되고 있다. 지금까지는 이러한 목적을 위해 일반적으로 올리고뉴클레오티드^{24~26)} 또는 cDNA 라이브러리로부터 증폭한 PCR 산물²⁷⁾을 유리 표면에 점적하여 왔다.

본 연구에서는 LC-sense 분자를 탐침 DNA로 이용하는 새로운 형태의 DNA 칩을 고안하였으며, 유전자의 발현 비교 연구를 위한 동 분자들의 유용성을 검증하였다. 먼저 DNA 염기서열을 알고 있는 1,152개의 유니진 cDNA를 가진 제조합 페이지미드들을, 헬퍼 페이지가 미리 감염된 대장균 숙주 세포에 형질전환하였다. 다음으로 각 클론 유래의 LC-sense DNA들을 96개 단위로 배양 상청액으로부터 소량 정제한 후

그 농도가 0.35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 가 되게 농축하였다. 이 방법으로 칩 제작을 위한 1,152개의 탐침 DNA들을 고속으로 쉽게 얻을 수 있었다. 한편, 탐침 DNA에 대한 어레이 기질 (array substrate)로서는 poly L-lysine이나 amino-silane 등을 사용할 수 있는데, 이러한 기질들을 유리 표면에 코팅하면 핵산체의 고정성을 강화할 수 있다²⁸⁾. 본 연구를 통하여, LC-sense DNA가 상기 2종류의 어레이 기질 모두에 이용될 수 있음을 확인하였다.

$T_{m1/2}$ 값 분석을 통해 LC-sense DNA의 적정 혼성화 온도가 60°C 부근임을 예측할 수 있었다. PCR 산물을 탐침 DNA로 이용하는 cDNA 칩의 hybridization은 전형적으로 65°C 조건에서 수행한다. 이러한 차이점은 LC-sense DNA가 PCR 산물과는 다른 단가닥의 구조를 가진다는 사실을 반증해 준다. 이어서, 간 정상 및 간암 조직으로부터 정제한 poly(A⁺) RNA의 순도를 검정한 후 target cDNA를 조제하였고, 이를 LC-sense 칩과 hybridization하였다. 이때 표식 물질로는 보편적으로 사용되고 있는 Cy3-dNTP와 Cy5-dNTP 형광 염색제를 이용하였다. Hybridization 후 비결합 또는 비특이적 시그널을 제거하기 위해, LC-sense 칩을 반복하여 세정하였다. 소프트웨어에 의한 스캐닝 분석 결과 1,152개의 유전자 중 29개가 간암 조직에서 상향조절되고, 6개가 하향조절되고 있음을 알 수 있었다. 각 유전자 산물의 기능을 기준으로 분석한 결과, 상향조절되는 29개의 유전자 중 12개는 새로운 기능 (novel function)을 가지는 것이었다. 기존의 연구결과를 바탕으로 기능이 알려진 17개의 유전자들을 기능 범주 (functional category) 별로 분류한 결과, 4개는 세포신호 전달 (cell signaling)에, 1개는 세포 구조 (cell structure)에, 2개는 대사 (metabolism)에, 6개는 핵내에서의 전사 (transcription)에, 그리고 4개는 상기 4종류의 범주에 들지 않는 기타 기능에 관여하는 것임을 알 수 있었다. 특히, CD44 antigen¹⁵⁾, IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2¹⁶⁾, Multiple endocrine neoplasia 1¹⁷⁾ 등은 이미 간암 관련 유전자로 보고된 바 있다. 하향조절되는 유전자 중 3개는 새로운 기능을 가졌으며, 기능이 알려진 유전자들은 세포 성장, 세포 이동 (cell motility), 그리고 대사에 각각 관여하는 것이었다. 이 중 Fibrinogen-like 1 유전자는 ATL (adult T cell leukemia) 세포에서 하향조절되는 것으로 보고되었다¹⁸⁾.

탐침 DNA로서 올리고뉴클레오티드 또는 PCR 산물을 조제하는 과정을 분석하여 보면 여러 가지 문제점들을 발견할 수 있다. 예를 들면, 수천 또는 수만 개의 수식 올리고 (modified oligonucleotide)를 조제하기 위해서는 사전에 서열 정보를 반드시 알고 있어야 하며, 고가의 생산 비용이 수반되며, 또한 각 유전자마다의 목적부위 설정, 합성, 제염, 칼럼 정제, 농축, 수식 등으로 구성되는 복잡한 단계들을 거쳐 많은 시간 및 비용을 소모하여야 한다. 또한, 한 종류의 올리고

뉴클레오티드로 얻은 연구결과의 낮은 신뢰성을 극복하기 위하여, 동일 유전자에 대해 여러 개의 분자를 고안해야 하는 문제점도 가진다. PCR 산물의 경우도, 플라스미드 정제, Taq 중합 효소 (Taq polymerase)에 의한 증폭 및 PCR 산물의 정제 등 번거로운 과정들을 거쳐야 한다. 이러한 과정들은 고비용을 수반할 뿐만 아니라 소량 제작만이 가능하며, 많은 수의 탐침 DNA를 제작할 경우 균일한 DNA 농도를 확보하기가 어렵다. 또한 이중나선 DNA 구조를 가지므로, hybridization을 위해 변성과정을 거쳐야 하는데, 이 경우 상보적 DNA 가닥의 재결합 (renaturation)으로 인하여 표식된 타겟 cDNA의 결합강도 (sensitivity)가 현저히 저하될 가능성이 높다. 반면에, LC-sense 분자는 칩 제작용 탐침 DNA로서 많은 잇점을 가질 수 있다. 첫째, 대장균과 같은 형질전환체의 배양을 통해 빠른 속도로 대량 생산될 수 있다. 둘째, 페이지미드 벡터는 다양한 크기의 sense insert를 수용할 수 있으므로 LC-sense DNA의 크기는 3,000~8,000 염기에 이른다. 올리고뉴클레오티드에 비해 훨씬 넓은 영역에서 target mRNA와 결합할 수 있으므로 시그널 강도 (signal intensity)를 높일 수 있다. 단, 길이가 길어짐으로써 감도가 증가되는 반면에 SNP 분석으로의 응용은 힘들다는 단점도 가진다. 셋째, LC-sense 분자를 이용할 경우에는 장시간을 요하는 목표부위 설정을 하지 않아도 된다. 올리고뉴클레오티드의 경우처럼 유전자 서열에 대한 사전정보가 필요치 않으므로, 쉽게 제조할 수 있고, 효율적인 결합을 위한 시간과 비용을 대폭 절감할 수 있다. 넷째, LC-sense DNA는 대장균 숙주세포의 합성 교정 능력 (proof reading capability)을 가진 DNA polymerase에 의해 세포내에서 복제되므로, 높은 복제 충실도를 가지게 된다. 다섯번째, LC-sense 분자는 올리고뉴클레오티드와 PCR 산물보다 저비용으로 제조될 수 있다. 마지막으로, LC-sense DNA의 모체는 M13 페이지미드 벡터이므로, 수천 또는 수만개 유전자 유래의 LC-sense DNA library를 신속하게 제작할 수 있다. 즉, 비정상 세포 또는 조직으로부터 특정 질병에 관한 특이적인 cDNA library를 구축한 후 각 클론들에 대한 LC-sense DNA를 대량 생산함으로써, 미지유전자를 포함하여 질병 관련 유전자 군을 효율적으로 탐색할 수 있다. 또한, 유니진 클론들을 이용함으로써 각 질병들에 대한 다양한 발현 양상 (expression profile)을 동시에 얻을 수도 있다.

상기한 바와 같이, LC-sense DNA는 칩 제작을 위한 탐침 DNA로서 다양한 장점들을 가진다. 향후 대규모 유전자들에 대한 대량 정제 시스템을 개발하고, 기존 탐침 DNA와의 정량적 감도 비교 및 결과의 재현성을 추가적으로 확인한다면, 생산가격의 절감과 더불어 LC-sense DNA의 실용적 이용성을 향상시킬 수 있을 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 산업자원부 공통핵심과제지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Alwine JC, Kemp DJ and Stark GR (1977): Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci*, **74**: 5350-5354.
- 2) Berk AJ and Sharp PA (1977): Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell*, **12**: 721-732.
- 3) Liang P and Pardee AB (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**: 967-971.
- 4) Liang P, Averboukh L and Pardee AB (1993): Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res*, **21**: 3269-3275.
- 5) Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B and Moreno RF (1991): Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, **252**: 1651-1656.
- 6) Okubo K, Hori N, Matoba R, Niiyama T and Matsubara K (1991): A novel system for large-scale sequencing of cDNA by PCR amplification. *DNA Se*, **2**: 137-144.
- 7) Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B and Kinzler KW (1995): Serial analysis of gene expression. *Science*, **270**: 484-487.
- 8) Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B and Kinzler KW (1997): Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science*, **276**: 1268-1272.
- 9) Hubank M and Schatz DG (1994): Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*, **22**: 5640-5648.
- 10) Lisitsyn N, Lisitsyn N and Wigler M (1993): Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, **259**: 946-951.
- 11) Schena M, Shalon D, Davis RW and Brown PO (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**: 467-470.
- 12) DeRisi JL, Iyer VR and Brown PO (1997): Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278**: 680-686.
- 13) Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, Boguski Jr MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D and Brown PO (1999): The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*, **283**: 83-87.
- 14) Jupin I and Gronenborn B (1995): Abundant, easy and reproducible production of single stranded DNA from phagemids using helper phage-infected competent cells. *Nucleic Acid Res*, **23**: 535-536.
- 15) Endo K and Terada T (2000): Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival. *J Hepatol*, **32**: 78-84.
- 16) Ikegami T, Natsumeda Y and Weber G (1987): Purification of IMP dehydrogenase from rat hepatoma 3924A. *Life Sci*, **40**: 2277-2282.
- 17) Nakajima K, Sakurai A, Katai M, Yajima H, Mori J, Katakura M, Tsuchiya S and Hashizume K (2000): Chromogranin A expression in hepatocellular carcinoma in a patient with germline MEN1 gene mutation. *Intern Med*, **39**: 20-24.
- 18) Kohno T, Moriuchi R, Katamine S, Yamada Y, Tomonaga M and Matsuyama T (2000): Identification of genes associated with the progression of adult T cell leukemia (ATL). *Jpn J Cancer Res*, **91**: 1103-1110.
- 19) Young RA (2000): Biomedical discovery with DNA arrays. *Cell*, **102**: 9-15.
- 20) Kati PP and Tapio V (2001): Detection of differentially expressed genes in prostate cancer by combining suppression subtractive hybridization and cDNA library array. *J Pathol*, **193**: 73-79.
- 21) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO and Staudt LM (2000): Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, **403**: 503-511.
- 22) Shi LM, Fan Y, Lee JK, Waltham M, Andrews DT, Scherf U, Paull KD and Weinstein JN (2000): Mining and visualizing large anticancer drug discovery databases. *J Chem Inf Comput Sci*, **40**: 367-379.
- 23) Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett JC and Afshari CA

- (1999): Microarrays and toxicology: The advent of toxicogenomics. *Molecular Carcinogenesis*, **24**: 153-159.
- 24) Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, Hubbell E, Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R and Fodor SP (1995): Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques*, **19**: 442-447.
- 25) Lipshutz RJ, Fodor SPA, Gingeras TR and Lockhart DJ (1999): High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*, **21**: 20-24.
- 26) Singh-Gasson S, Green RD, Yue Y, Nelson C, Blattner F, Sussman MR and Cerrina F (1999): Maskless fabrication of light directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat Biotechnol*, **17**: 974-978.
- 27) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P and Trent JM. (1999): Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*, **21**: 10-14.
- 28) Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO and Davis RW (1996): Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci*, **93**: 10614-10619.