



High-Throughput TILLING 방법을 이용한 유전체 point mutation의 대규모적 발견과 분석

이 유(연세대학교 생명과학과)
김수환(연세대학교 생명과학과)

기능적 유전체학 (Functional genomics)이 강조되는 현대 생물학에서는 각 유전자의 기능과 그들의 연관성을 이해하기 위해 대규모로 많은 수의 유전자의 기능을 알아낼 수 있는 기술이 지속적으로 개발되어 왔고 현재까지는 유전자의 knock-out 또는 reverse genetics를 통해 그 목적을 이루어왔다. 식물종인 애기장대 (Arabidopsis)의 경우는 transposon jumping gene이나 T-DNA 삽입에 의해 유도되는 돌연변이 방법을 이용하여 high-throughput 유전자 분석과 상응 돌연변이체의 분석을 해왔는데 이러한 기능유전체학적 도구들은 식물유전자 기능분석에 많은 기여를 하여왔다. 하지만 이와 같은 DNA에 의한 삽입에 의한 돌연변이 유도기술은 문제점도

많았는데 예를 들면 거대 DNA 조각인 T-DNA나 transposon은 크기가 작은 유전자에 삽입될 확률이 적으며, 만약 이 T-DNA가 아주 중요한 유전자에 삽입되게 되면 식물의 치사를 유발하는 등의 문제점이 바로 그것이다. 따라서 가능한 많은 유전자의 기능을 알기 위해서는 약한 (less severe) 돌연변이의 생산이나 표현형의 정도를 달리하는 돌연변이를 일으킨 대립유전자들의 시리즈 (allelic series)를 만드는 방법의 개발이 중요하게 되었는데 여기서 소개되는 TILLING은 이 목적을 충족시키는데 이상적인 방법이라 할 수 있다. TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomics)은 reverse genetics 방법들 중의 하나로 DNA의 염기를 무작위적인 화학적 돌연변이법 (random

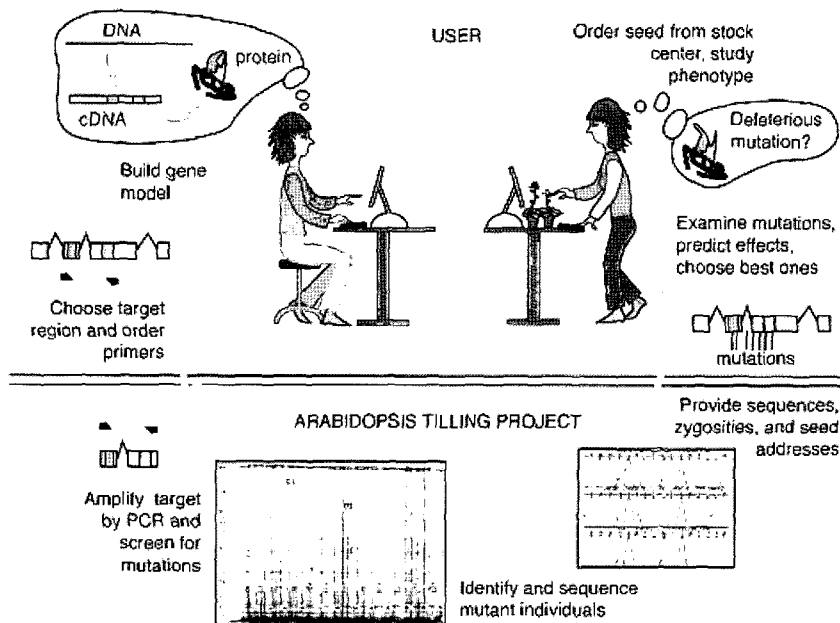


그림 1. Arabidopsis TILLING Project의 과정

chemical mutagenesis)과 관심 있는 유전자의 point mutation 을 규명하기 위해 사용하는 PCR 방법을 결합한 기술이고 (MaCallum et al., 2000), 미국의 Washington 대학에서는 high-throughput TILLING 방법을 애기장대의 유전자 연구에 적용한 Arabidopsis TILLING Project (ATP)를 시작하여 애기장대를 연구하는 사람들을 위해 service를 제공하고 있다 (Till et al., 2003).

ATP를 통한 TILLING은 네 단계를 거친다(그림 1). ATP의 사용자는 우선 CODDLE input utility (<http://www.proweb.org/input/>)를 이용하여 유전자의 model (gene model)과 단백질의 보존 model (protein conservation model)에 대한 정보를 얻는다. 사용자는 이 정보를 토대로 사용자가 관심 있어 하는 유전자의 서열에서 1000 bp 정도가 되는 크기의 부위를 증폭할 수 있는 primer를 CODDLE (<http://www.proweb.org/coddle/>)을 이용하여 고안한다. 이 부위는 EMS에 의해 point mutation이 일어날 확률이 높은 부위이다. 여기까지의 과정은 web-browser 상에서 행해지며, 만들 primer가 결정이 되면 사용자의 비용으로 주문을 하고, 만들어진 primer는 TILLING facility에 보내게 된다. ATP를 수행하는 곳에서 primer를 받으면, 돌연변이가 존재할 유전자의 부위를 EMS를 처리한 애기장대에서 추출한 DNA를 주형으로 증폭하고, TILLING 방법을 이용해 screening을 수행 한다(그림 2A).

그림 2A에서 보듯이 TILLING의 원리와 과정은 다

음과 같다. 우선 애기장대의 씨들을 G/C에서 A/T로의 point mutation을 일으키는 EMS로 처리한다. 이렇게 처리된 씨들을 받아서 키우면 M1 세대인 founder group을 형성하게 된다. 그 다음으로 M1 세대에서 돌연변이 식물의 chimerism에 의해 유발 될 수 있는 표현형의 모호성 (ambiguity)을 없애기 위해 자가수분을 시켜 교배된 집단 (crossed population)을 만든다. M1 씨 하나에서 유래한 M2 자손으로부터 DNA를 추출하여 96 well plate에 넣는다. 이 96 well plate 8개를 합쳐 (pool) 하나를 만들고 768개의 DNA sample을 가지고 PCR을 수행한다. 이 PCR에서 서로 다른 infrared red dye (infrared dye 700과 infrared dye 800)로 표지된 gene-specific primer로 PCR을 한다. PCR product를 얻으면, 여기에 열을 가하고 다시 섞여서 heteroduplex 형성을 유도하고 이를 자를 수 있는 효소CEL I을 처리한다. 이 잘린 DNA를 denaturing slab gel (LI-COR DNA analysis system)에 걸어 분석을 한다. 그림 3에서는 gel을 건 한 예를 보여주고 있다. DNA pool에 돌연변이를 갖고 있는 lane에서는, wild type band 아래에 band 하나가 IRDye 700 infrared dye image에서 보인다. 이에 상응하는 band가 IRDye 800 infrared dye image에서 볼 수가 있는데, 이 band는 전의 image에서 본 band에 상보적인 (complementary) band이다. 따라서, 이 두 band의 크기를 합친 것이 image의 위쪽에 나온 amplicon band (full length)가 된다(그

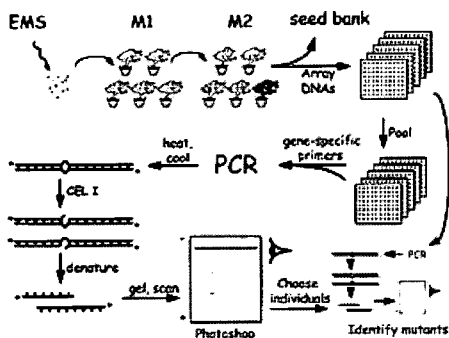


그림 2A. Arabidopsis에서의 high-throughput TILLING

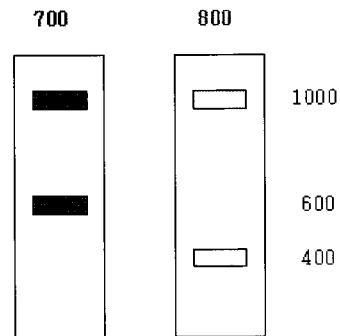
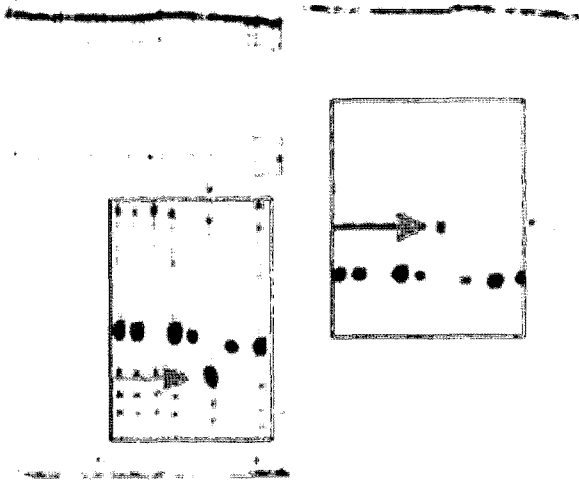
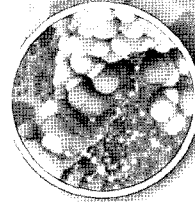
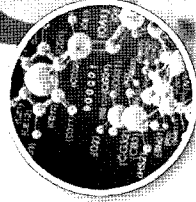


그림 2B. High-throughput TILLING에서 나온 gel 결과의 도식적인 예



(좌) IRDye 700 infrared dye image
 (우) IRDye 800 infrared dye image
 그림 3. High-throughput TILLING에서 나온 gel 결과의 실제적인 예

림 2B). DNA pool에서 돌연변이가 발견되면, pool안에 있는 각 DNA sample을 가지고 screening을 다시 하여 pool된 8개의 sample 중에서 어느 것이 돌연변이를 갖고 있는지 찾는다. 이 과정이 끝나면, 유전자 서열을 분석하고 동형 접합자인지의 여부를 결정하며, 씨가 어느 자리 (address)에 보관되어 있는지 찾는다. 돌연변이가 일어난 자리들을 살펴보아 제일 좋은

것을 고르고 씨를 주문하여 그 표현형을 관찰한다.

이 방법을 이용하면, 유전자의 크기와 염색체 상에서의 위치에 관계없이 돌연변이를 유도하여 연구를 할 수 있어서, T-DNA에 의한 돌연변이를 연구하는데에 보충 (첨가)적인 역할을 할 수 있다. 그리고 TILLING은 reverse genetics의 과정을 더욱 신속하게 하고, EMS의 농도를 조절함으로써 기능적인 유전자를 찾는 데에 알맞은 EMS의 농도를 맞출 수가 있다. 여기서 쓰이는 원리는 비단 애기장대 뿐만 아니라 다른 종의 식물과 *Drosophila melanogaster*, *C. elegans*에서도 쓰여질 수 있다.

참고문헌

MaCallum, C. M. et al., 2000. Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology* 18, 455-457.
 Till, B.J. et al., 2003. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Research* 13, 524-530.