

# 다중 역전사 중합효소 연쇄 반응(Multiplex RT-PCR)을 이용한 인간배아 줄기세포 및 유도만능 줄기세포의 효과적인 분화 양상 조사

김정모<sup>1,\*</sup> · 조윤정<sup>1,\*</sup> · 손은주<sup>1</sup> · 홍기성<sup>2</sup> · 정형민<sup>1,2,†</sup>

<sup>1</sup>차의과학대학 의생명과학대학원 줄기세포 연구실, <sup>2</sup>차바이오펜디오스텍

## Effective Application of Multiplex RT-PCR for Characterization of Human Embryonic Stem Cells/ Induced Pluripotent Stem Cells

Jung-Mo Kim<sup>1,\*</sup>, Youn-Jeong Cho<sup>1,\*</sup>, Onju Son<sup>1</sup>, Ki-Sung Hong<sup>2</sup> and Hyung-Min Chung<sup>1,2,†</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Life Science, CHA Stem Cell Institute, CHA University, College of Medicine, 605-21 Yeoksam 1 dong, Gangnam gu, Seoul 135-907, Korea

<sup>2</sup>CHA Biotech & Diostech Co., Ltd., 606-16 Yeoksam 1 dong, Gangnam gu, Seoul 135-907, Korea

### ABSTRACT

Techniques to evaluate gene expression profiling, such as sufficiently sensitive cDNA microarrays or real-time quantitative PCR, are efficient methods for monitoring human pluripotent stem cell (hESC/iPSC) cultures. However, most of these high-throughput tests have a limited use due to high cost, extended turn-around time, and the involvement of highly specialized technical expertise. Hence, there is an urgency of rapid, cost-effective, robust, yet sensitive method development for routine screening of hESCs/hiPSCs. A critical requirement in hESC/hiPSC cultures is to maintain a uniform undifferentiated state and to determine their differentiation capacity by showing the expression of gene markers representing all three germ layers, including ectoderm, mesoderm, and endoderm. To quantify the modulation of gene expression in hESCs/hiPSC during their propagation, expansion, and differentiation via embryoid body (EB) formation, we developed a simple, rapid, inexpensive, and definitive multimarker, semiquantitative multiplex RT-PCR platform technology. Among the 9 gene primers tested, 5 were pluripotent markers comprising set 1, and 3 lineage-specific markers were combined as set 2, respectively. We found that these 2 sets were not only effective in determining the relative differentiation in hESCs/hiPSCs, but were easily reproducible. In this study, we used the hES/hiPS cell lines to standardize the technique. This multiplex RT-PCR assay is flexible and, by selecting appropriate reporter genes, can be designed for characterization of different hESC/hiPSC lines during routine maintenance and directed differentiation.

(Key words : Human embryonic stem cells, Human induced pluripotent stem cells, Embryoid body, Multiplex RT-PCR, Pluripotency, Differentiation)

### 서론

1998년 Thomson 연구진은 최초로 인간 배아줄기세포(human embryonic stem cells)를 수립하였고, 그 이후 여러 종류의 인간 배아줄기세포가 수립되었으며(Nichols 등, 1998; Thomson 등, 1998; Reubinoff 등, 2000; Cowan 등, 2004; Chiao 등, 2008), 다양한 조직 유래의 세포와 유사한 계열로 분화를 유도하기 위한 방법들이 시도되면서 난치성 질병의 치료제로서의 가능성이 부각되었다. 또한, 2006년 Yamanaka 연구진에 의해 체세포로부터 유도만능

줄기세포(Induced pluripotent stem cells)를 만들어 내었고, 기존 인간 배아줄기세포의 생명윤리문제 및 조직 적합성의 문제를 극복한 새로운 줄기세포로 급부상하게 되었다(Takahashi 등, 2006; Liao 등, 2009; Zhou 등, 2009). 이렇게 인간 배아줄기세포와 인간 체세포 유래 유도만능 줄기세포만의 특징이 비교되고, 또 각각의 특징들이 새로 밝혀지면서 그 동안의 한계점을 극복하기 위한 노력들이 진행되고 있다(Horwitz, 2003; Kim 등, 2009; Park 등, 2009; Moore 등, 2010; Tropel 등, 2010). 세포 특유의 발현유전자들을 연구하는 실험 기술에는 중합효소 연쇄 반응(PCR) (Tzukerman 등, 2006; Lee 등, 2010), 유세포 분

\* 공동 1저자의 권한을 부여함(These authors contributed equally to this study.).

\*\* 본 연구는 교육과학기술부 세포융용연구사업단(SC3110)의 연구비의 지원으로 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-2-538-4104, E-mail: stemchung@gmail.com

석(FACS analysis)(Lee 등, 2010), 면역화학염색법 (immunocytochemistry)(Lee 등, 2010) 등과 같은 많은 분석 방법들이 제시되고 있다. 또한 줄기세포의 유전자 발현 패턴을 측정하는데 유용하게 쓰이는 기술로는 real-time quantitative PCR(Tzukerman 등, 2006; Mateizel 등, 2009; Tulpule 등, 2010), TaqMan low-density arrays(Langmann 등, 2006; Ek 등, 2007), 그리고 sensitive cDNA microarrays (Schna 등, 1995; Duggan 등, 1999; Bhattacharya 등, 2004) 등이 있다. 하지만 이런 고효율 진단 기술들은 고비용, 긴 시간의 소비, 그리고 특정 전문 인력들이 요구되는 등의 한계점이 있다. 그만큼 고비용과 적지 않은 시간을 보상하기 위해 간편하고 적은 양의 시료로 측정이 가능한 연구 방법이 요구되고 있다. 더욱이, 유도만능 줄기세포는 체세포로부터 줄기세포로 전환되는 확률이 매우 낮기 때문에 세포주 수립에 대한 진단을 위한 시료 보급의 한계성이 있다(Dvash 등, 2006; Klimanskaya 등, 2006; Friedrich Ben-Nun와 Benvenisty, 2006; Deb와 Sarda, 2008; Chiao 등, 2008).

최근 다중 역전사 중합효소 연쇄 반응(Multiplex RT-PCR) 기술(Chen와 Zhong, 2008; Mamidi 등, 2010)을 통해 인간 배아줄기세포의 미분화 단계와 분화 단계의 발현 패턴을 비교함으로써 다른 발현 패턴 측정기술에 비해 적은 비용과 짧은 시간으로 줄기세포를 연구할 수 있는 새로운 방법이 제시되었다(Mamidi 등, 2010). 다중 역전사 중합효소 연쇄 반응은 하나의 유전자풀(gene pool)에 2개 이상의 다양한 유전자 단편의 프라이머를 혼합하여 한번의 중합효소 연쇄 반응(PCR)으로 여러 가지 유전자 발현을 확인할 수 있는 분석기술을 일컫는다(Brimble 등, 2004; Clark 등, 2004; Chen와 Zhong, 2008; Mamidi 등, 2010).

본 연구에서는 다중 역전사 중합효소 연쇄 반응을 위한 적절한 프라이머 세트를 구성하고, 이를 통한 인간 배아줄기세포와 유도만능 줄기세포의 미분화 상태와 그들의 분화 상태의 발현유전자 패턴을 포괄적으로 분석함으로써 줄기세포연구에 있어서 유용한 실험 방법을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 인간 배아줄기세포(Human Embryonic Stem Cells: hES-Cs)와 유도만능 줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cells: hiPSCs)의 배양

미분화 상태의 인간 배아줄기세포(H9, CHA11-hESC)와 유도만능 줄기세포(hiPSC, System Bioscience, Mountain View, CA)를 0.1% 젤라틴으로 코팅한 배양접시(Nunc, Roskilde, Denmark)에서, 세포 성장 억제 물질인 mitomycin C(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 10  $\mu$ g/ml 농도로 90분 동안 처리하여 준비된 지지세포(Mouse embryonic fibroblast: MEF)와 공배양하였다. 이 때, 인간 배아줄기세포와 유도만능 줄기세포는 DMEM/F12(50:50, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20%(v/v) serum replacement(Invitrogen), 1% nonessential amino acids(Invitrogen), 1% penicillin streptomycin(Invitrogen), 0.1%  $\beta$ -

mercaptoethanol(Invitrogen), 4ng/ml bFGF (invitrogen) 역분화 줄기세포의 경우 8ng/ml bFGF(invitrogen)로 조성된 배양액을 사용하였다. 배양액은 매일 교체해 주고, 5일에서 7일 간격으로 새로운 지지세포에 계대배양하였으며 세포 배양은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도를 유지하면서 진행하였다.

### 배상체(Embryoid Body) 형성

분화 유도를 위한 배상체 형성은 인간 배아줄기세포를 dispase(Invitrogen) 효소로 지지세포와 분리시킨 뒤, 새로운 배양접시(Falcon/BD Biosciences, San Jose, CA)로 옮겨, 1번 세척을 하고, DMEM/F12(50:50, Invitrogen)에 2%(v/v) serum replacement(Invitrogen)가 첨가된 배양액에서 45분 동안 부유배양하면서 aggregation을 유도하였다. Aggregation된 배상체는 10%(v/v) serum replacement(Invitrogen), 1 mM L-glutamine(Invitrogen), 1% nonessential amino acids(Invitrogen), 1% penicillin streptomycin(Invitrogen), 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol(Invitrogen)로 조성된 배양액으로 옮겨 부유 배양하였으며, 배양액은 이틀에 한 번씩 교체하였고, 6일 동안 유지배양하였다.

### 세포 배양(Cell Culture)

인간 배아줄기세포로부터 만들어진 배상체를 이용하여 단일세포로 만든 뒤 세포외기질에 특이적으로 붙는 세포만을 분리하여 분화를 유도하였다(Fig. 4B)(Furue 등, 2008). 17주 태아의 조직으로부터 심장, 간 그리고 피부 세포를 얻어내고 일차배양을 통해 유지배양을 하고, 이로부터 cDNA를 얻어 다중 역전사 중합연쇄 반응에 사용하였다.

### 미분화 인간 배아줄기세포와 역분화줄기세포의 알칼라인포스파테이즈(AP) 염색

4일 동안 유지배양된 인간 배아줄기세포와 유도만능 줄기세포를 시트릿트 솔루션과 아세톤, 37% 포르말데하이드를 이용하여 2분 동안 고정을 시키고, dPBS로 세척을 해준 뒤 소듐 니트레이트와 FRL-알칼라인 솔루션을 1:1로 섞어 2분 동안 반응을 시키고, 일차중류수에 넣어 반응을 멈추게 한 다음 naphthol AS-BI 솔루션을 넣은 뒤 이 용액을 준비한 세포와 15분 동안 반응시킨다. 그 후 dPBS로 세척을 해준 뒤 위상차 현미경으로 관찰하였다. Alkaline Phosphatase(86R-1kt, SIGMA, USA) 키트를 이용하여 실험에 이용된 세포가 미분화 세포임을 확인하였다.

### 세포의 관찰

위상차 현미경을 이용하여 인간 배아줄기세포, 유도만능 줄기세포, 배상체, 일차배양세포 등을 관찰하였으며, EVOS 현미경(AMG, Bothell, WA, USA)을 이용하여 세포를 관찰하고, 사진촬영을 하였다.

### RNA 추출과 cDNA 합성

다중 역전사 중합연쇄 반응을 위해, RNeasy Micro Kit(QIAGEN, Germany)를 이용하여 단일 콜로니로부터 RNA를 추출하였으며, 추출된 RNA는 Accu Power™ Cycle-Script RT PreMix(dT20)(Bioneer, Daejeon South Korea)와 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germa-

ny)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA를 미분화 프라이머(Table 1)와 미분화 및 삼배엽 프라이머(Table 2)를 이용하여 35cycle을 증폭시켰으며, 증폭된 산물은 1.5% 아가로스겔을 사용하여 전기영동으로 확인하였다.

### 결 과

#### 실험에 사용된 세포들의 특성 확인

인간 배아줄기세포와 유도만능 줄기세포가 미분화 세포임을 확인하기 위하여 알칼라인 포스파테이즈 염색을 시행하여 미분화상태를 정상적으로 유지하고 있음을 확인하였다. 인간 배아줄기세포로부터 배상체가 정상적으로 형성됨을 확인하였다(Fig. 1).

#### 다중 역전사 중합연쇄 반응을 통해 단일 프라이머와 다중 프라이머의 제작 확인

미분화마커 5종(Table 1)과 미분화 및 삼배엽 마커 4종(Table 2)의 단일 프라이머를 확인하기 위해 다중 역전사 중합연쇄 반응에 사용된 각 유전자의 크기를 확인하여 유전자들 간의 크기의 중복이 발생하지 않고 작동되는 것을 확인하였다(Fig. 2). 미분화 인간 배아줄기세포(H9, CHA11)와 17주 태아의 조직(심장, 간, 피부)들로부터 얻어낸 cDNA를 이용하여 제작된 다중 프라이머를 통해 발현 정도를 확인하였다(Fig. 2).

#### 다중 역전사 중합연쇄 반응을 통해 인간 배아줄기세포와 유도만능 줄기세포의 단일 콜로니로부터 미분화 유전자 발현 확인

대표적인 미분화 마커들(Table 1)로 짜여진 다중 프라

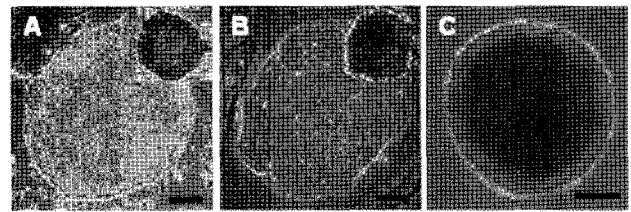
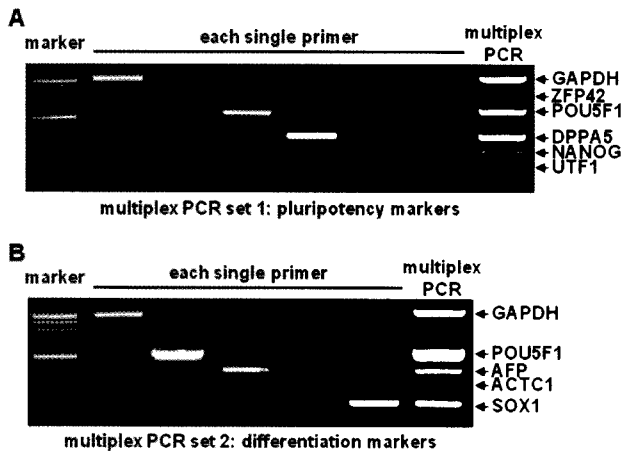


Fig. 1. Morphological characterization of human embryonic stem cells (hES), human induced pluripotent stem cells (hiPS) and human embryoid bodies (hEBs). (A) Phase contrast images of compact day 6 undifferentiated hESCs colony and AP staining  $\times 10$  magnification at passage 57 maintained on mouse embryonic fibroblast(MEF) feeders. (B) Phase contrast images of compact day 3 undifferentiated hiPSCs colony and AP staining  $\times 10$  magnification at passage 7 maintained on mouse embryonic fibroblast(MEF) feeders. (C) Image of day 6 embryoid body  $\times 10$  magnification. Scale bars are 100  $\mu$ m.

이머를 이용하여 미분화상태의 인간 배아줄기세포와 자발적 분화가 진행된 인간 배아줄기세포, 인간 배아줄기세포로부터 형성시킨 배상체, 유도만능 줄기세포의 cDNA를 다중 역전사 중합연쇄 반응을 통하여 확인하였다(Fig. 3). GAPDH를 이용하여 전체적인 유전자 발현량을 동일시 하였다. 미분화 인간 배아줄기세포는 단일 콜로니를 이용하였으며, 육안으로 확인하였을 때 미분화 상태로 동일해 보였으나, 각자가 가지는 미분화 유전자의 발현 정도의 차이가 있었다. 하지만 전체적으로 모든 미분화 마커가 정상적으로 발현을 하고 있는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 자발적 분화가 진행된 인간 배아줄기세포는 육안으로 관찰하였을 때 다른 양상으로 분화가 진행된 콜로니를 선별하여 샘플링을 시행하였으며, 부착부위의 바깥쪽 부분에 분화경향이 보이는 콜로니에서는 POU5F1의 발현이 유지하고 있음을 확인하였고, 자발적으로 분화가 진행

Table 1. List of gene primers classified in separate sets Pluripotency specific markers along with the sequences, annealing temperature and region of amplification by the multiplexPCR technique

No	Markers	Accession number	Tm (°C)	Product size (bp)	Primers (5'→3')
1	GAPDH Normalizing	NM_002046	60	983	F TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT
					R CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC
2	ZFP42	NM_174900.3		713	F GCCAAGACCTGCAGGCGGAAA
					R TCCCCCGTGTGGATGCGCAC
3	POU5F1	NM_002701		536	F GCAATTTGCCAAGCTCCTGAAGCAG
					R CATAGCCTGGGGTACCAAAATGGGG
4	DPPA5 Pluripotency	NM_001025290.1	349	F GGGAACTCTCCCGGCACGTAG	
				R TCACTTCATCCAAGGGCCTA	
5	NANOG	NM_024865.2	255	F GCTTGCCCTTGCTTTGAAGCA	
				R TTCTTGACTGGGACCTTGTC	
6	UTF1	NM_003577.2	171	F CCGTCGCTGAACACCGCCCTGCTG	
				R CGCGCTGCCCAGAATGAAGCCAC	

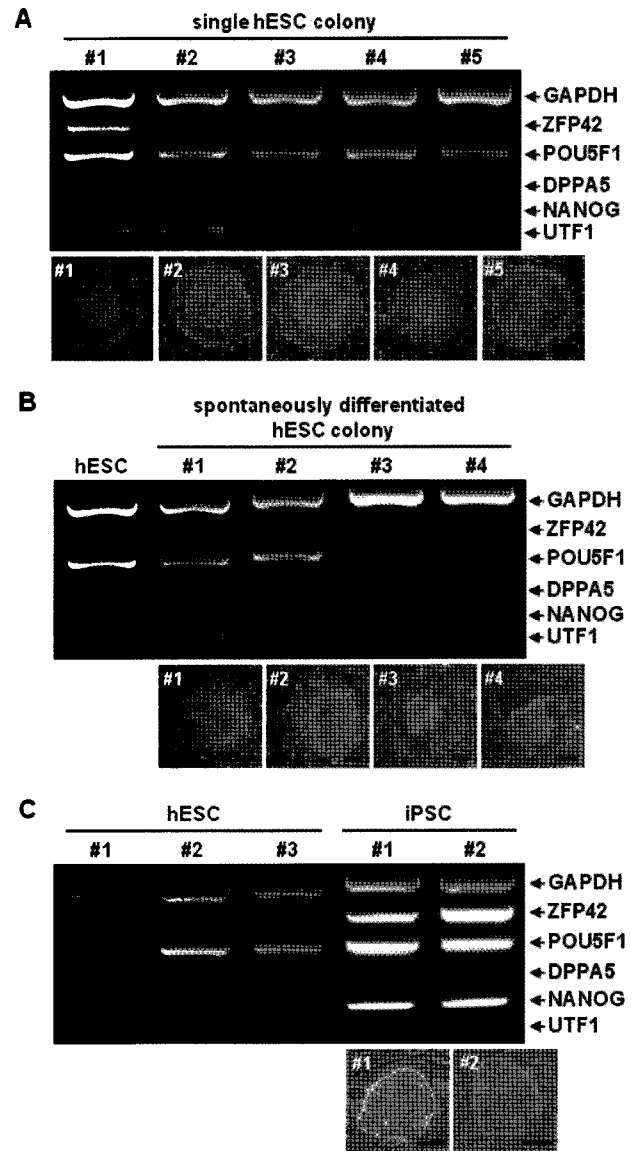


**Fig. 2.** Molecular characterization of undifferentiated human embryonic stem cells (hESCs) and human neonatal tissue by single PCR and multiplex PCR. Standardization of 2 different sets of multiplex PCRs, wherein each set constitutes a group of pluripotency gene primers and three germ layer gene primers. Image A, B represent 1.5% agarose pictures of set1: pluripotency markers, set2: differentiation markers. (A) Genes associated with pluripotency; ZFP42, POU5F1, DPPA5, NANOG, UTF1 in hESCs. (B) Genes associated with pluripotency (POU5F1), endoderm (AFP), mesoderm (ACTC1), ectoderm (SOX1) in hESCs and 17-week-old human neonatal tissues. Marker is 100-bp molecular marker (ladder). Scale bars are 100  $\mu$ m.

된 인간 배아줄기세포에서 전체적으로 미분화 마커가 눈에 띄게 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 3B). 유도만능 줄기세포에서의 미분화 마커에 따른 발현양상을 확인하기 위해 인간 배아줄기세포와 유도만능 줄기세포를 비교하여 미분화 유전자의 발현 정도를 확인하였다 (Fig. 3C). 유도만능 줄기세포에서 특이적으로 ZFP42, POU5F1과 NANOG가 높게 발현되고 있었으며, DPPA5와 UTF1의 발현은 확인할 수 없었다. 인간 배아줄기세포와 유도만능 줄기세포를 통해 미분화 마커들로 짜여진 다중 역전사 중합연쇄 반응 프라이머 세트가 정상적으로 작동하는 것을 보여줄 수 있으며, 인간 배아줄기세포와 유도만능 줄기세포의 단일 콜로니로부터 미분화 유전자의 발현 정도와 발현 여부를 확인할 수 있었다.

다중 역전사 중합연쇄 반응을 통해 인간배아 줄기세포로부터 분화된 세포로부터 삼배엽 분화 유전자의 발현량 확인

인간 배아줄기세포의 발달이 형성될 때 삼배엽의 대표적인 마커 (AFP, ACTC1 그리고 SOX1) 들을 이용하여 미분화상태의 인간 배아줄기세포를 이용하여 형성시킨 배상체, 배상체로부터 분화되어 확립된 세포주 그리고 17주 태아의 조직 (심장, 간 그리고 피부)의 cDNA를 다중 역전사 중합연쇄 반응을 통하여 확인하였다 (Fig. 4). 배상체가 형성될 때 서로 다른 모양과 색을 가지는 배상체를 관찰할 수 있었으며, 관찰된 서로 다른 모양의 배상체 하나를 사용하여 cDNA를 얻어냈다. GAPDH를 이용하여 전체적인 유전자 발현량을 동일시 하였으며, POU5F1을 통해 미분화 인간 배아줄기세포로부터 만들어진 배상체의 미분화 유전자 발현 정도를 확인하였다. 내배엽 세포의 대표적인 유전자인 AFP와 중배엽 세포의 대표적인 유전자인 ACTC1이 일부 배상체 (Fig. 4A, #1, 2)에서 발현되고 있음



**Fig. 3.** Establishment of multiplex PCR as a sensitive method for defining the state of human embryonic stem cells (hESCs), spontaneously differentiated hESCs and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). (A) Represent 1.5% agarose pictures and hESCs morphology of single undifferentiated hESCs colony. (B) Represent 1.5% agarose pictures and spontaneous differentiated hESCs morphology of single spontaneously differentiated hESCs colony. (C) Represent 1.5% agarose pictures and undifferentiated hESCs and hiPSCs morphology of single undifferentiated hESCs and hiPSC colonies. Scale bars are 100  $\mu$ m.

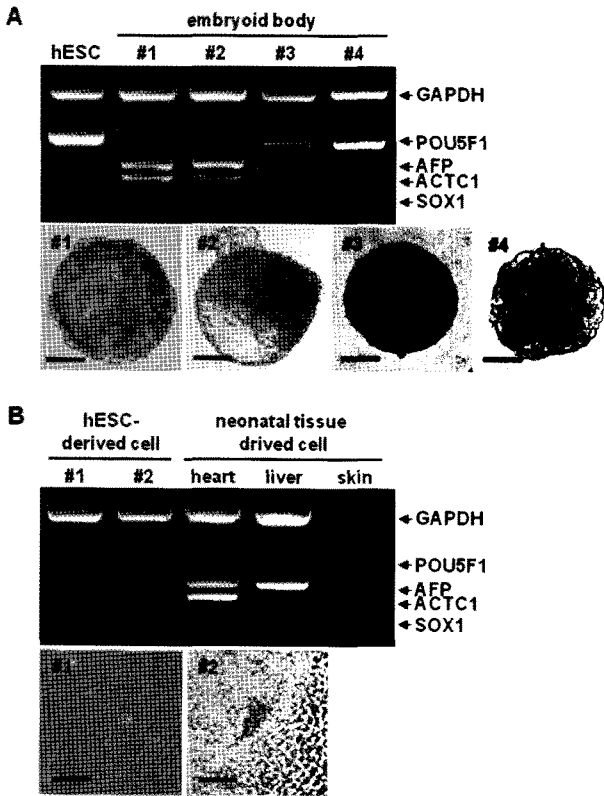
을 확인하였으며, 외배엽 세포의 대표적인 유전자인 SOX1도 배상체의 모양에 따라 발현 여부가 달라짐을 알 수 있었다 (Fig. 4A, #4). 인간 배아줄기세포로부터 그리고 배상체로부터 분화되어 확립된 두 종류의 세포주와 태아의 심장, 간 그리고 피부의 cDNA를 사용하여 삼배엽 마커를 확인하였다 (Fig. 4B). 인간 배아줄기세포로부터 분화되어 확립된 세포주 (Fig. 4B, #1, 2)에서는 미분화 마커가 발현되지 않고, 중배엽 마커가 약하게 발현하고 있음을 확

**Table 2. List of gene primers Pluripotency, Endoderm, Mesoderm, Ectoderm specific markers along with the sequences, annealing temperature and region of amplification by the multiplexPCR technique**

No	Markers	Accession number	Tm (°C)	Product size (bp)	Primers (5'→3')
1	GAPDH Normalizing	NM_002046		983	F TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGT R CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC
2	POU5F1 Pluripotency	NM_002701		536	F GCAATTTGCCAAGCTCCTGAAGCAG R CATAGCCTGGGGTACCAAAATGGGG
3	AFP Endoderm	NM_001134	60	400	F GAAATGACTCCAGTAAACCCTGGTG R AGACTCGTTTTGTCTTCTCTCCCC
4	ACTC1 Mesoderm	NM_005159		315	F CATCCTGACCCTGAAGTATCCCATC R CCCTCATAGATGGGGACATTGTGAG
5	SOX1 Ectoderm	NM_005986		202	F GTGTCCAATTGTGGCATCTAGGTC R CAAGGAAATAAGGTGGITGGAGCAC

**Table 3. Details of the gene markers used in this study**

No	Gene/name	Gene mapping in humans	Activity and function	Reference
1	GAPDH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Chromosome: 12; location: 12p13	Housekeeping gene; glucose metabolism	Brimble 등 (2004)
2	ZFP42 (REX1); Zinc finger protein 42 homolog	Chromosome: 4; location: 4q35.2	Transcription factor activity; binding of metal ions and controls cell division	Irene 등 (2004)
3	POU5F1 (OCT4); POU class 5 homeobox 1	Chromosome: 12; location: 6p21.31	Transcription factor activity; regulation of key processes in embryonic development by miRNA, DNA and nucleotide binding, maintenance of stem cell pool	Irene 등 (2004)
4	DPPA5 Developmental pluripotency-associated 5 protein	Chromosome 6 location: 6q	Involved in the maintenance of embryonic stem (ES) cell pluripotency. Dispensable for self-renewal of pluripotent ES cells and establishment of germ cells.	Brimble 등 (2004)
5	NANOG Nanog homeobox	Chromosome: 12; location: 12p13.31	Transcription factor activity; regulates cell proliferation and cell differentiation	Clark 등 (2004)
6	UTF1 Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1	Chromosome: 10; location: 10q26	Involved in the maintenance of embryonic stem (ES) cell pluripotency. Acts as a transcriptional coactivator of ATF2	Brimble 등 (2004)
7	AFP Alpha-fetoprotein	Chromosome: 4 location: 4q11-q13	Metal ion binding activity; associated with liver and pancreas development, transport, and organ regeneration	Irene 등 (2004)
8	ACTC1 Actin, alpha, cardiac muscle 1	Chromosome: 15; location: 15q11-q14	ATP binding and ATPase activity; regulates actin filament-based movement, muscle contraction, maintains cardiac myofibril assembly and actomyosin structure organization	Irene 등 (2004)
9	SOX1 Sex determining region Y-box 11	Chromosome: 13; location: 13q34	Transcription factor activity; regulation of embryonic development and in the determination of the cell	Brimble 등 (2004)



**Fig. 4.** Establishment of multiplex PCR as a sensitive method for defining the state of human embryoid bodies (hEBs), human embryonic stem cell derived cell, human neonatal tissue driven cells. (A) Represent 1.5% agarose pictures and hEBs morphology of single hEBs. (B) Represent 1.5% agarose pictures and cell morphology of hESCs-derived cell, and represent human neonatal tissue derived cells. Scale bars are 100  $\mu$ m.

인할 수 있었으며, 17주 태아의 심장에서는 미분화 마커는 전혀 발현되지 않으며, 내배엽과 중배엽 마커가 강하게 발현하고 있음을 확인할 수 있었으며, 간에서도 미분화 마커의 발현을 확인할 수 없었으며, 내배엽 마커만이 강하게 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 피부에서는 외배엽 마커만이 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 다중 역전사 중합효소 반응을 통해 적은 양의 세포를 사용하여 짧은 시간 안에 여러 종류의 유전자를 확인할 수 있음을 보여준다.

## 고 찰

전분화능을 지닌 인간 배아줄기세포, 유도만능 줄기세포, 또는 다른 형태의 유사한 줄기세포의 충분한 수적 확보는 인간 발생과정에 대한 기본 연구뿐만 아니라 난치병 치료를 위한 세포치료제 개발의 중요한 공급원이라는 인식에 있어서도 중요한 문제이다(Draper와 Andrews, 2002; Horwitz, 2003; Zeng와 Rao, 2006; Moore 등, 2010). 하지만 인간 배아줄기세포(Thomson 등, 1998)의 경우 테라토마 형성, 이종간 이식문제와 더불어 윤리적, 사회 제

도적인 문제에서 유도만능 줄기세포(Takahashi와 Yamanaka, 2006; Liao 등, 2009; Zhou 등, 2009)의 경우, 줄기세포 형성의 어려움, 배아줄기세포에 비해 낮은 분화 효율과 바이러스를 이용한 유전자 조작에 대한 안정성 문제와 같은 난제들을 품고 있다. 이런 이유로 이들 줄기세포의 수립은 굉장히 어렵고 복잡한 절차를 거치게 된다. 뿐만 아니라 수립 과정에서 줄기세포들의 정확한 성격을 검사하기 위해 유세포분석, 면역화학염색법과 같은 많은 실험들이 요구된다(Klimanskaya 등, 2006; Olsen 등, 2006; Cho 등, 2007). 특히, 줄기세포의 유전자 발현 패턴을 측정하는데 유용하게 쓰이는 기술로는 real-time quantitative PCR(Mateizel 등, 2009; Tulpule 등, 2010), TaqMan low-density arrays(Langmann 등, 2006; Ek 등, 2007), 그리고 sensitive cDNA microarrays(Schena 등, 1995; Duggan 등, 1999) 등이 있다. 하지만 이런 high-throughput 진단 기술들은 고비용, 긴 시간의 소비, 그리고 특정 전문 인력들이 요구되는 등의 한계점이 있다. 그만큼 고비용과 적지 않은 시간을 보충하기 위해 간편하고 적은 양의 시료로 측정이 가능한 연구 방법이 요구되고 있다. 더욱이, 줄기세포 수립에 있어 미분화능 및 전분화능 진단을 위한 시료 보급의 한계성이 있다.

이를 위한 하나의 해결책으로 본 연구에서는 다양한 줄기세포 관련 미분화 및 분화 마커 유전자간 발현 정도가 비교 가능한 다중 역전사 중합효소 연쇄 반응(semi-quantitative multiplex RT-PCR)(Edwards와 Gibbs, 1994; Tettelin 등, 1999)를 수행하였다. 이를 위해 관련된 9가지 유전자의 프라이머(Brimble 등, 2004; Bhattacharya 등, 2004; Clark 등, 2004; Ginis 등, 2004)를 다중 역전사 중합효소 연쇄 반응을 수행할 수 있도록 두 가지 세트(multiplex set 1: 미분화 마커 5종, multiplex set 2: 미분화 및 삼배엽 마커 4종)로 구성을 하였다(Table 1~3, Fig. 2). 또한, 이 프라이머 세트는 그 사용 목적에 따라 구성 프라이머를 다양하게 조합할 수 있다. 미분화 인간 배아줄기세포, 유도만능 줄기세포, 자연 분화된 인간 배아줄기세포 및 배상체에 대한 다중 역전사 중합효소 연쇄 반응 수행에 있어 이들 프라이머 세트는 구성 목적에 따라 정확하게 마커들의 발현과 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 3~5). 특히, 주목할 만한 차이는 인간 배아줄기세포에서 모두 발현되던 미분화 마커가 유도만능 줄기세포에서는 바이러스에 의해 도입된 POU5F1, NANOG의 발현이 상대적으로 높게 발현되는 반면, DPPA5, UTF1의 발현은 이뤄지지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이는 각 줄기세포의 미분화 상태뿐만 아니라 줄기세포간의 미분화 마커의 발현 차이도 간접적으로 확인할 수 있다는 점에서 의의가 있다고 할 수 있다.

따라서, 본 연구에서 제안한 다중 역전사 중합효소 연쇄 반응을 통한 줄기세포 유전자 발현 패턴에 관한 측정은 저비용, 시간단축, 고효율의 분석 방법이며, 목적에 따라 대상 프라이머 세트를 쉽게 변경할 수 있는 장점을 가지고 있다. 줄기세포 수립에 있어 따르는 시료 채취의 제한성과, 줄기세포 유지 배양 상태의 점검(quality control) 뿐만 아니라 분화 기술 적용에 있어서도 보다 쉽고 간단한 방법으로 사용될 것으로 기대된다.

## 인용문헌

1. Brimble SN, Zeng X, Weiler DA, Luo Y, Liu Y, Lyons IG, Freed WJ, Robins AJ, Rao MS, Schulz TC (2004): Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev* 13: 585-597.
2. Chen Y, Zhong JF (2008): Microfluidic devices for high-throughput gene expression profiling of single hESC-derived neural stem cells. *Methods Mol Biol* 438:293-303.
3. Chiao E, Kmet M, Behr B, Baker J (2008): Derivation of human embryonic stem cells in standard and chemically defined conditions. *Methods Cell Biol* 86:1-14.
4. Cho SW, Moon SH, Lee SH, Kang SW, Kim J, Lim JM, Kim HS, Kim BS, Chung HM (2007): Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* 116:2409-2419.
5. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer JP, Zucker S, Wang CC, Morton AP, McMahon J, Powers D, Melton DA (2004): Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350:1353-1356.
6. Deb KD, Sarda K (2008): Human embryonic stem cells: preclinical perspectives. *J Transl Med* 6:7.
7. Draper JS, Andrews PW (2002): Embryonic stem cells: advances toward potential therapeutic use. *Curr Opin Obstet Gynecol* 14:309-315.
8. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM (1999): Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21:10-14.
9. Dvash T, Ben-Yosef D, Eiges R (2006): Human embryonic stem cells as a powerful tool for studying human embryogenesis. *Pediatr Res* 60:111-117.
10. Edwards MC, Gibbs RA (1994): Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl* 3:S65-75.
11. Ek M, Soderdahl T, Kuppers-Munther B, Edsbacke J, Andersson TB, Bjorquist P, Cotgreave I, Jernstrom B, Ingelman-Sundberg M, Johansson I (2007): Expression of drug metabolizing enzymes in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Biochem Pharmacol* 74:496-503.
12. Friedrich Ben-Nun I, Benvenisty N (2006): Human embryonic stem cells as a cellular model for human disorders. *Mol Cell Endocrinol* 252:154-159.
13. Horwitz EM (2003): Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch Med Res* 34:600-606.
14. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hubner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Scholer HR (2009): Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136:411-419.
15. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R (2006): Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444:481-485.
16. Langmann T, Mauerer R, Schmitz G (2006): Human ATP-binding cassette transporter TaqMan low-density array: analysis of macrophage differentiation and foam cell formation. *Clin Chem* 52:310-313.
17. Lee MJ, Lee JH, Kim JM, Shin JM, Park SJ, Chung SH, Lee KI, Chae JI, Chung HM (2010): Differentiation of mesenchymal stem cell-like cell from feeder free cultured human embryonic stem cells using Direct Induction. *Reprod Dev Biol* 34:1-6.
18. Liao J, Cui C, Chen S, Ren J, Chen J, Gao Y, Li H, Jia N, Cheng L, Xiao H, Xiao L (2009): Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell* 4:11-15.
19. Mamidi MK, Pal R, Bhonde R, Zakaria Z, Totey S (2010): Application of multiplex PCR for characterization of human embryonic stem cells (hESCs) and its differentiated progenies. *J Biomol Screen* 15:630-643.
20. Mateizel I, Spits C, Verloes A, Mertzaniadou A, Liebaers I, Sermon K (2009): Characterization of CD30 expression in human embryonic stem cell lines cultured in serum-free media and passaged mechanically. *Hum Reprod* 24:2477-2489.
21. Moore JC, Atze K, Yeung PL, Toro-Ramos AJ, Camarillo C, Thompson K, Ricupero CL, Brenneman MA, Cohen RI, Hart RP (2010): Efficient, high-throughput transfection of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res Ther* 1:23.
22. Olsen AL, Stachura DL, Weiss MJ (2006): Designer blood: creating hematopoietic lineages from embryonic stem cells. *Blood* 107:1265-1275.
23. Park TS, Zambidis ET, Lucitti JL, Logar A, Keller BB, Peault B (2009): Human embryonic stem cell-derived hemoendothelial progenitors engraft chicken embryos. *Exp Hematol* 37:31-41.
24. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470.
25. Takahashi K, Yamanaka S (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
26. Tettelin H, Radune D, Kasif S, Khouri H, Salzberg SL (1999): Optimized multiplex PCR: efficiently closing a whole-genome shotgun sequencing project. *Genomics* 62:500-507.
27. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blas-

- tocysts. *Science* 282:1145-1147.
28. Tropel P, Tournois J, Come J, Varela C, Moutou C, Fragner P, Cailleret M, Laabi Y, Peschanski M, Vi-ville S (2010): High-efficiency derivation of human embryonic stem cell lines following pre-implantation genetic diagnosis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46:376-385.
  29. Tulpule A, Lensch MW, Miller JD, Austin K, D'Andrea A, Schlaeger TM, Shimamura A, Daley GQ (2010): Knockdown of *Fanconi anemia* genes in human embryonic stem cells reveals early developmental de-fects in the hematopoietic lineage. *Blood* 115:3453-3462.
  30. Tzukerman M, Rosenberg T, Reiter I, Ben-Eliezer S, Denkberg G, Coleman R, Reiter Y, Skorecki K (2006): The influence of a human embryonic stem cell-derived microenvironment on targeting of human solid tumor xenografts. *Cancer Res* 66:3792-3801.
  31. Zeng X, Rao MS (2006): The therapeutic potential of embryonic stem cells: A focus on stem cell stability. *Curr Opin Mol Ther* 8:338-344.  
(접수일자: 2010. 11. 4 / 채택일자: 2011. 1. 3)