

□ 원 저 □

Filter Hybridization과 Solution Hybridization 방법에 의한 백서 Surfactant Protein C mRNA 정량측정의 비교

한양대학교 의과대학 호흡기내과학교실

김진호, 손장원, 양석철, 윤호주, 신동호, 박성수*

= Abstract =

Comparative Quantitative Study of Surfactant Protein C mRNA by Filter Hybridization and Solution Hybridization in Rats

Jin Ho Kim, M.D., Jang Won Sohn, M.D., Seok Chul Yang, M.D.,
Ho Joo Yoon, M.D., Dong Ho Shin, M.D., Sung Soo Park, M.D.

Department of Medicine, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Background : Surfactant protein C(SP-C) is a hydrophobic 5,000 dalton molecule. SP-C has the primary roles in accelerating surface spreading of a surfactant phospholipid. The filter hybridization and solution hybridization assays are both rapid and sensitive and can be used to measure the RNAs complementary to any cloned DNA sequence.

Methods : The authors measured the SP-C mRNA levels quantitatively using solution hybridization and filter hybridization assays to obtain a standard curve equation to quantify the mRNA of unknown samples comparatively.

Results : 1. The minimum level of the specimens by solution hybridization was 3 pg for SP-C mRNA. 2. The standard curve equation of the solution hybridization assay between the counts per minute(Y) and the SP-C mRNA transcript input(X) was $Y = 6.46 X + 244$. The correlation coefficient was 0.99. 3. The minimum detection level of specimens by filter hybridization was 0.1 ng for SP-C mRNA. 4. The standard curve equation of the filter hybridization assay between the counts per minute(Y) and SP-C mRNA transcript input(X) is $Y = 2541.6 X + 252.7$. The correlation coefficient was 0.99.

Address for correspondence :

Sung Soo Park, M.D.

Department of Medicine, College of Medicine, Hanyang University Hospital

17 Haeng dang dong, Sung dong ku, Seoul, 133-792, Korea

Phone : 02-2290-8347 Fax : 02-2290-9183 E-mail : parkss@hanyang.ac.kr

Conclusions : A comparison of CPM/filter in the linear range allowed an accurate and reproducible estimation of the SP-C mRNA copy number. Filter hybridization and solution hybridization assays are both rapid and sensitive and can be used to measure the RNAs complementary to any cloned DNA sequence. It is ideally suited to situations where accurate quantitation of multiple samples is required. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 51 : 517-529)

Key words : Surfactant protein C mRNA, Solution hybridization, Filter hybridization

서 론

Surfactant(계면활성제)는 80-90%의 인지질과 5-10%의 단백질 및 탄수화물로 구성되어 있다. 가장 주요 인지질은 phosphatidylcholine으로 인지질의 70-80%를 점하며, 이 중 60-70%가 dipalmitoyl phosphatidylcholine이고 낮은 폐용적에서 표면장력을 낮추는 역할을 한다¹⁻³. Phosphatidylglycerol은 인지질의 5-10%를 점하고 surfactant대사와 지질과 단백질의 상호작용에 있어 중요한 역할을 한다^{4,5}. 그 외 10-15%는 phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylserine, sphingomyelin, 콜레스테롤 및 다른 중성지질이 포함된다. Surfactant의 5-10%는 단백질로 구성되어 있으며 단백질은 친수성단백인 surfactant protein A(SP-A)와 surfactant protein D(SP-D) 및 배수성단백인 surfactant protein B(SP-B)와 surfactant protein C(SP-C)로 구성되어 있다. SP-A에 SP-B와 SP-C의 혼합물을 첨가함으로써 공기액체계면에 인지질의 흡착을 촉진시킨다⁶.

King등⁷이 surfactant단백을 처음 기술한 이래 분자생물학의 발달로 SP-A, SP-B, SP-C 및 SP-D의 서로 다른 4가지의 surfactant단백을 밝혀냈다. Surfactant단백들은 제 II 형 폐포세포 기능의 표지자로 이용되고, 폐실질부에 존재하는 세포들의 약 10%를 점하고 있다⁸.

SP-C는 배수성 단백질이며, 비환원형의 분자량은 5-8 kDa이고 20 sequential valine들로 구성되며 SP-A와 SP-B에 비하여 지방친화성이 강하다^{9,10}. 이러

한 극도의 배수성 특성 때문에 SP-C는 항원성이 빈약하며 SP-C에 대한 항체도 거의 존재하지 않는다. SP-C mRNA는 제 II 형 폐포세포들에서만 발견되며 태아 13주에 폐조직에서 검출될 수 있고, 임신 16-24주에는 SP-C mRNA 양이 점차 증가되기 시작한다^{11,12}. 사람에 있어 임신 24주에 SP-C mRNA 양은 성인 폐조직양에 거의 도달한다. 쥐에서는 SP-C mRNA가 임신 19일째 태생기 폐조직에서 검출된다. 사람과 쥐와는 달리 토끼의 SP-C mRNA는 임신 19일부터 임신 말기까지의 태생기간동안에는 점차 증가하나 출생이후 성장된 토끼에서는 약간 감소한다. SP-C는 폐포내 제 II 형 폐포세포로 분화되기 전 태아 폐의 폐포전 상피 세포(pre-alveolar epithelial cell)에 존재하기 때문에 미지의 어떠한 기능을 발휘할 가능성이 많다. SP-C는 lamellar body와 폐포에서 발견된다. 공기액체계면에서 폐포단층에 인지질의 흡수에 관여한다. SP-C는 표면에서 인지질의 흡수를 촉진하고 film내 인지질의 구성을 변화시켜 작은 압축된 영역을 산출하며¹³, 폐포에서 lamellar body로 DPPC와 유사한 경로로 재순환한다. 폐손상을 입은 쥐에 SP-C단백만 포함한 surfactant를 투여하였을 시 폐기능이 호전되었다¹⁴. SP-C와 SP-B는 surfactant의 신속한 film형성에 있어서 SP-A와 상호협동작용을 하여 단층의 표면장력을 감소시킨다¹⁵.

유전자 발현을 연구분석함에 있어 complementary DNA(cDNA)탐지자와 유전자 재결합반응을 일으키는 특정 mRNA의 양을 정확히 측정하는것이 필수적이다. 특정 mRNA를 정량측정하는데 있어 Northern blot나 slot blot이 흔히 활용되고 있으며 이 방법

들은 특정 RNA의 크기를 결정할 수 있고 10pg이상 시는 정량측정이 가능하나 그 이하의 소량의 RNA를 blot하였을 시 소실될 수 있는 문제점과 함께 RNA 시료에 DNA가 오염되면 결과를 오판할 수 있는 단점이 지적되고 있으며, 한꺼번에 많은 시료들을 동시에 측정하기가 불가능하다. 그밖에 S1-mapping기법이 이용될 수 있으나 난잡하고 지루한 검사법이어서 일반적인 RNA의 정량측정방법으로 보편적으로 사용되지 못하고 있다. 이들 모두의 방법들은 특정시료들의 정량측정을 위하여 실험때마다 반드시 사전에 독자적으로 단계적인 회석농도에서의 RNA표준곡선을 결정해야 한다.

Filter hybridization이나 solution hybridization 방법들은 Northern blot나 slot blot에 비하여 신속하며 재현성이 높고 소량의 RNA를 측정할 수 있으며 한꺼번에 많은 시료들을 동시에 측정하는것이 가능하다¹⁶⁻²⁰.

이에 저자들은 쥐를 대상으로 하여 SP-C mRNA를 filter hybridization과 solution hybridization 방법으로 각각 정량측정하여 방법론에 따른 분자생물학적 정도관리에 대한 관찰을 하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. RNA의 Transcription System

Riboprobe[®] (Promega, Madison, WI) Gemini System을 이용하여 시행하였는데 이 system은 500u의 SP6 RNA polymerase, 500u의 T7 RNA polymerase, 20 μ g의 pGEM[®]-3Z plasmid DNA, 20 μ g의 pGEM[®]-4Z plasmid DNA, 5 μ g의 Riboprobe Gemini positive control template, 및 박테리아균주 JM 109으로 구성되어 있다. pGEM plasmid들은 세균과 지 SP6와 T7 RNA polymerase promoter를 포함하고 있는 cloning 매개물(vector)들이다. 매개물들은 lac α -peptide를 포함하고 있다. 원하는 DNA의

삽입(insert)을 clone한 후 양쪽 DNA외가닥으로부터 사용한 polymerase에 따라 RNA의 선택적인 합성을 유도할 수 있고, 전사반응에 있어 template로 plasmid DNA를 사용하여 균질의 RNA를 얻을 수 있다. 삽입DNA의 염기서열만을 전사하려면 plasmid를 전사반응전 적절한 제한부위에서 직선으로 만든 다음 분리된 run-off 전사체만을 얻었다. RNA의 분리는 Chomczynski와 Sacchi²¹ 방법으로 총 RNA를 solution D의 균등액으로 부터 분리하였다. Ethidium bromide로 염색한 alkaline formaldehyde/agarose denaturing gel에 5-10 μ g의 RNA를 전기영동시켜 전사체의 균질성 및 전체 길이와 크기를 확인하였다.

2. RNA Hybridization Assay

A) Solution Hybridization Assay

SP-C의 surfactant단백의 complementary DNA (cDNA)에 대한 완전한 coding부위는 Gem 4Z에 각각 subclone 하였다. Anti-sense나 sense 전사체는 SP6 RNA polymerase를 이용하여 얻었다. 전사 반응으로부터 산출물은 linealized vector microgram (μ g)당 전체 길이가 40 μ g/ml의 전사체였다 (Fig. 1).

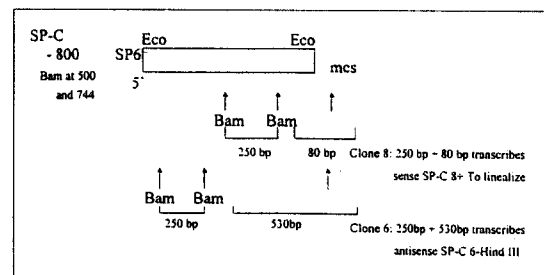


Fig. 1. Diagram of designed SP-C sense and anti-sense cDNA

The size of SP-C cDNA is 800 base pairs. Sense SP-C mRNA is 250 plus 80 base pairs by Bam transcribes.

Antisense SP-C mRNA is 250 plus 530 base pairs by Bam transcribes.

Table 1. Set-up for SP-C sense mRNA transcript standard curve employing solution hybridization

Test tube No.	+ Strand message(pg)	Sample	0.1×SET($\mu\ell$)
1,2,3	0		10
4,5,6	3	$3\mu\ell \times 1\text{pg}/\mu\ell$	7
7,8,9	10	$10\mu\ell \times 1\text{pg}/\mu\ell$	0
10,11,12	15	$1.5\mu\ell \times 10\text{pg}/\mu\ell$	8.5
13,14,15	30	$3\mu\ell \times 10\text{pg}/\mu\ell$	7
16,17,18	100	$10\mu\ell \times 10\text{pg}/\mu\ell$	0
19,20,21	No RNase		10

SP-C mRNA transcript input 0 to 100 pg was added to the microfuge tubes in a total volume of $10\mu\ell$ by adding $0.1 \times \text{SET}$ buffer.

Sense전사체를 spectrophotometry 260 nanometer에서 정량하여 표준곡선을 얻기 위해 3장의 glass microfibre filter(GF/C 2.5 cm in diameter, Whatman)들에 input한 SP-C sense mRNA의 양은 0, 3, 10, 15, 30 및 100pg씩이었고, 총량이 각각 $10\mu\ell$ 가 되도록 DEPC으로 전처치한 $0.1 \times \text{SET}$ 용액(0.1% SDS, 1mM Tris pH 7.5, 0.5 mM EDTA)을 첨가시켰다. 다음 excess RNase A 및 T1을 포함한 1 ml 용액으로 희석시켰다(Table 1). Hybrid는 RNase A와 T1의 소화에 저항하였다. 5x hybridization 완충용액(3M NaCl, 50mM Tris pH 7.5, 20mM EDTA, 모든시약은 DEPC로 전처치함)과 formamide를 1:2의 비율로 섞은 용액과 전사체의 매개물을 이용하여 SP-C cDNA를 ^{35}S 로 표지시킨 anti-sense전사체 탐지자의 혼합물을 $20\mu\ell$ 씩 각각을 첨가시켜 각 튜브당 5,000cpm의 탐지자가 균일하게 들어가도록 하였다. 각 튜브에 한방울씩의 paraffin oil을 가한 뒤 교반하여 1-3초동안 원심분리한 후, 68°C 에서 16시간 동안 유전자 재결합 반응을 일으켰다. 수확하기 위해 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 carrier DNA, $2\mu\text{g}$ RNase T1, $30\mu\text{g}$ RNase A, 1x hybridization 완충용액으로 구성된 혼합액 1ml씩을 각 튜브에 넣은 다음 교반하여 37°C 에서 45분간 잠복시켰다. 그 다음 100% trichloroacetic acid(TCA) $100\mu\ell$ 씩을 첨가하고 교반시켜 RNase 반응을 종식시켰다. 냉각

시킨 3% TCA와 95% ethanol로 세척후 진공하에 Whatmann GF/C위로 통과 시켰다. TCA 침전으로 filter에 모아진 SP-C mRNA에 대하여 scintillation으로 측정하여 정량하였다. 배후방사량의 검정을 위해서 ^{35}S 로 표지시킨 anti-sense전사체 탐지자와 멸균증류수를 섞어 유전자 재결합 반응을 일으키고, 나머지 전 과정은 상기실험과정과 동일하게 대조실험을 동시에 실시하였다. 특이성 검정은 RNase처리과 정만 거치지 않고 나머지 과정은 동일하게 상기실험과 동시에 대조 실험을 실시하였다.

B) Filter Hybridization Assay

Filter hybridization방법으로 쥐의 SP-C의 surfactant단백의 cDNA에 대한 완전한 coding부위를 Gem 4Z에 각각 subclone 하였다. Anti-sense나 sense 전사체를 SP6 RNA polymerase를 이용하여 얻었다. 전사반응으로부터 산출물은 linealized vector μg 당 전체 길이가 20-30 μg 의 전사체였다.

0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5.0 ng의 sense 전사체와 1 g의 RNA를 65°C 에서 10-15분 denature후 3장의 13 mm nitrocellulose filter ($0.45\mu\text{m}$ in pore size, Schleicher and Schuell, Keene, N.H.)에 $10\times$ standard saline citrate (SSC)/ 50% formaldehyde을 $20\mu\ell$ 씩 가하였다. Filter들을 80°C 에서 2시간 구워낸 후 1 M sodium chloride, 10%

Table 2. Quantitation for SP-C mRNA sense transcript after solution hybridization employing anti-sense cDNA probe

Test tube No.	Sense mRNA input(pg)	SP-C mRNA(CPM/Filter)
1,2,3	0	213, 263, 213
4,5,6	3	226, 242, 288
7,8,9	10	359, 266, 318
10,11,12	15	374, 353, 357
13,14,15	30	470, 441, 415
16,17,18	100	872, 862, 925
19,20,21	No RNase	1478, 1493, 1329

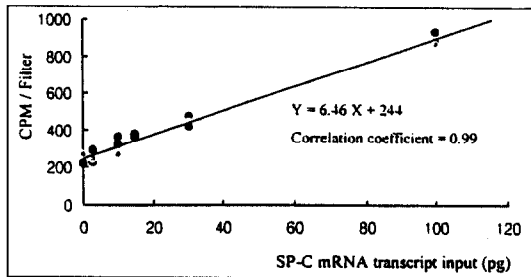


Fig. 2. Standard curve for SP-C mRNA transcript input

dextran sulfate, 50% formamide, 1% sodium dodecyl sulfate(SDS)을 포함하는 prehybridization 용액을 filter당 0.2-0.5 cc 양으로 56℃에서 12-14 시간 50 cc Falcon centrifuge tube 내에서 흔들면서 prehybridization 하였다. Prehybridization 후 4x SSC, 1x Denhardt's solution, 45% formamide, 10% dextran sulfate, 0.5% SDS, 0.1mg/ml salmon sperm DNA의 용액을 filter당 0.2-0.5 cc 가한 후 특이 활성도가 5×10^6 cpm/ml인 ^{32}P 로 표지시킨 쥐의 특이 cDNA probe로 56℃에서 흔들면서 17-20 시간 동안 hybridization 하였다. 모든 filter는 실온에서 2x SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번, 65℃에서 0.1x SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번 세척하였다. Filter는 공기 중에 말린 후 scintillation vial로 각각 계산하였다.

3. 성적 분석

표준 곡선을 구하기 위하여 회귀방정식(regression equation) 및 상관계수를 Epistat 통계처리를 사용하여 산출하였다.

결 과

1. Solution Hybridization Assay에 의한 SP-C에 대한 sense 전사체의 표준곡선

본 연구결과 SP-C sense mRNA input가 전혀 없는 3개의 튜브에서 방사성 동위원소로 표지시킨 SP-C anti-sense cDNA의 배후방사능은 213내지 263 cpm으로 검출되었다(Table 2). 또한 SP-C sense mRNA input양이 3pg인 경우 226내지 288 cpm으로 검출되었고, input양이 10pg인 경우 266내지 359 cpm 이었다. Input양이 15pg이상인 경우 모두 353 cpm이상으로 정량되었고, 30, 100pg으로 증가할수록 정량수치가 증가되었다. 이와같은 결과로 solution hybridization방법에 의한 SP-C mRNA의 정량측정을 위한 RNA 검체물의 최소량은 3pg 이상이었다.

배후 방사량의 검정을 위하여 방사성 동위원소로 표지시킨 SP-C anti-sense cDNA 탐지자와 멸균 증류

Table 3. Quantitation for SP-C mRNA sense transcript after filter hybridization employing anti-sense cDNA probe

Test tube No.	Sense mRNA input(ng)	SP-C mRNA(CPM/Filter)
1,2,3	0	155, 168, 181
4,5,6	0.1	432, 373, 462
7,8,9	0.5	1399, 1202, 1698
10,11,12	1.0	3111, 2926, 2569
13,14,15	2.5	8113, 6328, 7365
16,17,18	5.0	12431, 12384, 13544

수로 solution hybridization을 실시한 튜브에서는 229.7cpm으로 검출되었다. Solution hybridization 과정에서 RNase처리를 실시하지 않았던 대조 실험에서는 3개의 튜브 모두가 1,329 cpm이상을 나타내어서 방사성 동위원소로 표지된 SP-C anti-sense cDNA 탐지자의 특이성을 잘 입증할 수 있었다. Solution hybridization에 쓰이는 SP-C sense mRNA input양과 유전자 재결합반응 실험결과로 나타난 방사능 측정치 cpm과의 표준곡선은 $Y = 6.46 X + 244$ ($X = \text{SP-C mRNA 전사체}$, $Y = \text{CPM}$)였고, 양자간의 상관계수 r 은 0.99로 매우 밀접한 상관성을 보였다(Fig. 2).

2. Filter Hybridization Assay에 의한 SP-C에 대한 sense 전사체의 표준곡선

SP-C anti-sense cDNA의 배후 방사능은 155내지 181 cpm으로 검출되었다. SP-C sense mRNA input양이 0.1 ng인 경우 373내지 462 cpm으로 검출되었고, input양이 0.5 ng인 경우 1202 cpm이상으로 정량되었고, input양을 1, 2.5 및 5ng으로 증가할수록 정량수치가 각각 증가되었다. 이와같은 결과로 filter hybridization방법에 의한 SP-C mRNA의 정량측정을 위한 RNA검체물의 최소량은 0.1ng 이상이었다(Table 3). SP-C의 sense 전사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5 ng에 대한 cpm과의 표준곡선은 $Y = 2541.6 X + 252.7$ ($X = \text{SP-C mRNA 전사체}$,

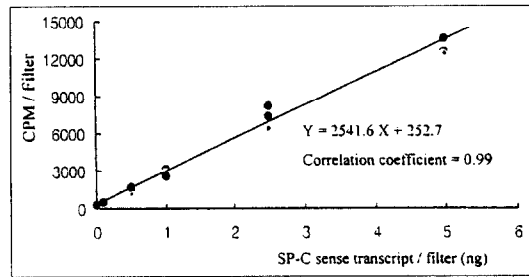


Fig. 3. Standard curve for SP-C mRNA transcript input

$Y = \text{CPM}$)이고 상관계수 r 은 0.99로 매우 밀접한 상관성을 보였다(Fig. 3).

고 찰

RNA는 분해에 아주 예민하므로 실험전 glassware을 깨끗이 세심하게 씻어야 하고 ribonuclease가 많이 존재하는 맨손으로 용기들을 만지지 말아야 한다. Diethyl pyrocarbonate을 1 L의 물에 2방울(0.2%) 가한 다음 30분동안 끓인다. 그 다음 glassware을 말린다. 중금속이온들 역시 RNA를 붕괴 변질시킬 수 있으므로 chelex resin(BioRad)용액에 여과함으로써 제거할 수 있다.

Poly(A)+mRNA 원형에 대한 cDNA를 합성하기 위해 역전사 효소를 사용할 경우, 특정 cDNA 분자의 상대 농도는 동량의 mRNA 분자의 농도를 반영한다. RNA시료가 동일 농도내 수많은 다른 분자

량의 mRNA로 구성되어 있다면, R_0T 1/2에 의하여 측정된 복합체는 길이가 서로 다른 mRNA분자의 총합으로 간주한다. 일단 역동학적 표준이 얻어진다면 cDNA와 순도의 mRNA의 유전자 재결합 반응은 염기서열 복합체와 순도의 SP-C mRNA를 정량측정 하는데 사용될 수 있다.

SP6 plasmid와 같은 특별히 조립된 재조합 plasmid로부터 시험관 내에서 대량의 RNA를 합성할 수 있다. 1 μ g template로부터 10 μ g까지 대량의 전사체를 생산할 수 있다. 이 탐지자는 저 복합체를 갖기 때문에 용액내 경쟁하는 재조합 반응은 없다. 또한 탐지자의 고품이성을 본래대로 유지할 수 있다. 본 실험에서는 Promega사의 Riboprobe Gemini System을 이용하였다.

Durnam과 Palmiter¹⁸이 개발한 solution hybridization방법은 총 핵산분리로부터 24시간내 0.5 pg의 RNA도 측정할 수 있을 뿐만 아니라 이중쇄의 cDNA탐지자로 mRNA를 검출할 수 있고 여타의 RNA나 DNA오염에 영향을 받지 않는 이점이 있다. 일반적으로 대량의 mRNA/cDNA를 필요로 하지 않는 경우엔 cDNA의 양을 고정 시킨 후 여러가지 RNA를 반응시킨다. 유전자 재결합 반응을 일으키는 cDNA의 분획은 본 연구에서처럼 RNA/cDNA의 비로서 그래프화 할 수 있다. 역전사효소를 사용하여 조제하고 방사성 동위원소로 표지시킨 탐지자 cDNA를 이용, mRNA와의 유전자 재결합반응 조건하에서의 동태와 시간 추이를 비교 파악할 수 있는 것이다. 유전자 재결합 반응 후, 재결합을 이룬 cDNA의 양은 nuclease S₁으로 unhybrid를 제거한 다음 TCA의 침강반응에 의하여 정량화 된다. 전체 RNA에 대한 정상 mRNA의 함량은 sense전사체를 이용한 표준곡선을 이용하여 얻을 수 있다. 이와같이 cpm치가 각 filter에 부하된 RNA와 관련하여 직선관계가 성립되고, hybridization이 특이하다면 미시시료의 filter당 cpm을 각각 비교함으로써 상대량을 평가할 수 있다. Solution hybridization방법은 DNA를 변성시키지 않으므로 DNA를 방해하지 않는 이점이 있는

반면 filter hybridization방법은 변성하여 구워내기 때문에 문제가 될 수 있다¹⁸. 이 방법으로 세포당 1 molecule미만으로 존재하는 mRNA를 측정하는데도 이용할 수 있다^{22, 23}.

본 연구에서 사용한 filter hybridization방법은 Northern blot이나 slot blot보다 소량의 변화에도 예민하고 재현성이 높을 뿐 아니라 방법에 있어서도 용이하다. 본 실험에서 사용한 각 nitrocellulose filter는 80 μ g/cm²량의 RNA와 결합할 수 있고 많은 시료들을 한꺼번에 시행할 수 있다. 그러나 nitrocellulose filter는 잘 부서지고 떨어뜨리기 쉽기 때문에 조심스럽게 다루어야 한다¹⁹. 반면 nylon filter는 nitrocellulose filter보다 유연하고 다루기 쉽고 붕괴되지 않고 무한정 사용할 수 있다는 장점이 있다. 효율적인 면에 있어서도 nitrocellulose filter만큼 효율적이다. Nitrocellulose filter의 종류는 membrane filters BA85, Millipore filter, Sartorius filter, Hybond C filter, GeneScreen 및 GeneScreen+ hybridization transfer membrane, Biotransfer membrane, Hybond-N membrane등이 있으며, 새로운 filter들이 계속 개발되고 있다¹⁹. 본 실험의 solution hybridization방법에는 3장의 2.5 cm glass microfibre filters(GF/C, Whatman)을, filter hybridization방법에는 3장의 13mm nitrocellulose filter(0.45 μ m in pore size, Schleicher and Schuell, Keene NH.)을 각각 사용하였다.

핵산이 filter에 결합하기 위하여서는 변성(denaturation)되어야 한다. 모든 종류의 filter에 균등하게 적용시킬 수 있는 고정(immobilization)과정은 현재까지는 없다. 고정에 있어 nitrocellulose filter나 Biotransfer nylon membrane에 DNA나 RNA의 정량적인 결합을 위하여서는 높은 이온농도가 필요하며, 낮은 이온농도에서는 결합능이 감소한다²⁴⁻²⁶. 반면, GeneScreen nylon membrane은 DNA나 RNA에 결합을 위하여서는 낮은 이온농도가 필요하고, 결합능은 높은 염농도에서는 빈약하다.

Hybridization과정은 prehybridization, 탐지자에

의한 hybridization, 세척(washing)의 세단계로 구분할 수 있다. Prehybridization시 용액에 잠복시켜 탐지자가 비특이적으로 결합할 수 있는 부위에 미리 피막을 입힌다. 만약 이 과정의 부진시에는 고배후방 사선량(background noisy)을 초래할 수 있다. 본 실험에서 solution hybridization에서 SP-C sense mRNA의 양은 0, 3, 10, 15, 30 및 100pg씩이었고, 총량이 각각 10 μ l 가 되도록 0.1x SET용액을 첨가시켰다. 다음 excess RNase A 및 T1을 포함한 1 ml 용액으로 희석시켰다. Hybrid는 RNase A와 T1의 소화에 저항하였다. 5x hybridization 완충용액과 formamide를 1 : 2의 비율로 섞은 용액과 전사체의 매개물을 이용하여 SP-C cDNA를 ³⁵S로 표지시킨 anti-sense전사체 탐지자의 혼합물을 20 μ l 씩 각각을 첨가시켜 각 튜브당 5,000 cpm의 탐지자가 균일하게 들어가도록 하였다. 각 튜브에 한방울씩의 paraffin oil을 가한 뒤 교반하여 1-3초동안 원심부리한 후, 68℃에서 16시간 동안 유전자 재결합 반응을 일으켰다. 수확하기 위해 100 μ g/ml의 carrier DNA, 2 μ gRNase T1, 30 μ g RNase A, 1x hybridization 완충용액으로 구성된 혼합액 1ml씩을 각 튜브에 넣은 다음 교반하여 37℃에서 45분간 잠복시켰다. 그 다음 100% TCA 100 μ l 씩을 첨가하고 교반시켜 RNase 반응을 종식시켰다. 본 연구에서 solution hybridization방법에 의한 SP-C mRNA의 정량측정을 위한 RNA검체물의 최소량은 3pg 이상이었다. Solution hybridization에 쓰이는 SP-C sense mRNA input양과 유전자 재결합반응 실험결과로 나타난 방사능 측정치 cpm과의 표준곡선은 $Y=6.46X+244$ ($Y=cpm$, $X=SP-C\ mRNA$)였고, 양자간의 상관계수는 0.99로 매우 밀접한 상관성을 보여 매우 예민한 검사법임을 입증한다. Filter hybridization에서는 NaCl, dextran sulfate, 50% formamide, 1% SDS들을 포함한 prehybridization 용액을 사용하였고, filter당 0.2-0.5 cc의 양으로 56℃에서 12-14시간 동안 50 cc Falcon centrifuge tube내에서 흔들면서 시행하였다. Prehybridization

이나 hybridization에 사용하는 용액은 prehybridization이나 hybridization에 필요한 온도로 미리 덩혀 놓아야 한다. Filter hybridization은 filter에 탐지자의 확산과 filter에 hybridization의 두가지 과정을 거친다. Filter에 결합된 핵산 염기서열의 농도가 낮으면, hybridization반응 자체는 속도를 제한하는 단계이고, 농도가 높으면 filter에 결합하는 탐지자의 확산에 의하여 제한된다. Filter hybridization의 속도는 filter에 결합된 적은량의 핵산에 대한 복합체비에 역비례한다. Filter에 결합된 핵산에 대한 용액내 변성된 핵산 탐지자의 hybridization은 용액내 염기서열의 재조합반응과 filter에 결합된 RNA hybridization의 경쟁반응이다. Filter hybridization방법에 의한 SP-C mRNA의 정량측정을 위한 RNA검체물의 최소량은 0.1ng 이상이었다. SP-C의 sense 복사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5 ng에 대한 cpm과의 표준곡선은 $Y=2541.6X+252.7$ ($X=SP-C\ mRNA\ 전사체$, $Y=CPM$)이고 상관계수는 0.99로 매우 밀접한 상관성을 보였다.

RNA는 single-strand이지만 filter에 효과적으로 결합하기 위하여서는 변성되어야하는 double-strand 부위를 포함한다. RNA변성을 위해서는 열이나 glyoxal, methyl mercuric hydroxide, formaldehyde, dimethyl sulphoxide(DMSO) 제제들을 일반적으로 사용한다^{27, 28}. Methyl mercuric hydroxide와 formaldehyde는 독성이 있고, DMSO는 nitrocellulose filter를 용해시킨다. Glyoxal을 변성제로 이용하는데 중합억제제를 포함하는 40% 용액(6.89M)으로 시판되고 있으며, 탈이온화(deionization)시켜 사용하고 있다.

³²P는 고에너지이고 짧은 scintillation 측정시간과 autoradiography의 노출시간등의 장점이 있다. Filter hybridization이나 solution hybridization에 이용된다. 본실험에서도 filter hybridization에는 ³²P, solution hybridization에는 ³⁵S를 각각 사용하였다. 보통 표지는 핵산내 ³⁵S나 ³²P를 첨가함으로써 핵산염의 부분을 교체할 수 있다. ³²P는 방사선 방출 때문에

다루는데 주의를 요한다. 반면 ^{35}S 의 베타입자는 피부층을 거의 통과할 수 없으므로 외부 해는 없다. ^{32}P 의 반감기가 14.3일, ^{35}S 는 87.4일이기 때문에 반감기에 맞추어서 실험을 시행하여야 한다. Filter hybridization의 속도에 영향을 주는 요소들 중 탐지자의 농도가 중요한데 single strand 탐지자인 경우 filter에 hybridization의 속도와 형성된 hybrid양은 용액내 핵산 탐지자의 농도의 증가와 함께 증가되어야 한다. 초기의 hybridization의 속도는 용액내 핵산 탐지자의 농도와 비례한다. Input DNA 탐지자의 20-30%는 재조합반응 때문에 hybridization을 위하여 이용할 수 없다²⁹. Filter에 결합된 염기서열에 hybridization할 수 있는 single strand 부위에 탐지자가 부분적으로 재조합된 이중 사슬을 형성한다. ^{32}P 가 표지된 탐지자를 ml당 100ng 이상 사용시 filter내 불가역적인 비특이적 결합반응이 일어난다. 본 실험에서는 solution hybridization에서는 SP-C cDNA를 ^{35}S 로 표지시킨 anti-sense복사체 탐지자의 혼합물을 20 μl 씩 각각을 첨가시켜 각 튜브당 5,000cpm의 탐지자가 균일하게 들어가도록 하였다.

Filter hybridization에서는 특이 활성도가 5×10^6 cpm/ml인 ^{32}P 로 표지시킨 쥐의 특정한 cDNA를 표지자로 사용하였다. 비특이적 비가역적으로 결합할 수 있는 조합되지 않은 전구물질을 제거함으로써 고배후 방사선량을 방지할 수 있다. 배후 방사선량을 줄이기 위하여 poly(A)와 poly(C)를 사용한다. Double-strand 탐지자는 알칼리나 끓인 후 변성시켜 사용한다. Filter에 탐지자의 확산을 용이하게 하기 위하여 재결합반응보다 hybridization을 장려하기 위하여서는 크기가 작은 표지자를 사용하고, 소량의 반응용량, 용액내 표지자의 낮은농도, 반응온도를 고온으로 하여야 한다. 탐지자의 농도, 탐지자의 복합체, 탐지자의 분자량, 염기구성, 온도, formamide의 농도, 이온농도, dextran sulfate, 점성, pH등이 filter hybridization의 속도에 영향을 줄 수 있는 요소들이다. 또한 핵산의 염기구성이 hybridization속도에 영향을 준다. Hybridization은 여러 가지 요소들에 의해 영향

을 받을 수 있다. G+C%가 증가하면 hybridization속도 역시 증가한다. 온도가 상승함에 따라 속도는 증가하며, DNA-DNA annealing을 위한 용해 온도 20-25 $^{\circ}\text{C}$ 이하에서 속도는 극적으로 증가한다. Well-matched hybrid에서 hybridization반응은 용액내에서 68 $^{\circ}\text{C}$ 에서, 50% formamide의 용액내에서는 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 시행된다.

일반적으로 유전자 반응 속도는 RNA길이의 제곱근에 비례한다고 한다³⁰. 핵산의 염기구성은 RNA-DNA 유전자 재결합 반응에 거의 영향을 미치지 않는다. 이온 농도는 유전자 재결합 반응 과정에 영향을 미칠 수 있는 바, NaCl농도를 0.2M에서 1.5M로 증가 시키면 phage T₂ RNA나 T₂ DNA의 유전자 재결합 반응 속도를 5-6배 증가시켜 준다³¹.

Dextran sulfate는 filter에서 DNA 결합반응을 촉진 시키며, 또한 DNA나 RNA 탐지자 농도를 증가시킨다^{32, 33}. Dextran은 점성이고 다루기가 어렵고, 고배후방사선량을 초래할 수 있다. 용액의 점성이 증가되면 hybridization농도가 감소한다. 본 실험에서는 10% dextran 용액을 hybridization을 위하여 사용하였다. pH는 5-9가 적절하고, 0.4M 염농도에서 hybridization속도는 pH와 무관하다. Formamide는 유전자 재결합 반응 온도를 낮출 목적으로 흔하게 이용된다. Filter에 결합된 DNA와 RNA의 유전자 재결합 반응은 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 50% formamide 존재하에 6시간내에 시행하는 것이 가장 이상적이다. 저온과 짧은 반응시간이 mRNA의 파괴를 극소화시킬 수 있다. 불충분한 formamide을 사용할 경우 유전자 재결합반응시 RNA의 파괴를 초래할 수 있어 각별한 주의를 요한다. DNA의 부정합(mis-matching)은 용해온도를 15 $^{\circ}\text{C}$ 로 감소시켜 reannealing속도를 감소시킨다. RNA-DNA hybridization의 최대 속도는 hybrid의 용해 온도가 10-15 $^{\circ}\text{C}$ 이하인 경우에 나타난다. RNA-DNA hybridization속도는 phenol aqueous emulsion 존재하에서 50-100배까지 증가될 수 있다³⁴.

Formamide는 핵산 hybrid의 용해온도를 낮추는데 30-50%의 formamide을 유지하면 잠복온도를

30-42℃로 낮출 수 있다. 저온에서 탐지자는 더 안정되며 nitrocellulose filter에 비공유 결합 핵산을 보유하는데 더 좋고 filter 자체도 저온도에서 붕괴되지 않는다. 30-50% formamide 농도는 filter hybridization 속도에는 아무 영향을 주지 않지만 20% formamide 농도시는 약 33.3%의 속도감소가 있다^{35, 36}. 본 실험에서는 56℃의 45% formamide 용액에서 hybridization을 시행하였다. Solution hybridization 방법에서는 68℃의 66.6%의 formamide 용액에서 16시간 동안 유전자 결합 반응을 일으켰다. 저온 농도시 핵산은 매우 천천히 hybridization되고 이온 농도가 증가되면 반응은 증가한다. 0.1M 이하의 저염 농도시 농도를 2배 증가시키면 hybridization 속도는 5-10배 증가된다^{32, 37}.

세척은 well-matched hybrid를 위해 용해 온도 5-20℃ 이하에서 시행되는데 실제로는 65-70℃에서 시행하며 반드시 흔들면서 시행되어야 한다. Solution hybridization에서는 냉각시킨 3% TCA와 95% ethanol로 세척 후 진공하에 Whatmann GF/C 위로 통과 시켰다. TCA 침전으로 filter에 모아진 SP-C mRNA를 scintillation으로 측정하여 정량하였다. Filter hybridization에서는 짝짓지 못한 loop와 single strand 탐지자 trail을 제거하기 위하여 본 실험에서는 RNase A와 T1 RNase로 filter를 처리한 후 37℃에서 2x SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번, 최종 실온에서 2x SSC 용액으로 세척하였다. 세척도 반드시 흔들면서 시행하여야 한다^{38, 39}. 이와같이 유전자 재결합 반응은 여러 가지 조건들에 따라 영향을 받기 때문에 매 실험 때마다 정도관리는 매우 중요한 필수 사항이다¹⁹.

본 연구에 이용한 solution hybridization과 filter hybridization 방법들 모두 sense mRNA를 이용하여 표준곡선을 얻는 동일과정으로 매 실험 때마다 동시에 정도관리를 겸한 검색을 실시함으로써 방사성 동위원소로 표지된 anti-sense cDNA가 결합하고 있는 표적 mRNA 양을 cpm으로 정량 측정하면 그 동일과정 하에서 구한 표준곡선으로 부터 함량 미지 시료의

mRNA 양을 정량 측정할 수 있다. 뿐만 아니라, 극미량의 정량 측정에 있어 정확성을 기할 수 있다.

결론적으로 solution hybridization 방법은 다른 방법에 비해 RNA input 양을 아주 소량 사용하면서도, 주위에 높은 배후 방사성 산란을 보이는 비특이성 DNA가 있음에도 불구하고 특정 시료의 양이 한정되어 있는 상황에서 RNA를 분석 검토하는데 매우 유용한 연구 방법임을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 filter hybridization 방법은 mRNA를 정량 측정하는데 있어서 신속하고 재현성이 높으며, 한꺼번에 많은 시료들을 시행할 수 있고, 시료의 mRNA를 정량 측정하는데 있어서 유용한 방법이다.

요 약

연구 배경 :

Filter hybridization이나 solution hybridization 방법들은 Northern blot나 slot blot에 비하여 빠르며 재현성이 높고 소량의 RNA를 측정할 수 있으며 한꺼번에 많은 시료들을 동시에 측정하는 것이 가능하다.

방 법 :

저자들은 쥐를 대상으로 하여 SP-C mRNA를 filter hybridization과 solution hybridization 방법들로 각각 정량 측정하여 방법론에 따른 분자 생물학적 정도관리에 대한 관찰을 하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

결 과 :

1) Solution hybridization 방법에 의한 SP-C mRNA의 정량 측정을 위한 RNA 검체물의 최소량은 3pg 이상이었다. 2) Solution hybridization에 쓰이는 SP-C sense mRNA input 양과 유전자 재결합 반응 실험 결과로 나타난 방사능 측정치 cpm과의 표준곡선은 $Y = 6.46X + 244$ ($X = \text{SP-C mRNA 전사체}$, $Y = \text{cpm}$)였고, 양자간의 상관계수 r 은 0.99로 매우 밀접한 상관성을 보였다. 3) Filter hybridization 방법에 의한 SP-C mRNA의 정량 측정을 위한 RNA 검체물의 최소량은 0.1ng 이상이었다. 4) SP-C의 sense 전사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5 ng에 대한 cpm과

의 표준곡선은 $Y=2541.6 X+252.7$ ($X=SP-C$ mRNA 전사체, $Y=CPM$)이고 상관계수 r 은 0.99로 매우 밀접한 상관성을 보였다.

결 론 :

Solution hybridization 방법은 다른 방법에 비해 RNA input 양을 아주 소량 사용하면서도, 주위에 높은 배후 방사성 산란을 보이는 비특이성 DNA가 있음에도 불구하고 특정 시료의 양이 한정되어 있는 상황에서 RNA를 분석 검토하는데 매우 유용한 연구 방법이며, 뿐만 아니라 filter hybridization 방법은 mRNA를 정량 측정하는데 있어서 신속하고 재현성이 높으며, 한꺼번에 많은 시료들을 시행할 수 있고, 시료의 mRNA를 정량 측정 하는데 있어서 유용한 방법임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Hildebran JN, Goerke J, Clements JA. Surfactant release in excised rat lung is stimulated by air inflation. *J Appl Physiol* 1981;51:905-10.
- Wright JR, Clements JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:426-44.
- Caminiti SP. Surface tension and mechanical properties of the lung. *Sem Respir Crit Care Med* 1995;16:5-10.
- King RJ, Carmichael MC, Horowitz PM. Reassembly of lipid-protein complexes of pulmonary surfactant : proposed mechanism of interaction. *J Biol Chem* 1983;258:10672-80.
- King RJ. Lipid-protein interactions in surfactant studied by reassembly. *Exp Lung Res* 1984;6:237-53.
- Hawgood S, Benson BJ, Schilling J, Damm D, Clements JA, White RT. Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP-18 and evidence for cooperation between SP-18 and SP26-36 in surfactant lipid adsorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:66-70.
- King RJ, Klass DJ, Gikas EG, Clements JA. Isolation of apoproteins from canine surface active material. *Am J Physiol* 1973;224:788-95.
- Capro JD, Peters-Golden M, Marsh-Salin J, Shelburne JS. Pathologic changes in the lungs of oxygen-adapted rats : a morphometric analysis. *Lab Invest* 1978;39:640-53.
- Warr RG, Hawgood S, Buckley DI, Crisp TM, Schilling J, Benson BJ et al. Low molecular weight human pulmonary surfactant protein (SP5) : Isolation, characterization and cDNA and amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:7915-9.
- Glasser SW, Korfhagen TR, Weaver TE, Clark JC, Pilot-Matias T, Meuth J, et al. cDNA, deduced polypeptide structure and chromosomal assignment of human pulmonary surfactant proteolipid, SPL(pVal). *J Biol Chem* 1988;263:9-12.
- Whisett JA, Weaver TE, Clark JC, Sawtell N, Glasser SW, Korfhagen TR, et al. Glucocorticoid enhances surfactant proteolipid phe and pVal synthesis and RNA in fetal lung. *J Biol Chem* 1987;262:15618-23.
- Liley HG, White RT, Warr RG, Benson BJ, Hawgood S, Ballard P, et al. Regulation of messenger RNAs for the hydrophobic surfactant proteins in human lung. *J Clin Invest* 1989;83:1191-7.
- Pérez-Gil J, Nag K, Taneva S, Keough KM. Pulmonary surfactant protein SP-C causes packing rearrangements of dipalmitoylphosphatidylcholine in spread monolayers. *Biophys J* 1992;63:197-204.
- Häfner D, Beume R, Kilian U, Krasznai G, Lachmann B. Dose- response comparisons of five

- lung surfactant factor(LSF) preparations in an animal model of adult respiratory distress syndrome(ARDS). *Br J Pharmacol* 1995;115: 451-8.
15. Yu SH, Possmayer F. Reconstitution of surfactant activity by using the 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. *Biochem J* 1986;236:85-9.
16. Denhardt DT. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1966;23(5):641-6.
17. Warnaar SO, Cohen JA. A quantitative assay for DNA-DNA hybrids using membrane filters. *Biochem Biophys Res Commun* 1966;24(4):554-63.
18. Durnam DM, Palmiter RD. A practical approach for quantitating specific mRNAs by solution hybridization. *Anal Biochem* 1983;131:385-93.
19. Anderson MLM, Young BD. Chapter 4. Quantitative filter hybridisation. In : Hames BD and Higgins SJ, *Nucleic acid hybridisation*. 1st ed. Oxford : IRL Press.;1985, p.73-111.
20. Young BD, Anderson MLM. Chapter 3. Quantitative analysis of solution hybridisation. In : Hames BD and Higgins SJ, *Nucleic acid hybridisation*. 1st ed. Oxford : IRL Press.;1985, p.47-71.
21. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
22. Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R. Analysis of membrane and surface protein sequence with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* 1984;179:125-42.
23. Steffan RT, Atlas RM. Solution hybridization assay for detecting genetically engineered microorganisms in environmental samples. *BioTechniques* 1990;8:316-8.
24. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-17.
25. Nagamine Y, Sentenac A, Fromageot P. Selective blotting of restriction DNA fragments on nitrocellulose membranes at low salt concentrations. *Nucleic Acids Res* 1980;8:2453-60.
26. Meinkoth J & Wahl G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem* 1984;138:267-84.
27. Bailey JM, Davidson N. Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1976;70:75-85.
28. McMaster GK, Carmichael GG. Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74:4835-8.
29. Flavell RA, Birfielder EJ, Sanders JPM, Borst P. DNA-DNA hybridization on nitrocellulose filters. *Eur J Biochem* 1974;47:535-43.
30. Hutton JR, Wetmur JG. Renaturation of bacteriophage ϕ X174DNA-RNA hybrid : RNA length effect and nucleation rate constant. *J Mol Biol* 1973;77:495-500.
31. Nygaard AP, Hall BD. Formation and properties of RNA-DNA complexes. *J Mol Biol* 1964;9:125-42.
32. Wetmur JG, Davidson N. Kinetics of renaturation of DNA. *J Mol Biol* 1968;31:349-70.
33. Wahl GM, Stern M, Stark GR. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76:3683-7.
34. Kohne DE, Levison SA, Byers MJ. Room temper-

- ature method for increasing the rate of DNA reassociation by many thousandfold: the phenol emulsion reassociation technique. *Biochemistry* 1977;16:5329-41.
35. McConaughy BL, Laird CD, McCarthy BJ. Nucleic acid reassociation in formamide. *Biochemistry* 1969;8(8):3289-95.
36. Howley PM, Israel MA, Law M-F, Martin MA. A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs; evaluation of polyomavirus genomes. *J Biol Chem* 1979; 254:4876-83.
37. Britten RJ, Graham DE, Neufeld BR. Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. *Methods Enzymol* 1974;29:363-418.
38. Lasky LA, Lev Z, Xin J-H, Britten RJ, Davidson EH. Messenger RNA prevalence in sea urchin embryos measured with cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci* 1980;77:5317-21.
39. Xin J-H, Brandhorst BP, Britten RJ, Davidson EH. Cloned embryo mRNAs not detectably expressed in adult sea urchin coelomocytes. *Dev Biol* 1982; 89:527-31.
-