

□ 원 저 □

## Surfactant Protein A mRNA을 이용한 유전자 재결합 반응에서 비특이성 RNA의 첨가에 의한 특이성 검정

한양대학교 및 제주대학교\* 의과대학 내과학교실

김병철, 김미옥\*, 김태형, 손장원,  
윤호주, 신동호, 박성수

=Abstract=

### Assessment of the Specificity of A Hybridization of Surfactant Protein A by Addition of Non-specific Rat Spleen RNA

Byeong Cheol Kim, M.D., Mi Ok Kim, M.D.\*, Tae-Hyung Kim, M.D.,  
Jang Won Sohn, M.D., Ho Joo Yoon, M.D., Dong Ho Shin, M.D.,  
Sung Soo Park, M.D.

*Departments of Internal Medicine, Hanyang and Cheju\* Universities, College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background** : Nucleic acid hybridization has become an essential technique in the development of our understanding of gene structure and function. The quantitative analysis of hybridization has been used in the measurement of genome complexity and gene copy number. The filter hybridization assay is rapid, sensitive and can be used to measure RNAs complementary to any cloned DNA sequence.

**Methods** : The authors assessed the accuracy, linearity, correlation coefficient and specificity of the hybridization depending on the added dose(0, 1, 5, and 10  $\mu$ g) of non-specific rat spleen RNA to hybridization of surfactant protein A mRNA. Filter hybridization assays were used to obtain the equation of standard curve and thereby to quantitate the mRNA quantitation.

#### Results :

1. Standard curve equation of filter hybridization assay between counts per minute (X) and spleen RNA input (Y) was  $Y=0.13X-19.35$ . Correlation coefficient was 0.98.
2. Standard curve equation of filter hybridization assay between counts per minute (X) and surfactant protein A mRNA transcript input (Y) was  $Y=0.00066X-0.046$ . Correlation coefficient was 0.99.
3. Standard curve equation of filter hybridization assay between counts per minute (X) and surfactant protein A mRNA transcript input (Y) after the addition of 1  $\mu$ g spleen RNA was  $Y=0.00056X-0.051$ .

---

Address for correspondence :

**Sung Soo Park, M.D., Ph.D.**

Department of Internal Medicine, Hanyang University, College of Medicine,  
17 Haengdang-dong, Sungdong-ku, Seoul, 133-792, Korea

Phone : 02-2290-8347 Fax : 02-2298-9183 E-mail : parkss@hanyang.ac.kr

Correlation coefficient was 0.99.

4. Standard curve equation of filter hybridization assay between counts per minute (X) and surfactant protein A mRNA transcript input (Y) after the addition of 5  $\mu$ g spleen RNA was  $Y=0.00065X-0.088$ . Correlation coefficient was 0.99.

5. Standard curve equation of filter hybridization assay between counts per minute (X) and surfactant protein A mRNA transcript input (Y) after the addition of 10  $\mu$ g spleen RNA was  $Y=0.00051X-0.10$ . Correlation coefficient was 0.99.

**Conclusions** : Comparison of cpm/filter in a linear range allowed accurate and reproducible estimation of surfactant protein A mRNA copy number irrespective of the addition dosage of non-specific rat spleen RNA over the range 0-10  $\mu$ g. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2004, 56:393-404)

---

**Key words** : Hybridization, Non-specific RNA, Spleen..

## 서 론

유전자 발현을 연구분석함에 있어 complementary DNA(cDNA)탐색자와 유전자 재결합반응을 일으키는 특정 mRNA의 양을 정확히 측정하는 것이 필수적이다. 특정 mRNA를 정량측정하는데 있어 Northern blot나 slot blot이 흔히 활용되고 있으며 이 방법들은 특정 RNA의 크기를 결정할 수 있고 10 pg이상 시는 정량측정이 가능하나 그 이하의 소량의 RNA를 blot하였을 시 소실될 수 있는 문제점과 함께 RNA 시료에 DNA가 오염되면 결과를 오관할 수 있는 단점이 지적되고 있다. 또한 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 희석농도에서의 mRNA표준곡선을 결정해야 한다.

Filter hybridization방법은 Northern blot나 slot blot방법들에 비하여 신속하며 재현성이 높고 소량의 RNA를 측정할 수 있으며 한꺼번에 많은 시료

들을 동시에 측정하는것이 가능하다<sup>1-3</sup>.

이에 저자들은 쥐를 대상으로 하여 비특이성 RNA 즉 비장 RNA의 첨가가 SP-A의 유전자 재결합 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 filter hybridization방법과 SP-A mRNA를 이용하여 SP-A mRNA양과 cpm과의 연관성을 비특이성 RNA의 첨가에 따른 linearity, 상관계수 및 특이성을 따른 각각의 분자생물학적 정도관리에 대한 비교 관찰을 하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

## 재료와 방법

### 1. RNA의 Transcription System

Riboprobe<sup>®</sup>(Promega, Madison, WI) Gemini System을 이용하여 시행하였는데 이 system은 500 u의 SP6 RNA polymerase, 500 u의 T7 RNA polymerase, 20  $\mu$ g의 pGEM<sup>®</sup>-3Z plasmid DNA, 20  $\mu$ g의 pGEM<sup>®</sup>-4Z plasmid DNA, 5  $\mu$ g의 Riboprobe Gemini positive control template, 및 박테리아균주 JM 109으로 구성되어 있다. pGEM plasmid들은 세균과지 SP6와 T7 RNA polymerase promoter을 포함하고 있는 cloning 매개체들이다. 매

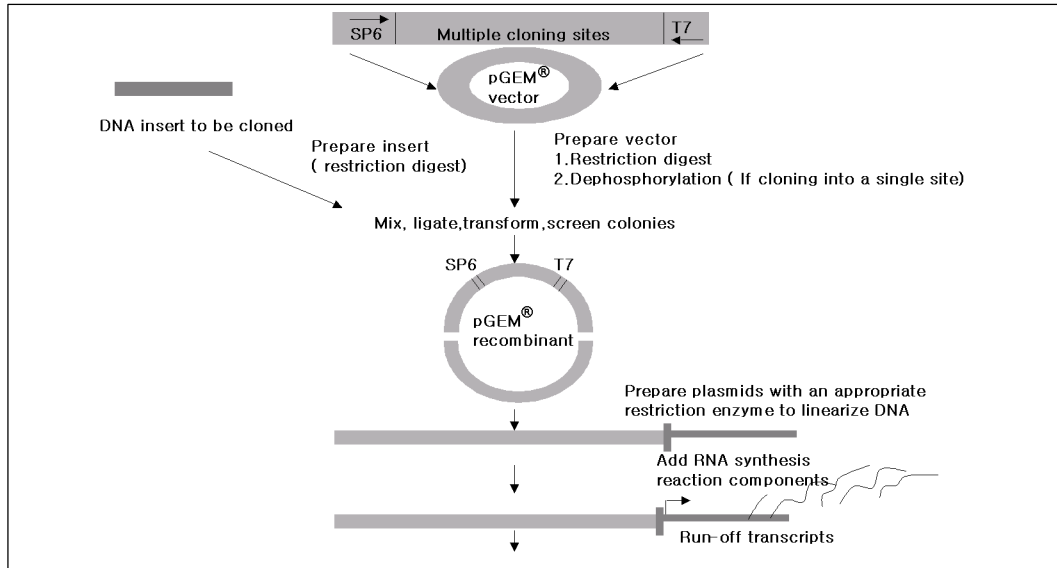


Fig. 1. Schematic of the Riboprobe Gemini system

개체들은 lac  $\alpha$ -peptide을 포함하고 있다. 원하는 DNA의 삽입을 clone한 후 양쪽 DNA 외가닥으로부터 사용한 polymerase에 따라 RNA의 선택적인 합성을 유도할 수 있고, 전사반응에 있어 template로 plasmid DNA를 사용하여 균질의 RNA를 얻을 수 있다. 삽입 DNA의 염기서열만을 전사하기 위해 plasmid를 전사반응 전 적절한 제한부위에서 직선으로 만든 다음 분리된 run-off 전사체만을 얻었다(Fig. 1).

## 2. RNA의 분리

Chomczynski와 Sacchi<sup>4</sup>의 방법으로 총 RNA를 solution D(4M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7, 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol)의 균등액으로부터 분리하였다. 즉 Eppendorf tube에 500  $\mu$ L의 solution D에 pH 4.0인 50  $\mu$ L 2 M sodium acetate를 가하여 산성화한 후 pH 7.5인 0.1 M Tris 및 pH 7.5인 10mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)로 완충한

후 phenol 500  $\mu$ L을 가하였다. 교반으로 잘 섞은 다음 chloroform과 isoamyl alcohol의 비가 49:1인 용액 100  $\mu$ L을 가한 후 다시 교반하였다. Eppendorf tube 내 이 혼합물을 15분 동안 얼음에 담근 후 10,000 G의 microfuge로 5분 동안 실온에서 원심하였다. Aqueous phase를 micropipette로 새로운 Eppendorf tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 가하여 RNA를 침강시켰다. 2시간 이상  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 잠복시킨 후, 10,000 G에서 5분 동안 원심하였다. 상층액을 가만이 따른 후 침전물을 150  $\mu$ L의 solution D에 녹인 후 침전물을  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 하룻밤동안 동량의 isopropanol로 재침전 시켰다. 5분 동안 10,000 G로 원심분리 후 침전물을 모은 다음 70% ethanol로 한차례 씻었다. 침전물을 건조한 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리한 1 mM EDTA pH 8로 다시 부유액을 만들었다. 분리한 RNA는 spectrophotometry의 260 nanometer에서 정량 측정하였다. RNA의 질은 ethidium bromide로 염색한 formaldehyde/agarose denaturing gel로 확인하여 붕괴 변질된 시료는 분석대상에서 제외

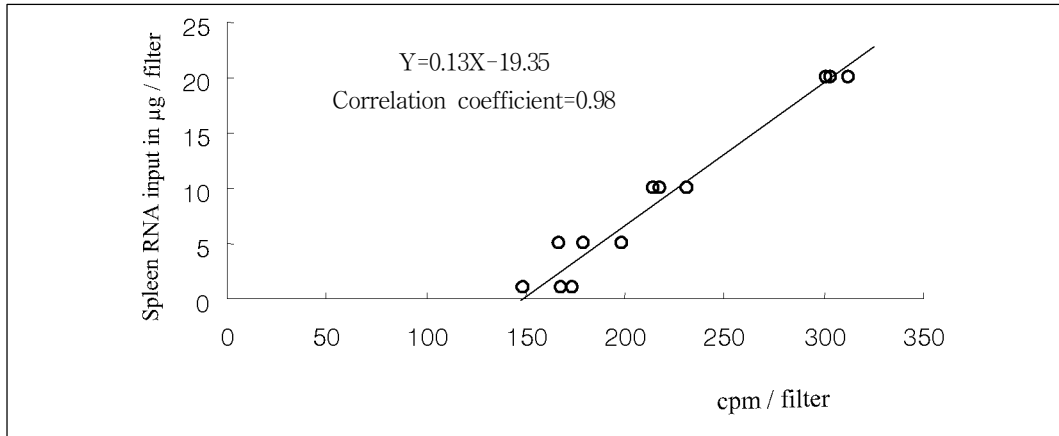


Fig. 2. Standard curve for spleen RNA input

시켰다.

### 3. Filter Hybridization Assay와 비장 RNA의 첨가

Filter hybridization 방법으로 쥐의 SP-A의 cDNA에 대한 완전한 coding 부위를 Gem 4Z에 subclone 하였다. Anti-sense나 sense 전사체를 SP6 RNA polymerase를 이용하여 얻었다. 전사반응으로부터 산출물은 linearized vector  $\mu$ 당 전체 길이가 20-30  $\mu$ 에 이르는 전사체였다.

SP-A의 표준곡선을 위하여 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5.0 ng의 sense 전사체와 SP-A에 대한 표준곡선을 위하여 0, 0.1, 0.5, 1 및 2.5 ng에 비특이성 RNA 즉 비장 RNA를 각각 1, 5 및 10  $\mu$ 를 첨가하였다. 그리고 비장 RNA input에 대한 표준곡선을 위하여 비장 RNA 0, 1, 5, 10 및 20  $\mu$ 를 65°C에서 10-15분 denature 후 3장의 13 mm nitro-cellulose filter(0.45  $\mu$  in pore size, Schleicher and Schuell, Keene, NH)에 10x standard saline citrate(SSC)/ 50% formaldehyde을 20  $\mu$ 씩 가하였다. Filter들을 80°C에서 2시간 구워낸 후 1 M

sodium chloride, 10% dextran sulfate, 50% formamide, 1% sodium dodecyl sulfate(SDS)을 포함하는 prehybridization 용액을 filter당 0.2-0.5 mL 양으로 56°C에서 12-14시간 동안 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 mL 가한 후 특이 활성도가  $5 \times 10^6$  cpm/mL인  $^{32}$ P로 표지시킨 쥐의 특이 cDNA 탐색자로 56°C에서 흔들면서 17-20 시간 동안 hybridization 하였다. 모든 filter는 실온에서 2x SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번, 65°C에서 0.1x SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번 세척하였다. Filter들은 공기 중에 말린 후 scintillation vial로 각각 계산하였다.

### 4. 성적 분석

표준 곡선을 구하기 위하여 회귀방정식 및 Spearman's Rank 상관계수를 Epistat 통계처리를 사용하여 산출하였다.

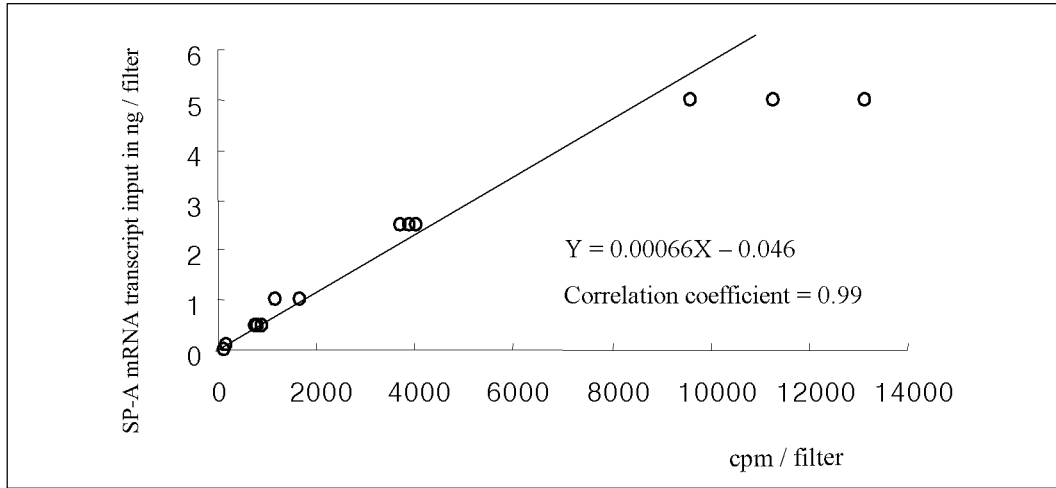


Fig. 3. Standard curve for SP-A mRNA transcript input

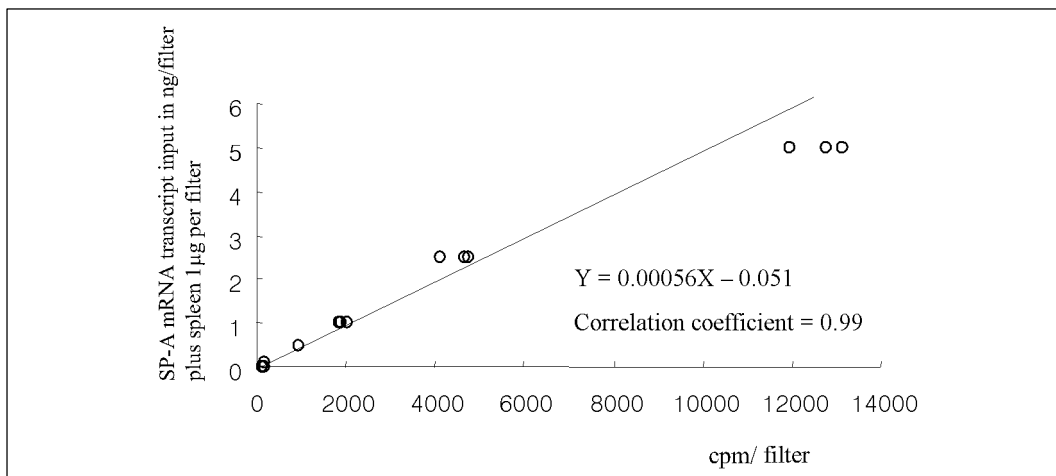


Fig. 4. Standard curve for SP-A mRNA transcript input plus spleen 1 µg per filter

## 결 과

이였다(Fig. 2).

### 1. Filter hybridization에 의한 Spleen RNA input에 대한 표준곡선

위의 비장 RNA 0, 1, 5, 10 및 20 µg에 대한 cpm과의 표준곡선 및 상관계수는  $Y=0.13X-19.35$  ( $X=$  cpm,  $Y=$  spleen RNA input)이고, 상관계수는 0.98

### 2. Filter hybridization에 의한 SP-A에 대한 sense 전사체의 표준곡선

SP-A sense 전사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5 ng에 대한 cpm과의 표준곡선 및 상관계수는  $Y=0.00066X-0.046$  ( $X=$  cpm,  $Y=$  SP-A mRNA 전사체)이고, 상관계

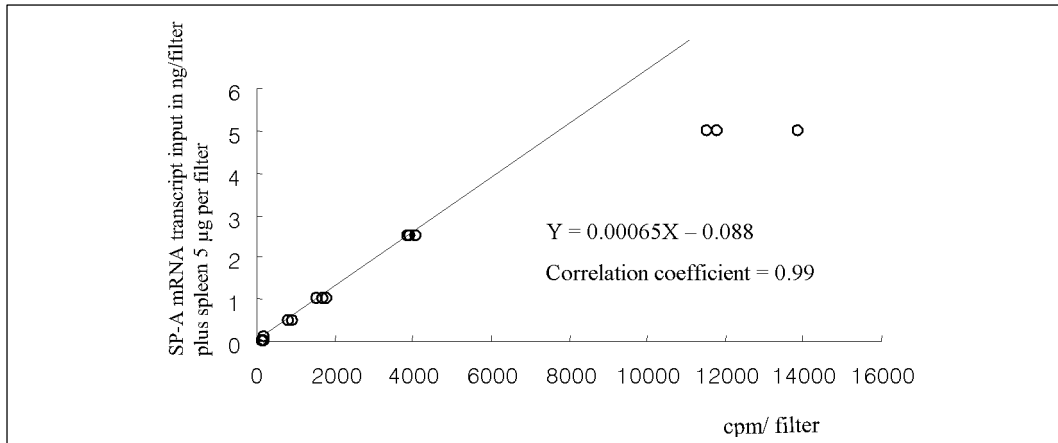


Fig. 5. Standard curve for SP-A mRNA transcript input plus spleen 5 µg per filter

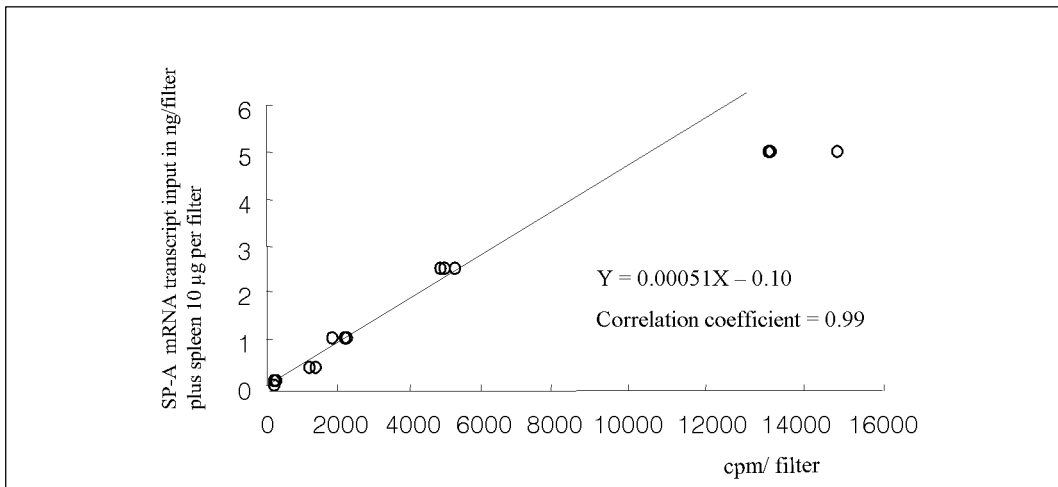


Fig. 6. Standard curve for SP-A mRNA transcript input plus spleen 10 µg per filter

수는 0.99이었다(Fig. 3).

### 3. 비장 RNA첨가 후 Filter hybridization에 의한 SP-A에 대한 sense 전사체의 표준곡선

쥐의 비장 RNA 1 µg을 첨가 후 SP-A sense 전사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5 ng에 대한 cpm과의 표준곡선 및 상관계수는  $Y=0.00056X-0.051$ ( $X=$ cpm,  $Y=$ SP-A mRNA 전사체)이고, 상관계수는 0.99이었다(Fig. 4). 쥐의 비장 RNA 5 µg을 첨가후

$Y=0.00065X-0.088$ ( $X=$ cpm,  $Y=$ SP-A mRNA 전사체)이고, 상관계수는 0.99이었다(Fig. 5). 쥐의 비장 RNA 10 µg을 첨가후  $Y=0.00051X-0.10$ ( $X=$ cpm,  $Y=$ SP-A mRNA 전사체)이고, 상관계수는 0.99이었다(Fig. 6 & Fig. 7).

### 고 찰

RNA는 분해에 아주 예민하므로 실험전 glassware를 깨끗이 세심하게 씻어야 하고 ribonuclease가

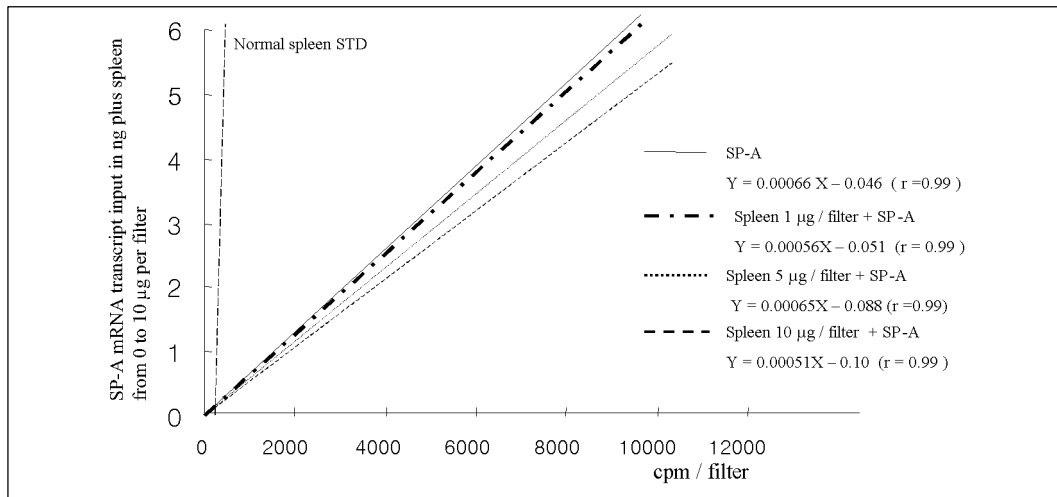


Fig. 7. Standard curve for SP-A mRNA transcript input plus from 0 to 10 µg of total cellular spleen RNA per filter

많이 존재하는 맨손으로 용기들을 만지지 말아야 한다. DEPC을 1 L의 물에 2방울(0.2%) 가한 다음 30분동안 끓인다. 그 다음 glassware를 말린다. 중금속이온들 역시 RNA를 붕괴 변질 시킬 수 있으므로 chelex resin(BioRad)용액에 여과함으로 제거할 수 있다.

Poly(A)<sup>+</sup>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 분자량의 mRNA로 구성되어 있다면, RoT 1/2에 의하여 측정된 복합체는 길이가 서로 다른 mRNA 분자의 총합으로 간주한다. 일단 역동학적 표준이 얻어지면 cDNA와 순도의 mRNA의 유전자 재결합 반응은 염기서열 복합체와 순도의 SP-A mRNA를 정량측정 하는데 사용될 수 있다.

SP6 plasmid와 같은 특별히 조립된 재조합 plasmid로부터 시험관 내에서 대량의 RNA를 합성할 수 있다. 1 µg template로부터 10 µg까지 대량의 전사체를 생산할 수 있다. 이 탐색자는 작은 용량의 복합체를 갖기 때문에 용액내 경쟁하는 재

조합 반응은 없다. 또한 탐색자의 고특이성을 유지할 수 있다. 본 실험에서는 Promega사의 Ribo-probe Gemini System을 이용하였다.

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 µg/cm<sup>2</sup>량의 RNA와 결합할 수 있고 많은 시료들을 한꺼번에 시행할 수 있다. 그러나 nitrocellulose filter는 잘 부서지고 떨어뜨리기 쉽기 때문에 조심스럽게 다루어야 한다<sup>3</sup>. 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 있다<sup>3</sup>. 본 실험에서는 filter hybridization방법에

는 Schleicher and Schuell사의 3장의 pore size가 0.45  $\mu\text{m}$ 인 13mm nitrocellulose filter들을 각각 사용하였다. 이 pore size는 큰 핵산분자량에 이용된다.

핵산이 filter에 결합하기 위하여서는 변성되어야 한다. RNA는 single-strand이지만 filter에 효과적으로 결합하기 위하여서는 변성되어야하는 double-strand부위를 포함한다. RNA변성을 위하여서는 열이나 glyoxal, methyl mercuric hydroxide, formaldehyde, dimethyl sulphoxide (DMSO) 제제들을 일반적으로 사용한다<sup>5,6</sup>. Methyl mercuric hydroxide와 formaldehyde는 독성이 있고, DMSO는 nitrocellulose filter를 용해시킨다. Glyoxal을 변성제로 이용하는데 중합억제제를 포함하는 40%용액 (6.89 M)으로 시판되고 있으며, 탈이온화시켜 사용하고 있다. 현재까지 모든 종류의 filter에 균등하게 적용시킬 수 있는 고정과정은 없다. 고정에 있어 nitrocellulose filter나 Biodyne nylon membrane에 DNA나 RNA의 정량적인 결합을 위하여서는 높은 이온농도가 필요하며, 낮은 이온농도에서는 결합능이 감소한다<sup>7-9</sup>. 반면, GeneScreen nylon membrane은 DNA나 RNA에 결합을 위하여서는 낮은 이온농도가 필요하고, 결합능은 높은 염 농도에서는 빈약하다.

Hybridization과정은 prehybridization, 탐색자에 의한 hybridization, 세척의 세단계로 구분할 수 있는데 prehybridization시 용액에 잠복시켜 탐색자가 비특이적으로 결합할 수 있는 부위에 미리 피막을 입힌다. 만약 이 과정의 부전시에는 주변산란 (background noise)을 초래할 수 있다. 본 실험에서는 filter hybridization에서는 NaCl, dextran sulfate, 50% formamide, 1% SDS들을 포함한 prehybridization용액을 사용하였고, filter당 0.2-0.5 mL의 양으로 56°C에서 12-14시간 동안 50mL Falcon centrifuge tube내에서 흔들면서 시행하였다. Prehybridization이나 hybridization에 사용하는

용액은 prehybridization이나 hybridization에 필요한 온도로 각각 미리 데워야 한다. Filter hybridization은 filter에 탐색자의 확산과 filter에 hybridization의 두 가지 과정을 거친다. Filter에 결합된 핵산 염기서열의 농도가 낮으면, hybridization반응 자체가 속도를 제한하는 단계이고, 농도가 높으면 filter에 결합하는 탐색자의 확산에 의하여 제한된다. Filter hybridization의 속도는 filter에 결합된 적은량의 핵산에 대한 복합체 비에 역비례한다. Filter에 결합된 핵산에 대한 용액내 변성된 핵산 탐색자의 hybridization은 용액 내 염기서열의 재조합반응과 filter에 결합된 RNA hybridization의 경쟁반응이다. 본 실험에서는 filter hybridization방법에 의한 SP-A mRNA의 정량측정을 위한 RNA 검체물의 최소량은 0.1 ng 이상이 었다.

Filter hybridization의 속도에 영향을 주는 요소들 중 탐색자의 농도가 중요한데 single strand 탐색자인 경우 filter에 hybridization의 속도와 형성된 hybrid양은 용액내 핵산 탐색자의 농도의 증가와 함께 증가되어야 한다. 초기의 hybridization의 속도는 용액내 핵산 탐색자의 농도와 비례한다. 투입한 DNA탐색자의 20-30%는 재조합반응 때문에 hybridization을 위하여 이용할 수 없다<sup>10</sup>. Filter에 결합된 염기서열에 hybridization할 수 있는 single strand 부위에 탐색자가 부분적으로 재조합된 이중 사슬을 형성한다. <sup>32</sup>P는 고 에너지이고 짧은 scintillation 측정시간과 autoradiography의 노출시간등의 장점이 있으며 filter hybridization이나 solution hybridization에 이용된다. 본실험에서도 filter hybridization에는 <sup>32</sup>P을 사용하였다. 보통 표지는 핵산 내 <sup>35</sup>S나 <sup>32</sup>P을 첨가함으로서 핵산염의 부분을 교체할 수 있다. <sup>32</sup>P은 방사선 방출 때문에 다루는데 주의를 요한다. <sup>32</sup>P의 반감기가 14.3일이므로 반감기에 맞추어서 실험을 시행하여야 한다. <sup>32</sup>P가 표지된 탐색자를 mL당 100ng이상 사용시



filter내 불가역적인 비특이성 결합반응이 일어난다. 본 연구에서는 filter hybridization에서는 특이 활성도가  $5 \times 10^6$  cpm/mL인  $^{32}\text{P}$ 로 표지시킨 쥐의 특정한 cDNA를 탐색자로 사용하였다. 비특이적 비가역적으로 결합할 수 있는 조합되지 않은 전구물질을 제거함으로써 주변산란을 방지할 수 있다. 주변산란을 줄이기 위하여 poly(A)와 poly(C)를 사용한다. Double-strand 탐지자는 알칼리나 끓인 후 변성시켜 사용한다. Filter에 탐색자의 확산을 용이하게 하기 위하여 재결합반응보다 hybridization을 장려하기 위하여서는 크기가 작은 탐색자를 사용하고, 소량의 반응용량, 용액 내 탐색자의 낮은 농도, 반응온도를 고온으로 하여야 한다. 탐색자의 농도, 탐색자의 복합체, 탐색자의 분자량, 염기구성, 온도, formamide의 농도, 이온농도, dextran sulfate, 점성, pH등이 filter hybridization의 속도에 영향을 줄 수 있는 요소들이다. 또한 핵산의 염기구성이 hybridization속도에 영향을 준다<sup>3</sup>.

Hybridization은 여러 가지 요소들에 의해 영향을 받을 수 있다. G+C%가 증가하면 hybridization속도 역시 증가한다. 온도가 상승함에 따라 속도는 증가하며, DNA-DNA annealing을 위한 용해온도 20-25°C이하에서 속도는 극적으로 증가한다. Well-matched hybrid에서 hybridization반응은 용액내에서 68°C에서, 50% formamide의 용액내에서는 42°C에서 시행된다<sup>3</sup>.

일반적으로 유전자 반응 속도는 RNA길이의 제공 근에 비례한다고 한다<sup>11</sup>. 핵산의 염기구성은 RNA-DNA유전자 재결합 반응에 거의 영향을 미치지 않는다. 이온 농도는 유전자 재결합 반응 과정에 영향을 미칠 수 있는 바, NaCl 농도를 0.2 M에서 1.5 M로 증가시키면 phageT<sub>2</sub>RNA나 T<sub>2</sub>DNA의 유전자 재결합 반응 속도를 5-6배 증가시켜 준다<sup>12</sup>.

Dextran sulfate는 filter에서 DNA결합반응을 촉진 시키며, 또한 DNA나 RNA탐지자 농도를 증가 시킨다<sup>13,14</sup>. Dextran은 점성이고 다루기가 어렵고,

고주변산란을 초래할 수 있다. 용액의 점성이 증가되면 hybridization농도가 감소한다. 본 실험에서는 10% dextran용액을 hybridization을 위하여 사용하였다. pH는 5-9가 적절하고, 0.4 M 염농도에서 hybridization속도는 pH와 무관하다. Formamide는 유전자 재결합 반응 온도를 낮출 목적으로 흔하게 각각 이용된다. Filter에 결합된 DNA와 RNA의 유전자 재결합 반응은 37°C에서 50% formamide존재하에 6시간 내에 시행하는 것이 가장 이상적이다. 저온과 짧은 반응시간이 mRNA의 파괴를 극소화시킨다. 불충분한 formamide를 사용한 경우 유전자 재결합반응시 RNA의 파괴를 초래할 수 있어 각별한 주의를 요한다. DNA의 부정합(mis-matching)은 용해온도를 15°C로 감소시켜 reannealing 속도를 감소시킨다. RNA-DNA hybridization의 최대 속도는 hybrid의 용해 온도가 10-15°C이하인 경우에 나타난다. RNA-DNA hybridization속도는 phenol유탁액(emulsion)존재하에서 50-100배까지 증가될 수 있다<sup>15</sup>. Formamide는 핵산 hybrid의 용해온도를 낮추는데 30-50%의 formamide를 유지하면 잠복온도를 30-42°C로 낮출 수 있다. 저온에서 탐색자가 더 안정되어 있고 nitrocellulose filter에 비공유 결합 핵산의 보유에 더 좋고 filter자체도 저온도에서 붕괴되지 않는다. 30-50% formamide 농도는 filter hybridization속도에는 아무 영향을 주지않지만 20% formamide농도 시는 약 33.3%의 속도 감소가 온다<sup>16,17</sup>. 본 실험에서는 56°C의 45% formamide용액에서 hybridization을 시행하였다. 저이온농도시 핵산은 매우 천천히 hybridization되고 이온농도가 증가되면 반응은 증가한다. 0.1M이하의 저염농도시 농도를 2배 증가시키면 hybridization 속도는 5-10배 증가된다<sup>13,18</sup>.

세척은 부합화되지 않는 탐색자를 제거하기 위하여 또한 불안정한 hybrid를 해리시키기 위하여 시행된다. Filter hybridization에서는 짝짓지 못한 loop와 single strand 탐색자 trail을 제거하기 위하

여 본실험에서는 RNase A와 T1 RNase로 filter를 처치한 후 37°C에서 2x SSC, 0.2% SDS용액으로 3번, 최종 실온에서 2x SSC용액으로 세척하였다. 세척도 반드시 흔들면서 시행하여야 한다<sup>19,20</sup>. 이와 같이 유전자 재결합반응은 여러 가지 조건들에 따라 영향을 받기 때문에 매 실험때마다 정도관리는 매우 중요한 필수사항이다<sup>3</sup>.

본 연구에 이용한 filter hybridization 방법은 sense mRNA를 이용하여 표준곡선을 얻는 동일과정으로 매 실험때마다 동시에 정도관리를 겸한 검색을 실시함으로써 방사성 동위원소로 표지된 anti-sense cDNA가 결합하고 있는 표적 mRNA양을 cpm으로 정량측정하면 그 동일 과정 하에서 구한 표준곡선으로부터 함량 미지 시료의 mRNA양을 정량측정할 수 있다. 뿐만 아니라, 0.1ng의 극미량의 정량측정에 있어 정확성을 기할 수 있었다.

이상의 결과는 filter hybridization과 SP-A mRNA를 이용한 sense유전자와 anti-sense유전자 재결합 반응에 있어서 다양한 양의 비특이성 RNA의 첨가나 오염에도 불구하고 linearity, 상관계수 및 그 특이성이 잘 유지됨을 입증해 준 결과라고 생각한다.

## 요 약

### 연구배경 :

유전자 재결합 반응에 있어서 다른 종류의 RNA의 첨가에도 불구하고 유전자 반응에 영향이 없어야 여타 실험의 정량적 분석에 이용이 가능하다.

이에 저자들은 쥐를 대상으로 filter hybridization방법과 SP-A mRNA를 이용하여 비특이성 RNA 즉, 쥐의 비장 RNA의 첨가가 surfactant protein A (SP-A)의 유전자 재결합반응의 linearity, 상관계수 및 특이성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 이 연구를 시행하였다.

### 방 법 :

SP-A transcript mRNA의 정량, 즉 0, 0.1, 0.5, 1 및 2.5 ng에 비특성 RNA 즉 비장 RNA를 각각 0, 1, 5 및 10  $\mu$ g을 첨가하여 filter hybridization 방법을 이용하여 SP-A mRNA양과 cpm과의 연관성을 비교정량측정하여 각각의 linearity, 상관계수 및 특이성의 분자생물학적 정도관리에 대한 비교 관찰을 하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

### 결 과 :

1. 쥐의 spleen RNA 0, 1, 5, 10 및 20  $\mu$ g에 대한 cpm과의 표준곡선 및 상관계수는  $Y=0.13X-19.35$  ( $X=cpm$ ,  $Y=spleen\ RNA\ input$ )이고, 상관계수는 0.98이었다.
2. SP-A sense 전사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5 ng에 대한 cpm과의 표준곡선 및 상관계수는  $Y=0.00066X-0.046$  ( $X=cpm$ ,  $Y=SP-A\ mRNA\ 전사체$ )이고, 상관계수는 0.99이었다.
3. 쥐의 비장 RNA 1  $\mu$ g을 첨가 후 SP-A sense 전사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5 ng에 대한 cpm과의 표준곡선 및 상관계수는  $Y=0.00056X-0.051$  ( $X=cpm$ ,  $Y=SP-A\ mRNA\ 전사체$ )이고, 상관계수는 0.99이었다. 쥐의 비장 RNA 5  $\mu$ g을 첨가 후 표준곡선은  $Y=0.00065X-0.088$  ( $X=cpm$ ,  $Y=SP-A\ mRNA\ 전사체$ )이고, 상관계수는 0.99이었다. 쥐의 비장 RNA 10  $\mu$ g을 첨가 후 표준곡선은  $Y=0.00051X-0.10$  ( $X=cpm$ ,  $Y=SP-A\ mRNA\ 전사체$ )이고, 상관계수는 0.99이었다.

### 결 론 :

이상의 결과는 비특이성 RNA인 비장 RNA의 첨가 후 SP-A sense mRNA양과 cpm과의 상관관계는 sense 유전자와 anti-sense 유전자의 유전자 재결합 반응에 있어서 다양한 양의 비특이성 RNA의 첨가나 오염에도 불구하고 linearity, 상관계수 및 그 특이성이 잘 유지됨을 입증해 준 결과라 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Denhardt DT: A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1966;23: 641-6.
2. Warnaar SO, Cohen JA: A quantitative assay for DNA-DNA hybrids using membrane filters. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; 24:554-63.
3. Anderson MLM, Young BD: Chapter4, Quantitative filter hybridisation. In: Hames BD and Higgins SJ, *Nucleic acid hybridisation*, Oxford. IRL Press.; 1985 p.73-111.
4. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162 :156-9.
5. Bailey JM, Davidson N: Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1976;70:75-85.
6. McMaster GK, Carmichael GG: Analysis of single-and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Pro Natl Acad Sci* 1977;74:4835-8.
7. Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-17.
8. 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.
9. Meinkoth J & Wahl G: Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Analytical Biochemistry* 1984;138:267-84.
10. Flavell RA, Birfeld EJ, Sanders JPM, Borst P: DNA-DNA hybridization on nitrocellulose filters. *Eur J Biochem* 1974;47:535-43.
11. Hutton JR, Wetmur JG: Renaturation of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA-RNA hybrid: RNA length effect and nucleation rate constant. *J Mol Biol* 1973;77:495-500.
12. Nygaard AP, Hall BD: Formation and properties of RNA-DNA complexes. *J Mol Biol* 1964;9:125-42.
13. Wetmur JG, Davidson N: Kinetics of renaturation of DNA. *J Mol Biol* 1968;31: 349-70.
14. Wahl GM, Stern M, Stark GR: Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Pro Natl Acad Sci* 1979;76:3683-7.
15. Kohne DE, Levison SA, Byers MJ: Room temperature method for increasing the rate of DNA reassociation by many thousandfold: the phenol emulsion reassociation technique. *Biochemistry* 1977;16:5329-41.
16. McConaughy BL, Laird CD, McCarthy BJ: Nucleic acid reassociation in formamide. *Biochemistry* 1969;8:3289-95.
17. 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.
18. Britten RJ, Graham DE, Neufeld BR: Analysis of repeating DNA sequences reassociation, in Grossman L and Moldave K, *Methods in Enzymology*, Academic Press,

- NY, 1974, p363-431
19. 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.
20. 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.
-