약학회지 제31권 제 2 호 116~125 (1987)
Yakhak Hoeji Vol. 31, No. 2

효율높은 cloning system을 통한 Rat Liver 전장 낙산탈수소효소 A-cDNA의 제조 및 분리동정

魯 玉 慶·裵 錫 哲·李 承 基
서울대학교 약학대학

(Received April 1, 1987)

Rapid and Efficient Molecular Cloning of Rat Liver Full-length LDH A-cDNA

Ok Kyung Rho, Suk Chul Bae and Seung Ki Lee
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract—It is still difficult and time consuming to obtain cDNA sequences that contain the entire nucleotide sequence of the corresponding mRNA. A rapid and high efficient cloning method to obtain full-length cDNA segments is thus developed. The cloning procedure described here consists of the construction of oligo(dT)—tailed vector primer using pWR34 plasmid, polyadenylation of mRNA—cDNA heteroduplex using terminal deoxytransferase, and replacement of mRNA strand with DNA by RNase H and DNA polymerase I. The restriction endonuclease analysis shows that the size of inserted-cDNA is in the range of 1.5~4.0 kb long suggesting that most of cloned cDNA are full-length or nearly full-length cDNA. The plasmid-DNA recombinants obtained were $4\times10^5-10^6$ per μg of rat liver poly (A^+)mRNA, which is 4 to 10 fold higher cloning efficiency in comparison to the presently used methods for full-length cDNA cloning. The results indicate that the described cloning system is much simpler, less time consuming, and very efficient cloning method to construct a cDNA library.

Rat brain에서 분리한 C_6 glioma cell culture 중에 존재하는 낙산탈수소 효소(LDH)는 3종의 isozyme이 각각 LDH-3(10%), LDH-4(20%)와 LDH-5(70%)의 비율로 존재함이 밝혀졌다[1]. 이들 LDH isozyme의 구성비율은 catecholamine (isoproterenol), 또는 dibutyryl cAMP로 처리한 후 그 상대비율이 현저히 변화되어 LDH-5가 전체 LDH 활성의 85%로 증가되어[1,2] hormone 및 cAMP에 의해 LDH 활성이 induction됨이 보고된바 있다.

Rat C_6 glioma cell에서의 isoproterenol에 의한 LDH-5의 induction mechanism을 규명하기 위한 연구결과 isoproterenol 자극후 LDH A-mRNA의 분자 농도가 정상치에 비해 2~3배가 증가되고 LDH A-mRNA의 단백으로의 번역활성이 8~10배 증가됨이 밝혀졌다[2,3].

홀몬자극후 LDH A-subunit의 전사단계와 번역단계에서 서로 다른 증가효과를 나타내는 요인중의 하나가 LDH A-mRNA의 반감기가 홀몬처리후 약 3배가 증가되기 때문이며 이와 같은 반감기의 증가는 홀몬처리후 생성된 LDH A-mRNA의 5′-, 또는 3′- 말단의 비번역 부위의 nucleotide 순서가 상이하며, 그 결과로 LDH A-mRNA의 2차 구조의 차이를 가져왔기 때문일 가능성이 제시된바 있다[3,4].

본 연구에서는 홀몬처리 전후에 생성된 LDH A-mRNA의 비번역 부위의 nucleotide 순서를 분석 비교 검토할 목적으로, 일차적으로 전장 LDH A-cDNA를 얻기위한 간단하고 효율적인 cloning system을 개발하여 rat liver poly(A^+) mRNA로부터 cDNA library를 제조하고저 하였으며 이로부터 colony hybridization 방법에 의해 LDH A-cDNA를 분리하여 3′-말단의 비번역 부위의 nucleotide 순서를 분석하여 이 부위의 홀몬처리 전후에 생성된 LDH A-mRNA의 3′-말단 부위의 구조를 비교 검토하고자 하였다.

실 험 방 법

실험재료—Oligo(dT)-cellulose은 New England Biolab(NEB)에서 구입하였고 Oligo(dA)-cellulose column은 PL-Biochemical로 부터 구입하였다. AMV reverse transcriptase, E. coli DNA ligase (NAD^+), Terminal deoxynucleotidyl transferase, RNase H 등은 PL-Biochemical에서 구입하였다. 또한 E. coli DNA polymerase I은 BRL, restriction enzyme인 Pst I, Hind Ⅲ, Eco-RI 등은 NEB 제품을 사용하였다. DE-81 paper는 Whatman, ABM (aminobenzyloxyloxymethyl) paper는 Bio-Rad에서 구입한 것이다. 그리고 buffer를 만들때 사용한 각 시약은 enzyme grade 및 특급시약을 사용하였다.

Full-length cDNA의 합성 및 cloning.

Poly(A^+) mRNA의 분리 및 정제—Rat liver 및 testes로 부터 Guanidinium isothiocyanate method[5]로써 total RNA를 분리하고 Oligo(dT)-cellulose column chromatography를 2회 반복하여 poly(A^+) mRNA를 분리 정제하였다.

Vector primer의 제조—Fig. 1에 도식된 바와같이 plasmid pWR34 20μg을 Pst I 40 unit로 37°C에서 3시간 digestion 시킨후 돌출된 3′-end를 calf thymus terminal deoxynucleotidyl transferase를 사용하여 oligo(dT)로 tailing하였다. Tailing 조건은 Pst I-digested pWR34 5μg을 10μl의 재증류 증류수에 용해시키고 10μl 2x tailing buffer (2×140mM sodium cacodylate, 2×30mM tris-HCl(pH6.8), 2×0.1mM dithiothreitol, 2×1mM $CaCl_2$), 1.0mM dTTP 2μl, (α-^{32}P) dTTP (3,000 Ci/mmole) 5μCi를 가하고 37°C에서 60분간 반응시켰다. dT-tailed DNA oligo(dA)-cellulose column[6]을 행하여 vector primer를 정제하였다.

cDNA의 합성—분리정제된 poly(A^+) mRNA의 2차 구조를 denaturation 시키기 위해 100mM methyl mercuric hydroxide를 2mM 되도록 가하여 실온에서 30분간 방치하였다. denatured mRNA 1μg을 취하여 5×RT buffer 5×100mM

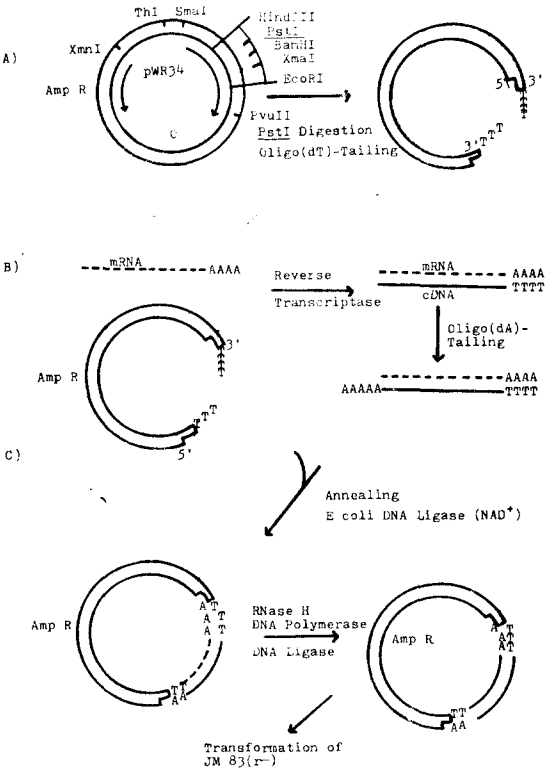


Fig. 1—Preparation of oligo(dT)-tailed vector primer(A) and full-length cDNA(B). Construction of plasmid-cDNA recombinants and cloning into JM83(r^-) is shown in(C).

Tris-Cl(pH 8.3 at42°C), 5×10mM $MgCl_2$, 5×70mM KCl, 5×10mM dithiothreitol, 5×dNTPs (5×0.5mM dATP, 5×1mM dTTP, 5×1mM dGTP, 5×1mM dCTP), RNasin, oligo(dT) primer (100μg/ml), (α-^{32}P) dATP(3,000Ci/mmole) 20μCi 및 AMV reverse transcriptase 20 unit를 가하고 total volume 25μl로 하여 42°C에서 3시간 반응시켰다. 0.4M EDTA 1.25μl, 10% SDS 1μl를 가하여 반응을 종결시킨후 phenol/$CHCl_3$ extraction을 2회 반복 추출하였다. 수층을 취해 4M ammonium acetate를 동량 가하고 ethanol 2.5volume 가하여 dry ice에서 15분간 방치후 상온까지 gentle shaking한 후 원심분리하여 침전을 모았다. 이 조작을 2회 반복하여 free dNTP를 제거하였다.

cDNA:RNA heteroduplex의 deoxyadenylatetailing—cDNA:RNA heteroduplex 0.8μg(17μl)에 2×tailing buffer 17μl와 (α-^{32}P) dATP (3,000Ci/mmole) 6μCi를 가한후 15unit의 terminal deoxy nucleotidyl transferase로 37°C에서 반응시켜 각 incubation time(0′, 30′, 60′, 120′)마다 2μl씩 취하여 0.5M Na_2HPO_4로 pretreated DE-81 ion exchange paper에 spotting하고 0.5M Na_2HPO_4로 세척한 후 Scintillation cocktail 10ml를 넣고, 도입된 (α-^{32}P) dATP의 양을 측정하였다.

Cyclization—(dA) tailed-heteroduplex를 67°C에서 5분 동안 가열하고 0°C로 즉시 냉각시킨 후 phenol/chloroform으로 2회 추출하고 그 수층을 취하여 동량의 4M ammonium acetate와 2.5 volume Ethanol으로 침전시켰다. dry ice상에서 20분동안 침전시킨후 20분동안 microcentrifuge로 원심분리하여 침전을 모았다. 진공건조한 (dA) tailed-heteroduplex에 (dT) tailed-vector primer, 5x RT buffer, 5×dNTPs 2μl, d.d. H_2O를 total volume 20μl로 하여 57°C에서 30분 incubation하고 상온에서 30분 방치하였다. AMV reverse transcriptase 2μl(=20 unit)를 가하고 42°C에서 1시간 incubation하였다. 0°C로 냉각후 2×ligation buffer (2×20mM Tris-Cl pH 7.5, 2×4mM $MgCl_2$, 2×10mM $(NH_4)_2SO_4$, 2×0.1M KCl, 2×50μg/ml Bovine Serum Albumin, 2×0.1mM β-NAD), E. coli DNA ligase(NAD^+)를 가하여 total volume 102μl로 한후 14~15°C에서 16시간 incubation 함으로써 cyclization 반응을 실시하였다.

Replacement of RNA strand by DNA—cyclization reaction mixture에 5mM dNTPs 4μl(40μM), (α-^{32}P) dATP(3,000Ci/mmole) 10μCi, β-NAD를 0.15mM되게 가한후 E. coli DNA ligase(NAD^+) 1μl, DNA polymerase I 3μl, RNase H 2μl을 가하고 total volume 114.8μl로 한후 14~15°C에서 2시간, 상온에서 1시간 반응시켰다. cold 10mM Tris-HCl(pH 7.4)을 가하여 반응을 종결 시켰다.

Transformation of JM 83(r^-)—상기 과정

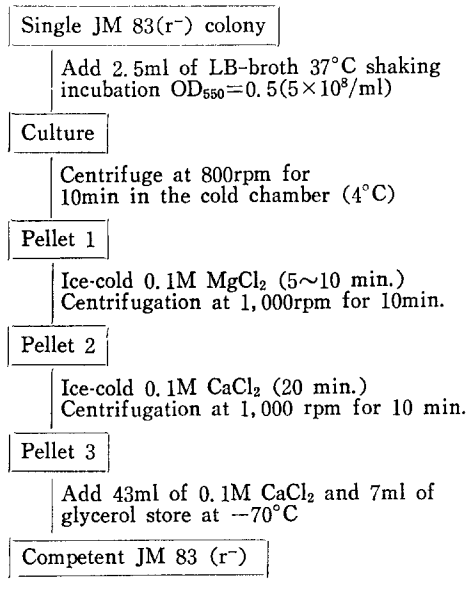


Fig. 2—Preparation of competent cells.

에서 얻은 ligation mixture 50μl에 Fig. 2에서 설명된 방법으로 만든 competent JM83(r^-) cell[7]을 가하고 잘 혼합한 후 빙욕상에서 60분간 방치하였다. 42°C에서 2분간 가온한 후 빙욕상에서 1시간 방치하여 transformation 반응을 종결하였다. 5ml의 LB-broth를 가한 후 37°C에서 약 5시간 진탕배양 하였다. 8,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 침전된 세포를 1ml의 10mM NaCl에 현탁시킨 후 적당한 농도로 희석시켜 ampicillin resistant white colony를 분리하기 위해 50μg/ml ampicillin, IPTG 및 X-Gal을 함유한 LB-broth agar plate에 100μl씩 spreading하고 37°C에서 24시간 배양하였다.

Clone된 cDNA의 size range의 동정—ampicillin resistant white colony중에서 무작위로 12개를 분리한 후 Fig. 3와 Guo와 Wu[8]등의 방법으로 RNA를 제거한 순수한 plasmid를 분리하였다. cloning에 사용한 vector primer인 pWR 34에 poly linker site를 절단하는 제한효소중 Pst I과 Hind Ⅲ와 EcoR I등의 제한효소를 사용하여 도입된 cDNA의 존재와 크기를 동정하였다.

Colony hybridization methid[9]에 의한 LDH cDNA의 확인—상기에서 제조한 transformant 100ml를 50μg/ml ampicillin, IPTG 및 X-Gal

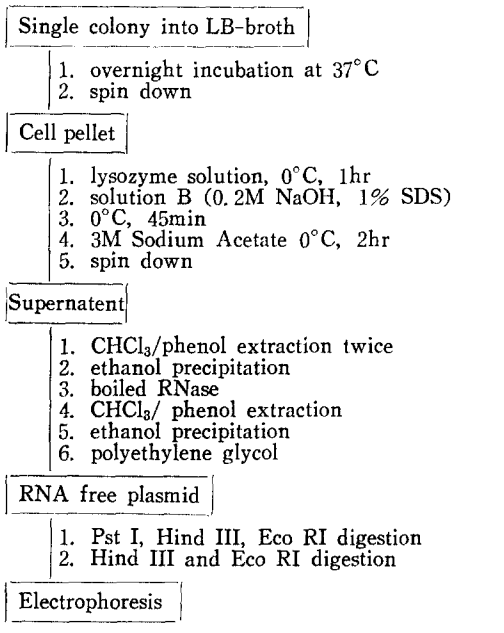


Fig. 3—Minipreparation of plasmid and restriction enzyme digestion.

등을 포함한 LB-broth agar plate에 spreading하고 37°C에서 24시간 또는 colony의 크기가 직경 0.2~1.0mm가 되도록 배양하였다. nitrocellulose membrane에 agar plate상의 colony를 부착시키고 colony DNA를 고정시키기 위해 denaturation 및 neutralization을 행한후 chloroform으로 처리하였다. 실온에서 30분간 공기건조를 하고 80°C에서 120분간 진공건조를 하였다.

LDH cDNA(3′-end coding 500bp)를 nick translation하기 위하여 0.4mM dCTP, dTTP, dGTP 2μl씩을 각각 가하고 20μM dATP 2.5μl, (α-^{32}P) dATP 30μCi, 10×nick translation buffer (500mM Tris-Cl(pH 7.8), 90mM $MgCl_2$, 100 mM 2-mercaptoethanol, 500μg/ml Bovine Serum Albumin) 5μl, DNA 0.5μg, DNA polymerase I unit 및 DNase 0.16ng을 가하여 total volume 50μl로 15°C에서 2시간 반응시킨후 spun column을 행하여 free isotope와 dNTPs를 제거하였다. nick translated LDH cDNA probe를 10^6 dpm/filter 취하여 denaturation시켜 가한후 55~60°C에서 20시간 hybridization 반응을 시켰다. wash를 행한후 Kodak XAR-5 X-ray film 상에서 Dupont intensifying Screen을 사용하여 Autoradiography를 실시하였다.

2. LDH A-cDNA의 3′-말단 DNA 순서분석

Rat C_6 glioma cell에서 isoproterenol로 stimulation한 후 cloning하여 얻은 LDH A-subunit poly (A^+) mRNA의 3′-end를 coding하는 약 700base pair의 cDNA sequence를 밝힘으로서 3′-말단 비번역 부분의 DNA sequence와 C-terminal 일부 LDH coding sequence를 분석할 목적으로 DNA sequencing을 하였다.

Pst I-digested pPLD 42의 subcloning—약 700bp의 LDH A-cDNA 3′-말단을 함유하는 plasmid pRLD 42 42.3μg을 Pst I 100 unit를 가하고 37°C에서 반응시킨후 1.5% agarose gel상에서 전기 영동하여 DEAE membrane를 사용하여 1970bp 8.8μg, 48bp 2.2μg, 482bp 22μg을 각각 얻었다. Pst I-digested DNA fragment 10 nmole과 Pst I-digested pWR 34 12nmole을 T_4 DNA ligase 0.01 unit를 가하여 14°C에서 16시간 ligation 반응을 실시한후 JM 83(r^-)에 transformation하여 IPTG, X-Gal, ampicillin(50 μg/ml)을 포함한 LB. agar plate에서 selection하였다.

Sanger 방법에 의한 LDH cDNA sequence 분석—Fig. 3과 같은 방법으로 subcloned plasmid를 분리한 후 universal 또는 reverse primer를 사용하여 Sanger의 dideoxy chain termination 방법에 의해 DNA 순서분석을 행하였다.

실험결과 및 고찰

Full-length cDNA의 합성 및 cloning

1) Poly(A^+) mRNA—Oligo(dT)-cellulose column chromatography를 행한후 각 분취액의 흡광도를 파장 260nm에서 측정한 결과 Fig. 4와 같았다. RNA의 single peak가 나타나 4번 분취액으로부터 10번 분취액을 취하여 3M sodium acetate 0.1volume과 ethanol 2.5volume을 가한후 Dry ice상에서 1시간 동안 침전시키고 12,000g에서 20분간 원심분리하여 약 100μg의 poly(A^+) mRNA를 분리 정제하였다.

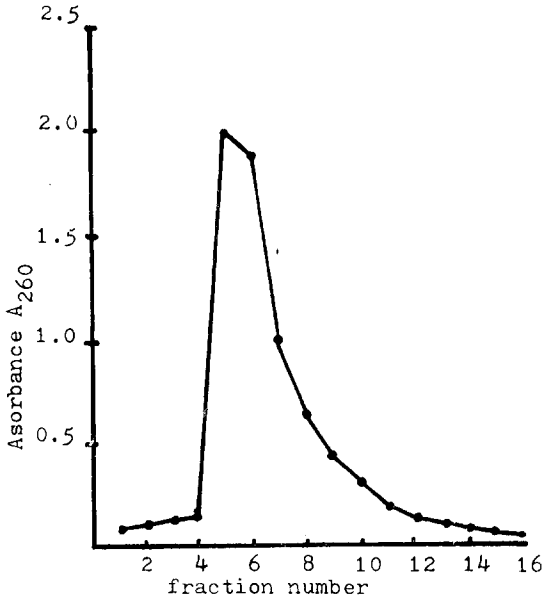


Fig. 4—Oligo(dT) column chromatography of total cellular RNA extracted from rat liver.

2) **Vector primer의 제조**—사용된 vector plasmid pWR34는 Amp^r gene과 lac Z gene을 coding하고 있는 2.7kb의 plasmid로써 (Fig. 1), high copy number를 가지며 Hind Ⅲ, Pst Ⅰ, Bam HI등 9개의 unique한 restriction enzyme sites가 존재하여 이들 sites를 cloning site로 사용하였다.

또한 polylinker site 전후에 reverse primer와 universal primer의 complementary sequence가 존재하여 직접 sequencing 할 수 있는 plasmid이다. 이 plasmid pWR34 10μg을 Pst Ⅰ으로 분해한 후 terminal deoxytransferase에 의하여 [α-^{32}P] dTTP를 기질로 하여 oligo (dT)-tailing 반응을 실시하고 incorporation된 [^{32}P]의 활성을 측정한 결과 Table Ⅰ과 같았다.

60분 incubation한 후 도입된 dT잔기는 57개로 밝혀져 poly(A^+) mRNA와 annealing 반응에 적합한 oligo(dT)-tailed (50~70개 dT잔기) plasmid-primer를 얻을 수 있었다. Oligo (dT) tailed vector primer를 1.5% agarose gel에 전기영동한 후 Autoradiography를 행한결과를 Fig. 5와 같이 단일 밴드로 2.8kb 부근에서 oligo (dT) tailed vector primer의 band를 확인하였다.

Table Ⅰ-Addition of oligo(dT) tail onto Pst Ⅰ-digested pWR 34 with terminal deoxynucleotidyl transferase.

Incubation time (min)	DPM
0	401.0
10	3,276.2
20	7,780.0
40	9,545.2
60	16,479.2

3) **cDNA의 합성과 deoxyadenylate-tailing**—합성된 cDNA의 크기를 확인하기 위하여 1% agarose gel에 전기영동한 후 autoradiography를 실시한 결과 Fig. 6에서 나타난 것과 같이 길이가 2~4.3kb의 큰 분자량의 cDNA의 smear band를 볼 수 있었고 분자량이 큰 cDNA가 합성되

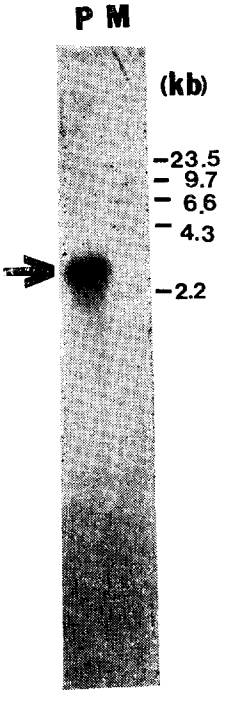


Fig. 5—Autoradiogram of Oligo(dT)-tailed pWR34/Pst I. (α-P)dTMP-labelled pWR34/Pst I (P) was electrophoresed on 1.5% agarose gel and visualized by autoradiography.
M indicates molecular markers in kilobases.
Arrow indicates the oligo(dT)-tailed pWR34/PstI.

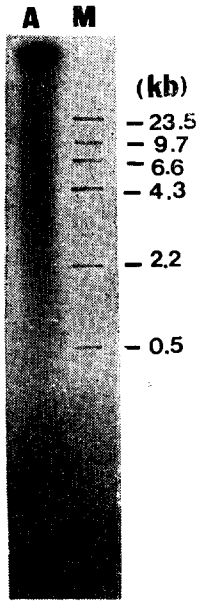


Fig. 6—cDNA Synthesis. cDNA synthesis was performed with rat liver poly(A$^+$)mRNA under the condition as described in the text. cDNA synthesized(A) was eletrrophoresed on 1% agarose gel and autoradiographed. M indicates molecular weight markers in kilobases.

었음을 확인하였다. cDNA:RNA heteroduplex의 dAtail의 수는 3′-말단마다 dAMP residue가 30분 배양후 15~18개가 도입된 것을 확인할 수 있었다.

4) Transformation of JM 83(r$^-$)—사용된 JM 83(r$^-$)는 E. coli mutant이며 ampicillin sensitive하고 lacZ 유전자가 negative인 균주이다. 이와 같은 균주를 host로 하여 상기에서 제조한 rDNA로 transformation 한후, 24시간 37°C에서 배양한후 ampicillin resistant white colony의 숫자를 측정한 결과 약 4×10^5~10^6 transformants/μg mRNA를 나타내었다. 본 결과는 종래 사용해온 Okayama-Berg의 cloning 방법에 비해 약 5~10배의 높은 transformation 효율을 나타내는 것으로 이는 사용한 plasmid가 2.7kb의 작은 분자의 vector를 사용하므로 transformation 효율이 높아진 것으로 사료된다.

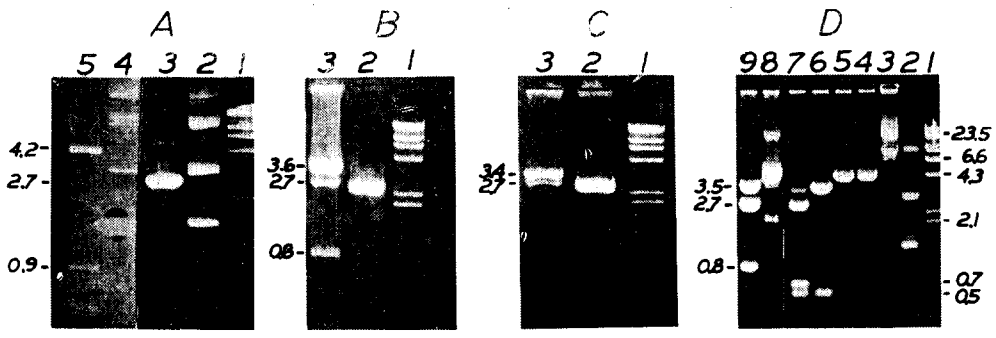
5) Clone된 cDNA Size Range 동정—Fig. 7의 A-D의 결과에서 보여주는 바와 같이 2.7 kb의 vector의 band와 colony 25에서는 Hind Ⅲ로 digestion 되었을 때 생기는 0.5kb의 fragment와 E. coRI으로 digestion 하였을때 0.7kb와 0.5kb 즉, 1.2kb의 도입된 cDNA를 확인하였다 colony 8에서는 4.3kb(3.5kb+0.8kb), colony 38에서는 3.4kb, colony 23과 colony 37에서는 각각 4.5kb (3.6+0.8kb)와 2.3kb의 도입된 cDNA를 또한 확인하였으며 따라서 본 cloning 방법에 의해 clone된 cDNA의 길이는 1.2~4.0kb의 비교적 긴 cDNA가 도입되었음을 확인할 수 있었다. 그러므로 Okayama & Berg[6] 방법과 비교할 때 여러 제한효소를 사용하는 번거로움과 linker를 사용하지 않으므로 훨씬 간단하고 신속하게 full-length cDNA를 합성할 수 있었으며 보다 높은 transformation efficiency를 나타내 효율적이고 개선된 방법임을 입증하였다.

6) Colony hybridization method에 의한 LDH cDNA의 확인—pRLD 42의 500 base pair fragment를 Nick translation하여 얻어진 probe (1×10^6 dpm/filter)를 사용하여 상기의 방법에 의해 제조한 rat liver cDNA library에서 LDH A-cDNA의 존재를 확인하기 위하여 행해진 colony hybridization을 실시하고 이의 autoradiography를 행한 결과 Fig. 8과 같은 결과를 얻었다. Fig. 8의 화살표로 표시한 바와 같이 LDH A-cDNA를 함유하고 있는 colony를 확인하였다. 이들 colony를 분리하여 제한효소에 의한 분석을 행한 결과 1.6kb의 긴 cDNA의 insert를 확인하였고 도입된 cDNA의 배열순서와 제한효소 지도를 작성하기 위해 실험중에 있다.

2. DNA sequence analysis of 3′-end LDH A-cDNA

isoproterenol로 자극시킨 Rat C_6 glioma cell로부터 cloning하여 얻은 LDH A-mRNA의 3′-말단 약 700bp의 DNA 배열순서를 분석하기 위해 Sangers dideoxy chain termination method에 의해 sequencing 하였으며 그 결과를 종합하면 (Fig. 9)과 같다.

Fig. 6와 같이 pRLD 42에 cloning되어있는 홀몬으로 자극한 rat C_6 glioma cell에서 cloning하여 얻은 LDH A-cDNA는 LDH A-subunit C-



Lane Numbers	A Colony37 (C37)	B Colony23 (C23)	C Colony38 (C38)	D Colony25(C25) Colony8 (C8)
1	M.W. Marker	M.W.Marker	M.W. Marker	M.W. Marker
2	pWR34 Plasmid	HindIII-digested pWR34	HindIII-digested pWR34	pWR34 Plasmid
3	HindIII-digested pWR34	(HindIII+EcoRI)-digested C23	(HindIII+EcoRI)-digested C38	C25-Plasmid
4	C-37-Plasmid			PstI-digested C25
5	HindIII-digested C37			HindIII-digested C25
6				EcoRI-digested C25
7				(HindIII+EcoRI)-digested C25
8				C8-Plasmid
9				(HindIII+EcoRI)-digested C8
Inserted cDNA Size	2.3 Kb	4.5 Kb	3.4 Kb	C25; 1.24 Kb C8 ; 4.3 Kb

** Numbers on the side of each figure indicate the molecular weight of indicated DNA band.

Fig. 7—Identification of inserted cDNA and range of inserted cDNA size obtained from rat liver cDNA Librarg.

terminal의 59개의 아미노산을 coding하는 177개의 nucleotide sequence와 504개의 3′-end nontranslated nucleotide sequence를 포함하여 682개의 nucleotide sequence로 이루어져 있으며 3′-end의 669~674 위치에 poly(A) signal sequence로 사료되는 AATAAA가 존재하고 있음을 확인하였다. 또한 이들 nucleotide sequence와 mouse liver에서 분리한 LDH A-mRNA의 3′-end쪽을 coding하는 cDNA nucleotide sequence를 비교한 결과 아미노산을 coding하는 region에서는 177개의 nucleotide중 167 nucleotide sequence가 동일하여 약 94%의 sequence homology를 보였으며 3′-end nontranslated region의 504 nucleotide중 414 nucleotide sequence가 동일하여 약 82%의 homology를 보였다. 이것으로 보아 3′-end nontranslated region은 아미노산 coding region에 비하여 homology가 많이 떨어짐을 알 수 있었다. 또한 rat glioma cell LDH A-cDNA의 poly (A) signal sequence로 추정되는 AATAAA를 전후하여 654~665 및 688~695의 nucleotide sequence가 추가되어 있었다. Eucaryotic mRNA 3′-end nontranslated region의 base sequence가 어떤 중요성을 가지고 있는지는 아직 확실히 밝혀진 바는 없으나 이 region의 secondary structure는 poly(A) binding protein에 binding site를 제공하여 mRNA의 stability와 translation efficiency에 영향을 미친다고 보고되고 있다. 이들 654~665, 688~695의 nucleotide sequence의 차이로 인해 이들 mRNA의 secondary structure에 차이를 나타낼 것으로 예상된다. 이러한 secondary structure의 변화에 의해서 홀몬으로 자극한 rat C_6 glioma cell로 부터 생산된 LDH A-mRNA는 반감기와 translation efficiency가 달라졌을 가능성을 제시할 수 있겠다. 그러나 이러한 sequence

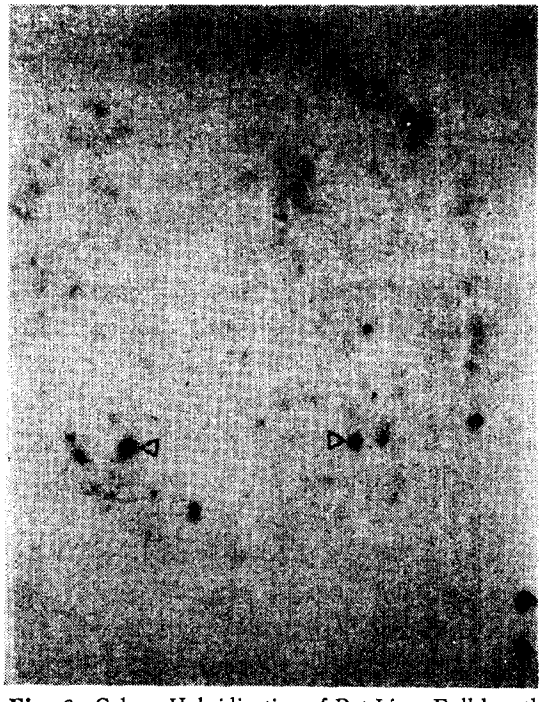


Fig. 8—Colony Hybridization of Rat Liver Full-length LDH A-cDNA.
Nicktranslated ^{32}P-labeled 500bp LDH A-cDNA was used as a probe. For the nicktrantranslation and hybridization conditions, see the text.

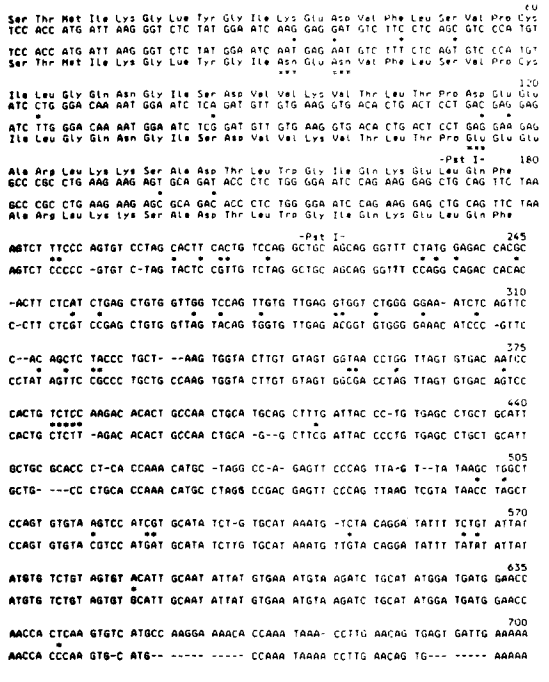


Fig. 9—Comparison of C-terminal amino acid sequences and 3-end nontranslated sequences of rat LDH A-cDNA(A) and mouse A-cDNA(B). The discrepancy in amino acid residues is marked by ¦ ¦ ¦ and the different nucleotide sequences are marked by*.

들의 차이가 mouse와 rat간의 species차에서 기인한 것인지는 밝혀져야 하겠으나 poly(A) signal sequence의 5′쪽에 인접한 base sequence는 poly (A) tail addition position을 결정하며 이 부위의 sequence 차이는 poly(A$^+$) mRNA의 안정성에 중요한 인자가 된다는 증거들을 고려해 볼때[13] 654~665의 12nucleotide sequence의 차이로 인해 홀몬 자극후에 생성된 LDH A-mRNA의 반감기가 2~3배 증가되는 원인중에 하나일 가능성이 크다. 또한 Rat의 LDH A-cDNA의 nucleotide-sequence로 부터 유추하여 얻은 아미노산 배열순서와 이미 밝혀진 다섯종류의 다른 species에서 얻어진 다른 LDH isozyme의 아미노산 배열순서와 비교해본 결과 Fig. 10과 같이 species와 isozyme의 차에 관계 없이 17개의 aminoacid의 위치가 같은 homology를 보여주어 진화론적으로 매우 conservative한 위치와 아미노산 종류를 보여주었으며 LDH의 구조로서 C-terminal의 negative ring구조와 β-sheet 구조를 형성하는데 이들 아미노산이 중요한 역할을 하리라는 가설을[12] 뒷받침 해주고 있다.

Rat와 mouse의 LDH A-subunit의 C-terminal의 59개의 아미노산 배열을 비교해 보면 Fig. 11과 같이 3개의 아미노산 잔기를 제외하고는 모두 일치하는 결과를 보였는데 흥미있는 사실은 이들 아미노산을 coding하는 nucleotide sequence는 (Fig. 9) 177개의 nucleotide중 10개의 nucleotide가 상이함을 보였으나 이들중 8개의 nucleotide가 codon의 third position에 위치하고 있어 3개의 아미노산 배열만이 서로 차이가 나는 degeneracy를 보이고 있다. 이로서 Rat와 mouse의 LDH A-subunit의 gene은 진화과정중 아미노산 coding DNA sequence가 mutation에 의하여 nucleotide가 바뀌더라도 아미노산 배열이 바뀌지 않는 방향으로 mutation이 일어나 생체내 basic metabolism에 중요한 enzyme으로 알려진

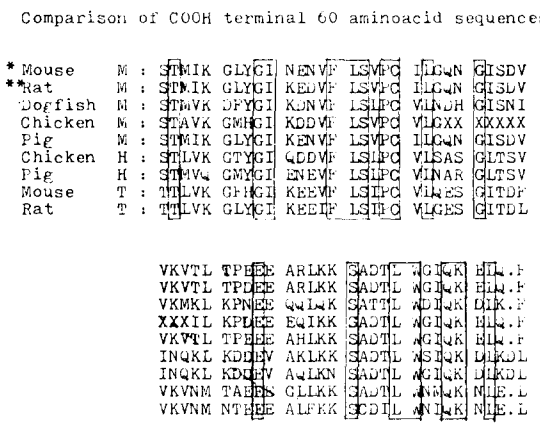


Fig. 10—Comparison of C-terminal 60 amino acid sequences of different types of lactate dehydrogenases obtained from 9 different species.
X means the unknown residues
The identical residues of all 9 sequences at 17 positions are indicated by boxes
M means muscle type
H means heart type
T means testis type
* Mouse M: unpublished data
** Rat M: C-terminal aminoacid sequence obtained from DNA sequence of LDH-cDNA

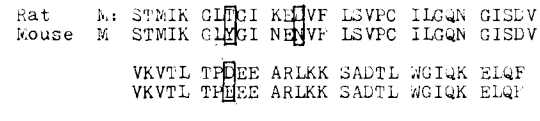


Fig. 11—Comparison of C-Terminal 60 Amino Acid Sequences of Lactate Dehydrogenase A-Subuit Obtained from Rat and Mouse.
The discrepancy in amino acid residues of rat and mouse LDH A-subunit at three positions is boxed.

LDH의 구조와 기능을 유지하려는 성향을 보여주고 있다는 점은 흥미있는 일이라 하겠다.

결 론

홀몬으로 처리후 induction된 LDH A-mRNA는 LDH A-mRNA의 5′- 또는 3′-말단의 비번역 부위의 nucleotide sequence가 차이가 나기 때문이라는 가능성이 제시된바 있다. 따라서 본 연구에서는 LDH A-mRNA를 coding하는 Full-length cDNA를 cloning하여 3′과 5′-말단의 비번역 부위의 nucleotide sequence를 밝히기 위해 일차적으로 Full-length cDNA library를 제조하기 위한 cloning system을 개발하여 종전의 방법보다 간단하고도 5~10배 더 높은 효율적인 Full-length cDNA를 cloning system을 개발하였으며 inserted cDNA의 size가 1.5~4.0kb의 큰 cDNA가 cloning 되었음을 확인하였다. colony hybridization 방법에 의해 cDNA library로 부터 LDH A-cDNA를 확인하였으며 제한효소 분석에 의해 1.6 kb의 LDH A-cDNA를 검정하였다. 또한 홀몬으로 stimulation한 Rat C_6 glioma cell에서 cloning하여 얻은 3′-end를 coding하는 약 700bp의 LDH A-cDNA의 nucleotide 배열을 pWR 34 plasmid에 subcloning한후 Sanger의 방법에 의하여 sequencing하여 얻은 결과 mouse liver로 부터 얻은 LDH A-cDNA sequence와 비교할때 3′-말단 비번역 부위의 523bp에 있어서 82%의 homology를 보이고 있으며 poly(A) signal sequence로 사료되는 AATAAA sequence를 전후하여 12 nucleotides와 8 nucleotides가 mouse LDH A-cDNA에 비해 rat C_6-glioma cell LDH A-cDNA에는 첨가되어 있음을 확인하였다. 이러한 nucleotide sequence 들의 차이는 mRNA의 secondary structure에 변화를 가져와 각 mRNA의 반감기와 translation efficiency에 영향을 미칠 것으로 예상되나 이러한 차이가 mouse와 rat간의 species 차에서 기인한 것 일수도 있으므로 Rat liver로 부터 cloning하여 얻은 LDH A-cDNA와 홀몬으로 처리하지 않은 rat C_6 glioma cell로 부터 cloning하여 얻은 LDH A-cDNA의 nucleotide sequence를 비교 검토하므로 상기의 가설을 뒷받침하고자 계속 연구를 진행하고 있다.

감사의 말씀 이 연구논문은 1985년 한국과학재단의 연구비와 1986년도 문교부 연구지원 계획에 의해 수행된 연구결과의 일부이다. 이들 연구비 지원에 깊히 감사한다.

문 헌

1) Derda, D.F., Miles, M.F., Schweppe, J.W., and Jungmann, R.A. *J. Biol. Chem.* **255**, 11112 (1980).
2) Kumar, S., McGinnis, J. F., and Devellis, J. *J. Biol. Chem.* **255**, 2315 (1980).
3) Miles, M. F., Hung, P., and Jungmann, R.A. *J. Biol. Chem.* **256**, 23, 12545 (1981).
4) Jungmann, R. A., Derda, D. F., Kelley, D.C., and Schweppe, J.S. *Isozymes*, Vol. **7**, 161 (1983).
5) Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., and Rutter W.J. *Biochemistry* **18**, 5294 (1979).
6) Okayama, H., and Berg, P. *Molec. Cellular Biol.* **2**, 161 (1982).
7) Morrison, D.A., *Methods in Enzymology*, Vol. **68**, 326.
8) Guo, L. H., and Wu. R. *Methods in Enzymology*, Vol. **100**, 60.
9) Grustein, M., and Hogness *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3961 (1975).
10) Sanger, F., Nicklen, S., and coulson, A.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463 (1977).
11) Richard A. Jungmann *J. Biol. Chem.* **258**, 5312 (1983).
12) Le, S. S-L., Feldmann, R.J., Okabe, M., and Pan Y-C, E. *J. Biol. Chem.* **258**, 11, 7017 (1983).
13) Ingrid. E., Bergmann and George Brawerman, *J. Mol. Biol.* **139**, 439 (1980).