

메틸머큐리젤에 분리된 리보핵산의 니트로셀룰로스막으로 이동

安 正 善

(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

Transfer of RNA from Methylmercury-agarose Gel to Nitrocellulose Membrane

An, Chung Sun

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

Effects of staining, buffer washing and denaturing agents on the transferrability of RNA fractionated on a methylmercury hydroxide-agarose gel to a nitrocellulose membrane were studied. Ethidium bromide staining and ammonium acetate buffer washing inhibited RNA transfer, while 3% HCHO and 0.5 M NaOH treatments stimulated transfer which was negated in the ammonium acetate buffer. Accordingly, maintenance of primary structure of RNA was proved to be essential for transferring RNA from the methylmercury hydroxide-agarose gel to the nitrocellulose membrane.

緒 論

생물체의 한 조직이나 기관으로부터 분리한 총 리보핵산(RNA)은 다양한 종류와 크기를 갖는 RNA들의 집합체이며 그들로부터 특수한 분자량을 갖는 특성의 RNA만을 분리하는 것은 유전자 발현연구의 첫 단계라고 하겠다. 분리된 특정 RNA는 *in vitro* translation 방법(Marcu and Dudock, 1974)에 의해서 그것으로부터 합성되어지는 단백질을 동정하기 위해서나 reverse transcription(Retzetl *et al.*, 1980)방법을 이용하여 cDNA를 만들기 위해서 사용될 수도 있고, 또는 적절한 막으로 옮김으로서 특정한 유전자발현여부나 발생과정에 따른 유전자발현의 조절 기작에 대한 연구(Bishop *et al.*, 1974)등 생명현상의 분자생물학적 연구에 다방면으로 사용될 수 있다.

특정한 RNA를 분리하는데는 여러 방법들이 사용되고 있지만 크기는 자연상태의 리보핵산 분리와 일차구조로 변형된 RNA의 분리로 나눌 수 있으며, 후자의 방법은 전기영동법에서 RNA가 갖는 이차구조와 같은 구조적인 특성의 영향을 배제하여 분자량의 차이에 의해서만 RNA를 분리하는데 목적이 있다(Peacock and Dingman, 1968).

RNA를 일차 구조로 변형시키기 위해서는 온도처리, 알카리처리 방법외에도 formaldehyde(Lehrach *et al.*, 1977), urea(Rosen *et al.*, 1975), formamide(Lehrach *et al.*, 1977), methylmercury

본 연구는 1985년도 한국 과학기술재단 학술연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

hydroxide(Bailey and Davidson, 1976) 및 glyoxal(McMaster and Carmichael, 1977) 처리 방법이 사용되고 있다.

그중에서 methylmercury hydroxide(MeHgOH) 처리방법은 agarose에 사용하면 다른방법에 비해서 보다 손쉽고, 믿을 수 있으며 반복될 수 있는 결과를 보여주고 있어서(Carmichael, 1980) 특정 RNA의 분리 및 분자량 결정에 많이 이용되고 있다.

그러나 MeHgOH-agarose젤에 분리된 RNA를 직접 nitrocellulose(NC) membrane으로 옮기는 방법은 개발되지 않은 상태이다. Thomas(1980)는 일차적으로 glyoxal-dimethylsulfoxide로 변형시킨 RNA를 메칠머큐리젤에 분리한 후 NC막으로 옮기는 실험에 대해서 언급하였지만 자세한 결과를 발표하지는 않았다.

NC막 대신으로는 활성화된 셀룰로스막의 일종인 diazobenzyloxymethyl(DBM)막이 사용되고 있는데(Alwine *et al.*, 1977) DBM막은 준비하는데 장시간이 소요되며 반복성이 결여된 결과를 보일뿐만 아니라 감도면에서도 NC막보다 훨씬 떨어진다(Thomas, 1980).

따라서 본 실험에서는 지금까지 보고된 염색과 변형유도체들이 RNA의 이동에 미치는 영향들(Alwine *et al.*, 1977; Thomas, 1980)을 고려하여 비교적 용이하고 효과적으로 RNA를 메칠머큐리젤로부터 NC막으로 옮기는 방법에 대하여 연구하였다.

材料 및 方法

배(embryo)의 수확. 미성숙 종자, 성숙종자 및 48시간 발아한 목화(*Gossypium hirsutum*, var. Coker 201) 종자로부터 배를 수확하였다. 미성숙 종자로부터는 40 mg, 80 mg, 100 mg 정도의 무게를 갖는 배를 배유(endosperm), 주피(integguement) 및 유근(radicle)을 제거한 후 수확하여 액체 질소에 넣어서 급속냉동 시킨 후 -70° 에서 보관하였다. 성숙한 종자로부터는 종피(seed coat)를 벗겨서 배를 노출시킨 후 미성숙 종자와 동일한 방법으로 처리하여 배를 수확하였다. 종자의 발아는 종피를 벗겨서 수확한 배를 증류수에서 한 시간 진탕하여 배유와 주피를 제거한 후 멸균된 여과지가 있는 petri dish에 옮겨서 30°C 암소에서 48시간 발아시켰다. 발아한 종자로부터는 성장한 유근을 제거하고 자엽(cotyledone)만을 수확하여 액체 질소에 넣어서 급속냉동 시킨 후 -70°C 에서 보관하였다.

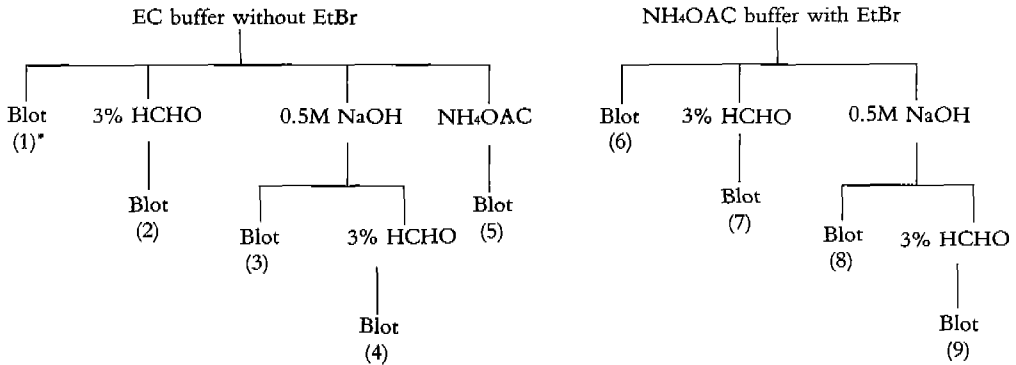
RNA 추출. 목화(*Gossypium hirsutum*, var. Coker 201) 배로부터 총 RNA의 추출은 Galau *et al.* (1981)의 방법에 따라서 행하였다. 100개의 목화(*Gossypium hirsutum*, var. Coker 201)를 100 ml의 추출완충액(100 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM sodium-EDTA, 0.5% SDS, pH 7.6)과 함께 tissue homogenizer로 마쇄한 후 phenol 및 chloroform/isoamyl alcohol(24 : 1) 용액으로 deproteinization시키고 RNA는 2 M LiCl와 3 M sodium acetate로 침전시킨다. 침전된 RNA는 적당량의 TE 완충액(10 mM Tris, pH 7.6, 1 mM sodium-EDTA, pH 8.0)에 녹인 후 반복해서 deproteinization시키고 두 배의 ethyl alcohol로 침전시킨다음 TE 완충액에 녹인 후 -20°C 에 보관하였다.

MeHgOH-agarose젤 전기영동. 10 mM MeHgOH를 포함하는 1.8% agarose 겔은 Bailey and Davidson(1976)법에 따라서 EC 완충용액(50 mM boric acid, 5 mM sodium borate, 10 mM sodium sulfate, 0.2 mM EDTA, pH 8.3)을 사용하여 형성하였다. RNA은 10 mM MeHgOH, 15% sucrose, 0.01% bromophenol blue, 5 mM sodium-EDTA를 포함하는 완충액에 넣어 겔로 옮겼다. 전기영동은 10 volt/cm로 600 volt.hr까지 행하며 전기영동 완충액은 EC 완충액

을 사용하였다.

젤의 처리 및 nitrocellulose막으로 이동. 성숙한 종자의 배로부터 추출한 RNA시료를 14개의 well에 넣고 전기영동시킨후 7개의 well을 포함하도록 젤을 반으로 나누어, 한쪽의 젤은 0.1 M ammonium acetate(NH₄ OAC)용액에서 ethidium bromide(EtBr)로 20분간 염색하고 다른 반쪽 젤은 EC 완충액에 방치하였다. 각각의 젤 절편을 U.V. transilluminator로 관찰한 후 각각 1, 5 개의 well을 포함하는 젤로 절단하여 Table 1과 같은 처리를 하였다. 염색하지 않고 EC 완충액에 방치한 시료는 그대로(1), 3% formaldehyde(HCHO)(2), 0.5 M sodium hydroxide-(NaOH)(3), NaOH처리후 HCHO처리(4), NH₄OAC처리(5)하였다. NH₄OAC에서 EtBr로 염색한 시료는 그대로(6), 3% HCHO(7), 0.5 M NaOH(8), NaOH 처리 후 HCHO 처리(9) 하였다. 각각의 처리는 실온에서 20분간 행하였으며 처리된 젤 절편들을 한데모아서 분리된 RNA를 Southern(1975)의 방법에서 denaturation과 neutralization과정을 생략하고 NC막으로 이동시켰다.

Table 1. Schematic diagram of various treatments on MeHgOH-agarose gel slices



* Number in parenthesis represents each gel slice with specific treatment as described in the text.

RNA 이동의 관찰. RNA의 이동이 끝난 후 agarose젤 절편들을 다시 EtBr로 염색하여 U.V. transilluminator를 사용하여 이동정도를 관찰하고, NC막은 nick-translation법으로 p³²로 표시된 cDNA(D-113)와 반응시켜서 처리가 RNA의 이동에 미치는 영향을 autoradiography법으로 조사하였다. 목화종자로부터 분리한 총 m-RNA를 역전사과정에 의해서 만든 클론중의 하나인 cDNA(D-113)은 총 mRNA의 4%를 차지하는 특정 mRNA 서열에 상응하며(Galau et al., 1983) Dr. Galau로부터 공급받았다.

結果 및 考察

RNA 추출. 40mg, 80mg, 100mg의 미성숙 종자와 성숙한 종자 및 48시간 발아한 종자의 배로부터 총 RNA를 추출한 결과, 종자 발생시기에 따라 RNA의 총 양은 증가하였으나 발아하는 동안 감소의 경향을 보였다(Table 2).

Table 2. Yield of total RNA per embryo at various developmental stages

| Embryo | 40mg | 80mg | 100mg | Dry seed | 48hr-germinated |
|-----------|------|-------|-------|----------|-----------------|
| Total RNA | 70ug | 140ug | 160ug | 180ug | 140ug |

MeHgOH-agarose젤 전기영동. 분리된 총 RNA를 10 mM MeHgOH를 포함하는 1.8% agarose젤에서 분자량에 따라 분리하여 EtBr로 염색한 후 U.V. Transilluminator를 사용하여 관찰한 결과, 목화의 배로부터 추출한 모든 RNA 시료는 뚜렷이 나타나는 고등생물 고유의 18S, 25S의 rRNA와 희미한 배경으로 나타나는 다른 종류의 리보핵산을 갖고 있었으며 발생단계에 따른 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

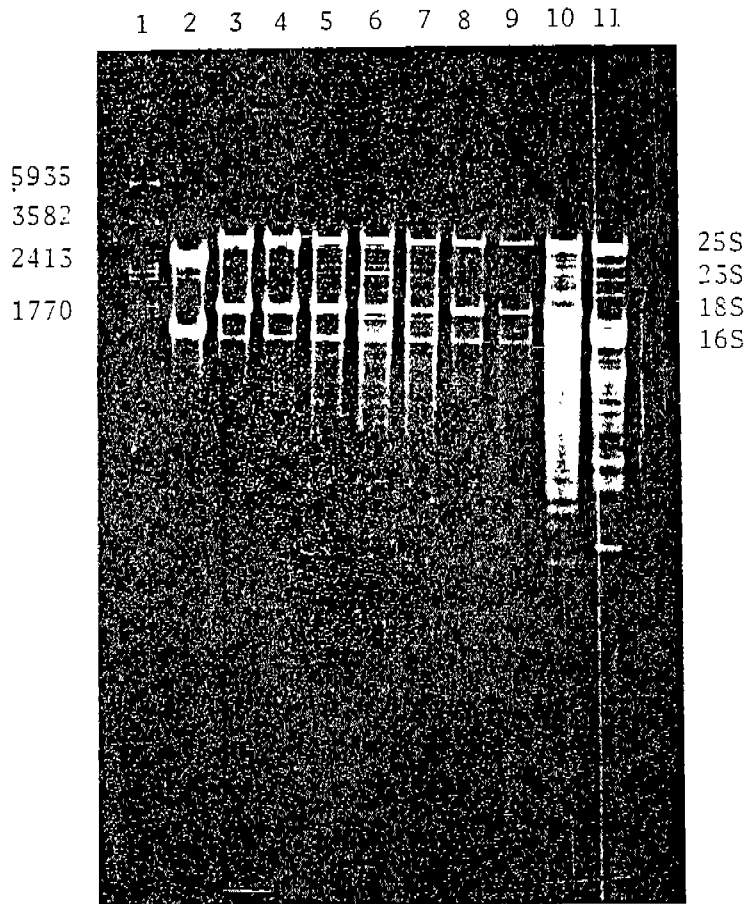


Fig. 1. Electrophoretic migration pattern of total RNA isolated from embryos at various developmental stages. 5 ug of RNA in each lane was from *E. coli*(2), 40 mg-embryo(3), 80 mg-embryo(4), dry seed(5-9);and 10 ug of 100 mg-embryo(10) and 48hr-germinated embryo(11). 1 ug of pBR325 DNA fragments generated by digestions with PstI, BagII, HindIII and HinfI was loaded in lane(1) as sigc markers.

따라서 MeHgOH-agarose젤에 분리된 RNA의 NC막으로의 이동성을 연구하기 위해서 총 RNA를 가장 많이 함유하고 있는 것으로 나타난 성숙한 종자(dry seed)의 배로부터 추출한 총 RNA를 시료로 사용하였다.

성숙한 목화 종자의 배로부터 추출한 총 RNA를 젤의 모든 well에 5ug씩 넣고 전기영동한 후 7개의 lane을 포함하는 반쪽의 gel을 0.1 M NH₄OAC 완충액에서 EtBr로 염색하여 관찰한 결과(data not shown) 분리된 양상은 Fig. 1의 lane 5-9의 양상과 동일하였다.

RNA의 NC막으로 이동. NC막으로 이동시킨 후 처리한 젤 절편들을 EtBr로 재염색한 결과 이동하기 전의 뚜렷한 band들을 관찰할 수 없었으나 0.1 M NH₄OAC 완충액에서 EtBr로 염색한 젤 절편들에서는 약한 25S rRNA band를 볼 수 있었다(data not shown). 따라서 분자량이 큰 RNA를 제외한 모든 RNA들이 MeHgOH-agarose젤을 빠져나간 것으로 판단되었으므로 빠져나간 RNA들이 NC막으로 이동하였는지를 조사하였다.

p³²로 표지된 cDNA(D-113)를 탐침으로 사용하여 NC막과 hybridization한 후 autoradiography 방법으로 RNA의 이동을 조사한 결과는 Figure 2과 같다. EtBr로 염색하지 않고 EC 완충액에 방치한 경우와 그대로 옮겼을 경우는 약한 반응을 보였고(Fig. 2-1), denaturing agent인 3% HCHO(Fig. 2-2)와 0.5M NaOH를 처리했을 경우는(Fig. 2-3) 모두 강한 반응을 보였는데 HCHO와 NaOH를 모두 처리한 경우는 HCHO를 단독 처리한 경우와 유사한 강도의 반응을 보였으며(Fig. 2-4), 완충액을 EC에서 NH₄OAC로 바꾸었을 경우는 반응을 보이지 않았다(Fig. 2-5). NH₄OAC 완충액에서 EtBr으로 염색한 경우는 모든 처리에서 반응을 보이지 않았다(Fig. 2-6, 7, 8, 9).

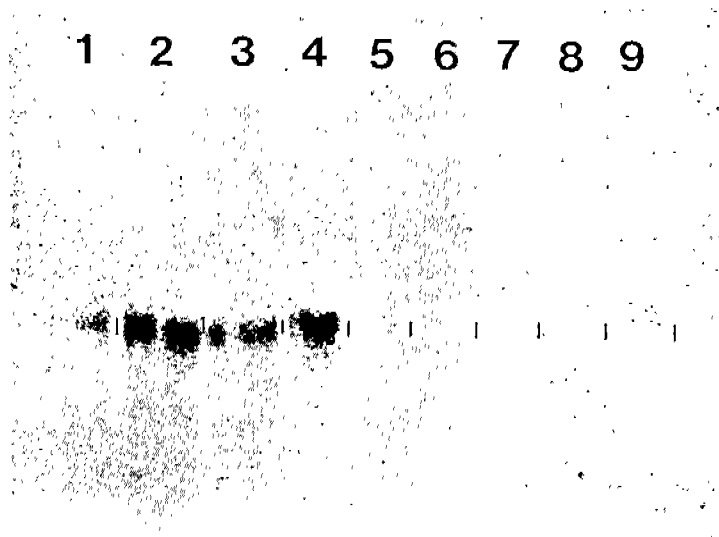


Fig 2. Photograph of developed X-ray film of nitrocellulose filter to which RNA was transferred from MeHgOH-agarose gel, and hybridized with p³²-cDNA (D-113). See Table 1 for the identification of gel slices and specific treatments. Small vertical lines were put on the photograph to define each gel slice. Two bands are shown because each slice contained 1.5 wells.

이러한 결과로부터 메칠머큐리젤에 분리된 RNA를 NC막으로 이동하는데 미치는 EtBr 염색, denaturing agents 및 buffer의 영향을 정리하면 Table 3과 같다. 즉 EtBr 염색과 NH_4OAC 완충액은 RNA의 이동을 방해하며, denaturing agent인 HCHO와 NaOH는 RNA 이동을 촉진하는데 NH_4OAC 완충액에서는 그 효과가 상실된다고 요약할 수 있다. EtBr의 효과는 일단 염색된 RNA는 NC막으로의 이동성이 저하된다는 보고(Thomas, 1980)와 일치하며 특히 NH_4OAC 완충액에서 염색한 경우는 저해효과가 증대되었는데 그것은 MeHgOH 가 NH_4OAC 완충액에 의해서 젤로부터 제거되어 EtBr이 보다 강력하게 RNA와 결합하여 (Alwine *et al.*, 1977) 방해 효과를 촉진한 것으로 판단된다. NH_4OAC 완충액의 효과는 MeHgOH 와 RNA 염기와의 결합이 가역적이며, halide ion, sulfhydryl compound 및 NH_4OAC 와 같은 amine 완충액에 의해서 MeHgOH 가 염기로부터 제거될 수 있다는 사실에 기인한다(Bailey and Davidson, 1976). 따라서 NH_4OAC 완충액을 처리하면 MeHgOH 에 의해서 파괴되었던 RNA의 이차구조가 복귀됨으로서 RNA의 이동을 방해하였다고 판단된다. Denaturing agent의 효과는 RNA가 일반적으로 NC막에 결합하지 않지만 RNA의 이차구조를 파괴하면 직접 NC막에 결합하거나 또는 젤로부터 이동하여 결합할 수 있다는 보고(Alwine *et al.*, 1977)와 일치한다. 그러나 NH_4OAC 완충액에서 이들의 효과가 상실되는 것은 EtBr 염색이나 NH_4OAC 에 의한 MeHgOH 의 제거 또는 두 가지 요인의 복합적인 결과일 수 있으며, 염색을 하지 않고 NH_4OAC 완충액에서 denaturing agent를 처리하면 그 요인을 보다 명확히 밝힐 수 있을 것이다.

이상의 결과로부터 RNA가 NC막으로 이동하는데 가장 중요한 요인은 RNA의 일차구조를 유지시키는 것임을 알 수 있고, 따라서 직접 NC막으로 옮길 수 없는 MeHgOH -agarose젤에 분리된 RNA는 일단 EC 완충액에서 방치한 후 HCHO와 같은 denaturing agent로 처리하여 일차 구조를 유지시켜 준다면 효율적으로 NC막으로 이동할 수 있음을 알 수 있었다.

Table 3. Effects of various treatments on the transferrability of RNA from MeHgOH -agarose gel slices to NC membrane

| Treatment | Transferrability(*) |
|---|---------------------|
| Without EtBr in EC buffer | |
| Blot | +** |
| 3% HCHO in EC buffer | ++ |
| 0.5M NaOH in EC buffer | ++ |
| 0.5M NaOH + 3% HCHO in EC buffer | ++ |
| 0.1M NH_4OAC buffer | - |
| With EtBr in NH_4OAC buffer | |
| Blot | - |
| 3% HCHO in NH_4OAC buffer | - |
| 0.5M NaOH in NH_4OAC buffer | - |
| 0.5M NaOH + 3% HCHO in NH_4OAC buffer | - |

* Based on the observation of Figure 3.

** +, positive; ++, strong; -, negative

摘 要

목화종자의 배로부터 추출한 RNA를 전기영동법으로 methylmercury hydroxide-agarose 겔에 분리시킨 후 염색, 완충액세척 및 변형유도체를 처리하였고 각 처리가 RNA를 nitrocellulose 막으로 이동시키는데 미치는 영향을 조사하였다. Ethidium bromide 염색과 ammonium acetate 완충액 세척은 RNA의 이동을 방해하였으며 변형유도체인 3% HCHO와 0.5 M NaOH는 RNA의 이동을 촉진시켰는데 ammonium acetate 용액에서는 촉진효과가 상쇄되었다. 따라서 RNA를 nitrocellulose막으로 이동시킬때는 RNA의 일차구조를 유지시키는 것이 중요함을 알 수 있었다.

參 考 文 獻

- Alwine, J.C., D.J. Kemp and G.R. Stark. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethylpaper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**: 5350-5354.
- Baily, J.M. and N. Davidson. 1976. Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **70**: 75-85.
- Bishop, J.O., J.G. Morton, M. Roshbash and M. Richardson. 1974. Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA. *Nature* **250**: 199-204.
- Carmichael, G.G. 1980. Molecular weight determinations of RNA by gel electrophoresis. *Electrophoresis* **1**: 78-82.
- Galau, G.A., A.B. Legocki, S.C. Greenway and L. Dure III. 1981. Cotton messenger RNA sequences exists in both polyadenylated and nonpolyadenylated forms. *J. Biol. Chem.* **256**: 2551-2560.
- Galau, G.A., C.A. Chlan and L. Dure III. 1983. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. XVI. Analysis of the principal cotton storage protein gene family with cloned cDNA probes. *Plant Mol. Biol.* **2**: 189-198.
- Lehrach, H.D., D. Diamond, J.M. Wozney and H. Boedker. 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**: 4743-4751.
- MacMaster, G.K. and G.G. Carmichael. 1977. Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 4835-4838.
- Marcu, K. and B. Dudock. 1974. Characterization of a highly efficient protein synthesizing system derived from commercial wheat germ. *Nucleic Acids Res.* **1**: 1385-1397.
- Peacock, A.C. and C.W. Dingman. 1968. Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. *Biochemistry* **7**: 668-674.
- Retzl, E.F., M.S. Collet and A.J. Faras. 1980. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid by the avian retrovirus reverse transcriptase *in vitro*: optimum conditions required for transcription of large ribonucleic acid templates. *Biochemistry* **19**: 513-524.
- Rosen, J.M., S.L.C. Woo, J.W. Holder, A.R. Means and B.W.O'Malley. 1975. Preparation and preliminary characterization of purified ovalbumin messenger RNA from the hen oviduct. *Biochemistry* **14**: 69-78.

Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-509.

Thomas, P.S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 5201-5205.

(1987, 5. 18 接受)