

Filter Hybridization 방법에 의한 Surfactant Protein B mRNA의 정량측정

한양대학교 의과대학 내과학교실

박성수 · 이동후 · 신동호 · 이정희

— Abstract —

Quantitative Measurement of Surfactant Protein B mRNA by Filter Hybridization

Sung Soo Park, M.D., Dong Hoo Lee, M.D., Dong Ho Shin M.D. and Jung Hee Lee, M.D.

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

Background: The ability to precisely measure specific mRNA levels by hybridization to complementary DNA probes is an important tool for analyzing the regulation of gene expression. Surfactant proteins have important roles in regulating surfactant metabolism as well as in determining its physical properties.

Method: The complete coding regions for rat surfactant protein complementary DNA of surfactant protein B were subcloned into pGem 3Z or 4Z such that either antisense or sense transcripts were obtained by using SP 6 RNA polymerase. Surfactant protein B mRNA was measured by filter hybridization.

Results: Equation of standard curve between counts per minute (Y) and surfactant protein B mRNA transcript input (X) was $Y=2034.9 X+159.1$. Correlation coefficient was 1.0.

Conclusions: Filter hybridization assay is suited to situation when rapid, accurate quantitation of multiple samples is required.

Key Words: Filter hybridization, Quantitation mRNA, Surfactant Protein B

서 론

유전자 발현의 조절을 분석하기 위하여 complementary DNA (cDNA)의 hybridization에 의한 특정 mRNA의 양을 측정하는 것이 매우 중요하다. 특정 cDNA의 탐지자(probe)의 조제로 reverse transcriptase 효소를 이용한 특정한 정제 mRNA를 조제에 의하여 만들 수 있다¹⁻³⁾. 역시 분자생물학적 cloning 기법에 의하여 정량측정하려고 하는 특정 mRNA에 대한 부가적 방법들이 개발되고 있다. mRNA를 정량 분석하는 방법으로 1) northern blot, 2) filter hybridization, 3) solution hybridization 방법들이 있다.

Northern blot은 10 pg까지 측정할 수 있고, 시료의 크기와 숫자를 동시에 얻을 수 있는 장점이 있으나⁴⁾, filter hybridization 방법은 northern blot이나 slot blot보다 소량의 변화에도 예민하며 재현성이 높을 뿐만 아니라, 많은 양의 시료를 동시에 검사할 수 있고, 방법에 있어서도 용이하다.

최근 분자생물학적 기법을 이용하여 서로 다른 4가지의 surfactant protein (SP)을 밝혀냈다. 첫째 SP-A는 당단백이며 환원형의 분자량은 28~36 kDa이고, 둘째 SP-B는 배수성 단백질이며, 비환원형의 분자량은 18 kDa이고 셋째, SP-C 역시 배수성 단백질이고 비환원형의 분자량은 5~8 kDa이다. 넷째, SP-D는 교원질성 당단백이며, 환원형은 43 kDa이다^{5,6)}. Surfactant 단백질은

surfactant의 물리학적성상 및 대사를 조절 하는데 있어서 중요한 역할을 한다. 배수성인 SP-B mRNA을 filter hybridization 방법으로 국내에서는 처음 정량적으로 측정하였다.

대상 및 방법

1. RNA Hybridization Assays

SP-B의 surfactant 단백질의 cDNA에 대한 완전한 coding 부위를 Gem 3Z나 4Z에 subclone 하였고, antisense나 sense 복사체(transcript)를, SP6 RNA polymerase를 이용하여 얻었다. 복사반응으로부터 얻은 산출물은 linealized vector microgram (μg)당 전체 길이가 20~30 μg 의 복사체였다.

0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 ng의 sense 복사체를 65°C에서 10~15분 denature 후 3장의 13 mm nitrocellulose filter (0.45 μm in pore size, Schleicher and Schuell, Keene, N.H.)에 10× standard saline citrate (SSC)/50% formaldehyde를 20 μl 씩 가하였다. Filter 들을 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 cc양으로 56°C에서 12~15시

간동안 50 cc Falcon centrifuge tube내에서 흔들면서 prehybridization 하였다. prehybridization 후 4× SSC, 1× Denhardt's solution, 45% formamide, 10% dextran sulfate, 0.5% SDS, 0.1 mg/ml salmon sperm DNA의 용액을 filter당 0.2~0.5 cc가한 후 특이 활성도가 5×10^6 cpm/ml인 ^{32}P 로 표지시킨 쥐의 특정한 cDNA탐지자와 함께 56°C에서 흔들면서 17~20시간 동안 hybridization하였다. 모든 filter는 실온에서 2× SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번, 65°C에서 0.1×SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번 세척하였다. Filter는 공기중에 말린 후 scintillation vial에 넣은 후, Packard Liquid Scintillation Analyzer (1500 TRI-CARB[®])로 CPM (counts per minute)을 측정 후 눈금이 정해진 곡선을 이용하여 각 filter에 결합된 recombinant에 대한 [^{32}P] cDNA의 hybridization 정도를 mRNA의 복사체의 실제 숫자를 정하는데 이용할 수 있었다. SP-B mRNA는 회귀방정식(regression equation)을 사용하여 정상곡선(standard curve)으로부터 산출하였다.

2. 성적 분석

회귀방정식과 상관계수(correlation coefficient)는 Epistat statistical package으로부터 산출하였다.

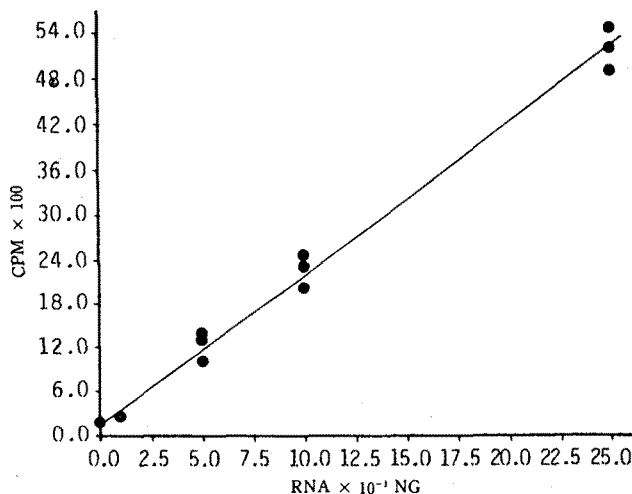


Fig. 1. Standard curve for SP-B mRNA transcript input. CPM deposition/filter increase in a linear fashion with SP-B mRNA transcript input. Equation of standard curve between CPM(Y) and SP-B mRNA (X) is $Y=2034.9X+159.1$. R is 1.0.

결 과

SP-B의 sense 복사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5 ng에 대한 cpm과의 정상곡선 및 상관계수(r)는 다음과 같다. SP-B에 대한 sense 복사체의 정상곡선은 $Y=2034.9X+159.1$ ($X=SP-B$ mRNA 복사체, $Y=CPM$) 이고 r계수는 1.0이었다(Fig. 1).

고 안

SP-B는 표면장력의 감소를 촉진한다⁷⁾. SP-B와 SP-C는 음이온 인지질 (phospholipid) 존재하에 인지질 vesicle의 응집과 융합을 강화시킨다. 특히 SP-B는 강한 양이온 단백질로 음이온 인지질의 head group과 선택적으로 작용하여 인지질막의 표면을 만들도록 지시한다. SP-B와 SP-C는 인지질을 흡수하는데 있어서 용량에는 의존하나, 온도, 세포의 특이성, 포화도에는 의존하지 않는다. 또한 수용체에 의존하지 않는 경로로 내부이행(internalization)된다⁸⁾.

RNA는 분해(degradation)에 아주 예민하다. 실험 전 glassware를 세심하게 깨끗이 씻어야 하고 ribonuclease가 많은 맨손으로 용기들을 만지지 말아야 한다. Diethylpyrocarbonate (DEPC)을 1 l의 물에 2방울 가한 다음 30분동안 끓인다. 그다음 glassware를 말린다. 중금속이온들 역시 RNA를 붕괴 변질 시킬 수 있으므로 Chelex resin (BioRad)용액에 여과함으로 제거할 수 있다.

Nitrocellulose filter는 대체로 여러가지 크기의 구형이며, 크기가 13 mm이고, $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 DNA나 RNA 양과 결합할 수 있다. 특정 RNA의 1 pg까지 검출할 수 있다. Filter pore 크기는 분자량이 큰 핵산에는 $0.45 \mu\text{m}$ 의 nitrocellulose filter를, 500 핵산염(nucleotide) 보다 작은 분자량에 대하여서는 pore 크기가 $0.22 \mu\text{m}$ 을 사용한다. $0.1\sim 0.22 \mu\text{m}$ 크기의 pore를 가진 filter가 가장 유효하다. Nitrocellulose filter의 단점은 잘 부서지고 떨어뜨리기 쉽기 때문에 조심스럽게 다루어야 한다. 반면 nylon filter는 nitrocellulose filter보다 유연하고 다루기 쉽고 붕괴되지 않고 무한정 사용할 수 있다는 장점이 있다. 효율면에서 있어서 nitrocellulose filter 만큼 효율적이다. Nitrocellulose filter의 종류는

membrane filters BA85, Millipore filter, Sartorius filter, Hybond C filter, GeneScreen and GeneScreen plus hybridization transfer membrane, Biotransfer membrane, Hybond-N membrane 등이 있으며, 계속 새로운 filter들이 현재 개발되고 있다⁹⁾. 본 실험에서는 3장의 13 mm nitrocellulose filter ($0.45 \mu\text{m}$, Schleicher and Schuell, Keene NH.)을 사용하였다.

핵산이 filter에 결합하기 위하여서는 변성(denaturation)되어야 한다. 모든형의 filter에 균등하게 적용시킬 수 있는 고정(immobilisation)과정은 현재 없다. 고정 은 예로 nitrocellulose filter나 Biotransfer nylon membrane에 DNA나 RNA의 정량적인 결합을 위하여서는 고이온농도가 필요하고, 저이온농도에서는 결합능이 감소한다^{10,11)}. 반면 GeneScreen nylon membrane은 DNA나 RNA에 결합을 위하여서는 저이온농도를 필요로 하고, 결합능은 고염농도에서는 빈약하다.

RNA는 single-strand이지만 filter에 효과적으로 결합하기 위하여서는 변성 되어야 되는 double-strand 부위를 포함한다. RNA 변성을 위하여서는 열이나 glyoxal, methyl mercuric hydroxide^{12,13)}, formaldehyde, dimethyl sulphoxide (DMSO), 제제들을 일반적으로 사용한다. Methyl mercuric hydroxide, formaldehyde는 독성이 있고, DMSO는 nitrocellulose filter를 용해시킨다. Glyoxal을 변성제로 이용하는데 중합억제제를 포함하는 40% 용액(6.89M)으로 시판되고 있다. 탈이온화(deionization)시켜 사용하고 있다.

Hybridization 과정은 prehybridization, 탐지자에 의한 hybridization, 세척(washing)의 삼단계로 구분할 수 있다. Prehybridization시 용액에 잠복시켜서 탐지자가 비특이적으로 결합할 수 있는 부위를 미리 피막을 입힌다. 만약 이 과정의 부전시 고배후방사선량(background noisy)을 초래할 수 있다. 본 실험에서 이 prehybridization용액은 NaCl, dextran sulfate, 50% formamide, 1% SDS를 사용하였고, filter당 $0.2\sim 0.5$ cc 양으로 56° 에서 12~14시간 동안 50 cc Falcon centrifuge tube내에서 흔들면서 시행하였다. Prehybridization이나 hybridization에 사용하는 용액은 prehybridization이나 hybridization에 필요한 온도로 미리 덩혀야 한다. Filter hybridization은 2가지 과정 즉 filter에 탐지자의 확산과 filter에 hybridization의 두가지 과정에 의하여 설명된다. Filter에 결합된 핵산

sequence의 농도가 낮으면 hybridization 반응자체는 rate limiting step이고, 농도가 높으면 filter에 결합되는 탐지자의 확산에 의하여 제한된다. Filter hybridization의 속도는 filter에 결합된 핵산의 저장에 대한 복합체(complexity)비에 역비례한다. Filter에 결합된 핵산에 대한 용액내 변성된 핵산 탐지자의 hybridization은 용액내 sequences의 재조합반응(reassociation)과 filter에 결합된 RNA에 hybridization의 경쟁반응이다.

최근에 SP6 plasmid와 같은 특별히 조립된 재조합 plasmid로부터 시험관 내에서 대량의 RNA를 합성할 수 있다. 1 μ g template로부터 10 μ g까지 대량의 복사체를 생산할 수 있다. 이 탐지자는 single strand이고, 저 복합체를 갖기 때문에 용액내 경쟁하는 재조합 반응이 없다. 또한 탐지자의 고특이성 및 본래대로 유지할 수 있다. 이러한 이유 때문에 SP6 RNA 복합체를 사용한 탐지자가 현재 인기가 있다. 그러나 DNA에 반하여 RNA를 다루기 때문에 훨씬 많은 주의를 요하고 in situ hybridization에는 유익하지 않다. 본 실험에서도 Promega사의 Riboprobe Gemini System을 이용하였다. 32 P는 고에너지이고, 짧은 scintillation 측정시간과 autoradiography의 노출시간들의 장점이 있다. Filter나 solution hybridization에 이용된다. 본 실험에서도 32 P를 사용하였다. 보통 표지(labeling)는 핵산내 32 P를 첨가함으로써 핵산염의 부분을 교체할 수 있다. 32 P은 방사선 방출 때문에 다루는데 주의를 요한다. 32 P의 반감기가 14.3일이기 때문에 반감기에 맞추어서 실험을 시행해야 한다.

Filter hybridization의 속도에 영향을 주는 요소들 중 탐지자의 농도가 중요한데 single strand 탐지자인 경우 filter에 hybridization의 속도와 형성된 hybrid의 양은 용액내 핵산 탐지자의 농도의 증가와 함께 증가되어야 한다. 초기의 hybridization 속도는 용액내 핵산 탐지자의 농도와 비례한다. Input DNA 탐지자의 20~30%는 재조합반응 때문에 hybridization을 위하여 이용할 수 없다¹⁴⁾. Filter에 결합된 sequence에 hybridization할 수 있는 single-strand 부위에 탐지자가 부분적으로 재조합된 이중의 사슬을 형성한다. 그러나 ml당 100 ng의 32 P가 표지된 탐지자 이상을 사용시 filter에 비특이성 불가역적인 결합반응이 일어난다. 본 실험에서는 특이활성도가 5×10^6 CPM/ml인 32 P로 표지시킨

의 특정한 cDNA를 표지자로 사용하였다. 비특이적으로 비가역적으로 결합할 수 있는 조합되지 않은 전구물질들을 제거함으로써 고배후방사선량을 방지할 수 있다. 배후방사선량을 줄이기 위해서는 poly (A)와 poly (C)를 사용한다. Double-strand 탐지자는 알칼리에 의하여 서나 끊어서 변성시킨 후 사용한다.

Filter에 탐지자의 확산을 용이하게 하기 위하여 재결합반응보다 hybridization을 장려하기 위하여서도 크기가 작은 표지자를 사용하고, 소량의 반응용량, 용액내 표지자의 저농도, 고반응온도들의 조건을 취하여야 한다. 그 밖에 filter hybridization의 속도에 영향을 줄 수 있는 여러가지 요소들이 있다. 즉 탐지자의 농도, 탐지자의 복합체, 탐지자의 분자량, 염기구성, 온도, formamide의 농도, 이온농도, dextran sulfate, 점성(viscosity), pH 등이다.

핵산의 염기구성이 hybridization 속도에 영향을 준다. G+C%가 증가하면 hybridization속도 역시 증가한다. 그러나 이 효과는 미미하기 때문에 실제에 있어서는 무시할 수 있다. 온도가 상승함에 따라 속도는 증가하며, DNA-DNA annealing을 위한 용해온도 이하 20~25°C에서 속도는 극적으로 증가한다. Well-matched hybrid에서 hybridization 반응은 용액 내에서는 68°C에서, 50% formamide의 용액내에서는 42°C에서 시행된다. Formamide는 핵산 hybrid의 용해온도를 낮추는데 30~50%의 formamide를 유지하면 잠복 온도를 30~42°C로 낮출 수 있다. 이것은 저온에서는 탐지자가 더 안정되어 있고 nitrocellulose filter에 비공유결합 핵산의 보유에 더 좋고 filter자체도 저 온도에서는 붕괴되지 않는다. 30~50%의 formamide 농도는 filter hybridization 속도에는 아무 영향이 없다. 20% formamide 농도시는 약 1/3 속도의 감소가 온다¹⁵⁾. 80% formamide 농도시 역시 속도의 감소가 온다¹⁶⁾. 본 실험에서는 45% formamide 용액에서 56°C에서 hybridization을 시행하였다. 저이온농도시 핵산은 매우 천천히 hybridization되고 이온농도가 증가되면 반응은 증가한다. 0.1M Na⁺이하의 저염농도시 농도를 2배 증가시키면 hybridization속도는 5~10배가 증가된다^{17,18)}. Dextran은 용액내 hybridization 속도를 증가시킨다. 또한 DNA나 RNA 탐지자 농도를 증가시킨다¹⁹⁾. Dextran은 점성이고 다루기가 어렵고, 고배후방사선량을 초래할 수 있다. 용액의 점성이 증가하면 hybridiza-

tion 농도가 감소한다. 본 실험에서는 10% dextran-용액을 hybridization을 위하여 사용하였다. pH는 5~9가 적절하고 0.4 M Na⁺ 농도에서 hybridization 속도는 pH와 무관하다.

세척은 well-matched hybrid를 위해서는 용해온도 이하 5~20°C에서 시행되는데 실제 65~70°C에서 시행한다. 반드시 흔들면서 시행되어야 한다. 짝짓지 못한 loop와 single strand 탐지자 trail을 제거하기 위하여 본 실험에서는 RNase A와 T₁ RNase로 filter를 처치한 후 37°에서 2×SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번, 65°C에서 0.1 SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번, 최종적으로 실온에서 2×SSC 용액으로 세척하였다. 세척도 반드시 흔들면서 시행하여야 한다^{20,21}. 본 실험에서 filter hybridization으로 SP-B mRNA와 CPM사이에 상관계수 1.0인 선상 정상곡선을 보였다.

Filter hybridization 방법은 mRNA를 정량 측정하는데 있어서 빠르고 재현성이 높으며, 많은 시료를 한꺼번에 시행할 수 있고, 앞으로 다른 surfactant 단백질 및 시료의 mRNA를 정량 측정 하는데 있어서 유용한 방법이다.

요 약

연구배경 : Surfactant 단백질의 물리학적 성상의 결정 및 대사를 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다. 유전자 발현의 조절을 연구하기 위하여서는 cDNA의 탐지자에 의한 mRNA의 정량측정이 중요하다.

방법 : 쥐의 surfactant 단백질 B의 cDNA에 대한 coding 부위를 PGem 3Z 또는 4Z에 subclone하여 SP6 RNA polymerase 효소를 이용하여 antisense와 sense를 얻었다. Sense를 이용한 filter hybridization을 시행하여 정상곡선을 얻었다. Antisense는 ³²P를 표지시켜 탐지자로 이용하였다.

결과 : SP-B에 대한 sense 복사체의 정상곡선은 Y = 2034.9X + 159.1 (X = SP-B mRNA 복사체, Y = CPM) 이고, 상관계수는 1.0이었다.

결론 : 이상의 결과로 filter hybridization 방법은 mRNA를 정량 측정 하는데 있어서 빠르고, 재현성이 높으며, 많은 시료를 한꺼번에 시행할 수 있는 유용한 방법이다.

REFERENCES

- 1) Gillespie D, Spiegelman S: A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J Mol Biol* 12:829, 1965
- 2) Nygaard AP, Hall BD: A method for the detection of RNA-DNA complexes. *Biochem Biophys Res Comm* 12:98, 1963
- 3) Warnaar SO, Cohen JA: A quantitative assay for DNA-DNA hybrids using membrane filters. *Biochem Biophys Res Comm* 24:554, 1966
- 4) Thomas PS: Hybridization of denatured RNA and DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Nat Acad Sci USA* 5201, 1980
- 5) King RJ, Klass DJ, Gikas EG, Clements JA: Isolation of apoproteins from canine surface active material. *Am J Physiol* 224:778, 1973
- 6) Person A, Rust K, Chang D, Moxley M, Longmore W, Crouch E: CP₄: A pneumocyte derived collagenous surfactant-associated protein. Evidence for heterogeneity of collagenous surfactant proteins. *Biochemistry* 27:8576, 1988
- 7) Yu SH, Possmayer F: Role of bovine pulmonary surfactant-associated proteins in the surface-active property of phospholipid mixtures. *Biochim Biophys Acta* 1046:233, 1990
- 8) Weaver TE: Surfactant proteins and SP-D. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:4, 1991
- 9) Margaret LM, Anderson, Young BD: Chapter 4, Quantitative filter hybridization, In *Nucleic acid hybridization*, p 73-111, Oxford. IRL Press 1985
- 10) Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503, 1975
- 11) Nagamine Y, Sentenac A, Fromageot P: Selective blotting of restriction DNA fragments on nitrocellulose membranes at low salt concentrations. *Nucleic Acids Res* 8:2453, 1980
- 12) 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 USA* 74:4835, 1977
- 13) Bailey JM, Davidson N: Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Anal Biochem* 70:75, 1976
- 14) Flavell RA, Birkfelder EJ, Sanders JP, Borst P:

- DNA-DNA hybridization on nitrocellulose filters. Eur J Biochem 47:535, 1974
- 15) Howley PM, Israel MA, Law MF, Martin MA: A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. J Biol Chem 254:4876, 1979
 - 16) McConaughy BL, Laird CD, McCarthy BJ: Nucleic acid reassociation in formamide. Biochemistry 3289, 1969
 - 17) Britten RJ, Graham DE, Neufeld BR: Analysis of repeating DNA sequences reassociation, in Grossman L and Moldave K, Methods in Enzymology, p 363-431, Academic Press, NY, 1974
 - 18) Wetmur JG, Davidson N: Kinetics of renaturation of DNA. J Mol Biol 31:349, 1968
 - 19) 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. Proc Natl Acad Sci USA 76:3683, 1979
 - 20) 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 USA 77:5317, 1980
 - 21) Xin J-H, Brandhorst BP, Britten RJ, Davidson EH: Cloned embryo mRNAs not detectably expressed in adult sea urchin coelomocyte. Dev Biol 89:527, 1982