

RNA 定量法에 관한 研究

—過鹽素酸농도가 Orcinol 反應에 미치는 影響—

襄 武·金 炳 弘

韓國科學技術研究所 應用微生物研究室

(1971년 6월 30일 수리)

A Study on RNA Determination by Ribose Estimation

—Condition of Perchloric acid Concentration on the Color generation by Orcinol reaction—

by

Moo Bae and Byung-Hong Kim

Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

(Received June 30, 1971)

Abstract

Effects of perchloric acid (PCA) and trichloroacetic acid (TCA) on the color generation by orcinol reaction were systematically investigated. When the concentration of PCA on hot acid treatment was varied from 1 through 5 to 10%, and then the concentration of PCA on orcinol reaction was adjusted to 5% of reaction volume, no difference in the color generation was observed between 5 and 10% of PCA, but clearly observed between 1 and 5% PCA.

When RNA was treated in 5% hot PCA and then PCA concentrations on orcinol reaction were adjusted to 5% and 10%, respectively, remarkable differences in color generation were observed.

When RNA was treated in 10% hot PCA and then PCA concentration on orcinol reaction was adjusted to 5%, no difference in color generation between 5% and 10% hot acid treatment was observed.

The results show that PCA concentration must be adjusted prior to orcinol reaction.

結 言

1871年 Miesher⁽¹⁷⁾에 의해 核酸이 發見된 以來 一世期 동안의 研究로 核酸은 리보核酸(ribonucleic acid, RNA라 약)과 디옥시리보核酸(deoxyribonucleic acid, DNA라 약)으로 大別되며 生命現象에 必須的 存在로 生體內에서 DNA는 遺傳子의 本體이며 RNA는 또한 遺傳情報의 傳達等 各生物에 特異한 protein 合成에 關係하는 것 등이 알려지면서 급기야는 分子生物學(molecular biology)이라는 새로운 分野의 기초를 마련하게 되었다.

한편 1913年 Kodama⁽²⁾에 의해 건조가다랭이 (kat-

suobushi)의 정미성분이 RNA의 分解產物인 inosine-monophosphate의 histidine 鹽인 것이 밝혀진 以後 核酸系의 化學調味料가 工業的으로 生産되게 되었다.

이러한 研究를 위해 核酸을 組織에서 抽出 및 定量하는 技術이 必要하게 되었고 실제 여러가지 方法이 알려졌으며 최근 10년 간의 發展은 分子生物學의 技術의 土臺의 하나가 되고 있다.

이들 方法은 大部分 組織에서 核酸을 抽出하기 前에 定量에 방해되는 物質을 除去시키는 處理를 行한다.

抽出 및 定量法을 Munro와 Fleck의 分類에 따라⁽³⁾ 살펴보면 抽出方法으로는 1) 90°C에서 trichloroacetic

acid(TCA 라 약함)로 熱酸處理하는 Schneider procedure, 2) room temperature 에서 alkali digestion 시켜 酸을 加해 RNA 와 DNA 를 分離 抽出하는 Schmidt-Thanhauser procedure, 3) Ogur-Rosen 이 植物組織中의 核酸을 抽出할 때 채택한 4°C 에서 perchloric acid(PCA 라 약함)로 18 時間 處理하는 方法 및 4) 食鹽水로 抽出하는 方法이 있다. 한편 抽出한 核酸의 定量法으로는 1) 核酸中의 base 가 wave length 260 m μ 에서 ultra violet 를 吸收하는 성질을 利用한 UV 吸收法, 2) 構成糖을 化學的인 方法으로 色度를 比較定量하는 比色定量法 3) phosphate 를 定量하는 方法 등을 그 代表的인 것으로 들 수 있다.

抽出方法中 Ogur-Rosen procedure 로는 RNA 抽出이 不完全하며⁽⁴⁾ Schmidt-Thanhauser procedure 는 Schneider procedure 보다 조작이 복잡하고 長時間을 要하므로⁽⁵⁾ 一般적으로 Schneider procedure 로 核酸을 抽出한다.

Schneider procedure 로 核酸을 抽出할 때의 定量法은 DNA 와 RNA 가 함께 抽出되므로 ribose 와 deoxyribose 에 特異적으로 反應하는 比色定量法이어야 한다.

RNA 의 比色定量法으로 Dische 등⁽⁶⁾의 phloroglucinol 을 使用하는 方法 Mauritzen 등⁽⁷⁾의 aniline 使用方法, Roe 등⁽⁸⁾의 p-bromoaniline 使用方法 등 여러 가지가 있으나 Bial 의 orcinol 을 利用한 pentose 定量法을 應用한 Mejbaum⁽⁹⁾의 方法이 가장 sensitive 한 것⁽¹⁰⁾으로 알려져 있다.

Schneider procedure 中 試料의 前處理에서 核酸의 loss 에 對한 研究은 많아⁽³⁾ 어느정도 이를 피할 수 있는 改良된 方法이 있으나 抽出 및 發色이 확실히 정립되지 못하고 있다.

본 연구에서는 抽出 및 發色에서의 조건을 여러가지로 살펴 보았으며 특히 Hutchison 등⁽¹¹⁾이 말한 組織에서 RNA 를 抽出할 때 PCA 의 濃도가 미치는 영향을 強調하고 있을 뿐 發色에 미치는 영향에는 언급하지 않고 있는 事實과 相異한 點이 밝혀졌기에 여기 보고한다.

材料 및 (實驗)方法

1) RNA 標準純品

Ribonuclein säure <C.F. Boehringer & Soehne Gmb H Mannheim >

2) Preparation of orcinol reagent.

純品 orcinol 1 g 을 34 ml 의 98% ethanol 에 녹이고 0.1% FeCl₃ 14 drops 를 加한다.

3) Optical density 測定.

Orcinol reaction 으로 發色시킨 後 Bausch & Lomb 製 Spectronic 20 型 Spectrophotometer 로 wave length 660 m μ 에서 optical density 를 測定 比色定量하였다.

4) RNA 抽出 및 發色法

RNA 를 含有한 組織을 熱酸處理하면 Oligo-RNA 를 거쳐 purine nucleotide 는 base, 糖 및 phosphoric acid 로 그리고 pyrimidine nucleotide 는 nucleotide 혹은 nucleoside 로 分解되어 soluble 狀態로 抽出된다고 하므로 RNA 標品도 同一한 作用을 받는 것으로 보고 다음과 같은 조작으로 分解 및 發色시켰다.

特別히 기술하지 않은 각 조작에서의 조건은 이와 同一하다.

① RNA 의 熱酸處理

PCA 또는 TCA 5%로 90°C water bath 에서 20 分間 加熱하였다.

② Orcinol reaction 에 依한 發色.

熱酸處理가 끝난 試料을 5 ml 取하여 濃-HCl 3.5 ml 와 orcinol reagent 0.5 ml 加하여 boiling water bath 에서 15 分間 作用시켰다.

5) 抽出 혹은 前處理에 使用하는 酸의 濃도에 따른 영향

TCA 各 0.5, 5, 10%로 各 濃度の RNA 를 15 分間 熱酸處理하고 10 分間 發色시켜 OD 를 比較하였으며 PCA 는 1, 5, 10%로 前과 같이 處理 比較하였다.

6) 熱酸處理 時間에 따른 영향

5%의 PCA 로 5 分부터 30 分까지 每 5 分마다 熱酸處理하여 10 分, 15 分間 各 各 發色시켰다.

7) 發色時間에 따른 영향

5% PCA 로 20 分間 熱酸處理하여 5 分부터 30 分까지 每 5 分마다 各 各 orcinol reaction 으로 發色시켰다.

8) 發色時 PCA 및 TCA 共存濃도에 따른 영향

PCA 5%로 熱酸處理하여 發色試料로 할 때 PCA 濃도를 各 各 5%, 10%로 하였다. 이에 比較를 하기위해 10%로 熱酸處理한 것을 5% PCA 로 하여 함께 發色시켰다.

TCA 도 같은 濃도와 같은 方法으로 실시하였다.

實驗 結果

1) 熱酸處理時 酸의 濃度가 發色에 미치는 영향

Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 TCA에서 0.5%, 5% 處理間에는 發色強度에 그 差異를 인정할 수 있으나 5%와 10% 處理間에는 거의 같음을 알 수 있다.

PCA에서도 1%와 5% 處理間에는 差異가 있으나 5%와 10% 處理間에는 差異가 없다.

發色 때의 TCA 濃度는 2.5%, PCA 濃度는 5%로 모두 同一하였다.

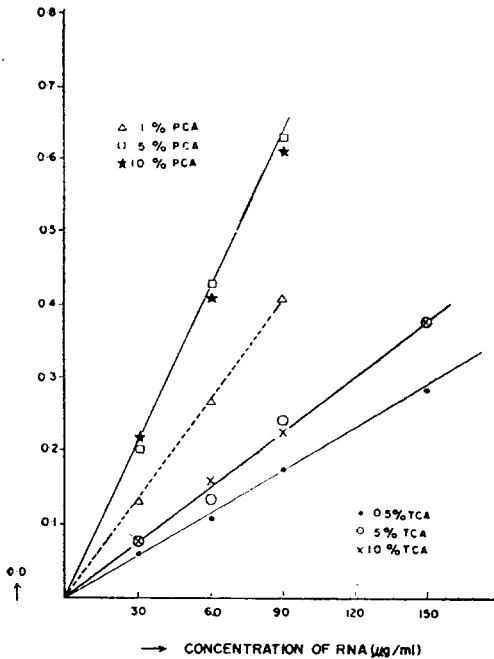


Fig. 1. Effects of the hot acid concentrations on the color generation by orcinol reaction

Acid treatment: 15 min.

Orcinol reaction: 10 min.

2) 熱酸處理 時間이 發色度에 미치는 영향

5% PCA로 熱酸處理하여 10分 및 15分間 發色시킨 것 모두 15分 以後부터는 거의 一定하게 됨을 Fig.2에서 볼 수 있다.

3) 發色時間에 따른 영향

Fig. 3에서 15分까지는 色度增加速度가 빠르며 15分 以後부터는 一定함을 알 수 있다. 따라서 20分 熱酸處理後 15分間 發色시키면 安全한 것으로 나타났다.

4) 發色時 共存하는 TCA 및 PCA의 濃度가 發色度에 미치는 영향

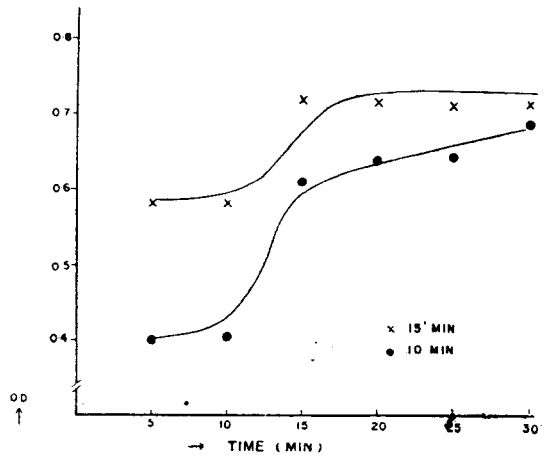


Fig. 2. Effect of the length of hot acid treatment on color generation in orcinol reaction

PCA concentration: 5%

Reaction time: 10 and 15 min.

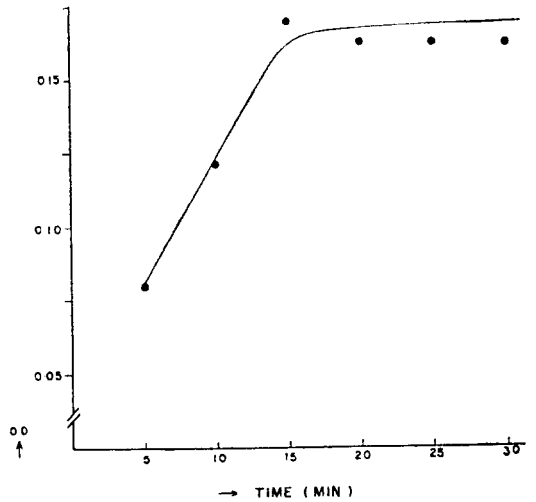


Fig. 3. Effect of the length of orcinol reaction after hot acid treatment

PCA 5%, 20 min.

熱酸處理時의 PCA 濃度에는 5%나 10%에 關係없이 發色할 때의 PCA 濃度가 5%이면 같은 值의 發色強度를 보이며 5%로 熱酸處理한 것이라도 發色할 때 PCA가 10%이면 훨씬 높은 값의 發色強度를 보인다는 것이 Fig. 4에 나타나 있다.

한편 發色할 때 TCA의 濃度가 試料의 5% 以上일 때는 현탁되어 OD 測定이 不可能하였다.

以上 Fig.1 및 Fig.4에서 알 수 있는 바와 같이 發色時의 最終 PCA 濃度가 같으면 前處理 단계의 PCA 濃度가 5% 내지 10%에서는 發色에 아무런 영향을 미치지

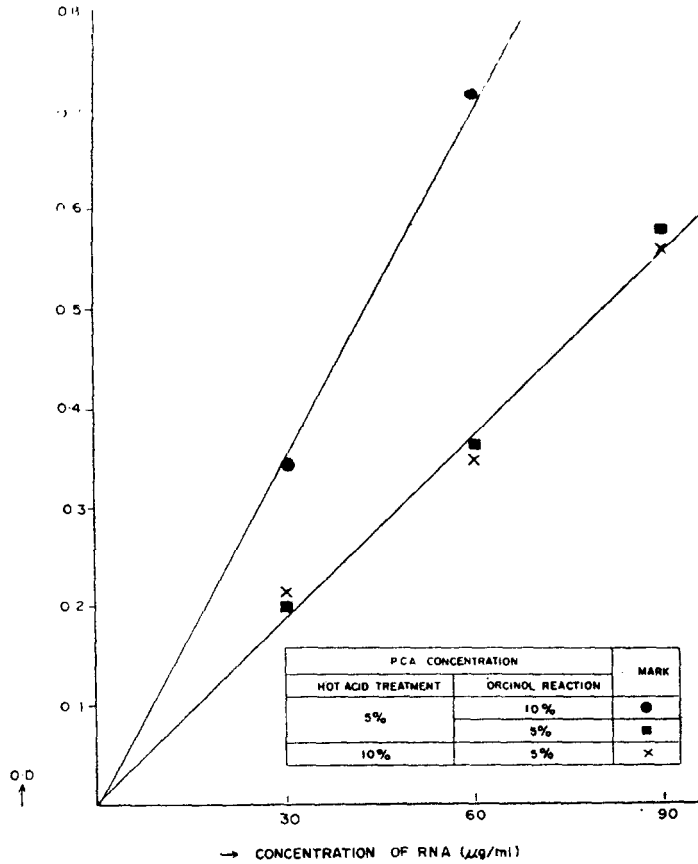


Fig. 4. Effect of concentration of PCA included in solution on hot acid treatment and orcinol reaction

지 않는 것을 알 수 있으며, 또한 抽出 및 前處理에서 PCA 濃度가 一定하다 해도 發色時 試料溶液에 포함된 PCA의 最終濃度가 다르면 發色에 현저한 差異를 나타낸다는 것이 確證되었다.

考 察

核酸 抽出조작으로 Schneider는 원보에서 5%로 TCA 熱酸處理했으며 實驗者에 따라서 TCA 濃度를 3%⁽¹¹⁾ 6%⁽¹²⁾, 7.5%⁽¹⁸⁾로 使用했으며 그 時間도 10分⁽¹¹⁾부터 30分까지 여러 方法으로 실시하였다. PCA로 抽出할 때 0.5N로 부터 1.0N까지 있었으나 結果 1)과 2)에서 熱酸處理는 TCA, PCA 모두 5%로 20分이면 충분하며 TCA로 抽出할 때 다음 조작인 發色에서 試料溶液中 TCA 濃度가 5% 이상 되지 않게 유의해야 되며 260 mμ에서 紫外線 吸收法에 의한 定量時에는 TCA가 강한 紫外線 吸收物이므로 이를 分離시킬⁽¹⁴⁾ 必要가 있

는 등 PCA 보다 使用에 좋지 않다는 것이 분명하다.

Munro 등과 Schneider는 發色反應인 orcinol reaction을 boiling water bath上에서 30分間 실시한다고 하나 結果 2)에서 20分, 熱酸處理後에는 15分間의 發色反應이면 충분하다는 것을 알 수 있다. Orcinol reaction의 原理는 RNA中の pentose가 熱酸存在하에서 furfural로 變하므로서 發色하는 것이며 FeCl₃는 여기서 촉매作用을 하게 된다.

Orcinol reaction에 의한 RNA의 比色定量에서 여러 가지 조건 즉 orcinol, FeCl₃ 및 HCl의 濃度 등을 Miller 등⁽¹⁵⁾이 조직적인 研究를 하여 위에 나열한 各反應物의 濃度가 增加하면 어느 정도까지 色度가 增加한다고 發表하였다. 또한 Hutchison 등⁽¹⁶⁾은 熱酸處理時 1.0N의 PCA를 20分以上 處理한다던지 PCA의 濃度로 2.0N, 3.0N로 增加시키면 RNA以外的 orcinol反應物이 抽出된다고 發表하였다. 그러나 結果 1)과 4)에서 볼 때 PCA 濃度가 抽出에서 영향을 미친다는^(1,15) 것보

다 發色過程에서 더욱 현저한 영향을 미친다는 事實이 여기서 밝혀졌다.

또한 結果 1)과 4)를 Miller 등의 結果와 比較해 보면 濃HCl과 共存下에서 PCA의 濃度差 5%는 그렇게 큰 問題가 되지 않을 것을 알 수 있다. 이를 종합해 보면 PCA는 發色過程에서 orcinol, RNA 등과 그作用 그 色度를 增加시키는, 알려지지 않은 作用을 갖는 것으로 생각된다.

要 約

- 1) 熱酸處理에서 酸의 濃度は TCA, PCA 모두 5% 이면 충분하다.
- 2) 熱酸處理時間은 發色時間을 15分으로 할 때 20이면 충분하다.
- 3) 20分間 熱酸處理하면 發色時間은 15分이면 된다.
- 4) PCA 濃度가 5% 以上에서는 RNA 前處理에서는 영향을 미치지 않으나 發色시킬 때는 영향을 미치므로서 이때 PCA의 濃度を 一定하게 해줄 必要가 있다.
- 5) 發色시킬 때 試料 中에 TCA가 5% 以上 共存하면 현탁되어 OD 測定이 不可能하며 PCA 처럼 濃度差가 色度에 영향을 미칠 可能性이 있으므로 熱酸處理는 TCA 보다 PCA를 使用하는 것이 좋다.

文 獻

- (1) 水野重樹: 核酸의 一般的 分離·定量法(東京大學 出版會, 東京, 日本) 81, (1969).
- (2) Kodama, S: *J. Chem. Soc. (Tokyo)*, 34, 751(1913).

- (3) Munro, H. N. and Fleck, A.: *Methods Biochem. Anal.*, 14, 113 (1967).
- (4) Munro, N. H. and Fleck, A.: *Methods Biochem. Anal.*, 14, 132 (1967).
- (5) Davidson, J. N.: *The Biochemistry of the Nucleic Acid*, 100 (1969).
- (6) Dische, Z. and Borefreund, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 23, 639 (1957).
- (7) Mauritzen, C. M., Roy, A. B. and Stedman, E.: *Proc. Roy. Soc. (London)*, B.140, 18 (1952).
- (8) Roe, J. H. and Rice, E. W.: *J. Biol. Chem.*, 173, 507 (1948).
- (9) Mejbbaum, W.: *Z. Physiol. Chem.*, 258, 117 (1939).
- (10) Schneider, W. C.: *Methods Enzymol.*, 3, 681(1966).
- (11) Hultin, T., Slautterback, D. B. and Wessel, G.: *Exptl. Cell Res.*, 2, 696 (1951).
- (12) Mirsky, A. E. and Ris, H.: *J. Gen. Physiol.*, 31, 7 (1947).
- (13) Caldwell, P. C. and Hinshelwood, C.: *J. Chem. Soc.*, 1415 (1950).
- (14) 水野重樹: 核酸의 一般的 分離·定量法(東京大學 出版會, 東京, 日本) 74 (1969).
- (15) Miller, G. L., Golder, R. H. and Miller, E. E.: *Anal. Chem.*, 23, 903 (1951).
- (16) Hutchison, W. C., Downie, E. D. and Munro, H. N.: *Biochim. Biophys. Acta*, 55, 561 (1962).
- (17) Miescher, F.: *Die histochemischen and physiologischen Arbeiten* (Leipzig) (1897).