

## DNA/RNA Hybridization 에 의한 흰쥐의 Transferrin mRNA 분포에 관한 연구

김세은·김선여·박미정·송진호·이은방\*·이훈파·김영중

서울대학교 약학대학, \*생약연구소

(Received October 13, 1989)

### Localization of Transferrin mRNA in Rat by DNA/RNA Hybridization

Se Eun Kim, Sun Yeou Kim, Mi Jung Park, Jin Ho Song, Eun Bang Lee,\*  
Heun Pa Lee and Young Choong Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korean and \*Natural Products  
Research Institute

**Abstract**— Expression of transferrin gene in various organs of rat was studied using rat transferrin cDNA. The hybridization method of [<sup>35</sup>S]-labeled transferrin cDNA with transferrin mRNA in cytoplasmic preparations was used to measure the level of transferrin mRNA. The rat from 15-day old fetus to 21-day old postnatal were employed as an animal model. In the liver, the level of transferrin mRNA increased with increasing age. However, the level of transferrin mRNA in brain was significantly lower than that in liver and the level did not increase with age.

**Keywords** □ Transferrin cDNA plasmid, transferrin mRNA, cytoplasmic preparations, hybridization.

척추동물의 혈청단백질 중의 하나인 transferrin 은 체내에서 철분을 운반 이송하는 단백질로만 알려져 왔다.<sup>1-3)</sup> 그러나 최근에 transferrin 은 체외에서 세포를 배양할 때 세포의 증식과 분화를 촉진시키는 뚜렷한 효과가 있을 뿐 아니라<sup>4,5)</sup> 신경영양인자로써도 작용한다<sup>6,7)</sup>는 사실이 알려졌다. 즉, transferrin 은 조류 배아의 근세포를 체외에서 배양할 때, 근세포의 발달을 촉진시키며, 이를 장기간 유지시키고,<sup>8)</sup> 세포분열이 끝난 근육에서 단백질 합성을 증가시키며,<sup>9)</sup> 아세틸콜린 수용체의 합성과 유지에 꼭 필요하고, 근세포<sup>10)</sup>의 분화에 필수성분<sup>11)</sup>으로 알려졌다. 또한 transferrin 은 중추신경계 및 말초신경계의 신경세포에는 물론 이들의 신경돌기에 다량 존재함이 밝혀졌으며<sup>12-16)</sup> 임파구의 성장을 촉진

시킨다는 보고도 있다.<sup>17)</sup> 더욱이 transferrin 과 색소세포종 표면 항원이 부분적으로 일치한다는 보고<sup>18)</sup>와 닭의 B 세포 임파종<sup>19)</sup>과 소이에게 발생하는 다발성 임파종인 Burkitt's lymphoma<sup>20)</sup>에서 발견된 유전자의 순서가 transferrin 의 아미노기 말단과 일치한다는 것이 알려지면서 transferrin 에 대한 관심이 새롭게 고조되고 있다. 그러나 transferrin 이 어떻게 상기의 생물학적 작용을 나타내는지에 대하여서는 정확히 밝혀지지 않았다. 이러한 transferrin 의 작용기전을 규명하기 위하여서는 transferrin 이 체내의 어느 장기에서 합성이 되며, 어떻게 다른 장기로 운반이 되는지, 또 그 장기에서는 어떠한 작용기전에 의하여 transferrin 을 받아들이며, 무슨 목적에 의하여 transferrin 을 필요로 하는가에 대한 일련의 연구가 수행되어야 하겠다.

본 연구에서는 이러한 연구의 일환으로 우선 흰쥐

본 연구는 문교부 1987년도 자유공모과제 학술연구 조성비에 의하여 수행되었음.

의 transferrin cDNA 를 사용하여 태아에서 이유기까지의 흰쥐의 성장발달에 따른 transferrin 합성 부위를 transferrin mRNA 의 분포를 밝힘으로써 알아보았다.

## 실험방법

### 1. 실험동물

흰쥐를 임신시키기 위하여 쥐장 하나에 5개월된 Sprague-Dawley 계 흰쥐 암컷 2마리에 수컷 1마리를 같이 넣어 사육하여 임신을 확인한 후 암컷을 다른 쥐장으로 옮겨 실험계획에 따라 흰쥐 태아를 적출하여 실험에 사용하였다.

### 2. 시약

실험에 사용한 nitrocellulose paper 는 Gelman 에서, DE-81 paper 는 Whatman 에서, sephadex G-50 mini-column 은 Boehringer Mannheim 에서, dCTP, dGTP, dTTP 는 PL-Biochemical 에서, [<sup>35</sup>S]dATP 는 Amersham 제품을 사용하였다. RNase A 는 Boehringer Mannheim 에서, EcoRI 와 salmon sperm DNA 는 Sigma 에서 구입하였다. 그 외의 시약은 molecular biology 연구용 시약 및 특급시약을 사용하였다. 그리고 실험에 사용한 Luria 배양액은 10g/l NaCl, 10g/l Bactotryptone, 5g/l Yeast extract 의 조성이며, 변질완충액 (pH 6.5) 은 75mM calcium chloride, 10mM MOPS, 0.5% glucose 의 조성이다.

### 3. 대장균을 이용한 흰쥐의 transferrin cDNA 의 대량생산

Transferrin cDNA 를 함유하는 plasmid 는 미국의 Washington 대학의 G. S. Mcknight 교수로부터 기증받았으며 그 성질은 다음과 같다

cDNA	Length (bp)	Vector	Restriction enzyme flanking insert	Antibiotic resistance	Host for cloning
Rat transferrin	390	SP64	EcoRI	Ampicillin	E.coli HB101

**Competent cell 의 제조 (preparation of competent cell)<sup>21-23</sup>**—대장균을 외부로부터 DNA 를 쉽게 받아 들일 수 있는 적합한 세포 (compe-

tent cell) 로 만들기 위하여 Luria 배양액 5ml 에 대장균 HB101 균주를 접종하여 37°C 에서 가볍게 진탕하면서 하룻밤 배양하였다. 이 배양액을 다시 Luria 배양액 95ml 에 옮겨 배양액을 20배 희석시킨 후, 다시 37°C 에서 가볍게 진탕하면서 대장균 HB101 이 log-phase 중간에 이르기까지 90-100분 간 배양하였다. 배양액 40ml 를 8,000 rpm 에서 5분간 4°C 에서 원심분리한 후 상등액을 버리고 침전된 대장균 HB101 에 pH 6.5 의 변질완충액 20ml 를 가하여 분산시킨 다음 다시 상등액을 버리고 침전된 대장균 HB101 을 변질완충액 1ml 로 분산시킨 다음 효율을 높이기 위하여 4°C 에서 20시간 정도 보관하여 변질에 적합한 대장균을 만들었다.

**대장균의 변질 및 증식 (transformation and propagation of *E. coli* HB101)**—위에서 제조한 변질에 적합한 대장균 분산액 0.2ml 에 흰쥐의 transferrin cDNA 50ng 을 첨가하여 잘 섞은 후 냉온조에서 45분간 처리하였다. 열충격을 주기 위하여 42°C 에서 3분간 처리한 다음 다시 냉온조로 옮겨 온도에 의한 충격을 준 다음 Luria 배양액 1ml 를 첨가하여 37°C 에서 40분간 가볍게 진탕하면서 배양하였다. 배양액을 가볍게 원심분리한 다음 상등액을 버리고 다시 200  $\mu$ l Luria 배양액을 가하여 침전물을 분산시켰다. 이 대장균 분산액을 ampicillin 을 함유하는 Luria-agar 배지에 5, 10, 25, 50  $\mu$ l 씩 접종하여 37°C 에서 하룻밤 배양하였다. 그 결과 모든 plate 에서 접종한 농도 증가에 따라 대장균이 잘 자라는 것을 관찰할 수 있었다.

**흰쥐의 transferrin cDNA plasmid 의 추출, 분리 및 확인<sup>24,25</sup>**—흰쥐의 transferrin cDNA plasmid 를 받아들이는 대장균을 200  $\mu$ g ampicillin/ml 함유 Luria 배양액 2ml 에 접종하여 37°C 에서 가볍게 진탕하면서 하룻밤 배양한 다음 작은 원심분리관에 옮겨 1분간 원심분리하여 대장균만 모았다. 대장균을 분해시키기 위하여 10mM EDTA, 25mM Tris, 5mM glucose 혼합액 (pH 8.0) 100  $\mu$ l 를 각각의 원심분리관에 첨가하여 침전된 대장균을 다시 분산시킨 다음 냉온조에서 30분간 방치하였다. 다시 DNA 를 유리하고 chromosomal DNA 만을 분쇄시키기 위하여 최종농도가 0.2N NaOH 이며 1% SDS 인 혼합액 (pH 12) 200  $\mu$ l 를 첨가하여 잘 섞은 후 냉온조에서 다시 20분간 방치하였다.

Plasmid DNA와 chromosomal DNA를 분리하기 위하여 3M sodium acetate 용액(pH 4.8) 150  $\mu$ l를 가하여 냉온조에서 30분 동안 방치한 다음 저온실에서 20분간 원심분리하여 chromosomal DNA만을 침전으로 분리하였다. 상등액 400  $\mu$ l를 다른 원심분리관에 옮겨  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 냉각시킨 무수 ethanol 1ml를 가하여 잘 섞은 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 인 dry ice-ethanol에서 10분간 처리하여 점성이 생기면 원심분리하였다. 상등액을 버리고 최종농도가 0.1 M sodium acetate, 0.05 M Tris 혼합용액(pH 8.0) 100  $\mu$ l를 첨가하여 침전을 완전히 용해시킨 다음 다시  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 냉각시킨 무수 ethanol 200  $\mu$ l를 가하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 인 dry ice-ethanol에서 10분간 처리하여 원심분리한 다음 상등액은 버리고 침전을  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 냉각시킨 무수 ethanol로 세척한 다음 진공 데시케이터에서 plasmid DNA를 완전히 건조시켰다.

흰쥐의 transferrin cDNA plasmid의 대량생산은 대장균을 ampicillin 함유 Luria 배양액에서 대량배양하여 속성 알칼리 추출방법으로 규모만 늘려서 추출하였다. 이렇게 추출하여 얻은 crude plasmid DNA를 정제하기 위하여 crude plasmid DNA를 Tris-EDTA 완충액(pH 8.0)에 녹인 후 CsCl 결정을 가하여 비중을 1.57-1.59로 맞춘 후 ethidium bromide 용액을 첨가하여 vTi 80 rotor를 사용하여 70,000 rpm에서 15시간 원심분리하였다. 암실에서 plasmid DNA band를 확인한 다음 주사기로 뽑아 새로운 시험관에 옮긴 후 ethidium bromide를 CsCl로 포화시킨 isopropanol로 추출한 다음 투석하여 CsCl를 제거하여 정제하였다. 정제한 흰쥐의 transferrin cDNA plasmid의 순수도를 보기 위하여 258 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 비율, 즉 흡광도 258 nm/280 nm=1.97로 아주 순수한 plasmid DNA임을 확인할 수 있었다. 한편 소규모로 plasmid DNA를 정제하기 위하여 preparative agarose gel을 이용하여 전기영동한 다음 plasmid DNA band만 잘라내어 electroelution법으로 다시 plasmid DNA를 gel로부터 유출시켜 3M NaOAc와 ethanol로 침전시켜 정제하였다.

**흰쥐의 transferrin cDNA plasmid의 직선화**<sup>26-29)</sup>—흰쥐의 transferrin cDNA plasmid 0.5

$\mu$ g을 100 mM Tris-HCl(pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl 존재하에서 제한효소 EcoRI 1-2 unit를 사용하여 37°C에서 2시간 작용시켜 직선화하였다. 65°C에서 10분간 처리하여 제한효소를 불활성화시키고 agarose gel을 이용하여 DNA 분자량 표준품과 함께 전기영동하였다. Ethidium bromide로 착색하고 암실에서 자외선하에서 plasmid의 직선화를 확인하였다.

**[<sup>35</sup>S]로 표지된 흰쥐의 transferrin cDNA 제조**<sup>30,31)</sup>—Feinberg와 Vogelstein의 multiprimed DNA labeling 방법(probe 제조)에 따라 흰쥐의 transferrin cDNA를 방사성원소 [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S를 사용하여 표지하였다. 95°C에서 10분간 처리하여 변성시킨 transferrin cDNA 125 ng에 2.5 nmole dCTP, dGTP, dTTP 및 0.25 nmole (250  $\mu$ Ci) [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S를 가하고 random hexanucleotide 용액과 klenow fragment를 가하여 실온에서 18시간 반응시킨 후 0.5 M EDTA(pH 8.0) 용액으로 반응을 중단시켰다. 반응하지 않는 [<sup>35</sup>S]dATP $\alpha$ S를 제거하고 [<sup>35</sup>S]로 표지된 transferrin cDNA probe를 반응액으로부터 회수하기 위하여 Sephadex G-50 mini-column을 사용하여 유출되는 5회의 분획물을 각각 얻었다. 각 분획물 1  $\mu$ l를 취하여 2개의 Whatman DE 81 filter disc의 중심부에 흡착시킨 후, 그 중 한 개의 disc는 0.5 M sodium phosphate로 5분간 5회, 증류수로 1분간 2회 및 95% ethanol로 1분간 2회 씻어내었다. 각각 80°C에서 10분간 건조시킨 후 aquasol 5 ml를 가하고 liquid scintillation counter에서 방사능을 측정하였다.

**세포질 추출물(cytoplasmic extract) 제조**<sup>31,32)</sup>—흰쥐를 임신 후 15, 17, 20일째 되는 날에 ether로 마취시킨 후 자궁을 적출하여 태아를 꺼낸 다음 해부현미경(stereo zoom microscope)하에서 태아의 각각의 장기를 분리하였다. 또한, 생후 1, 7, 14, 21일 되는 흰쥐로부터 각각의 장기를 적출하였다. 장기의 젖은 무게 100 mg당 1 ml의 냉각된 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA(pH 7.0), 0.5% Nonidet P-40 혼합용액을 사용하여 조직 분쇄기에서 15회 정도 회전하여 균질화시킨 후, 0°C에서 5분간 방치한 다음 4°C에서 15,000g로 5분간 원심분리하였다. 상정액 500  $\mu$ l에 20배 농도의 stan-

standard saline citrate 300  $\mu$ l, 37% (w/w) formaldehyde 200  $\mu$ l 를 가하여 잘 섞은 후 60°C에서 15분간 처리하여 -70°C에 보관하였다. 대조액으로 사용하기 위하여, 원심분리한 상정액 100  $\mu$ l에 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA (pH 7.0) 100  $\mu$ l 를 가하고 20  $\mu$ g/unit/ $\mu$ l의 RNase A 용액 2  $\mu$ l 를 가하여 37°C에서 30분간 배양하여 세포질 추출물 중의 모든 RNA 를 분해하였다.

**Dot Blot hybridization**<sup>33-35)</sup>—Nitrocellulose paper 는 미리 증류수에 5분간, 다시 20배의 standard saline citrate에 5분간 적셔서 RNA 가 잘 부착되도록 전처리하였다. 96 well dot blot 장치에 처리한 nitrocellulose paper 를 놓고 15배 농도의 standard saline citrate로 100배 희석한 세포질 추출물과 RNase A 로 처리한 대조액을 50  $\mu$ l 씩 가하였다. 5분 후 진공으로 빨아내고 80°C 진공 건조기에서 2시간 처리하여 세포질 추출물 중의 RNA 가 완전히 부착하도록 하였다. 50% formamide, 5배 농도의 standard saline citrate, 50 mM sodium phosphate (pH 6.5), 0.02% Denhardt 및 0.1% salmon sperm DNA 의 혼합 용액을 가하고 42°C 항온조에서 가볍게 교반하면서 3시간 동안 prehybridization 시켰다. Prehybridization 용액을 버리고 새로운 prehybridization 용액 4분과 50% dextran sulfate 1분 및 [<sup>35</sup>S]로 표지된 흰쥐의 transferrin cDNA probe 를 가하여 42°C 항온조에서 가볍게 교반하면서 14시간 이상 처리하여, 세포질 추출물 중의 mRNA 와 [<sup>35</sup>S]로 표지된 흰쥐의 transferrin cDNA 가 hybridization 할 수 있도록 하였다. Hybridization 시킨 nitrocellulose paper 는 standard saline citrate, 0.1% SDS 혼합용액으로 실온에서 5분간 4회 세척하고 다시 0.2배의 standard saline citrate, 0.1% SDS 혼합용액으로 50°C에서 30분간 2회 세척하였다. 공기 중에서 건조시킨 nitrocellulose paper 의 각각의 well 을 잘라서 aquasol 5 ml 에 용해시킨 다음 liquid scintillation counter 로 cpm 을 측정하였다.

### 결과 및 고찰

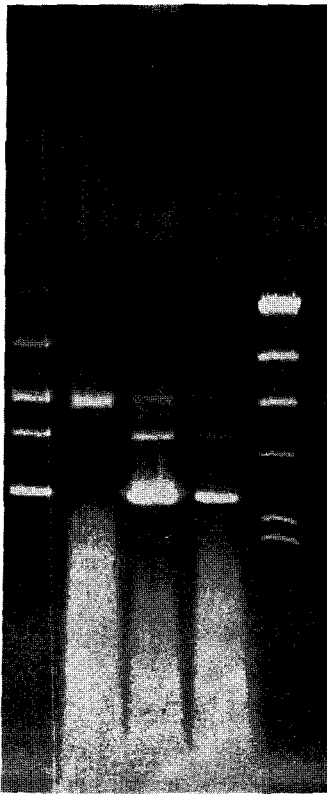
척추동물의 혈청단백질 중의 하나인 transferrin

의 세포증식 및 분화 촉진작용의 기전을 규명하기 위하여 transferrin 이 체내의 어느 장기에서 합성이 되며, 어떻게 다른 장기로 운반이 되는지 또, 그 장기에서는 어떠한 작용기전에 의하여 transferrin 을 받아들이며, 무슨 목적에 의하여 transferrin 을 필요로 하는지가 밝혀져야 하겠다.

이러한 연구의 일환으로 우선 흰쥐의 태아에서부터 이유기까지의 성장발달 단계에 따른 각 장기에서의 transferrin 합성여부를 흰쥐의 transferrin cDNA 를 사용하여 hybridization 법으로 각 장기 중의 transferrin mRNA 의 존재를 확인하는 방식으로 알아보았다.

흰쥐의 각각의 장기 중에 존재하는 transferrin mRNA 를 확인하기 위한 probe 로 사용하려는 흰쥐의 transferrin cDNA 는 대장균 HB 101을 이용하여 대량생산 하였다. 즉, 실험방법에 명시한 대로 먼저 대장균 HB 101을 흰쥐의 transferrin cDNA 를 쉽게 받아들이기 적합한 세포로 만든 다음 흰쥐의 transferrin cDNA 를 첨가하여 0°C에서 45분간 처리한 다음 다시 42°C에서 3분간 처리하여 열충격을 줌으로써 흰쥐의 transferrin cDNA 를 대장균 HB 101에 도입시켰다. 대장균 HB 101의 흰쥐의 transferrin cDNA 수용 여부는 transferrin cDNA 가 ampicillin 에 저항하는 유전자를 가지고 있으므로 ampicillin 함유 배지에서 살아남는 균주만을 선택함으로써 흰쥐의 transferrin cDNA 를 받아들인 대장균을 얻을 수 있었다. 대장균이 흰쥐의 transferrin cDNA plasmid 를 받아들인 것은 ampicillin 함유 Luria-agar 배지에서 자라는 것은 물론 이 배지에서 자란 대장균으로부터 plasmid 추출을 소규모로 하여 이 plasmid DNA 의 전기영동 pattern 을 봄으로써 확실히 증명할 수 있었다 (Fig. 1). 흰쥐 transferrin cDNA plasmid 정제는 CsCl density gradient centrifugation 법을 사용하였다 (Fig. 2). 또한 변질시킨 대장균 HB 101에서 분리, 정제한 transferrin cDNA plasmid 가 원래의 흰쥐의 transferrin cDNA 인 것을 확인하기 위하여 제한효소 Eco RI 으로 직선화시킴으로써 확인할 수 있었다.

Probe 로 사용한 흰쥐의 transferrin cDNA 를 방사성 동위원소로 표지할 수 있는 방법은 여러가지가 있다. 본 연구에서는 DNA polymerase I의

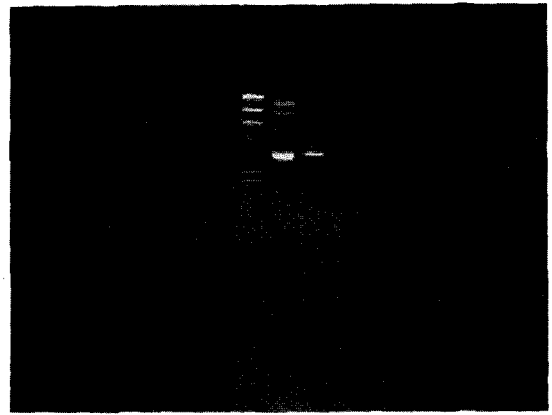


1 2 3 4 5

**Fig. 1**—The pattern of rat transferrin cDNA plasmid obtained from the rapid small scale alkaline extraction method in 0.7% agarose gel.

- Lane 1. : Rat transferrin cDNA plasmid from Dr. Mcknight (standard)  
 Lane 2. : Rat transferrin cDNA plasmid from clone I  
 Lane 3. : Rat transferrin cDNA plasmid from clone II  
 Lane 4. : Rat transferrin cDNA plasmid from clone III  
 Lane 5. : Molecular weight marker : DNA Hind III digested; 23130, 9416, 6557, 4301, 2322, 2027, 564, 125 base pair.

klenow fragment를 이용하여 random hexanucleotide를 primer로 하여 새로운 DNA를 합성하는 random primed DNA labeling 방법을 사용하였다. 이 방법은 미량의 template DNA로도 재조가 가능하며 제조된 probe의<sup>30,31</sup> 비방사능이 높고 klenow fragment는 3'→5' exonuclease activity가 없으므로 장시간 반응에서도 probe가



1 2 3

**Fig. 2**—The EcoRI digested pattern of rat transferrin cDNA plasmid in 1% agarose gel.

- Lane 1. : Molecular weight marker : DNA Hind III digested  
 Lane 2. : Rat transferrin cDNA plasmid  
 Lane 3. : EcoRI digested rat transferrin cDNA plasmid

안정한 장점이 있다. 또한 흰쥐의 transferrin cDNA가 pSP 64 vector의 Sma I -Hinc II 사이에 삽입되어 있으므로 흰쥐의 transferrin cDNA를 이들 제한효소로 소화시킨 후 회수하여 nick translation하는 방법<sup>36,37</sup>과 제한효소 Eco RI으로 직선화시킨 흰쥐의 transferrin cDNA plasmid를 SP6 RNA polymerase template를 사용해서 riboprobe를 제조하는 방법<sup>38</sup>도 있다. 그러나 nick translation에 의하여 제조된 probe는 nicking에 의하여 길이가 짧은 probe가 많이 만들어지고 DNase 존재하에서 probe가 불안정하며 riboprobe는 간편하게 고농도의 probe를 만들 수 있으나 RNA 조작이 까다로운 단점이 있다. Random primed labeling 방법에 의하여 [<sup>35</sup>S] dATP $\alpha$ S를 사용하여 반응시킨 후 미반응의 [<sup>35</sup>S] dATP $\alpha$ S를 제거하기 위하여 Sephadex G-50 mini-column을 통과시켜 얻은 유출물의 각 분획을 Whatman DE 81에 흡착시켜 각 분획의 총 방사능과 반응에 통합된 방사능을 각각 측정하였다(Fig. 3). 이 결과 1번 분획물에서 반응에 통합된 방사능의 90% 이상이 검출되었으므로 1번 분획물만을 hybridization에 이용하였다. 1번 분획물 중의 비방사능은 다음과 같이 얻었다.

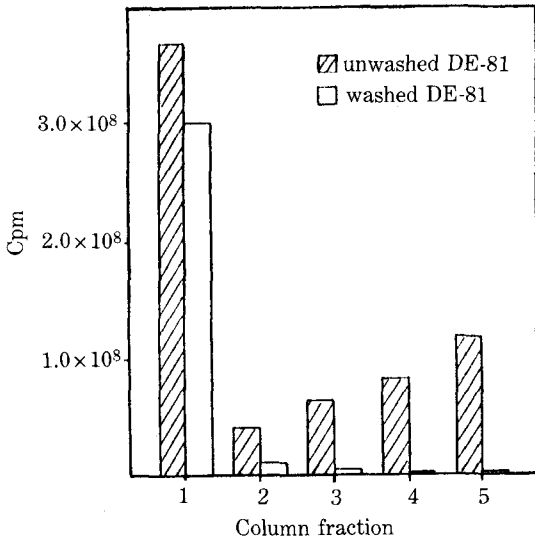


Fig. 3—Removal of unincorporated [<sup>35</sup>S]dATP α S by Sephadex G-50 mini-column.

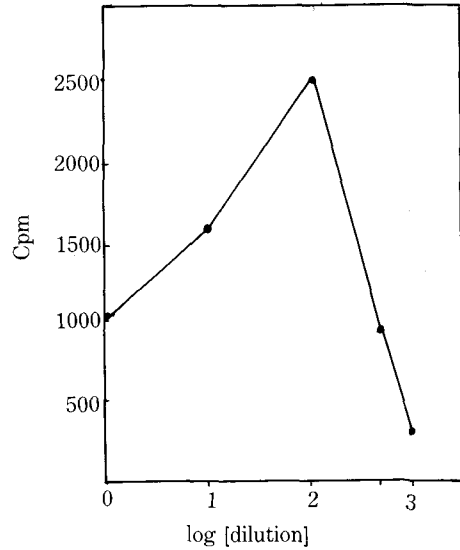


Fig. 4—Relative levels of transferrin mRNA in 21-day-old rat liver cytoplasmic preparation by dilution.

통합률 (incorporation yield)

$$= \frac{\text{1번 분획물 중의 cDNA 로 통합된 방사능}}{\text{총 방사능}}$$

$$= \frac{2.82 \times 10^8 \text{ dpm}}{250 \mu\text{Ci} \times 2.2 \times 10^6 \text{ dpm}/\mu\text{Ci}}$$

$$= 0.51$$

1번 분획물의 cDNA 의 비방사능

$$= \frac{\text{1번 분획물 중의 cDNA 로 통합된 방사능 (dpm)}}{\text{DNA 총량 } (\mu\text{g})}$$

$$= 2.3 \times 10^9 \text{ dpm}/\mu\text{g cDNA}$$

흰쥐의 성장발달 단계에 따른 각 장기에 존재하는 transferrin mRNA의 확인 및 대체적인 증감 경향을 dot blot hybridization 방법으로 알아보기 위하여 세포질 중의 전체 RNA 분획을 분리하거나 따로 mRNA만을 분리 정제하여 사용하지 않고 각각의 장기의 세포질 추출물을 사용하였다. Dot blot hybridization에 적절한 점도와 충분한 양의 mRNA 함유 세포질 추출물을 얻기 위하여 먼저 50 mg/ml로 제조한 21일된 간세포 추출물을 일련으로 희석하여 dot blot hybridization을 하였다 (Fig. 4). Fig. 4에서 볼 수 있듯이 세포질 추출물은

100배로 희석하였을 때 가장 hybridization이 잘 되는 것을 알 수 있었다.

태아에서 이유기까지의 흰쥐의 성장발달 단계별로 얻은 각각의 장기에서의 transferrin 합성 여부 및 정도는 Fig. 5와 같다. 일령 15일된 흰쥐 태아의 간에서 transferrin이 합성되는 것을 알 수 있었으며 간에 존재하는 transferrin mRNA의 양은 생후 21일까지 성장발달에 따라 크게 증가하는 것을 알 수 있었다. 그러나 뇌에서도 성장발달에 따른 transferrin mRNA의 양의 증가는 없었으나 미량이지만 transferrin mRNA의 존재는 확인할 수 있었다. 뇌에서 합성되는 transferrin의 양이 뇌의 정상적인 성장발달과 기능의 유지에 필요한 충분한 양인지 또는 뇌에서 일부를 합성하는 한편 혈류를 통하여 필요한 양 만큼의 transferrin을 더 받아들여야 하는가 등에 대한 의문은 앞으로 풀어야 할 과제이다. 또한 뇌에서의 transferrin mRNA의 분포도 조직학적인 연구가 뒤따라 정확히 뇌조직 중의 어느 부분, 어느 특정세포에 분포되어 있는지가 밝혀져야 transferrin의 정확한 생물학적 작용을 이해할 수 있겠다.

흰쥐의 간이나 뇌 이외의 장기 또는 심장, 신장, 위, 폐, 소장, 비장 등에서의 transferrin mRNA의 분포를 살펴보았다. 본 연구결과로는 이들 장기

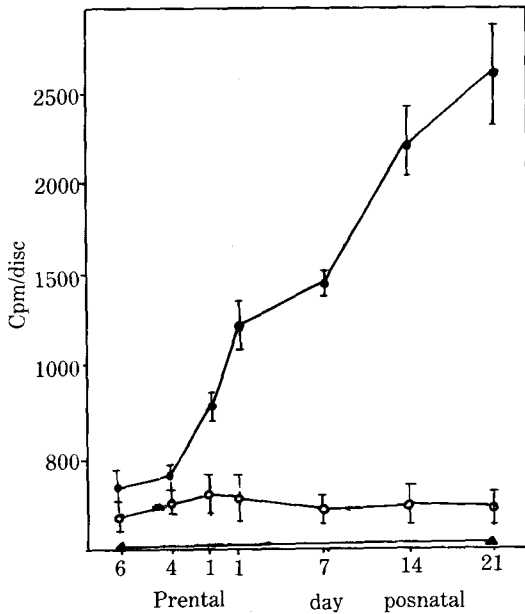


Fig. 5—Relative levels of transferrin mRNA in various organs of rat according to the developmental stage.

(●-●), liver, (○-○), brain, (▲-▲), other organs (lung, heart, stomach, small intestine, spleen, kidney) used experiment except liver and brain. The cpm value was presented after subtracting that of background measured for RNase A treated samples.

에서 transferrin mRNA의 존재여부를 유의성있게 결론을 내릴 수 없었다. 이들 장기에서 미량이지만 transferrin이 합성되는지의 여부를 확실하게 알아보기 위하여서는 직접 장기 중의 mRNA를 분리 정제하여 hybridization 하거나 조직내에서 in situ hybridization 하여야 될 것으로 사료된다.

## 결 론

흰쥐의 태아에서 이유기까지의 성장발달 단계에 따른 각각의 장기에서의 transferrin 합성여부를 transferrin cDNA를 사용하여 hybridization 방법으로 알아보았다. 일령 15일된 태아의 간에서도 transferrin이 합성되는 것을 알 수 있었으며 간에 존재하는 transferrin mRNA 양은 생후 21일까지 성장발달에 따라 크게 증가하는 것을 알 수 있었다. 뇌에서도 미량이지만 transferrin mRNA의 존재

를 확인할 수 있었으며 성장발달에 따른 transferrin mRNA 양의 증가는 없었다.

## 감사의 말씀

본 연구는 문교부 1987년도 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 이루어졌으며 이에 깊이 감사드립니다.

또한 본 연구에 흰쥐 transferrin cDNA plasmid를 분양하여 주신 미국 Washington 대학교 G.S. McKnight 교수님과 많은 도움을 주신 미국 Maryland 대학교의 T.H. Oh 교수님, G. Markelonis 교수님께 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) F.W. Putnam, Transferrin in the Plasma Protein. Vol. I. "Structure, Function and Genetic Control" (F.W. Putnam, eds.), pp. 266-316, Academic Press, New York (1975).
- 2) R.S. Lene, "Structure and Fuction of Plasma Proteins" (A.C. Allison, eds.), pp. 35-75, Plenum Press, New York (1976).
- 3) E.H. Morgan, Transferrin and Transferrin Iron in "Iron in Biochemistry and Medicine" (A. Jacobs and M. Worwood, eds.), pp. 30-71, Academic Press, London and New York (1974).
- 4) M.K. Skinner and M.D. Griswold, *J. Biol. Chem.*, **255**, 9523-9525 (1980).
- 5) M.J. Levin, D. Tuil, G. Uzan, J.C. Dreyfus and A. Kahn, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 212-217 (1984).
- 6) E.H. Morgan, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4193-4199 (1969).
- 7) P.W. Dickson, A.R. Aldred, P.D. Marley, T. Guofen, G.J. Howlett and G. Schreiger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**, 890-895 (1985).
- 8) G.J. Markelonis and T.H. Oh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 2470-2474 (1979).
- 9) G.J. Markelonis, T.H. Oh and D. Derr, *Exp. Neurol.*, **70**, 598-612 (1980).
- 10) G.J. Markelonis, T.H. Oh, Eldefrawi, M.E. and L. Guth, *Dev. Biol.*, **89**, 353-361 (1982).
- 11) T.H. Oh, and G.J. Markelonis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 6922-6925 (1980).

- 12) K. Mollgard and M. Jacobsen, *Dev. Brain Res.*, **13**, 49-63 (1983).
- 13) T.H. Oh, C.A. Sofia, Y.C. Kim, C. Caroll, H.H. Kim, G.J. Markelonis and P.J. Peier, *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 1205-1212 (1981).
- 14) K. Mollgard, M.L., Reynolds, M., Jacobsen, K.M. Dziegielewska and N.R. Saunders, *J. Neurocytol.*, **13**, 497-502 (1984).
- 15) M.L. Reynolds, and K. Mollgard, *Anat. Embryol.*, **171**, 41-60 (1985).
- 16) C.D. Toran-Allerand, *Nature*, **286**, 733-735 (1980).
- 17) M.L. Dillner-Centerlind, S. Hammarstrom, and P. Perlmann, *Eur. J. Immun.*, **9**, 942-948 (1979).
- 18) J.P. Brown, R.M. Hewick, I. Hellstrm, K.E. Hellstrom, R.F. Doolittle and W.J. Dreyer, *Nature* **296**, 171-173 (1982).
- 19) G. Goubin, D.S. Goldman, J. Luce, P.E. Neiman and G.M. Cooper, *Nature*, **302**, 114-119 (1983).
- 20) A. Diamond, G.M. Cooper, J. Ritz and M.A. Lane, *Nature*, **305**, 112-116 (1983).
- 21) M. Mandel and A. Higa, *J. Mol. Biol.* **53**, 154-158 (1970).
- 22) S.N. Cohen, A.C.Y. Chang and L. Hsu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2110-2114 (1972).
- 23) M. Dagert and S.D. Ehrlich, *Gene*, **6**, 23-28 (1979).
- 24) H.C. Birnhoim and J. Doly, *Nucl. Acid. Res.*, **7**, 1513-1523 (1979).
- 25) T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" pp. 93-94, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- 26) E. Southern, *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-571 (1975).
- 27) E. Southern, *Methods Enzymol.*, **68**, 152-182 (1979).
- 28) H.O. Smith, *Methods Enzymol.*, **65**, 371-390 (1976).
- 29) M.W. McDonnell, M.N. Simon and F.W. Studier, *J. Mol. Biol.*, **110**, 119 (1977).
- 30) Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13 (1983).
- 31) T. Kornberg, I. Siden, P.O'Farrell and M. Simon, *Cell* **40**, 45-53 (1985).
- 32) B.A. White and F.C. Bancroft, *J. Biol. Chem.*, **257**, 8569-8572 (1982).
- 33) A.J. Stauder, P.W. Dickson, A.R. Alded, G. Schreiber, F.A.O. Mendelsohn and P. Hudson, *J. Histochem. Cytochem.*, **34**, 949-952 (1986).
- 34) J.T. McCabe, J.I. Morrel, R. Ivell, H. Schmale, D. Richta and D.W. Pfaff, *J. Histochem. Cytochem.*, **34**, 45-50 (1986).
- 35) J.I. Morrel and D.W. Pfaff, "Autoradiographic Techniques for Steroid Hormone Localization in neuroendocrinology of Reproduction" (N.T. Adler, ed.), Plenum Publishing, New York, pp. 519-531 (1981).
- 36) P.W.J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes and P. Berg, *J. Mol. Biol.*, **113**, 237-251 (1977).
- 37) P.W. Ingham, K.R. Howard and D. Ish-Horowicz, *Nature*, **318**, 439-445 (1985).
- 38) D.A. Melton, P.A. Krieg, M.R. Rebasliati, T. Maniatis, K. Zinn and M.R. Green, *Nucleic Acid Res.*, **12**, 7035-7057 (1985).