

Renin-Angiotensin계의 분자생물학적 연구 : Renin유전자의 발현과 Genomic Library작성

박영순 · 한동민 · 김종호 · 문영희* · 이호섭** · 고건일*** · 김성준****

원광대학교 자연과학대학 분자생물학과, 의과대학*, 한의과대학**, 약학대학***,
조선대학교 자연과학대학 유전공학과****

생쥐 악하선으로부터 분리한 전 RNA를 poly(U)-sepharose chromatography와 sucrose linear density gradient centrifugation 방법으로 레닌 mRNA를 분리하여 *in vitro* translation과 immunoprecipitation에 의하여 레닌 mRNA를 확인하였다. 레닌 mRNA로부터 레닌 cDNA를 합성하여 EcoRI linker를 이용하여 pUC19에 삽입시켰고, Taq. polymerase를 이용한 PCR방법으로 합성한 레닌 cDNA는 pUC19의 HindIII 부위에 삽입하여 재조합 plasmid를 각각 작성하였다. 이것을 JM103에 형질전환시켜 레닌 유전자 발현을 유도하여 45,000의 분자량을 갖는 레닌을 얻었으며 이 레닌 단백질은 토끼의 혈압을 85-115 mmHg에서 115-140 mmHg로 증가시키는 생리 활성을 나타냈다.

토끼의 신장 DNA를 EMBL3 phage에 삽입시켜 genomic library를 작성한 후, 레닌 cDNA로부터 합성한 probe로 plaque hybridization시켜 genomic 유전자를 갖는 재조합 phage를 분리하였다.

KEY WORDS: Submaxillary gland renin, Kidney renin, Renin cDNA

Aspartyl protease인 renin(EC. 3.4.99.19)은 renin-angiotensin-aldosterone계를 통하여 수분과 염기의 균형을 유지하는데 영향을 미치는 물질로서 혈압을 조절하는 효소이다(Laragh *et al.*, 1973; Oparil *et al.*, 1974). 레닌은 신장의 사구방 세포(juxtaglomerular cell)에서만 분비되는것으로 알려졌으나 Cohen 등(1972)에 의하여 생쥐 악하선에서 레닌을 분리함으로써 악하선이 신장보다 풍부한 레닌 합성원이 된다는 것이 알려졌으며 호르몬에 의하여 분비가 조절 된다는 것이 밝혀지게 되었으므로 악하선이 레닌의 분자생물학적 특성을 연구하는데 중요한 재료가 되었다(Michelakis *et al.*, 1974; Bing *et al.*, 1980).

생쥐 악하선에서 합성되는 분자생물학적 특성

본 연구는 1988년도 문교부 기초과학 육성연구비의 지원에 의한 것임.

을 연구하여 저해제를 개발함으로써 혈압을 조절할 목적으로 악하선으로부터 polyadenylated mRNA를 분리하여 rabbit reticulocyte lysate system으로 레닌을 합성한 후 immunoprecipitation하고 SDS-PAGE를 실시하여 비교 확인하였다(Martial *et al.*, 1977; Laemmli, 1970; Maniatis *et al.*, 1982). 순도가 높은 mRNA를 분리한 후 cDNA를 합성하였고(Gubler *et al.*, 1983; Okayama *et al.*, 1982) 합성한 cDNA는 pUC19 plasmid에 재조합시켜 JM103 *E. coli*에 transformation시킨 후(Cohen *et al.*, 1972) 레닌 유전자 발현을 확인하였으며 cDNA로부터 probe를 합성하여 레닌 유전자를 갖는 recombinant plasmid(Kelley *et al.*, 1970; Rigby *et al.*, 1977)와 genomic library(William *et al.*, 1980; Aber *et al.*, 1983)를 제조하였다. 이로써 레닌을 양산하여 생화학적 특성을 연구할 수 있는 기초연구가 수행되

었다.

재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 제한효소들은 New England Biolabs, Bethesda Research Laboratories (BRL) 그리고 Promega Biotec.으로부터 구입하였고 T4 DNA ligase, *E. coli* DNA polymerase, 1kb DNA ladder 그리고 lambda DNA 등은 BRL에서 DNase I은 Worthington에서 ³⁵S-Methionine과 α -³²P dATP는 Amersham에서 *in vitro* translation system과 cDNA synthesis kit는 Promega로부터 각각 구입하여 사용하였다. EMBL3는 Clontech laboratories Inc.로 구입하였고 기타 다른 시약은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였다. 형질전환에 사용한 균주는 KAIST로부터 구입한 MJ103[Δ (*lac pro*), *thi*, *strA*, *supE*, *endA*, *sbcB*, *hsdR*, F⁻ *traD36*, *proAB*, *lacI^q* Z Δ M15]를 사용하였고 배지는 Difco Laboratories에서 구입하였으며 plasmid pUC19는 Pharmacia로부터 구입하여 사용하였다. Primer oligonucleotides는 BeckmanSystem plus DNA Synthesizer로 합성 사용하였다.

2. 方法

1) 레닌 분비 조직 표본의 제작

수컷 생쥐(ICR)의 악하선(submaxillary gland)과 토끼의 신장피질을 적출하여 formalin과 Helly 액에 고정한 후 파라핀으로 포매하였으며 formalin으로 고정한 조직 절편은 Hematoxylin-Eosine 염색을, Helly 액에 고정한 조직 절편은 Bowie염색을 각각 하였다(Smith *et al.*, 1966).

2) mRNA의 분리

ICR male mouse로부터 악하선을 적출하여 RNA를 GTC / CsCl 방법에 의하여 분리하여(Deeley *et al.*, 1977; Chirgwin *et al.*, 1979). 전 RNA를 Oligo(dT) cellulose와 poly(U)-sepharose 4B에 통과시켜 수집한 분획중 plate

assay(Davis *et al.*, 1986)와 formaldehyde gel 전기영동을 실시하여 mRNA가 풍부한 분획을 10-25%로 sucrose linear density gradient centrifugation을 실시한 후 fraction collector로 0.5ml 씩 수집하였다(Nagata *et al.*, 1980).

3) Cell free rabbit reticulocyte lysate system에서 mRNA의 해독

³⁵S-Methionine을 함유한 cell free rabbit reticulocyte lysate 38 μ l에 25 μ Ci ³⁵S-methionine과 2 μ g mRNA를 가하고 총 용량이 50 μ l이 되도록 하여 30°C에서 30분동안 반응시켰다. 반응물 2 μ l를 취하여 trichloroacetic acid 침전법에 의하여 radioactivity incorporation을 실시하였다. 잔류 반응액은 NET (150 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40, 1mM methionine, pH7.4) 완충액으로 40배 희석하여 사용하였다(Martial *et al.*, 1973).

4) Immunoprecipitation과 합성 단백질의 분석

Cell free system에서 해독된 단백질을 NET 완충액으로 희석한 후 항레닌 항혈청(Anti renin antiserum)을 희석한 반응액과 항레닌 항혈청의 비가 약 1 : 1,000이 되도록 혼합하여 4°C을 유지하면서 12시간 이상 반응시킨 후 protein A-sepharose 4B로 흡수시켜 NET완충액으로 4회 이상 세척하였다(Fukushi *et al.*, 1982). 레닌과 항레닌의 혼합물은 SDS시료 완충액에 끓인후 원침함으로써 protein A-sepharose 4B gel을 침전 제거하고 Laemmli (1970) 방법으로 10% slab gel SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동한 gel를 1M sodium salicylate로 처리하고 진공 건조시킨 후 Kodak X-Omat R film으로 autoradiography를 실시하였다(Chamberlain *et al.*, 1979; Springer, 1981; Anderson *et al.*, 1983).

5) 레닌 cDNA합성

Okayama등(1982)과 Gubler등(1983)의 방법에 따라 first strand cDNA를 합성하였고 총 반응액 25 μ l 내에 최종 농도가 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 4 mM Na-pyrophosphate, 1 mM(dATP, dTTP,

dCTP, dGTP), 1U / μ l RNasin, 0.5 μ g primer / μ g RNA, 15 unites reverse transcriptase / μ g RNA 되도록 한 후 42°C에서 60분 동안 반응시킨 후 second strand cDNA 합성을 진행하였다 (Monahan *et al.*, 1986; Kimmel *et al.*, 1987). 반응액 100 μ l내의 최종 농도가 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM NAD, 100 mM ammonium sulfate, 50 μ g / μ l bovine serum albumin, 0.2 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0.1 mM spermidine, 0.8 mM Na-pyrophosphate, 5 mM DTT, 8U / ml RNase H, 230 U / ml *E. coli* DNA polymerase I, 10 U / ml *E. coli* DNA ligase가 되도록 가한 후 14°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 70°C에서 10분 동안 끓이고 냉각시킨 후 2 unites의 T₄ DNA polymerase / μ g RNA 되도록 가하고 37°C를 유지하면서 10분 동안 반응시켰다. 0.2 M EDTA를 가하여 반응 정지시킨 후 phenol-chloroform extraction시키고 알콜로 침전시켰다. 침전된 cDNA를 진공 건조시킨 후 재조합 plasmid를 제조하였다.

또한 레닌 cDNA로부터 합성한 primer 1과 primer 2, 그리고 Taq. DNA polymerase를 이용한 polymerase chain reaction (PCR)방법에 의하여 레닌 mRNA로부터 직접 cDNA를 합성 증폭하였고 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA도 준비하였다 (Chien *et al.*, 1976; Saiki *et al.*, 1985; Wong *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1987; Higuchi *et al.*, 1988). 레닌 cDNA로부터 합성한 probe를 nick translation하여 (Grustein *et al.*, 1975; Vuorio *et al.*, 1982) southern blot analysis하였다. PCR은 반응액 총량이 100 μ l 내에 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% (W / V) gelatin, 200 μ M each dNTPs, 1 μ M primer 1과 primer 2, 2.5 units Taq. polymerase 그리고 1 ng cDNA 또는 mRNA가 되도록 혼합하여 94°C에서 1분동안 변성시켰다. Annealing-extension-변성 과정을 30회 반복 실시하여 cDNA를 증폭시켰다.

6) 재조합 plasmid 제조

AMV reverse transcriptase를 이용하여 합성한

cDNA에 EcoRI liker를 가한 후 EcoRI 제한 효소를 처리한 cDNA와 pUC19 plasmid를 ligation하여 재조합 plasmid를 제조하였다 (Maniatis., 1982; Helfman *et al.*, 1983; Wu *et al.*, 1987). 이것을 pUCR1이라 하였고 PCR 방법에 의하여 합성한 cDNA와 pUC19 plasmid는 HindIII로 처리한 후 ligation시켜 재조합 plasmid를 제조하였다. 이것을 pUCR2라고 하였다.

7) 형질전환

형질전환은 Cohen등(1972)의 방법에 따라 실시하였으며 heat shock을 실시하여 효율을 높였다. 형질전환체는 MacConkey plate agar에서 흰색 집락을 선택하여 다량 배양 후 집균하여 cracking buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 2 mM EDTA, 0.4 M sucrose, 0.01% BPB)에 처리하여 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 재조합 plasmid를 확인하였다.

8) Southern blot 분석

형질전환체로부터 재조합 plasmid를 분리한 후 0.7% agarose gel 전기영동을 실시하여 nitro-cellulose membrane (NCM)에 옮긴 후 레닌 cDNA로부터 합성한 DNA 조각을 nick translation하여 제조한 probe (Rigby *et al.*, 1977)로 hybridization 시킨 후 autoradiograph를 실시하였다 (Southern, 1975).

9) 유전자 발현

형질전환된 JM103 *E. coli*가 레닌을 합성하는가를 확인하기 위하여 Hirose등(1982)의 방법으로 대량 배양한 형질전환체를 초음파로 파괴시킨 후 75% ammonium sulfate로 침전시켜 투석시킨 후 pepstatin-aminohexyl-agarose column을 통과시킨 분획을 10% SDS-PAGE로 단백질이 생합성됨을 확인하였다.

10) 생합성된 레닌의 생리적 활성 검사

형질전환체의 추출물(0.5 mg protein / ml) 0.5 ml를 urethane (1 g / Kg)으로 마취시킨 토끼의 귀정맥에 주사하여 physiography (Narco, MK-IV)로 내성동맥의 혈압을 측정하였다 (Gould *et al.*,

1963; Werle *et al.*, 1957).

11) Genomic library의 제작

(1) DNA 절편의 준비

토끼 신장으로부터 DNA를 분리하여 EcoRI으로 처리한 후 0.5% agarose gel 전기영동하여 약 10-20Kb되는 DNA 절편을 용출시켰다(Maniatis *et al.*, 1982).

(2) EMBL3 arms에 10-20kb 신장 DNA 절편 연결

감염된 *E. coli*를 처리하여 stuffer를 제거한 후 정제한 EMBL3와 토끼 신장으로부터 추출한 DNA를 EcoRI로 처리한 10-20kb DNA 절편을 연결시켜 재조합 phage DNA를 제작하였다(Davis *et al.*, 1986).

(3) *In vitro* packaging

Packagene을 packaging extract하여 22°C에서 2시간 동안 배양한 후 packaging시킨 phage를

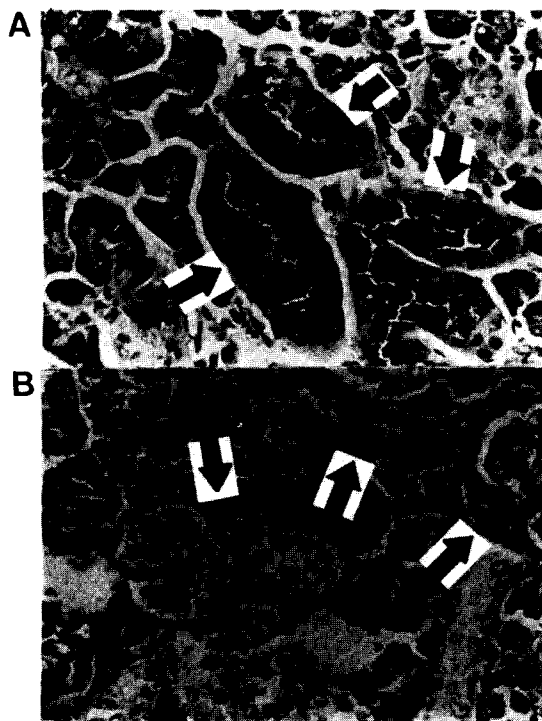


Fig. 1. Bowie's stain of the mouse submaxillary gland (A) and juxtaglomerular cells of mouse (B). Renin granules were stained with biebrich scarlet and ethylviolet, and were found as violet granules (arrows, $\times 400$).

NM538 *E. coli*에 감염시켜 genomic library를 제조하였다(William *et al.*, 1980; Grosveld *et al.*, 1981; Enquist *et al.*, 1979).

(4) Plaque hybridization

Phage (10^8 - 10^{11} phage / ml lysate)를 100배로 연속 희석한 후 lambda agar plate에 배양하여 형성된 plaques를 NCM에 옮긴 다음 레닌 cDNA로부터 제조한 probe를 사용하여 hybridization시켜 레닌 유전자를 갖는 재조합 phage를 screening하였다(Benton *et al.*, 1977; William *et al.*, 1980; Aber, 1983).

결과

1. 생쥐의 약하선으로부터 레닌 cDNA합성과 그의 발현

생쥐의 약하선으로부터 레닌의 분비를 확인할 뿐만 아니라 신장의 사구방 세포의 레닌분비와 비교 검토하기 위하여 조직화학적 실험을 해 본 결

1 2 3 4 5 6 7 8

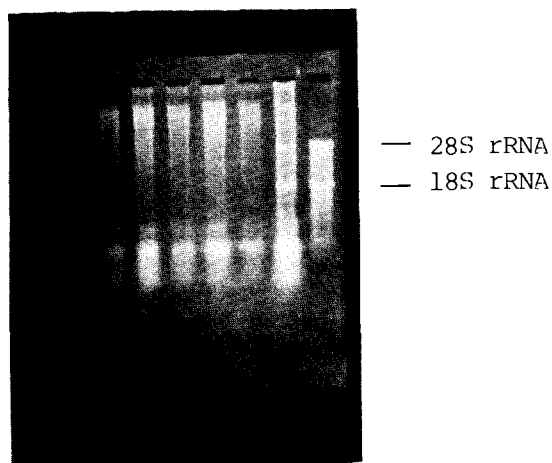


Fig. 2. Formaldehyde gel electrophoresis (1.5%) of mRNA fractions. Each fraction ($10 \mu\text{l}$) was loaded onto the well of formaldehyde gel and run at 200 V for 3 hours. Lane 1-6: mRNA fractions obtained from Sepharose column; lane 7: $10 \mu\text{g}$ of total RNA; lane 8: $10 \mu\text{g}$ of rRNA (18S and 28S).

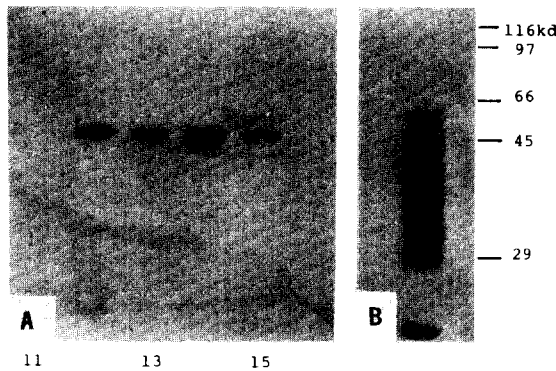


Fig. 3. SDS-PAGE (10%) of immunoprecipitated products. aliquots of the indicated fractions were translated using a rabbit reticulocyte system containing [³⁵S]-methionine. The products in the cell free translation system were analyzed by immunoprecipitation and electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gel. Molecular weight markers were β-galactosidase (116,000), phosphorylase (97,000), bovine albumin (66,000), egg albumin (45,000), carbonic anhydrase (29,000). A: Autoradiograph of immunoprecipitated products; B: Total translation products of mRNA rich fraction.

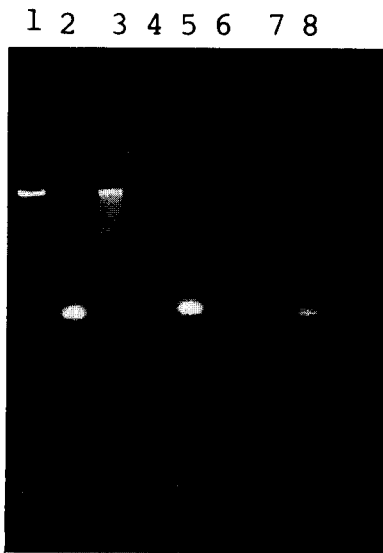


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of cDNA synthesized and amplified. Lane 1: size marker (HindIII digests of lambda DNA); lane 2: cDNA synthesized with oligo (dT) primer was amplified by PCR; lane 3: cDNA synthesized with primer; lane 5: cDNA synthesized with primer and amplified by PCR; lane 6: cDNA synthesized with primer; lane 8: cDNA synthesized with mRNA and amplified; lane 4, 5: Taq. polymerase and primer only.

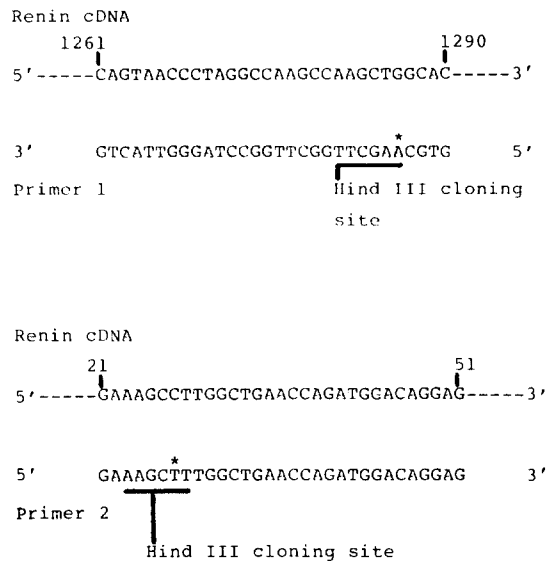


Fig. 4. Nucleotide sequence of primer 1 and primer 2 chemically synthesized. *: Mismatch.

과 약하선에서는 신장의 사구방 세포에서 보다 더 많은 양의 레닌이 분비됨을 확인하였다(Fig. 1).

따라서 약하선으로부터 전 RNA를 분리하여 poly (U) sepharose 4B column에 통과시켜 poly (A)⁺ RNA를 분리시켰고 plate assay와 denaturation formaldehyde agarose gel 전기영동을 실시하여(Fig. 2) mRNA가 풍부한 분획을 수집한 후 10-20% sucrose linear gradient 원심분리를 실시하여 immunoprecipitation 방법으로 레닌 mRNA가 들어있는 분획을 확인하였다(Fig. 3).

이 레닌 mRNA로부터 Okayama 방법으로 cDNA에서 primer 1과 primer 2를 합성하여(Fig. 4) Taq. polymerase를 이용한 PCR 방법으로 다량의 cDNA를 합성하였다(Fig. 5). 한편 생쥐 약하선 레닌 cDNA로부터 합성한 probe를 이용하여 southern blot에 사용하였다. 레닌 cDNA는 pUC19 plasmid에 삽입시켜 MacConkey agar 배지에서 배양시켜 형질전환된 흰색의 집락을 screening하였다. 이 집락에서 재조합된 plasmid를 분리하여 probe를 이용한 southern blot을 실시함으로써 cDNA가 pUC19에 삽입되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

약하선으로부터 합성한 cDNA에서 합성된 레닌

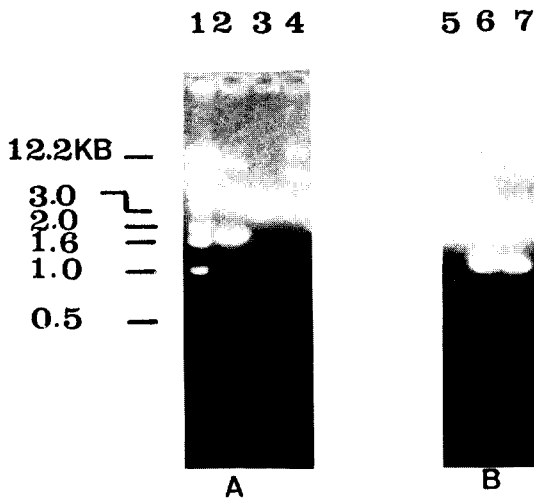


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis (0.7%) of EcoRI or HindIII digests of recombinant plasmid containing renin cDNA. Lane 1: size marker (1Kb DNA ladder); lane 2: pUC19 plasmid; lane 3: digest of pUC19 plasmid; lane 4: transformant (pUCR1); lane 5: transformant (pUCR2); lane 6: EcoRI digest of pUCR1; lane 7: HindIII digest of pUCR2.



Fig. 7. Southern blot analysis of EcoRI or Hind III digests of recombinant plasmid containing renin cDNA. The gel obtained from Fig. 6B was hybridized with renin cDNA probe, and autoradiographed. Lane 1: recombinant plasmid (pUCR2); lane 2: EcoRI digest of pUCR1; lane 3: Hind III digest of pUCR2.

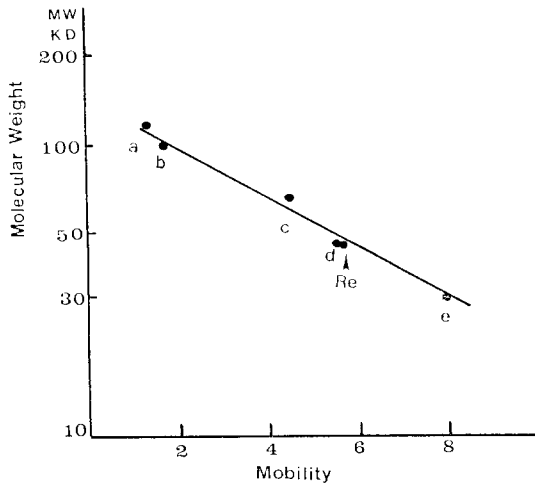


Fig. 8. Molecular weight calibration curve obtained from 10% polyacrylamide gels containing 1% SDS. The five marker proteins used were: a, β -galactosidase 116,000; b, phosphorylase 97,400; c, bovine albumin 66,000; d, indicates position of renin migrated.

의 생리활성을 알아보기 위하여 형질전환체를 다량 배양한 후 전기영동을 통하여 분자량이 45,000

임을 확인하였고(Fig. 8) 형질전환체의 추출물을 레닌 단백질을 추출하여 마취된 토끼에 주입하였더니 토끼의 혈압이 85-115 mmHg에서 115-140 mmHg로 상승하였다(Fig. 9).

2. 토끼의 신장으로부터 genomic library 제조

토끼의 신장으로부터 분리한 10-20Kb DNA 절편을 EMBL3 lamda phage DNA에 연결시켜 packaging하였다. 재조합 lamda phage는 plaque hybridization방법으로 확인하였으며 DNA의 서열을 결정하기 위하여 보관해 두었다(Fig. 10).

고찰

고혈압은 본태성 고혈압과 신장성 고혈압으로 야기된다. 신장성 고혈압은 Renin-Angiotensin-Aldosterone계의 분자생물학적 연구를 통하여 많은 연구가 되어가고 있으며 저해제를 이용하

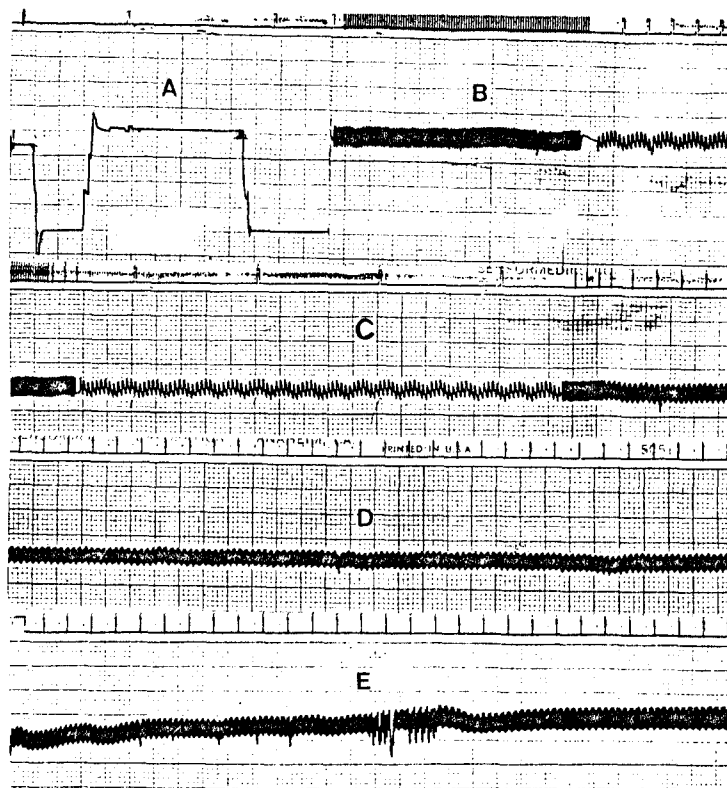


Fig. 9. The effect of the transformant *E. coli* extract on the rabbit blood pressure. A: Calibration with 100 mmHg; B: Blood pressure without injection; C: Blood pressure after injecting saline; D: Blood pressure after injecting the extract of *E. coli* transformed with pUC19 plasmid; E: Blood pressure after injecting the extract *E. coli* transformed with recombinant plasmid.

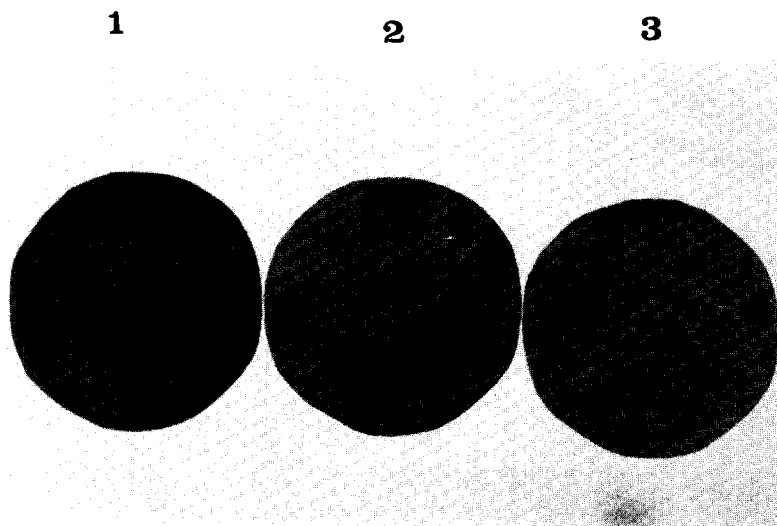


Fig. 10. Screening of the lambda EMBL3 library for the isolation of renin genomic DNA. Each plate was hybridized with radiolabeled renin cDNA probe, and then autoradiographed. 1: First screening; 2: second screening; 3: third screening.

여 레닌성 고혈압을 조절할 수도 있기때문에 레닌의 양산을 통하여 레닌의 구조와 생화학적 특성 연구가 무엇 보다도 중요하다(Panthier, 1982). 따라서 본 연구에서는 레닌을 대량 생산할 수 있는 기초 연구를 시도하였다.

본 연구에서는 레닌을 분리하는 생쥐 약하선으로부터 분리한 레닌 mRNA를 *in vitro* translation하여 분자량이 45,000인 레닌이 합성됨을 확인하였다. Yokosawa등(1980)은 사람의 신장으로부터 분리한 레닌을 sedimentation equilibrium방법과 gel filtration방법으로 분자량을 결정한 결과 40,000-41,000이었고 Takii(1982)와 Ueno등(1981)은 돼지의 레닌 분자량 측정을 sedimentation equilibrium방법만을 사용하여 측정한 결과 50,000-60,000이었다. 그러나 Fukushi등(1982)은 생쥐 약하선으로부터 분리한 레닌 mRNA를 *in vitro* translation시켜 분자량이 43,000-45,000되는 레닌을 합성한 보고와 본 연구에서 합성한 결과와는 유사하였다.

레닌 mRNA로부터 합성한 레닌 cDNA에 EcoR1 linker를 첨가하여 pUC19에 삽입시켜 재조합 plasmid (pUCR1)를 제작하였는데 보다 효율적인 방법을 시도하기 위하여 레닌 mRNA로부터 primer 1과 primer 2를 이용하여 직접 PCR방법으로 cDNA를 합성하여 재조합 plasmid (pUCR2)를 제작하였다. Masuda등(1982)은 AMV reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성한 후 oligo (dG-dC) tailing방법을 이용하여 재조합 plasmid를 합성하였으나 본 연구에서 사용한 PCR방법에 의한 cDNA합성은 훨씬 많이 증폭되었기 때문에 cDNA합성효과가 좋았으며 cDNA library제작이 효율적이었다.

레닌 cDNA를 pUC19에 삽입하여 합성된 재조합 plasmid를 JM103에 형질전환시킨 후 유전자 발현을 시켜 그 산물을 추출하여 토끼의 귀 정맥에 주입시켰더니 혈압이 85-115 mmHg에서 115-140 mmHg로 증가를 보였다. 이는 레닌 cDNA가 생리적 활성을 갖는 레닌으로 발현됨을 증명하고 있다. Panthier등(1982)은 cDNA를 합성하여 DNA의 서열을 결정하고 유전자 발현을 시켜 레닌의 아미노산 서열까지 보고한 바 있으나 생리적 활성을 측정할 바 없다.

본 연구에서는 레닌 cDNA의 서열과 양산을 위하여 genomic library도 제작하였다. 그리고 생쥐의 약하선 레닌 cDNA를 probe로 이용하여 토끼의 신장 DNA를 삽입시킨 재조합 EMBL3 phage를 plaque hybridization방법으로 screening하여 신장 레닌 genomic유전자를 색출하여 보관하여 두었다.

사사

본 연구를 위하여 여러모로 도와 주신 정진하(서울대), 조경우(전북대), 민경희(숙대), 이대실(과기원) 선생님들께 심심한 사의를 표한다.

인용문헌

- Aber, W. 1983. A beginner's guide to lambda biology. *In: Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.* pp. 381-395.
- Aber, W., L. Enquist, B. Hohn, N. Murray, and K. Murray. 1983. Experimental methods for use with lambda. *In: Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York,* pp. 433-466.
- Anderson, D. J. and G. Blobel, 1983. Immunoprecipitation of proteins from cell free translation. *Meth. Enzymol.* **96**: 180-182.
- Bing, J., K. Poulsen, E. Hackenthal, E. Rix, and R. Taugener. 1980. Renin in the submaxillary gland: a review. *J. Histochem. cytochem.* **28**: 847-880.
- Chien, A., D. B. Edgar, and J. M. Trela. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**: 1550-1557.
- Chamberlain, J. P. 1979. Fluorographic deletion of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *anal. biochem.* **98**: 132-135.
- Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. T. MacDonald, and W. J. Rutter. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *biochemistry* **18**: 5294-5299.
- Cohen, S., J. M. Taylor, K. Murakami, A. M. Michelakis, and T. Inagami. 1972. Isolation and characterization of renin like enzyme from mouse submaxillary glands. *Biochemistry* **11**: 4286-4291.
- Cohen, S. N. and C. Y. Chang. 1972. Nonchromosomal

- antibiotic resistance in bacteria; Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*. **70**: 84-87.
- Davis, L. G., M. D. Dibner, and Battey, J. F. 1986. *Methods in Molecular Biology*, Elsevier, New York, pp. 168-174.
- Deeley, R. G., J. I. Gordon, A. T. H. Burns, K. P. Mullinix, M. Binastein, and r. F. Goldberger. 1977. Primary activation of the vitellogenin gene in the rooster. *J. Biol. Chem.* **252**: 8310-8319.
- Enquist, L. and N. Stemberg. 1979. Packaging of bacteriophage lambda *in vitro*. *Methods Enzymol.* **86**: 281-298.
- Fukushi, T., T. Masuda, M. Sudo, S. Kimura, S. Hirose, and K. Murakami. 1982. Isolation and translation of renin mRNA from the mouse submaxillary gland. *Biomed. Res.* **3**: 534-540.
- Gould, A. B., L. T. Steggs, and R. K. Joseph. 1963. The Presence of Renin Activity in Blood Vessel Walls. *Wester reseve university*. pp. 389-398.
- Grosveld, F. G., H-H.M. Dahl, E. DeBoer, and R. A. Havel. 1981. Isolation of β -globin-related genes from a human cosmid library. *Gene* **13**: 227-231.
- Grustein, M. and d. Hogness. 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **72**: 3961-3965.
- Gubler, U. and B. J. Hoffman. 1983. A simple and very efficient method of generation cDNA libraries. *Gene* **25**: 263-269.
- Helfman, d. M., J. R. Feramisco, J. C. Fiddes, Thomas, P. and S. H. Hughes. 1983. Identification of clones that encode chicken tropomyosin by direct immunological screening of a cDNA expression library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**: 31-35.
- Higuchi, R., C. H. Beroldingen, G. F. Sensabaugh, and H. A. Erlich. 1988. DNA typing from single hairs. *Nature* **332**: 543-546.
- Hirose, S., M. Yamoto, S-G. Kim, M. Tsuchiy, and K. Murakami. 1982. Localization of renin mRNA in the mouse submaxillary gland by *in situ* hybridization histochemistry. *Biomed. Res.* **4**: 591-596.
- Kelley, R. G., N. Cozzarelli, M. P. Deutscher, I. R. Lehman, and A. Kornberg. 1970. Enzymatic synthesis of ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **245**: 39-42.
- Kimmel, A. R. and S. L. Berger. 1987. Preparation and cDNA and generation of cDNA libraries: overview. *Methods Enzymol.* **152**: 307-316.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
- Laragh, J. H. and J. E. Sealey 1973. The renin angiotensin-aldosterone hormonal system and regulation of sodium, potassium and blood pressure homeostasis: *In Handbook of Physiology: Renal Physiology*. (Orloff, J. and R. W. Berliner, eds.) Americal Physiological Society, Washington, d. C., pp. 381-908.
- Lee, M. S., K. S. Chang, F. Cabanillas, E. F. Freireich, J. M. Trujillo, and S. A. Stass. 1987. Detection of minimal residual cells carrying the t (14;18) by DNA sequence amplification. *Science* **237**: 175-178.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Martial, J. A., J. D. Baxter, H. M. Goodman, and P. H. Seeburg. 1977. Regulation of growth hormone messenger RNA by thyroid and glucocorticoid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 1816-1820.
- Masuda, T., T. Inami, T. Fukushi, M. Sudoh, S. Hirose, and K. Murakami. 1982. Molecular cloning of DNA complementary to mouse submaxillary gland renin mRNA. *biomed. Res.* **3**: 541-545.
- Michellakis, A. M., H. Yoshida, J. Menzie, K. Murakami, and T. Inagami. 1974. A radioimmunoassay for the measurement of renin in mice and its application to submaxillary gland and kidney studies. *Endocrinology* **94**: 1101-1105.
- Monahan, J. J., L. A. McReynolds, and O. Malley. 1986. The ovalbumin gene: *in vitro* enzymatic synthesis and characterization. *J. Biol. Chem.* **251**: 2471-2482.
- Nakata, S., H. Taira, A. Hall, L. Johnstrud, M. Streuli, J. Escodi, W. Boll, K. Cantell, and C. Weissmann. 1980. Synthesis in *E. coli* of polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature* **284**: 316-320.
- Okayama, H. and P. Berg. 1982. High efficiency cloning of full length cDNA. *Cell Biol.* **2**: 161-170.
- Oparil, S. and E. Haber. 1974. The renin angiotensin system first and two parts. *New Engl. J. Med.* **291**: 389-401.
- Panthier, J. J., S. Foote, B. Chambraud, A. D. Strosberg, P. Covol, and F. Rougen. 1982. Complete amino acid sequence and maturation of the mouse submaxillary gland renin precursor. *Nature* **298**: 90-92.
- Rigby, P. W. J., M. Diekmann, C. Rhodes, and P. Berg. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**: 237-251.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *science* **230**: 1350-1354.
- Smith, C. L. 1966. Rapid demonstration of juxtaglomerular granule in mammals and birds. *Stain technol.* **41**: 291-294.
- Springer, T. A. 1981. Monoclonal antibody analysis of

- complex biological system; combination of cell hybridization and immunoadsorbents in a novel cascade procedure and its application to the macrophage cell surface. *J. Biol. Chem.* **256**: 3833-3839.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Takii, Y. and T. Inagami. 1982. Purification of a completely inactive renin from hog kidney and identification as renin zymogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**: 144-140.
- Ueno, N., H. Miyazaki, S. Hirose, and K. Murakami. 1981. 56,000-dalton renin binding protein in hog kidney is an endogenous renin inhibitor. *J. Biol. Chem.* **256**: 12023-12027.
- Vuorio, E., L. Sandell, D. Kravis, V. C. Sheffield, T. Vuorio, A. Dorfman, and W. B. Upholt. 1982. Construction and partial characterization of two recombinant cDNA clones for procollagen from chicken cartilage. *Nucl. acid Res.* **10**: 1175-1192.
- Werle, E., R. Vogel, und L. F. Goldel. 1957. Über ein blutdruckstein gerndes prinzip in Extrakten aus der Glandula submaxillaris der WeiBen Maus. *Arch. Exper. Path. U. Phamarkol. Bd.* **230**:w 236-244.
- Williams, B. G. and F. R. Blattner. 1980. Bacteriophage lambda vector for DNA cloning; In genetic engineering, Vol. 1, 2. pp. 201-210, Plenum, N.Y.
- Wong, C., C. E. Dowling, R. K. Saiki, R. G. Higuchi, H. A. Erlich, and Jr. H-H. Kazazian. 1987. Characterization of β -thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* **330**: 384-386.
- Wu, R. W. T. and R. Anuradha. 1987. Adoptors, Linkers and Methylation. *Methods Enzymol.* **152**: 343-349.
- Yokosawa, H., L. A. Holladay, T. Inagami, E. Hass, and K. Murakami. 1980. Human renal renin complete purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **255**: 3498-4502.

(Accepted November 25, 1989)

**A Study on the Molecular Biology of Renin-Angiotensin System:
Renin Gene Expression and Construction of Genomic Library**

Young-Soon Park, Dong-Min Han, Chong-Ho Kim, Young-Hoe Moon,* Ho-Sup Lee,**
Geon-Il Ko*** and Sung-Joon Kim****

(Dept. of Molecular Biology, Medical School,* Oriental Medical School,** School of
Pharmacy,*** Wonkwang University, Iri city, Chulla Buk-Do, 570-749, and Dept. of Genetic
engineering, Chosun University,**** Kwangju city, Chulla Nam-Do, 501-759, Korea)

Poly (A)⁺ RNA was isolated from mouse submaxillary gland and renin mRNA was isolated by poly (U)-sepharose chromatography and sucrose linear density gradient centrifugation. And renin mRNA was identified by *in vitro* translation and immunoprecipitation. In order to construct recombinant plasmid, renin cDNA was synthesized by using reverse transcriptase and inserted into EcoRI site of pUC19. In addition, the cDNA was also synthesized using polymerase chain reaction and inserted into HindIII site of pUC19. The recombinant plasmid was transformed into JM103 and the expression of the inserted renin cDNA was examined. The transformant produced renin protein having a molecular weight of 45,000 dalton, which showed hypertensive effect upon injecting it into rabbit ear vein.

A renin genomic library was prepared by inserting rabbit kidney DNA into EMBL3 phage, and was screened for the isolation of renin genomic DNA using renin cDNA probe.