

Sephadex G-15 또는 G-50 chromatography를 이용한 방사성 동위원소로 표지된 RNA의 정제

원광보건대학 방사선과
유병규 · 이종석

- Abstract -

Purification of Radiolabeled RNA Using Sephadex G-15 or G-50 Chromatography

Beong Gyu Yoo · Jong Seok Lee
Dept. of Radiotechnology, Wonkwang Health Science College

We attempted to purify radiolabeled RNA using Sephadex G-15 and G-50 chromatography instead of commercial RNA purification kit. In the Sephadex G-15 chromatography the major portion of RNA was eluted in the fractions ranging from 3rd to 5th whereas broad elution profile of RNA was obtained from the Sephadex G-50 chromatography. The elution profile and purity of RNA obtained from Sephadex G-15 chromatography was very similar to that by commercial RNA purification kit. Furthermore, operating time required for purification of RNA by Sephadex G-15 was rather smaller than that by commercial kit.

Overall results suggest that the purification of radiolabeled RNA using Sephadex G-15 is more money and time saving than using commercial RNA purification kit.

I. 서 론

순수한 RNA의 분리는 클로닝 실험, 유전자 발현의 분석, RNA 자가촉매 실험 및 특정 cell type의 cDNA library 구축 등 RNA 관련 연구에 중요한 실험 과정이다.¹⁾ 유전자 발현 연구의 첫 단계는 유전자에 대한 상보적 RNA strand를 형성하는 transcription 과정이며 transcription 연구를 위해서는 RNA transcript를 온전한 형태로 얻을 수 있어야 한다. 얻어진 transcript의 일부 (introns)가 제거되는지의 여부를 확인하고 나아가 intron의 구조 및 기능을 조사할 수 있다.²⁾ RNA transcription은 정제된 유전자 단편을 cloning 하여 in vitro에서 Mg²⁺, spermidine, ribonucleotide 및 RNA polymerase를 첨가하여 수행될 수 있다.³⁾ RNA 실험에 있어서 가장 중요한 요인은 전체 크기의 순수한 RNA의 분리이며 실험 실패의 주된 요인은 일반적으로 cofactor를 필요로 하지 않고도 매우 안정한 ribonuclease의 오염이다. 그러므로

순수한 RNA의 정제를 위해서는 ribonuclease(RNase), protein, DNA 및 salt 등의 제거가 필수적이다.¹⁾ 시료 속의 단백질 및 salt 제거 방법에는 phenol/chloroform 처리 및 에탄올 침전법이 일반적으로 사용되나 시료의 소실 및 mRNA의 파괴에 영향을 미치고 극미량의 경우 부적당하다. 따라서 극미량의 RNA로도 관련연구를 하기 위해서는 방사성 동위원소로 표지된 RNA의 순수 분리 및 정제가 필요하다. 이러한 이유로 세계의 유명 시약·기기 회사들은 고유 상품명의 chromatography kit를 개발 판매하고 있다. Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)의 경우 Nuclei Clean, Boehringer Mannheim Co. (Mannheim, Germany)의 경우 Quick Spin, DuPont NEN Co. (Boston, USA)의 경우 Nensorb 20 등의 제품을 시판하여 RNA관련 연구에 많이 이용되고있다.⁴⁻⁶⁾ 이상의 제품은 기존의 chromatography 기법을 응용한 것으로 사용은 편리하나 환율이 폭등하여 가격이 비싸 시약 구입에 어려움이 많다. 그러므로 본 연구에서는 Sephadex G-15과 G-50를 이용해 transcription 과정동안 형성된 α -³²P로 표지된 mRNA를 정제하고 상품화된 RNA 정제 kit와 경제 효율성을 비교하고자 하였다.

※ 이 논문은 1998학년도 원광보건대학 교내 연구비 지원에 의해 연구되었음

II. 재료 및 방법

1. Sephadex resin의 packing

Sephadex G-15 또는 G-50 resin을 mini-column에 column 부피의 각각 1/3과 1/10의 부피로 각각 넣고 STE (250 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.5) buffer를 넣어 10분과 30분 동안 각각 방치하며 10배 부피의 STE buffer로 washing하여 equilibration한다.

2. *In vitro* RNA 합성

pGEM-2 recombinant plasmid를 HpaI로 절단한 후 세포성 RNA를 제거하기 위하여 DNase-free RNase로 37°C에서 15분간 incubation 시킨다. Phenol 추출과 ethanol 침전으로 단백질을 제거한 다음 선상화된 recombinant plasmid DNA를 증류수에 녹여 그 농도가 1-2 mg/ml이 되도록 한다. *In vitro* transcription을 위하여 transcription buffer(40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 6 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 10 mM DDT, RNase(1 U/ml), ribonucleotide mixture (0.5mM ATP, 0.5 mM CTP, 0.5 mM GTP, 0.5 mM UTP), recombinant DNA, α -³²P-GTP (50 μ Ci), T7 RNA polymerase (10 U)와 함께 37°C에서 1시간 incubation 한다.

3. Sephadex G column에 시료의 첨가 및 회수

In vitro 합성과정 동안 α -³²P로 표지된 RNA를 STE buffer에 넣어 column에 loading하고 STE buffer로 용출시킨다. 용출되는 시료를 Geiger-Muller counter로 측정하여 radioactivity가 측정되지 않을 때까지 한방울씩 microfuge tube에 받는다. 용출액에 2.5배의 에탄올과 1/10 부피의 2.5 M sodium acetate를 첨가하여 -70°C에 1 시간 이상 침전 시킨후 tube를 원심분리한다. 상등액을 제거하고 침전된 RNA를 70%의 에탄올로 2회 세척하고 증류수에 녹여 실험에 사용한다.

4. RNA의 회수율 및 순수도 확인

회수된 RNA의 radioactivity를 liquid scintillation counter로 측정하여 chromatography profile을 확인하고 회수율을 확인한다. 알칼리 용액으로 RNA를 nucleotides로 가수분해하여 260 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 흡광계수를 구한다. 각각의 ribonucleotide의 흡광계수를 기준으로하여 Puglisi와 Ignacio Tinoco의 방법⁷⁾에 따라 RNA를 정량한다. 단백질의 정량은 Bradford의 방법⁸⁾에 따라 수행한다. 4% polyacrylamide-8M urea gel에 loading하여 전기영동 하고 autoradiography한 후 RNA 순수도를 확인한다.

III. 결과 및 고찰

Transcription reaction 종료 후 Sephadex G-15 column에 loading된 transcription reaction solution을 분획한 결과 분획 3에서부터 radioactivity(13,200 cpm/ μ l)가 측정되었고 분획 5에서 최고의 radioactivity(18,600 cpm/ μ l)를 나타내었다(Fig. 1). 분획 6에서부터 radioactivity가 감소되기 시작하여 분획 25까지 낮은 radioactivity가 유지되었다. 이 결과로부터 *in vitro*에서 합성된 RNA의 대부분은 분획 3, 4, 5에 존재하며, 분획 8 이후에는 소량의 RNA와 RNA 합성에 참여하지 않은 여분의 α -³²P GTP, rNTP, 그리고 DNA 가닥으로부터 가수분해된 mononucleotide들이 존재하는 것으로 보인다.

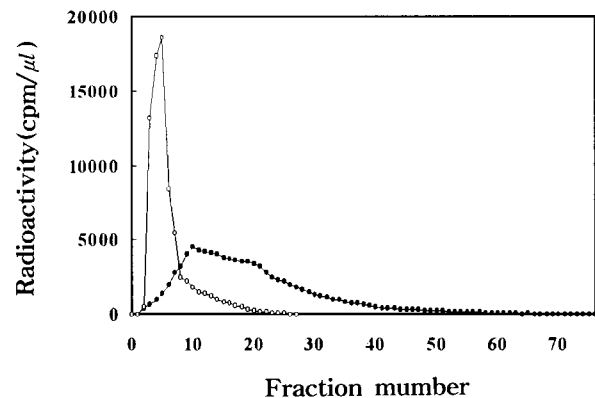


Fig. 1. The elution profiles of α -³²P labeled RNA by Sephadex G-15 or G-50 chromatography. Transcription solution was immediately loaded on Sephadex G-15(\circ - \circ) or G-50(\bullet - \bullet) column equilibrated with STE buffer, and then eluent was harvested in each tube.

이러한 분획 양상은 상품화된 RNA 정제 kit인 Nensorb 20 chromatography를 사용하여 얻어진 결과와 유사하다 (data not shown).

한편 Sephadex G-50 column을 통과한 분획들의 elution profile을 조사한 결과 Sephadex G-15의 경우와는 매우 다른 양상을 보여주었다. Radioactivity는 분획 1에서 분획 50 사이에 넓게 분포되어 있어서 peak의 형태가 매우 완만하였다.

단백질 정제의 경우 Sephadex G-15 resin은 1,500 dalton 이하의 분자량을 지닌 단백질 분리에 유용하고, Sephadex G-50 resin은 1,500부터 30,000 dalton 범위의 분자량을 갖는 단백질 분리에 유용하다.⁹⁾ 본 실험의 결과로 미루어 실험에 사용된 약 2000 base 크기의 RNA를 분리하는 데에는 Sephadex G-15이 G-50 보다 분리 효율이 좋은 것으로 확인되었다. Sephadex G-15 chromato-

graphy에 의해 분획된 RNA의 purity를 흡광도계 260 nm와 280 nm에서 각각 측정된 결과 A260/A280이 2.0이었고 RNA 함량은 약 40 ng/ μ l이었다. 분획의 단백질 정량 결과 단백질 함량이 측정되지 않았다. 이러한 결과는 RNA가 비교적 순수하게 정제되었음을 의미하나 RNA 순수도를 재확인 하기위해 *in vitro* splicing reaction을 수행하였다. Splicing reaction 동안 RNA는 단백질, DNA 및 metal ions에 의해 영향을 받아 splicing이 억제되거나 가수분해될 수 있다.³⁾ Sephadex G-15으로부터 분획된 RNA 분획 3, 4, 5를 *in vitro* splicing reaction에 사용한 결과 splicing reaction을 일으키지 않은 pre-mRNA (Fig. 2, lane 1)가 가수분해 되지 않고 온전함을 알 수 있었고 분획 3, 4, 5를 splicing reaction에 사용한 경우(Fig. 2, lane 2, 3, 4)도 정상적인 splicing products(Fig. 2 arrows)가 형성됨을 보여주었다. 이러한 결과들은 약 2000 base의 RNA가 Sephadex G-15 chromatography에 의해 순수하게 정제되었음을 의미한다.

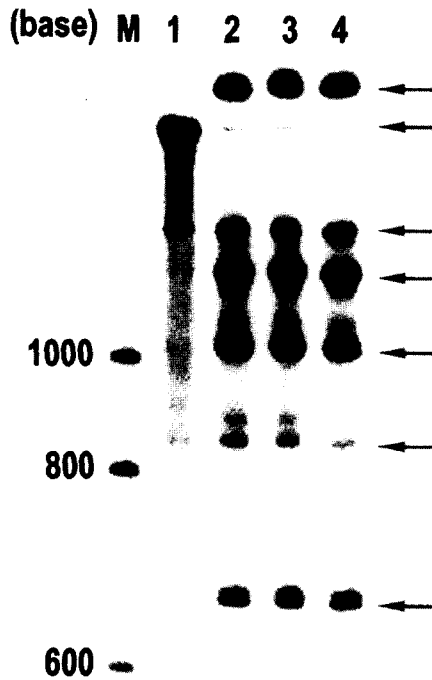


Fig. 2. An Urea-polyacrylamide gel electrophoretogram of α -³²P labeled RNA separated from transcription reaction components by Sephadex G-15 chromatography. Lane M designates standard RNA marker. The remaining lanes show unspliced pre-mRNA(lane 1) and normally spliced products which were obtained from fraction 3(lane 2), 4(lane 3), 5(lane 4) and subsequently applied to the splicing reaction. Arrows designate each splicing product obtained from normal splicing reaction.

Sephadex G-15 chromatography와 상품화된 RNA 정제 kit인 Nensorb 20의 정제 효율을 비교해 보면 chromatography profile과 순수도가 유사하였으며(data not

shown) 경제적, 시간적 효율을 비교해 보면(Table 1) Sephadex G-15 chromatography의 경우 packing과 eluting buffer가 별도로 필요하지 않아 경제적이고 작업 시간도 약 70 % 가량 줄일 수 있음을 확인하였다.

Table 1. Comparison of solutions and operating time needed for Sephadex G-15 chromatography with those for commercial RNA purification kit.

	Sephadex G-15	Commercial kit (Nensorb 20*)
packing solution	n. n.	50% methanol
equilibration & loading buffer	STE	TTE
eluting buffer	n. n.	20% ethanol
operating time	< 20 min	< 1 hr

* Nensorb 20 resin was obtained from Dupont NEN Co. (Boston, USA).

STE consists of 250 mM NaCl, 1mM EDTA and 10 mM Tris-HCl (pH 7.5).

TTE consists of 10 mM triethanolamine, 1 mM EDTA and 100 mM Tris-HCl (pH 7.5).

n. n. : not necessary.

IV. 결 론

주로 저분자량의 단백질 분리 정제에 많이 사용되는 Sephadex G-15과 G-50 resins을 약 2000 base크기의 α -³²P로 표지된 RNA정제에 사용한 결과 Sephadex G-15 resin은 상품화된 RNA정제 kit와 비교해볼 때 유사한 정제 효율을 갖고 있음을 확인하였다. 반면 Sephadex G-50은 정제효율이 떨어짐을 확인하였다. 뿐만 아니라 Sephadex G-15은 경제적으로나 시간적으로 상품화된 kit보다 효율적임을 확인하였다.

이러한 연구 결과는 앞으로 방사성 동위원소로 표지된 RNA 정제시 상품화된 고가의 RNA 정제 kit 대신 비교적 저렴한 Sephadex G resin을 이용한 gel filtration을 사용함으로써 경제적인 연구활동을 하는 데 도움이 되리라 본다.

참 고 문 헌

1. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl: Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley &

- Sons, New York, 4-1, 1992.
2. Arthur J. Zaugg, and Thomas R. Cech: The Tetrahymena intervening sequence ribonucleic acid enzyme is a phosphotransferase, *Biochemistry* 25, 4478-4482, 1986
 3. Jung-Suk Sung and In Kook Park: Effects of K^+ ion on *in vitro* RNA splicing of T4 phage thymidylate synthase gene, *Jour. Microbiol.* 34, 49-53, 1996.
 4. Naoki Sugimoto, Ryszard Kierzek, and Douglas H. Turner: Kinetics for reaction of a circularized intervening sequence with CU,UCU,CUCU, and UCUCU: mechanistic implications from the dependence on temperature and on oligomer and Mg^{2+} concentrations, *Biochemistry* 27, 6384-6392, 1988.
 5. Drew Smith and Norman R. Pace: Multiple magnesium ions in the ribonuclease P reaction mechanism, *Biochemistry* 32, 5273-5281, 1993.
 6. Hong-Lin Li, Bhadrani S.Chelladurai, Kejing Zhang and Allen W.Nicholson: Ribonuclease III cleavage of a bacteriophage T7 processing signal. Divalent cation specificity, and specific anion effects, *Nucleic Acids Research* 21, 1919-1925, 1993.
 7. Puglisi, J. D. and Ignacio Tinoco, Jr.: Absorbance melting curves of RNA, *methods in enzymology* 180, 304-325, 1989.
 8. M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254, 1976.
 9. M. P. Deutscher: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, New York, 321, 1990.