

단 신

RNA-RNA 상호작용 분석을 위한 DNA Library와 Affinity Column의 제조

조 봉 래*

청주대학교 이공대학 응용과학부 응용화학전공
(2006. 5. 3 접수)

Preparation of DNA Library and Affinity Column for the Analysis of RNA-RNA Interaction

Bongrae Cho*

Department of Applied Chemistry, Division of Applied Science, Cheongju University, Cheongju 360-764 Korea
(Received May 3, 2006)

주제어: aptamer, 친화 크로마토그래피, 과요오드산 나트륨

Keywords: SELEX, Affinity column, NaIO₄

Combinatorial chemistry의 한 종류인 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)는 1990년에 Gold 연구진¹과 Szostak 연구진²이 처음 사용한 이후로 현재까지 널리 사용되는 방법으로서, affinity selection과 PCR (polymerase chain reaction) 증폭의 과정을 반복해서 실시하여 특정 target 분자에 특이하게 결합하는 핵산분자들을 random sequence library로부터 선별해내는 방법이다. 지금까지 이 방법을 사용해서 아미노산, 단백질, 뉴클레오티드 및 항생제 등에 강하게 결합하는 핵산 분자(aptamer라고 한다)들이 분리되었다.³⁻¹¹ RNA - RNA 상호작용에 대한 정보를 얻기 위해 SELEX가 사용되기도 하였는데, 예를 들면, 리보솜을 구성하는 rRNA들 사이의 리보솜 내에서 상호작용에 대한 정보를 얻기 위해 그리고 단백질 합성 과정에서 rRNA와 tRNA들 사이의 상호작용에 대한 정보를 얻기 위해 SELEX가 사용되었다.¹²⁻¹⁴ 또한 SELEX를 이용하여 *Bacillus subtilis* RNase P RNA의 역할에 중요한 hairpin RNA에 특이하게 결합하는 RNA aptamer들도 선별되었다.¹⁵ target 분자에 강하게 결합하는 aptamer들의 성공적인 선별 과정을 위해서는 적절한 random sequence library의 제조와 적당한 selection protocol의 선택이 필수적이다.

따라서 본 연구에서는 random DNA library 제조를 위해 T4 DNA polymerase와 Taq DNA polymerase를 사용한 두 가지 경우를 비교 분석하여 어떤 효소를 이용하는 방법이 DNA pool 합성의 yield를 높일 수 있는지 알고자 하였다. 또한 강하게 결합하는 핵산분자들의 선별을 위해 사용되는 여러 가지 selection protocol들 가운데 RNA-RNA 상호작용에 대한 연구에 널리 사용되는 affinity chromatography용으로 이용될 RNA ligand가 결합된 affinity column의 제조를 위해 NaIO₄를 사용하였고 이 방법으로 세 가지 RNA ligand들을 붙였을 때의 그 yield를 비교 분석하였다.

DNA library는 가운데 40-mer의 random sequence를 가지고 양쪽으로 일정한 서열을 가진 구성을 한다(Fig. 1). Fig. 1에 나타난 것처럼 동량의 두 가지 primer들 즉, random 서열 부분을 가진 72-mer의 DNA primer와 대장균 tRNA^{Phe}에 해당하는 서열 부분을 가진 92-mer의 tRNA primer로부터 연장 반응으로 이종나선 DNA library 합성을 위해 두 가지의 DNA 중합효소 즉, Taq DNA polymerase와 T4 DNA polymerase가 사용되었다. 두 경우의 합성에 대한 정량적 분석의 비교를 위해 Taq DNA polymerase를 이용한 연장 반응은 1회만 실시하였다. 각각으로부터 합성된 DNA library를

5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG-N40-CAGACGACGAGCGGGAGCCCCGGATAG
CTCAGTCGGTAGAGCAGGGGATTGAAAATCCCCGTGTCCTTGGTTCGATTCCGAGTCCGGGCACCA-3'

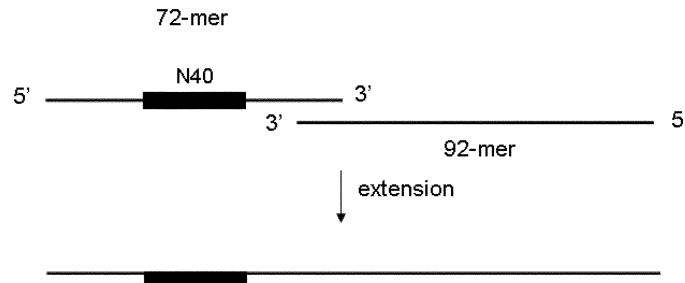
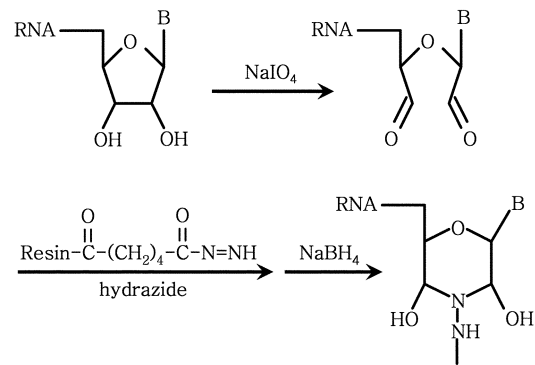


Fig. 1. DNA construct used in this experiment. Double-strand DNA library was prepared through extension reaction using Taq DNA polymerase or T4 DNA polymerase with a DNA primer of 72-mer having 40 random sequence and tRNA primer of 92-mer having the sequence corresponding to tRNA^{Val} during the extension.

native PAGE로 정제한 후 UV를 이용하여 정량 분석하였다. T4 DNA polymerase를 사용하여 합성된 DNA pool의 양은 79.2 ug 이었고 Taq DNA polymerase를 이용한 경우에는 11.5 ug의 DNA가 합성되었다. 따라서 본 연구에서 사용된, RNA library를 만들기 위한 주형으로 작용하는 이중나선 DNA pool 합성의 수득률을 높이기 위해 Taq DNA polymerase를 이용한 연장 반응보다는 T4 DNA polymerase를 사용하는 것이 유리한 것으로 나타났다. 그러나 이 실험에서 Taq DNA polymerase를 사용한 연장 반응의 각 단계의 시간(94에서 50초, 45에서 50초 그리고 72에서 1분)을 증가시키면 Taq DNA polymerase를 이용한 방법의 수득률도 증가할 것으로 생각된다.

Affinity chromatography용으로 사용된 RNA가 결합된 affinity column의 제조를 위해 NaIO₄와 NaBH₄를 사용하였다. ligand RNA 3' 말단의 리보스당을 NaIO₄를 이용하여 산화시킨 후 Sepharose-adipic acid hydrazide resin에 공유 결합적으로 coupling시킨 다음 NaBH₄로 처리하여 환원시킴으로써 RNA가 결합된 affinity column을 만들 수 있었다(Fig. 2). ligand RNA와 resin 사이의 coupling 과정에서 형성된 Schiff base는 NaBH₄로 환원시킴으로써 안정화 되었다. affinity column 제조에 사용된 세 가지 RNA ligand들 즉, hairpin RNA, 5S rRNA 혹은 tRNA들을 resin에 붙이는 이 coupling 과정의 efficiency는 반응 후의 flow-through 액을 받아서 반응하지 않고 용액에 남아 있는 RNA들을 정량하여 결정하였다. 이 결과에서 95% 이상의 RNA들이 resin에 결합하는 것을 관찰하였다(Table 1).



RNA bound to column > 95 %

Fig. 2. RNA ligand was oxidized at its 3'-end with NaIO₄ and covalently fixed to the commercial Sepharose-adipic acid hydrazide resin by hydrazone formation to prepare RNA-attached affinity column.

Table 1. Coupling efficiency of RNA ligands to resin

	Hairpin RNA	5S rRNA	tRNA ^{Val}
Coupling efficiency (%)	96.1	95.3	95.5

실 험

Random DNA library의 제조. 가운데 40-mer의 random sequence를 가지고 5'-쪽과 3'-쪽 양쪽으로 일정 시열을 가진 구성을 한 이중나선의 DNA library의 합성을 위해 다음과 같은 연장 반응을 실시하였다. 동량의 72-mer의 DNA primer(AGGGAGGACGATGCGG-N40-CAGACGACGAGCGGGAGCCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCAGGGGATTGAAAATCCCCGTGTCCTTGGTTCGATTCCGAGTCCGGGCACCA) N은 네 가지 뉴클레오티드

드의 동등한 혼합물을 나타낸다)와 92-mer의 tRNA primer(TGGTGCCCGGACTCGGAATCGAACCAAGGACACGGGGATTTTCAATCCCCTGCTCTACCGACTGAGCTATCCGGGGCTCCCGCTCGTCGTCTG)로부터 Taq DNA polymerase를 이용한 연장 반응으로(94 °C에서 50초, 45 °C에서 50초 그리고 72 °C에서 1분) 이중가닥 DNA를 만들었다. 그리고 한편으로 72-mer의 DNA primer와 92-mer의 tRNA primer의 혼합물을 95 °C에서 가열한 후 실온으로 서서히 cooling시킨 다음 T4 DNA polymerase를 이용하여 37에서 30분간 반응시켜서 이중가닥 DNA를 만들었다. 이 두 가지 방법에서 합성된 이중나선 DNA library들을 native PAGE로 정제한 후 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

RNA가 결합된 affinity column의 준비. RNA ligand가 결합된 affinity column을 제조하기 위하여 다음과 같이 반응시켰다. RNA ligand들로 hairpin RNA, 5S rRNA 혹은 tRNA^{Val}들이 사용되었다. hairpin RNA에 대한 주형 DNA에 T7 promoter를 annealing시킨 후 T7 RNA polymerase를 이용하여 hairpin RNA를 만든 다음 denaturing PAGE로 정제, 분리하였고 5S rRNA는 대장균에서 페놀로 추출하여 denaturing PAGE로 정제한 후 사용하였고 tRNA^{Val}는 sigma에서 구입한 후 denaturing PAGE로 정제한 후 사용하였다. 정제된 ligand RNA에 100 ul의 0.1 M K-phosphate, pH 8.0를 첨가하여 녹인 다음 50 ul의 20 mM NaIO₄ (freshly prepared)를 넣고 어두운 곳에서 2시간 동안 얼음에서 방치하였다. 3' 말단의 리보스당이 산화된 RNA를 에탄올로 회수한 후 0.1 ml의 0.1 M K-acetate, pH 5.0에

녹여 Separose-adipic acid hydrazide resin (Pharmacia)에 첨가하여 4 °C에서 24 시간 동안 조금씩 흔들어 주면서 coupling시킨 다음 NaBH₄로 환원시켜 RNA ligand가 결합된 affinity column을 만들었다. coupling 반응 후 반응하지 않고 용액에서 남아있는 RNA ligand의 양은 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

인용문헌

1. Tuerk, G.; Gold, L. *Science* **1990**, *249*, 505-510.
2. Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818-822.
3. Binkley, D. P.; Szostak, J. W. *Science* **1993**, *261*, 1411.
4. Giver, L.; Bartel, D. P.; Zapp, M. L.; Green, M. R.; Ellington, A. D. *Gene* **1993**, *137*, 19.
5. Famulok, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1698.
6. Geiger, A.; Burgstaller, P.; von der Eltz, H.; Roeder, A.; Famulok, M. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1029.
7. Sassanfar, M.; Szostak, J. W. *Nature* **1993**, *364*, 550.
8. Haller, A. A.; Samow, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8521.
9. Lauthon, C. T.; Szostak, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1246.
10. Lato, S. M.; Boles, A. R.; Ellington, A. D. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 291.
11. Wallace, S. T.; Schroeder, R. *RNA* **1998**, *4*, 112.
12. Ko, J.; Cho, B.; Ahn, J. K.; Lee, Y.; Park, I. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1999**, *20*, 1335-1339.
13. Ko, J.; Lee, Y.; Park, I.; Cho, B. *FEBS Lett.* **2001**, *508*, 300-304.
14. Cho, B. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2005**, *26*, 2093-2094.
15. Cho, B.; Taylor, D. C.; Nicholas, Jr., H.B.; Schmidt, F. J., *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1107-1113.