대한신장학회지 : 제 19 권 부록 제 1 호 2000

RNA를 이용한 분자생물학적 연구

충남대학교 의과대학 내과학교실

이 강 욱

서 론

RNA는(ribonucleic acid) 단일쇄 구조를 하고 있는데 데옥시라이보오즈(deoxyribose) 대신 라이보오즈(ribose)를 가지고 있으며(Table 1) 염기는 T 대신 U를 가지고 있어서 rATP(ribose adenosine triphosphate), rCTP(ribose cytidine triphosphate), rGTP(ribose guanidine triphosphate), rUTP(ribose uridine triphosphate)의 4종류 라이보뉴클레오타이드(ribonucleotide)가 있다. 그런데 RNA의 단일쇄 위에서도 염기 서열이 상보적인 경우(complementary)마치 DNA처럼 염기서열 사이에 수소결합이 이루어져 이중쇄를 형성하여 엉킨 모양의 복잡한 구조를 지니게 되는 경우도 있다(Fig. 1). 일반적으로 동물세포속에는 약 100pg 정도의 RNA가 들어 있다. RNA는 기능에 따라서 라이보좀 RNA(ribosomal RNA, rRNA), 운반 RNA(transfer RNA, tRNA), 전령 RNA(messenger RNA, mRNA)의 3가지 종류로 분류된다. 라이보좀 RNA는 라이보좀 RNA을 구성하는 RNA로서 세포내에 존재하는 총 RNA의 약 95%를 차지한다. 운반 RNA는 전령 RNA가 가져온 정보에 따라서 해당 단백을 라이보좀에서 생산할 때 정보에 맞는 각각의 아미노산을 라이보좀으로 운반해오는 역할을 하는데 총 RNA의 약 15% 정도 차지한다. 전령 RNA는 유전자가 가지고 있는 정보를 세포질내의 단백질 제조공장인 라이보좀으로 전달해주는 역할을 하는데 전체 RNA의 약 1% 정도밖에 되지 않는다. 전령 RNA 위에 있는 3개의 뉴클레오타이드는 한 개의 아미노산 생산을 결정하는 정보를 가지고 있는데, 이러한 뉴클레오타이드의 조합들을 부호 또는 코돈(codon)이라고 부른다. DNA의 이중쇄 구조에서 이러한 코돈과 동일한 염기 서열을 가지고 있는 쪽을 부호 결정쇄(coding strand) 또는 감각쇄(sense strand)라고 하며, 그 반대쪽을 비부호 결정쇄(noncoding strand) 또는 항감각쇄(anti-sense strand)라고 한다. 대부분의 유핵세포 전령 RNA는 3' 말단에 아데닌(poly-A tail)이 많이 부착되어 있다(Fig. 2). 따라서 순수 mRNA를 분리하기 위하여는 oligo(dT)-cellulose를 이용한 친화성 색층분석(affinity chromatography)를 이용하여 정제할 수 있다.

RNA를 이용한 일반적인 분자생물학적인 연구는 다음과 같은 것이 있다.

1) 세포내 유전자 특정 RNA 전사의 상대적인 양의 측정
2) 특정 유전자의 전사율(transcription rate) 또는 RNA들의 processing 경로 연구
3) RNA 분자의 지도작성(mapping 5', 3' 말단부위, 크기, 인트론의 위치 등)

Table 1. RNA 뉴클레오타이드(nucleotide)와 DNA 뉴클레오타이드의 비교

	RNA nocleotide	DNA nocleotide
Key nucleotide components	5-Carbon ribose	5-Carbon deoxyribose
	Phosphate group	Phosphate group
	Nitrogenous group	Nitrogenous group
Common nitrogenous group	Adenine	Adenine
	Cytosine	Cytosine
	Guanine	Guanine
	Uracil	Thymine

4) 정제된 특정 mRNA를 이용한 시험관내 특정 펩타이드 합성

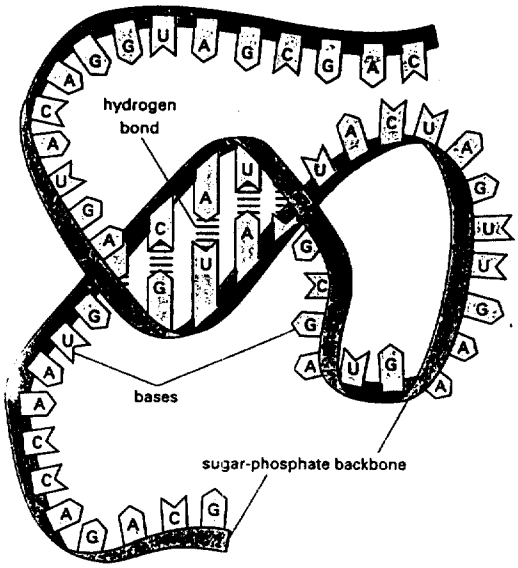


Fig. 1. 단일쇄 RNA 내부의 보합결합.

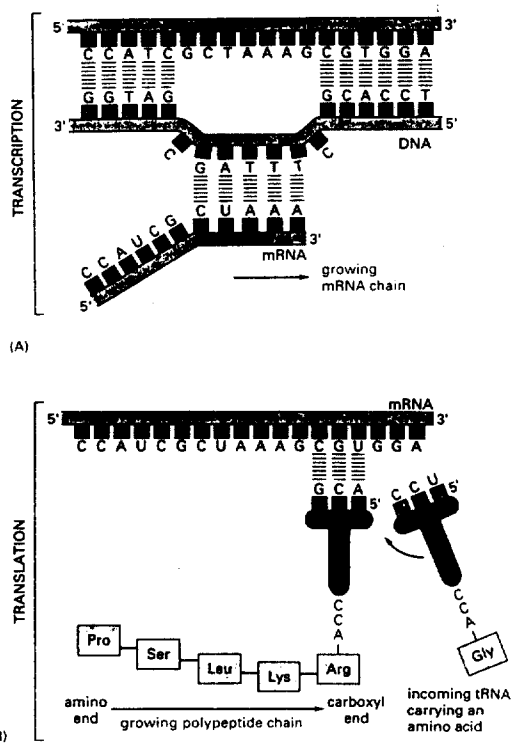


Fig. 2. DNA로부터 전령 RNA의 형성 및 단백질 합성의 개요 그림.

RNA의 추출 및 분리

RNA는 DNA에 비하여 불안정하기 때문에 다루기가 어렵다. 또한 RNase는 endonucleolytic 및 exonucleolytic 활성도를 통하여 RNA를 분해시킨다. 이 효소는 황결합이 되어있어 매우 안정하여 끓이더라도 효소의 활성도가 쉽게 사라지지 않는다. 그리고 넓은 범위의 pH에서도 작동한다. 따라서 RNA를 이용한 실험에서는 반드시 RNase 활성도를 배제하고 실험을 해야만 좋은 결과를 얻을 수 있다. 특히 초가기구 파이펫 팁, 완충액 등에서 모두 이러한 RNase 활성도가 없어야 한다. RNase 활성도를 배제하기 위하여서는 첫째 RNase를 함유하고 있는 세포나 조직 등 시료 외에도 RNase에 오염될 가능성이 있는 초자기구나 완충액 등으로부터 RNase가 없어야 하며, 둘째로 조직이나 세포 시료 속에 들어있는 RNase 활성도를 함께 억제하여야 한다. 특이적으로 RNase를 억제제로는 vanadyl ribonucleoside complexes(VDR)이나 RNasin 또는 RNAguard 등이 상품으로 나와 있다. 특히 사람의 손가락 피지 등에 많이 포함되어있어서 실험 조작중 장갑을 반드시 사용해야하며 자주 장갑을 갈아 끼워야 한다. 가장 많이 이용되는 물은 보통 diethyl procarbonate(DEPC)로 처리하여 사용하며, 초자기구 등은 깨끗하게 탈이온수로 씻고 DEPC 처리한 물로 다시 한번 깨끗하게 세척하고 180-200℃ 건열 하에서 3-4시간 정도 가열하여 RNase를 파괴하고 난 후에 사용한다. RNA를 다루는 실험은 따라서 실험실의 한 곳에서 정하여 모든 기구 용액 등을 분리하여 사용하는 것이 좋다.

RNA를 분리하기 위하여는 다음의 2가지 종류의 완충액을 이용하는데 첫째 구아니디움 염(guanidium salts), SDS(sodium dodesyl sulfate) 등을 포함된 완충액(chaotropic lysis buffer)으로 세포막과 세포내 미세기관들을 파괴하고 동시에 RNase를 억제하는 일반적인 완충액이다. 둘째 세포내 핵의 형태를 유지하면서 세포막을 부드럽게 용해시키는 완충액(gentle lysis buffer)으로 NP-40(hypotonic nonidet-40)이 있다. 특히 이 방법은 핵내의 RNA 전사 등을 특이적으로 연구할 때 필요하다. 상기 완충액들과 함께 조직이나 세포를 균질화하고 균질화된 용액을 ce-

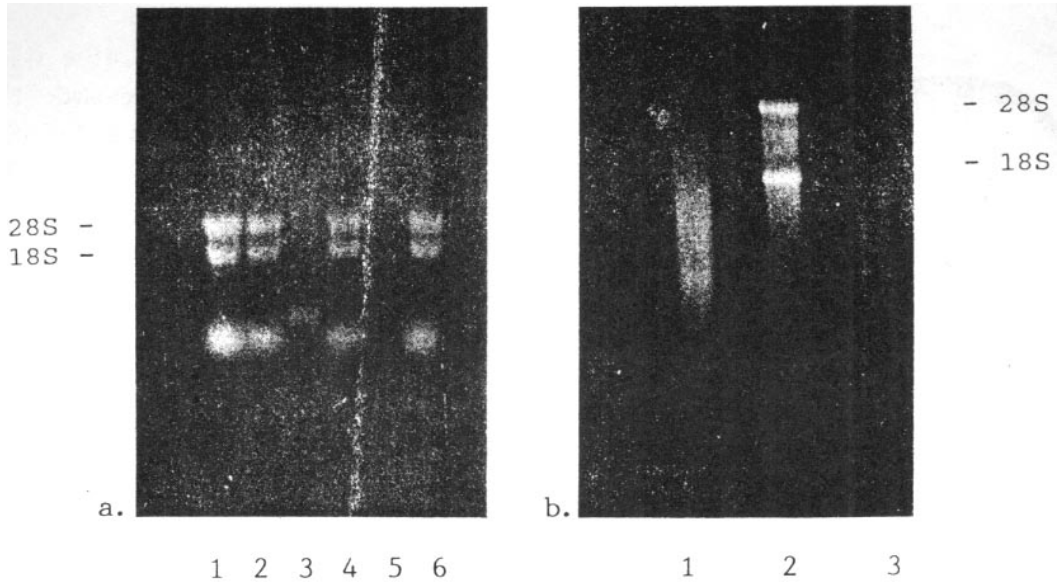


Fig. 3. *RNA의 1% 한천 겔 전기영동 사진. a-1, 2, 4, 6 : 18S 및 28S 라이보좀 RNA가 잘 보이고 있다. a-3 : RNA ladder, a-5 : blank, b-2 : 18S, 28S 라이보좀 RNA가 잘 보이는 잘 정제된 RNA, b-1, 3 : RNase에 의하여 파괴된 RNA로 뭉개진(smear) 모양.*

sium chloride 용액 위에 얹어(cesium chloride는 매우 비중이 높다) 장시간 초원심분리(ultracentrifugation)를 하면 밀도가 낮은 지방, 단백질 등은 상층부에 뜨며 DNA 는 중간 부위에 그리고 가장 밀도가 높은 RNA가 원심분리 튜브 바닥에 침전되도록 하여 순수 RNA를 정제한다. 최근에는 초원심분리를 하지 않고도 RNA를 분리할 수 있는 여러 종류의 키트(kit)들이 상품화되어 있다.

추출된 RNA의 질 평가(quality control)

추출된 RNA를 이용한 실험에서 첫째 중요한 것은 추출된 RNA가 RNase에 의하여 파괴되지 않고 DNA나 단백질 찌꺼기들이 최소한으로 포함된 순수한 RNA이어야 한다는 점이다. 이러한 RNA의 질을 평가하는 방법으로 한천 겔에 RNA 시료를 전기영동하여 라이보좀 RNA의 18S 및 28S의 선명한 밴드가 보이는 것을 확인하는 방법이 있다. 이때 이러한 선명한 밴드들이 보이지 않고 뭉개진(smear)된 모양을 보이면 RNA가 파괴되었음을 의미한다(Fig. 3). 한가지 중요한 점은 RNA들은 단일쇄 구조를 보이지만

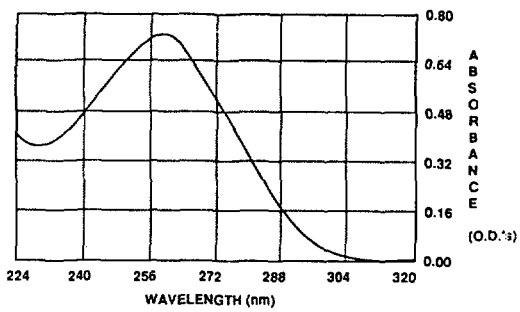


Fig. 4. *순수 핵산(nucleic acid)의 자외선 스펙트럼 (UV spectrum).*

상응하는 염기간에 서로 보합결합을 일으켜 엉켜있는 모양을 보이게 되는데 전기영동을 하기 전에 이러한 상태를 반드시 풀어주어야 한다(Fig. 1). 이렇게 변성(denature)시키는 방법으로는 포름알데히드(formaldehyde) 또는 glyoxal/DMSO(dimethyl sulfoxide)를 사용하는 방법이 있다. RNA 질을 평가하는 다른 방법으로는 자외선 흡광도기(UV spectrophotometer)를 이용하는 방법이 있다. 자외선 흡광도는 순수 핵산(nucleic acid)의 경우 260nm에서 최대치를 보

인다(Fig. 4). 일반적으로 UV 흡광도비(A260/A280)를 측정하는데 순수 RNA인 경우에 이 비율은 2±0.05이다. 순수 DNA는 1.8±0.05이다. 단백질이나 염류에 의한 오염이 심한 경우 이 흡광도 비율이 감소하게 된다. 자외선 흡광도기를 이용하면 동시에 UV 흡광도 A260에서 RNA의 농도를 함께 측정할 수 있는 장점이 있다. 염류 등 이물질이 많이 함유된 RNA 시료는 원심분리기와 70-75% 알코올 침전 방법으로 다시 정제할 수 있다.

노던 블롯팅(Northern Blotting)(Fig. 5, 6)

써던 블롯팅이 DNA를 다루는 작업인 반면에 노던 블롯팅은 RNA를 다루는 기술이다. 즉 한 개체의 모든 세포는 이중쇄 구조의 DNA가 들어있으며 이로부터 어떠한 유전자가 발현될 때 mRNA를 통해서 나타나게 되는데 특정한 조직에서의 이러한 mRNA의 양을 측정하는 것은 넓은 의미로 유전자 발현이 어느 정도 일어나는지를 상대적으로 정량화 할 수 있는 기술이다. 노던 블롯팅은 우선 원하는 세포나 조직에서 RNA를 추출하고 추출된 RNA를 한천 겔에서 전기영동 방법으로 크기별로 나열되도록 한 다음 다루기 쉬운 nitrocellulose나 nylon membrane에 흡착시킨다. 이러한 membrane에 흡착된 RNA에 원하는 mRNA에 상호 보합적인 염기서열을 가지고 있는 DNA나 RNA에 방사능동위원소로 표지한 소식자(probe)와 결합시키고 이를 x-선 필름에 감광되도록 하여 원하는 전령 RNA의 크기와 상대적인 양을 측정하는 것이다. 이때 각 시료에 적절한 양의 RNA가 포함되어 있는지 확인이 되어야 서로 유전자 발현의 상대적인 양을 측정할 수 있는데 어떠한 조건에서도 변화를 보이지 않는 소위 house keeping 유전자의 mRNA의 발현정도를 대조물로 사용하여 비교한다. House keeping 유전자로 많이 쓰이는 유전자는 beta-actin, 라이보좀 RNA 및 G3PDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 등이 있다.

노던 블롯팅의 각 과정을 간단하게 요약하면 다음과 같다.

1) 세포 및 특정 조직으로부터 RNA의 분리

2) 전기영동 전 RNA 처리

RNA의 염기간에 서로 보합결합 되어있는 상태를 풀어주어야 전기영동시 크기순으로 배열되기 때문에 시료당 충분한 양의 RNA(10-40 μg)를 65℃로 약 5분간 가온하여 열 변성(denaturation)시키고 얼음위에 급냉시킨다. 다음 MOPS 완충액, ethedium bromide, formaldehyde 등이 들어 있는 완충액과 혼합하여 전기영동한다.

3. RNA의 한천 겔 전기 영동

RNA 시료 속에는 서로 크기가 다른 RNA들이

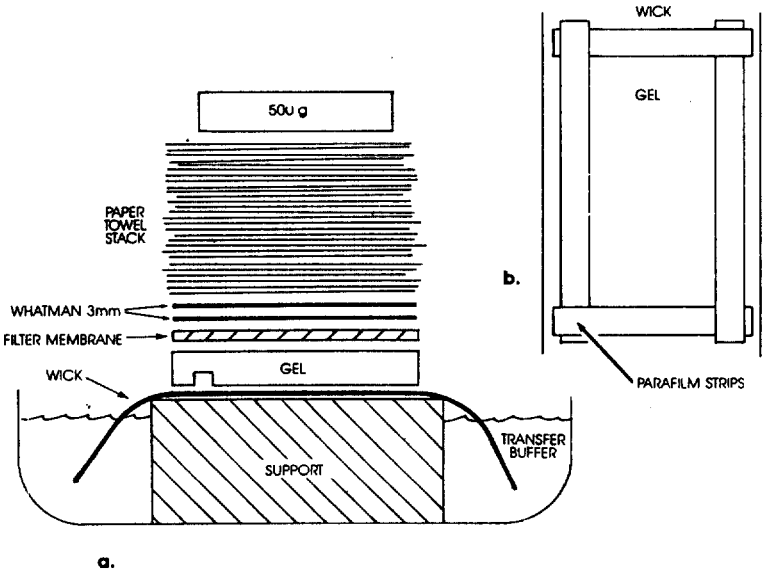


Fig. 5. 노던 로롯팅(Northern)에서 전기영동을 끝낸 한천 겔로부터 RNA의 나일론 membrane 전이.

들어 있으므로 한천 겔속에서 이를 크기별로 배열하기 위하여 formaldehyde가 포함된 1% 한천 겔에 loading하고 formaldehyde가 포함된 전기영동 완충액(MOPS buffer) 속에서 3-4V/cm 정도의 직류 전기를 연결하여 전기 영동을 수행한다. 전기 영동이 끝난 한천 겔을 UV 하에서 관찰하면 18S 및 28S의 라이보좀 RNA에 ethedium bromide가 결합되어 오렌지 빛의 띠를 관찰하게 된다.

4. 한천 겔로부터 RNA nitrocellulose 흡착지나 nylon 흡착지에 전이(Fig. 5)

전기영동 후 크기별로 배열된 RNA들이 들어 있는 한천 겔로부터 흡착지에 RNA를 전이하는 방법이다. 20XSSC(standard sodium citrate) 이전용액 하에서 한천 겔 위에 nylon 흡착지를 놓고 그위에 3MM Whatman 지를 올려놓는다. 다시 그 위에 여러겹의 흡수지를 5-8cm 쌓아놓고 맨 윗부분에 약 500g 정도의 물체를 올려놓으면 전이용액이 한천 겔, 흡착지, 흡수지를 통해 올라오면서 RNA는 흡착지에 잘 흡착된다. 전이를 위하여 걸리는 시간은 RNA의 크기에 따라서 달라진다. 크기가 1kb 이하인 것은 수시간 이내 15kb 이상이면 10시간 이상 소요된다. 전이가 끝난 흡착지는 상온에서 말리고 80℃ 진공 오븐에서 굽거나 254nm의 자외선을 조사하여 고정시킨다.

5. 보합 결합

전보합결합 용액과 흡착지를 비닐주머니에 넣고 약 10시간 정도 방치한 다음 전보합결합 용액을 제거한다. 전보합결합 용액 속에는 흡착지에 비특이적으로 소식자가 결합하는 것을 차단하기 위하여 Denhardt's reagent, BLOTTO, heparin, denatured salmonsperm DNA 등을 포함한다. 이후 방사능동위원소가 표지된 RNA 또는 DNA 소식자가 들어 있는 보합결합 용액을 주머니 속에 넣고 약 42℃에서 15-24시간 동안 보합결합을 시행한다. 흡착지를 꺼내어 2X SSC, 0.1% SDS 용액으로 세척하고 가이거 계수기로 대략적인 흡착지의 남아있는 방사능을 측정한다.

6. X-선 필름에 자가방사기록

증감지(intensifying screen)가 장착된 X-선 필름 카세트에 흡착지와 2장의 X-선 필름을 넣고 -70℃에서 자가방사기록(autoradiography)을 한다 12-24시간 뒤 필름 한 장을 암실에서 꺼내어 현상하고 감광 정도를 확인하고 적절한 감광 시간을 결정한다.

RNA 분해효소 보호분석법
(RNase protection assay, RPA)

RNA 분해효소(RNase)는 단일 나선으로 되어있는 RNA만을 소화시키고 다른 한 분자의 RNA 또는 DNA와 결합되어 있는 이중쇄를 이루고 있는 RNA는 소화시킬 수 없다. RPA는 이러한 원리를 이용하는데, 원하는 RNA 소식자를(riboprobe)를 지놈 DNA로부터 전사하여 만들어 세포로부터 추출된 RNA와 결합시킨 후, 결합에 참여하지 않은 부위의 단일쇄 RNA 소식자를 RNA 분해효소로 분해하고 남은 부위를 변성 폴리아크릴아마이드 겔상에서 분리함으로써 mRNA의 정량 및 구조 등을 파악하는 방법이다. 특히 이 방법은 어떠한 mRNA가 존재하는지 유무를 알고 정량적 분석을 시행하고자 할 때, 또는 어떤 유전자의 전사시작부위나 RNA 접합결합(splicing)부위 등을 알고자 할 때 이용되는 방법이다. 이러한 RPA의 장점은 mRNA의 검출에 있어서 노던 블롯팅에 비하여 5배 정도 예민하다. 즉, 흡착지에 전령 RNA를 옮겨서 소식자를 결합시키는 노던 블롯팅과 달리 시험관내에서 직접 소식자가 mRNA와 결합하기 때문에 결합이 더욱 잘 이루어지고 mRNA가 0.1pg만 들어 있어도 검출이 가능하다. 일반적인 노던 블롯팅에서는 DNA 소식자를 이용하지만 RPA에 있어서는 RNA 소식자를 이용하기 때문에 전령 RNA와의 결합이 더욱 강하고 특이적이어서 인공과오물(artifact)이 적게 생긴다. 또한 실험에 소요되는 시간이 노던 블롯팅에 비하여 짧게 걸려 보통 3-5일이면 원하는 mRNA의 정량을 위한 밴드를 자가방사기록 필름에서 관찰할 수 있다. 단점으로는 RNA 분해효소작용의 적절한 조건을 결정하는데 예비실험이 필요하여 시간이 많이 걸릴 수도 있다. 또한 폴리아크릴아마이드 겔을 이용하기 때문에 길이가 긴 소식자를 이용하기 어렵다. 또한 RPA 실험 자체가 RNase를 사용하기 때문에 실험실내에서 이로 인한 다른 RNA 시료와 용액, 기구들의 오염에 주의하여야 한다.

실험의 순서를 요약하면 다음과 같다(Fig. 6).

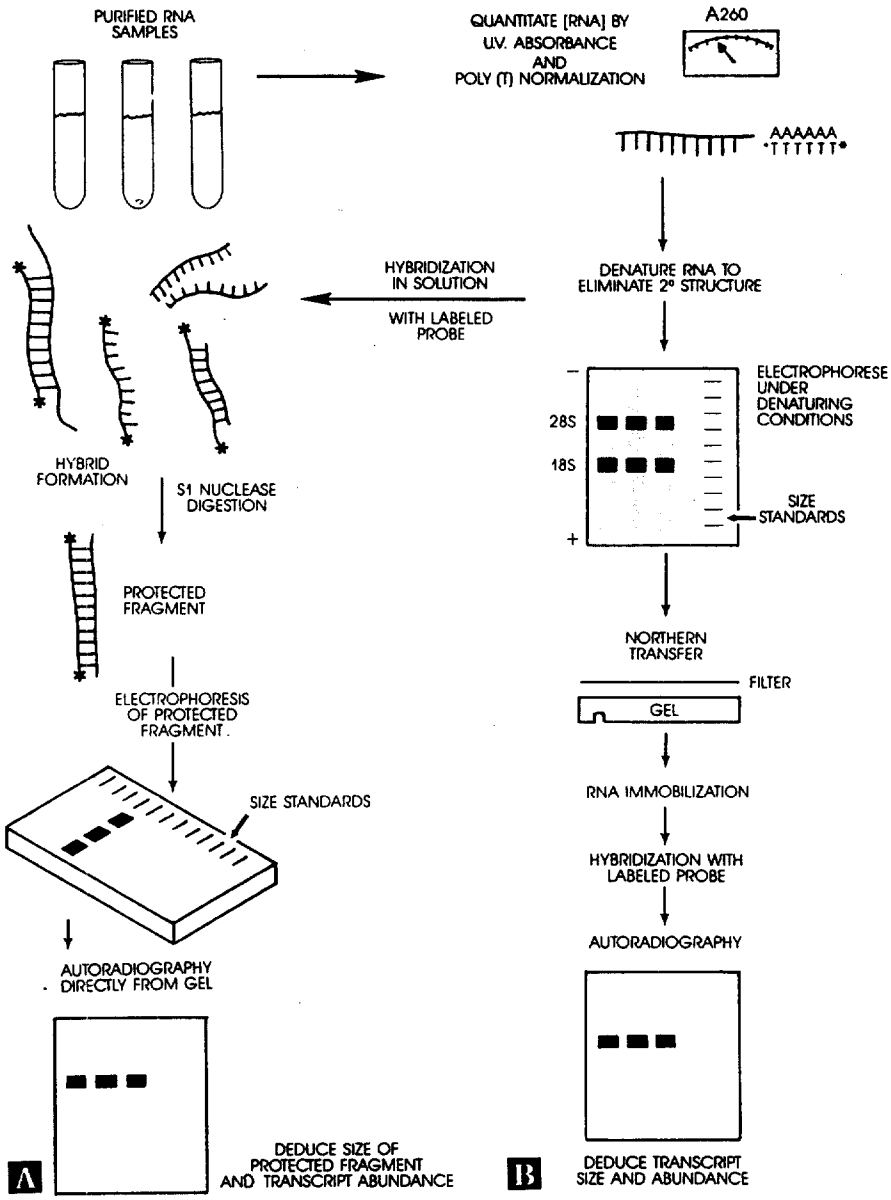


Fig. 6. 노던 블롯팅(*A. Northern blotting*)과 RNA 분해효소 보호 분석법(*B. RNase protection assay*)의 비교그림.

1. RNA 소식자 제조

관심 있는 유전자를 RNA 중합효소(RNA polymerase)가 결합할 수 있는 플라즈미드에 연결해야 하는데 현재 판매되는 많은 플라스미드 들이 T3, T7, SP6 등의 파아지 촉진자를 가지고 있으며 이들 중 적당한 것을 선택한다. 그리고 RNA 소식자 제조시 반드시 전령 RNA와 결합하지 않을 부위가 포함되도록 하여야만 후에 RNAase 에 의하여 이 부분이 소화되어 원래 소식자와 길이차이가 생겨서 알아볼 수 있게 된다. 이를 위하여 전사 시작할 부위의 상부 서열염기 50-100bp 정도 포함되고 mRNA와 동일한 서열이 150-250bp 정도 포함되도록 하는 것이 적당하다고 한다. 전체 소식자의 길이는 200-300base 정

도로 하고 RNA와 결합되는 부위는 이보다 약 50bp 적도록 하는 것이 좋다고 한다. RNA 소식자는 P^{32}-α-UTP(650-3,000Ci/ml)과 플라스미드를 이용한 방법으로 증폭된 원하는 유전자의 DNA 주형(template) 및 RNA 중합효소를 이용하여 제조한다. 이러한 방법으로 표지한 RNA 소식자는 폴리아크릴아마이드 겔에서 TBE 완충액을 이용하여 전기영동하고 겔로부터 소식자의 위치를 확인한 다음 RNA 소식자를 추출한다.

2. 보합결합 및 RNase 소화

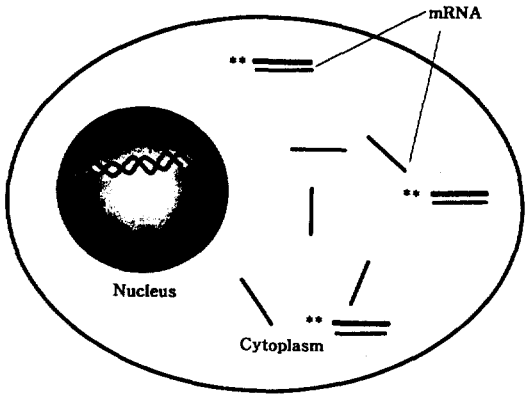
시료 RNA(1-20 μg)과 소식자용액(10^4-10^5cpm)을 미세원침튜브속에 혼합한 다음진공건조기에서 10-20분간 원침시킨다. 건조한 혼합물을 다시 보합결합 완충액에 녹이고 85-90℃ 수조에서 5분간 변성시켜 혼합한 후 미세원심분리기에서 수초간 원침한다. 다음 RNase 소화 완충액과 RNase를 첨가한 후 37℃ 수조에서 30-60분간 배양한다. 다음 proteinase K 소화용액을 첨가하고 혼합한 후 37℃에서 15분간 더 배양하여 RNase 활성도를 제거한다.

3. 보호분절의 확인

Phenol-isoamylalcohol-chloroform(24 : 1 : 24)을 첨가하여 진탕 혼합하고 원심분리한다. 다음 음성 대조군으로 yeast tRNA와 에탄올을 첨가하여 혼합하고 드라이아이스에 10분간 세워둔다. 다시 저온에서 원심분리기로 15분간 원침시키고 진공건조기에 건조한 다음 겔 부하 완충액에 녹인다. RNA를 변성시키기 위하여 65-85℃로 5분간 수조에서 가온한 뒤 얼음 위에서 빠르게 냉각시킨다. 5-6% 폴리아크릴아마이드/8M urea 겔에서 150-300V로 전기영동하고 겔 건조기에서 겔을 말린다. 건조된 겔은 X-선 필름 카세트 속에 X-선 필림을 사용하여 영하 70℃에서 1-7일간 노출시켜 감광 밴드를 확인한다.

인 싸이투 보합결합(In situ hybridization)

동위원소나 바이오틴(biotin) 등으로 표지된 어떤 유전자의 DNA 또는 RNA 소식자를 슬라이드 위에 고정시킨 세포나 조직의 세포질 속에 있는 mRNA에 직접 결합되도록 하여 세포내 그 유전자의 DNA가 존재하는지 유무나 mRNA의 발현정도를 직접 조사하는 방법이다. 관심 있는 세포나 조직의 절편을 만들어 슬라이드 위에 고정한 다음 표면활성제(detergent)가 들어있는 완충액으로 세포막을 파괴하고 적당한 완충액으로 전보합결합(prehybridization)을 시행한다. 다음 관심 있는 유전자의 DNA 중 일부를 이용하여 DNA 소식자를 만들거나 RNA 소식자(cRNA 또는 riboprobe)를 만들어 적당한 온도에서 12-16시간 정도 보합결합(hybridization)을 시행한다. 소식자를 표지하는 방법으로는 방사능동위원소를 이용하여 표지하는 방법과 바이오틴을 이용하는 방법이 있다. 이후 결합되지 않은 소식자들은 DNase나 RNase로 처리하여 제거시킨 후 슬라이드를 완충액으로 수회 세척하고 알코올로 고정하여 건조시킨다. 건조한 슬라이드 위에 결합되어 남아있는 소식자의 방사능을 검출하기 위하여 노던 블롯팅이나 RPA 때와는 달리 자가방사기록방법으로 X-선 필름대신 자가방사기록현탁액(autoradiography emulsion)을 사용한다. 즉 슬라이드를 암실에서 현탁액 속에 담갔다가 꺼내어 건조시킨 후 건조제가 들어있는 차광된 상자 속에 넣어 4℃에서 3-10일간 보관한다. 다음 미리 차게 해 둔 현상액, 고정액 및 물 속에 슬라이드를 차례로 담가서 현상한 다음, methylgreen 등으로 대조염색을 하여 조직의 형태를 구분할 수 있도록 하여 건조시키고 광학현미경(light microscope) 및 암시야현미경(dark field microscope) 하에서 관찰한다. 본 실험에서 관찰하고자 하는 RNA가 조직 내에서 파괴되지 않고 잘 보존되어 있어야만 좋은 결과를 얻을 수 있으므로 조직을 준비하는 과정이 매우 중요하다. 조직의 고정은 4% paraformaldehyde를 이용하여 고정하는 방법이 보편화되어있다. 조직을 적출즉시 냉동시켜 영하 80℃에 보관하였다가 냉동 절삭하여 슬라이드에 절편을 붙여서 고정액속에 널어 고정하는 방법과 생체에서 직접 관류고정(perfusion fixation)하고 냉동 보관하거나 곧이어 냉동 절삭하는 방법이 있다. 이때에는 인공과오물(aftifact)을 방지하기 위하여 20% sucrose/4% paraformaldehyde 용액속에 담가두는 과정을 시행한다. RNA를 관찰하는 경우는 RNase에 의한 RNA의 파괴를 막기 위하여 역시 전 과정에서 사용되는 모든 용액을 DEPC 처리한 탈이온수를 이용한다. 보합결합용액은 노던 블롯팅에서 이용하는 방법과 거의 유사하지만 전보합과정은 다른데 대부분 조직 속에 있는 paraformaldehyde를 세척해



** ——— : Labeled RNA or DNA probes
Paraformaldehyde fixation → Thin section slide → Prehybridization → Hybridization → Autoradiography

Fig. 7. 인싸이투 보합결합(In situ hybridization)의 개요.

내는 과정과 세포막을 파괴시키는 과정이다. 그리고 소식자를 만들 때 S^{35}를 이용하는데 P^{32}는 방사능이 너무 강해서 현미경 관찰시 신호가 퍼져서 보이기 때문이다. 따라서 RNA 소식자를 만들 때 S^{52}-UTP를 이용한다. DNA 소식자보다는 RNA 소식자가 mRNA와 더욱 강력하고 특이적인 결합을 할 수 있기 때문에 유전자발현 정도를 관찰하고자 할 때에는 RNA 소식자를 사용하는 것이 더 좋다. 또한 보합결합을 시행할 때에는 반드시 감각 소식자(sense probe)도 함께 만들어 시행해야 하는데 감각 소식자들에 의하여 나타나는 신호는 비특이적인 것이라고 할 수 있기 때문에 나중에 자기방사기록후 관찰되는 신호들이 특이적인 것인지 비특이적인 것인지 판정하는데 매우 중요하다.

실험의 순서를 요약하면 위와 같다(Fig. 7).

1. 조직의 관류고정

신장조직을 관류고정 할 경우 실험동물을 마취 하에서 복부를 절개하고 대동맥, 대정맥, 신정맥이 보이도록 한다. 이어 대동맥에 가느다란 튜브를 삽입하고 이 관을 통하여 paraformalde hide가 포함된 용액을 실험동물의 혈압과 같은 정도의 압력으로 관류고정한다. 관류된 조직은 적출하여 4% paraformaldehyde/20% sucrose 용액에 담가서 4℃에서 12-16시간 보관한다.

2. 전보합 결합

슬라이드를 꺼내어 PBS, Triton X-100에 차례로 담가 세척하고 proteinkinase K/Tris/ EDTA 용액에 담가 약 37℃에서 30분 정도 소화시킨다. 이후 다시 4% paraformaldehyde에 고정하고 PBS로 세척한다. 다음 acetic anhydride/triethanolamine에 약 10분간 담가 두었다가 조직 속에 들어있는 RNA 변성을 위하여 50% formamide/2XSSC에 담가 37℃ 수조에서 배양한다.

3. 보합결합

소식자 용액을 녹인 후 적절한 용량을 취하여 보합결합용액에 혼합하고 65℃ 수조에 10분 정도 배양하여 열변성 시킨다. 이 용액을 앞서 준비한 조직슬라이드 위에 떨구고 cover slip을 덮은 다음 수분이 증발되지 않도록 밀폐된 플라스틱 용기에 담아서 55-60℃ 오븐 속에서 12-16시간 보합결합을 시행한다.

4. 세 척

비특이적으로 결합한 소식자 및 기타 인공과오물을 제거하는 과정으로 4XSSC 용액속에 슬라이드를 담그고 cover slip이 저절로 분리되어 나가도록 한 다음 37℃에서 1시간 정도 조용히 흔들어서 슬라이드를 세척한다. 다음 특이적 결합을 하지 못한 RNA 소식자들을 제거하기 위하여 RNase 용액으로 적절한 소화 환경을 만들어 제거한다. 다시 2X SSC로 세척하고 슬라이드를 70% 에탄올/0.3M 암모니움아세테이트(ammonium acetate)에 5분, 95% 에탄올/0.3M 암모니움 아세테이트에 5분, 100% 에탄올/0.3M 암모니움아세테이트 용액에 차례로 넣어 탈수시킨다.

5. 자기방사기록

X-선 현탁액(Kodak NBT-2)를 43℃ 오븐에 넣어 1시간 이상 충분하게 녹인다. 암실에서 녹은 현탁액과 같은 양의 0.6M 암모니움아세테이트를 혼합하여 차광용기에 분주한 다음 4℃에 보관한다. 앞서 기술한 방법으로 준비한 조직 슬라이드는 이러한 혼합용액에 차례로 담가서 건조시키고 방습제가 든 슬라이드 통속에 넣고 차광시켜서 4℃ 냉장고에 3-10일간 방치한다. 다음 약 200ml 용량의 유리 염색용기를 4개 준비하여 얼음이 든 커다란 플라스틱 용기에

첫째 현상액(Kodak D-19를 증류수와 1 : 1로 희석한 것) 200ml, 둘째 2% acetic acid 용액 200ml, 셋째 및 네번째 용기에는 고정액을 넣고 온도 13-15℃를 유지한다. 암실에서 이 용액에 슬라이드를 첫째 용기 2.5분 둘째 용기 30초, 셋째와 넷째에 각각 2.5분씩 담갔다가 물을 담은 용기에서 세척하고 건조시킨다.

6. 대조 염색

자가방사기록된 신호와 조직의 형태를 서로 구분하기 위하여 methylgreen 용액에 10분간 슬라이드를 담갔다가 증류수로 여러 차례 흔들어 세척한다. 다음 70, 80, 95, 100% 에탄올에 차례로 1분 가량 담가서 탈수한다. 다음 100% 에탄올 및 xylene에 각각 1분씩 2회 담갔다가 histomount를 조직위에 떨어뜨리고 cover glass을 덮은 후 실온에서 건조시킨 후 검경한다.

참 고 문 헌

1) Robert EF, Jr : RNA methodologies-A laboratory guide for isolation and characterization Academic Press, U.S.A, 1997
2) Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD : Molecular biology of the cell Garlend Publishing, Inc. U.S.A, 1994