



간암특이항원의 특이성규명 및
응용을 위한 연구

Study on the Characterization of Human
Hepatoma-Associated Antigen and its Therapeutic Applications

1992. 3

한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

T
KRIBB
92-
38

GERI

제 출 문

한국과학기술연구원장 귀하
부설유전공학연구소장

본 보고서를 “간암특이항원의 특이성 규명 및 응용을 위한 연구”사업의 최종보고서로 제출합니다.

1992. 3

연구책임자 : 김승호(유전공학연구소 선임연구원)

연구 원 : 함경수(유전공학연구소 책임연구원)

김길룡(유전공학연구소 선임연구원)

강주현(유전공학연구소 Post doc)

윤미리(유전공학연구소 연구원)

박필련(유전공학연구소 연구원)

요 약 문

I. 제목

간암특이항원의 특이성 규명 및 응용을 위한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

인체에서 발생하는 종양을 치료하는 방법으로서 외과적절제, 약물요법 및 방사선 요법등이 널리 사용되고 있으나 특이성이 없으며 정상세포에도 독성을 미치는 단점을 가지고있다.

따라서 종양세포에 특이하게 나타나는 항원을 이용하거나 이에 대한 단일클론항체를 이용하여 암세포에 특이하게 작용하는 물질을 투여함으로써 암세포만 선택적으로 파괴할 수 있으면 위의 단점을 보완할 수 있을것이다. 또한 종양 특이항원에 대한 단일클론항체는 정상세포와 암세포와의 차이를 민감하게 감지하는데 이용될 수 있으며 암의 근원세포의 규명에도 이용될 수 있다.

현재 국내의 종양 발생중에서 가장 많이 차지하고있는 간암의 진단시약을 개발하여 신속한 간암 진단의 필요성을 요구하고 있다.

본 연구실에서는 사람의 간암세포 원형질막 표면단백질중 그의 양이 현저하게 증가되고 있는 단백질에 대한 연구가 계속 되어왔으며 또한 그 단백질의 단일클론항체가 만들어져있다. 따라서 확보된 단일클론항체를 이용하여 간암특이항원에 대한 cDNA클론을

분리하고 그의 염기서열을 결정하여 그 단백질의 생화학적 성질을 규명함으로써, 이를 이용한 간암진단 시약개발 및 간암이 진전되는 과정에서의 여러 현상을 연구하는데 커다란 도움이 될것으로 사료된다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 간암특이항원에 대한 cDNA을 분리하기 위해 다음과 같은 내용의 연구를 수행하였다.

- 1) messenger RNA의 분리

사람의 간암조직을 채취한후 즉시 dry ice bath에서 냉동시키고 그로부터 guanidine/hot phenol방법으로 total RNA를 분리하였다. oligo dT cellulose column을 이용해서 mRNA를 정제하였다.

- 2) cDNA합성

순수 분리된 mRNA를 template로 하여 random primer, deoxyNTPs 그리고 reverse transcriptase를 사용해 첫번째 가닥 cDNA를 합성했다. 두번째 가닥 cDNA는 위의 반응 혼합물에 *E. coli* DNA polymerase I을 반응시켜 cDNA합성을 완료했다. 합성한 cDNA양끝에 EcoRI adaptor를 붙여 λ gt11 vector에 연결하고 이것을 Promega제품의 packgene을 이용

해 *in vivo* packaging한후 *E. coli* Y1090에 감염시켜 cDNA library를 만들었다.

3) λ gt11 library의 선별

E. coli Y1090을 0.2% maltose를 포함한 LB배지에서 12시간동안 배양한 후 200 μ l의 *E. coli* Y1090에 100 μ l의 phage를 첨가하여 37°C에서 20분간 흡착시킨후 3ml의 top agar와 섞어 plate에 깔았다. 42°C에서 3시간 30분간 배양한후 10mM IPTG로 포화된 nitrocellulose filter를 덮고 37°C에서 4시간동안 배양해서 cDNA의 유전자가 발현되도록 하였다. Nitrocellulose filter를 걷어낸후 이미 만들어진 monoclonal antibody를 이용해서 immunoscreening을 하였다.

2. 분리한 cDNA의 염기서열을 알기 위해서 Sanger등이 개발한 방법으로 반응시킨후, urea-6% polyacrylamide gel에 전기 영동하여 그의 염기서열을 확인하였다.
3. 간암특이항원을 코딩하는 염기서열이 또 다른 간암조직의 경우에서 얻은 것과 일치하는지 알기 위해 RNA를 template로 하여 polymerase chain reaction(PCR)을 하여 그 부위만을 증폭시킨 후 M13mp 19에 각 조각을 subcloning하여 염기서열을 결정하였다.

IV. 연구개발의 결과 및 활용에 대한 건의

간암특이항원 단백질을 코딩하는 cDNA 유전자를 분리하여 그의 염기서열을 결정한 결과 간암특이항원 단백질은 human serum albumin임을 알게되었다. 하지만 현재 보고된 human serum albumin의 염기서열과 완전히 동일하지 않고 6개의 염기서열에 변화가 있었으며 그중 한 염기의 경우는 아미노산 서열에까지 변화를 유발시켰다. 따라서 간암조직 9케이스와 metastasis된 간조직 1케이스에 대한 RNA-PCR실험을 통해 변화된 아미노산 주위의 DNA 염기서열을 알아본 결과 10가지 경우 모두 변화된 아미노산을 코딩하는 DNA 염기서열을 갖고 있음을 알았다. 현재 이 결과들을 토대로 이런 변화가 간암에 특이하게 나타나는 것인지, 만일 그렇다면 이 변화를 간암진단에 응용할 수 있을 것인지에 대한 연구가 진행중이다.

Summary

I. Title of Research

Study on the characterization of human hepatoma-associated antigen and its therapeutic applications

II. Objectives and Importance of Research

The major problems in cancer therapy using chemicals or radiation rather than using surgical removal of tumor mass are the nonspecificity of methods and the toxicity of methods to normal cells as well as to tumor cells.

To solve these problems, monoclonal antibodies against tumor-specific antigens can be developed in an attempt to make a substance that can specifically destroy cancer cells. Also these monoclonal antibodies against tumor-specific antigens will be useful in identifying cancer cells from normal cells and in diagnosing the origin of cancers.

Since hepatoma has outnumbered the other cancers in Korea, a diagnostic tool for hepatoma must be developed in near future.

We identified a plasma membrane surface protein(66KD) whose amount was increased during human hepatocarcinogenesis, and

developed the monoclonal antibodies against this protein

In this study the cDNA clones of the human hepatoma - associated antigen were screened using our monoclonal antibodies and sequenced in order to identify the biochemical properties of this hepatoma - associated protein. This study would be helpful in developing a diagnostic tool for hepatoma and in studying various processes in human hepatocarcinogenesis.

III. Scope and Content of Research

1. The following experiments were carried out in order to isolate the cDNA clones of human hepatoma - associated antigen.

- 1) Isolation of messenger RNA

Total RNA was isolated by guanidine/hot phenol method from human hepatoma tissue frozen in dry ice bath. Messenger RNA was separated using oligo(dT) cellulose column.

- 2) Synthesis and subcloning of cDNA

The first strand cDNA was synthesized from mRNA template by random primer, deoxyNTPs and reverse transcriptase. The second strand cDNA was synthesized by adding *E. coli* DNA polymerase I to reaction mixture and EcoRI adaptors were added to both ends of cDNA and this cDNA was subcloned

into λ gt11 vector. Using packgene(from Promega), this cDNA was packed *in vivo* and infected into *E. coli* Y1090 to construct cDNA library.

3) Selection of λ gt11 library

After 200 μ l of *E. coli* Y1090 was incubated in LB broth plus 0.2% maltose at 37°C for 12 hours, 100 μ l of λ gt11 phage was added and adsorption of phage to *E. coli* was allowed at 37°C for 20 minutes. 3ml of LB top agar was added to the culture, plated, and incubated at 42°C for 3.5 hours. Each plate was overlaid with a dry nitrocellulose filter previously saturated in 10mM IPTG, and incubated at 37°C for 4 hours to express products from the cDNA library. The filters were removed and immunoscreened using our monoclonal antibodies.

2. To determine the nucleotide sequence from positive cDNA clones sequencing reaction described by Sanger et. al. was performed and resolved by electrophoresis on urea - 6% polyacrylamide gel.
3. RNA-PCR(polymerase chain reaction)was carried out in order to compare the nucleotide sequence of the cDNA of hepatoma - associated antigen from different hepatoma tissues with that of our cDNA clone for hepatoma - associated antigen. PCR products were subcloned into M13mp19 and sequenced.

CONTENTS

Chapter I. Introduction	15
Chapter II. Materials and Methods	17
(1) Materials	17
(2) Methods	17
1. Isolation of mRNA from human hepatoma tissue	17
2. Synthesis of cDNA and subcloning into λ gt11 vector	19
3. Immunoscreening of λ gt11 library	21
4. DNA sequencing reaction	22
5. RNA-polymerase chain reaction	22
Chapter III. Results and Discussion	25
(1) Isolation of cDNA clone for hepatoma-associated antigen ...	25
(2) Restriction map and sequencing strategy	25
(3) DNA sequencing reaction of RNA-PCR products	29
Chapter IV. Conclusion	32
Chapter V. Summary	33
References	34

목 차

제 1 장 서론	15
제 2 장 실험재료 및 방법	17
제 1 절 실험재료	17
제 2 절 실험방법	17
1. messenger RNA의 분리	17
2. cDNA의 합성과 클로닝	19
3. λ gt 11 Library의 선별	21
4. DNA염기서열의 결정	22
5. RNA-polymerase chain reaction	22
제 3 장 실험결과 및 고찰	25
제 1 절 간암특이항원을 코딩하는 cDNA분리	25
제 2 절 분리한 cDNA의 제한효소 지도 및 염기서열	25
제 3 절 RNA-PCR을 이용한 염기서열결정	29
제 4 장 결론	32
제 5 장 요약	33
참고문헌	34

제 1 장 서 론

인체에서 발생하는 종양치료에 외과적 절제방법 이외에 방사선요법이나 약물을 이용하는 화학요법등이 현재 많이 이용되고 있으나 이 방법들은 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 독성을 미친다는 큰 문제점이 있다. 따라서 암세포에만 특이하게 작용할 수 있는 종양치료 방법이 개발되면 가장 이상적이겠기에 이 분야에 관한 연구가 많이 진행되고 있으나 아직 이와 같은 방법은 개발되지 않은 실정이다.^(1,2)

암세포는 정상세포와 다른 성질을 갖고 있으며, 따라서 속주로 하여금 이물질로 인식될 수 있다는 것이 일찌기 보고된 이래⁽³⁾, 정상세포가 암세포로 변형되는 과정에서 나타나는 여러 생화학적 변화에 대해 많은 연구가 진행되고 있다. 즉 종양특이항원(tumor specific antigen)이라는 새로운 단백질이 종양세포로의 변환과정에서 나타나며⁽⁴⁻⁹⁾, 또한 간장암의 경우, carcinogen - binding protein⁽¹⁰⁾, glutathione - S - transferase⁽¹⁰⁻¹²⁾, DT - diaphorase⁽¹¹⁻¹³⁾, aldehyde - NAD(P) oxidoreductase⁽¹⁴⁾ 및 p21과 p26⁽¹⁵⁾등의 단백질에 있어서 변화가 나타난다고 보고된 바 있다. 특히 glutathione - S - transferase나 p21과 같은 단백질이 2 - acetylamino - fluorene(2-AAF), diethylnitrosamine(DENA)과 같은 화학발암제에 의해 유발된 간장암 세포의 세포질에 공통적으로 나타난다고 보고된 바⁽¹⁶⁾있으나, 세포막 표면의 경우에는 아직 공통항원의 존재가 명확히 밝혀진

바가 없다. 한편 최근 본 연구실의 연구결과에 의하면 2-AAF, 3'-Me DAB 및 DENA 등 종류가 다른 화학발암제에 의해 유발된 백서의 간장암세포의 원형질막 표면에 공통항원의 존재가 시사된 바 있고⁽¹⁷⁾ 이 항원의 중요성때문에 이에 대한 단일클론 항체생산에 성공하여⁽¹⁸⁾ 그 항체가 많은 양 확보되어 있는 상태이다.

따라서 본 연구에서는 이미 확보되어있는 단일클론 항체를 이용해 λ gt11에 만들어져 있는 사람의 간암 cDNA library를 스크리닝하여 간암특이항원에 대한 cDNA를 분리하고 그의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 이미 보고되어 있는 여러 다른 단백질의 염기서열과 비교하여 간암특이항원의 성질을 밝히고 나아가서는 얻어진 염기서열의 변화가 여러 다른 간암의 경우에서도 나타나는지를 살펴봄으로써 이와같은 염기서열의 변화와 간암과의 상관관계 및 이를 이용한 간암진단시약 개발의 가능성을 알아보고자 하였다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험재료

사람의 간암조직을 연세대학교 부속 세브란스병원, 서울대학병원 및 전남대 의대 병원에 입원한 간암환자로 부터 분리한 조직을 얻어서 사용하였다. cDNA library는 Promega사에서 구입한 λ gt11 *in vitro* Packaging system을 사용하였으며 DNA절편을 얻기위한 제한효소는 New England Biolabs사 또는 제철화학에서 구입해서 사용하였다.

DNA염기서열을 결정하기 위해 Strategene사에서 Sequenase version II system을 구입하여 사용하였고 RNA-PCR은 Perkin Elmer Cetus사의 GeneAmp[®] RNA PCR kit를 이용하여 수행하였다. 실험에 사용한 기타 시약들은 Sigma사의 molecular biology grade제품들을 구입하여 사용하였다.

제 2 절 실험방법

1. Messenger RNA의 분리

간암조직에서의 messenger RNA의 분리는 암에 유발된 간조직을 채취 즉시 dry ice bath에서 냉동시키고 -70°C 에서 보관한 간암조직으로부터 guanidine/hot phenol방법에 따라 RNA를 분리하였다.

간암조직 1g에 20ml의 lysis 완충액(4M guanidine thiocyanate, 25mM EDTA, 2% Sarkosyl, 1% β -mercaptoethanol, 50mM Tris-HCl, pH 7.4)으로 균질화하고, 이 균질액을 60°C에서 25G 주사기를 이용하여 4회 반복 흡입, 배출하여 염색체 DNA를 파쇄시켰다. 이와같이 하여 얻은 파쇄액에 60°C phenol 20ml를 첨가하고 25G 주사기로 4회 반복하여 흡입, 배출한후 10ml의 A완충액(1mM EDTA, 0.1M sodium acetate, 10mM Tris-HCl, pH 7.4)과 20ml의 chloroform을 가하고 60°C에서 15분간 중탕하였다. 시료용액을 ice bath에서 10분간 냉각시킨후 7,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하고, 동량의 phenol과 chloroform 혼합액(1:1, v/v)을 첨가하여 잘 섞은 후 원심분리하여 상층액을 취하였으며, 다시 chloroform만으로 같은 방법에 의해 추출하였다. 이 용액에 용적의 2배가 되는 absolute ethanol을 가하고 잘 섞은 후 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 침전물을 5ml의 B완충액(50mM NaCl, 10mM EDTA, 0.2% SDS, 0.1M Tris, pH 7.4)에 용해시키고, proteinase K를 200 μ g/ml의 최종농도가 되도록 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액에 phenol과 chloroform 1:1(v/v) 혼합액 5ml를 첨가하여 수용액 층을 분리하고 다시 chloroform으로 추출하였다.

이와같이 하여 얻어진 수용액층에 LiCl과 SDS를 각각 0.5M 및 0.5% 되게 가하고 oligo(dT) cellulose column을 이용하여 mRNA를 정제하였다. oligo(dT) cellulose column의 washing 완충액은 1mM EDTA, 0.5% SDS, 10mM Tris-HCl 완충액, pH 7.4를 사용하였으

며, binding 완충액은 washing 완충액에 0.5M LiCl을 첨가하여 사용하였다. Column에 결합된 mRNA는 1mM EDTA, 0.05% SDS, 10mM Tris-HCl 완충액, pH 7.4로 유출시켰다. mRNA의 정량은 260nm에서의 흡광도를 이용하여 측정하였으며 ethanol로 침전시켜 1 μ g/ μ l의 농도가 되도록 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA)에 용해시켜 사용하였다.

2. cDNA의 합성과 클로닝

Gubler와 Hoffman⁽¹⁹⁾의 방법을 일부 수정하여 λ gt11 cDNA cloning vector에 연결하여 library를 제조하였으며 전체적인 cDNA 합성전략은 Fig.1에 표시하였다.

순수분리한 mRNA(5 μ g)를 1mM CH₃HgOH로 상온에서 15분간 처리하고 1M dithiothreitol로서 와해된 구조를 유지시켜 cDNA 합성이 용이하도록 하였다. 첫번째 가닥 cDNA는 50mM Tris-HCl 완충액, pH 8.3, 10mM MgCl₂, 10mM DTT (dithiothreitol), 100mM KCl, 1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 1mM TTP, 10 μ Ci(α -³²P)dATP, 100 μ l/ml random primer, 40U RNasin, 50U AMV reverse transcriptase, 5 μ g mRNA가 들어있는 반응액 50 μ l를 37 $^{\circ}$ C에서 15분, 42 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시켜 합성하였다. 이때 random primer는 calf thymus DNA를 micrococcal nuclease로 분해하여 얻은 6bp oligonucleotide를 순수분리하여 사용하였다.⁽²⁰⁾

두번째 가닥 cDNA는 50 μ l의 첫번째 가닥 합성용액, 25mM Tris-HCl 완충액, pH 7.4, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, 5mM DTT, 250

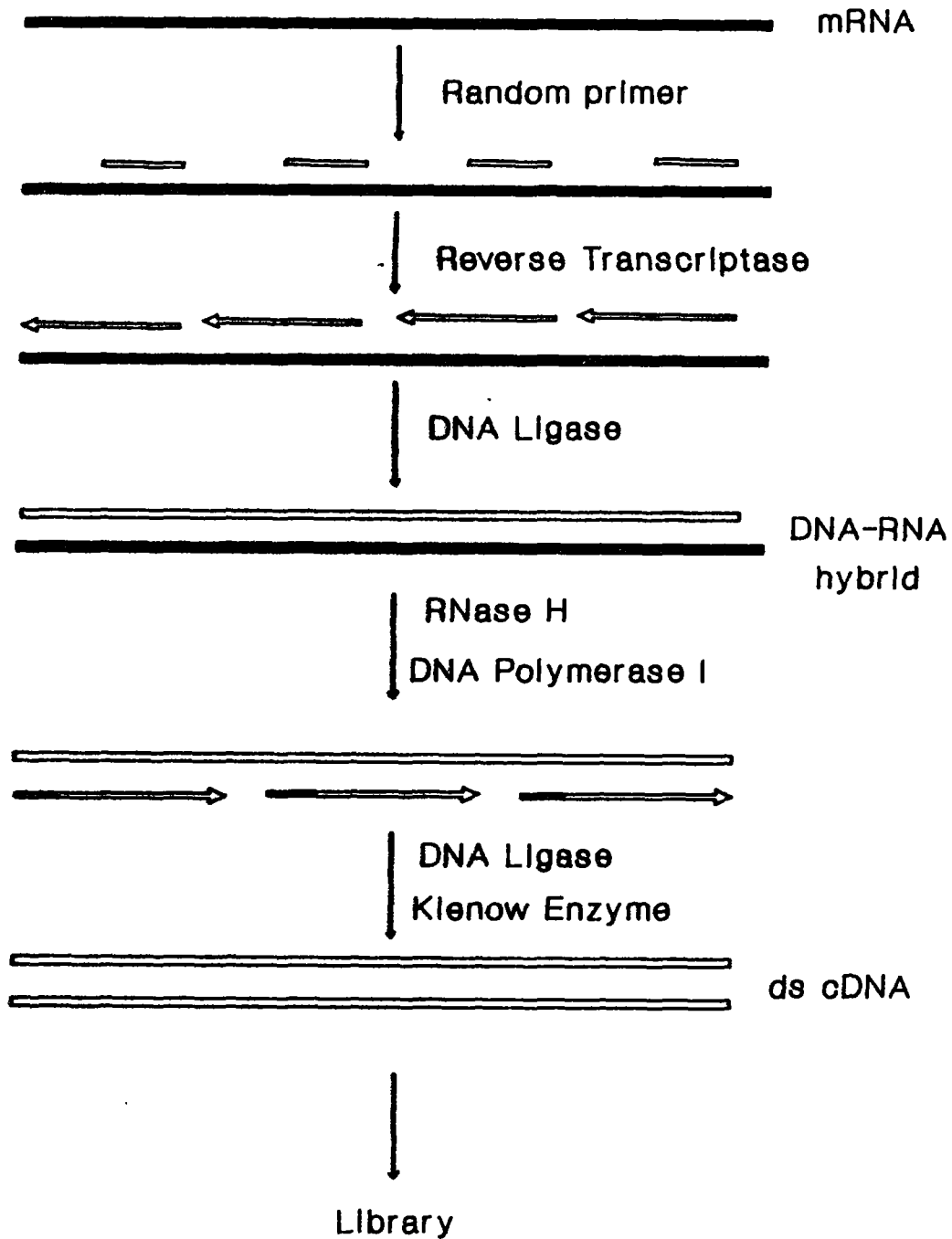


Fig.1. Schematic diagram of cDNA synthesis from human hepatoma mRNA

μM dNTP, $10\mu\text{Ci}(\alpha\text{-}^{32}\text{p})\text{dAT}$, 4U RNasin, 100U *E. coli* DNA polymerase I 을 첨가한 $400\mu\text{l}$ 의 반응액을 16°C 에서 2시간, 22°C 에서 30분간 반응시켰다. 이 반응용액을 phenol과 chloroform으로 추출한 후 Sephadex G-100 gel filtration chromatography로 미반응 mononucleotide와 random primer를 분리하여 2중 가닥의 cDNA를 얻어 ethanol로 침전시켰다.

2중가닥 cDNA에 EcoRI adaptor를 직접 연결함으로써 EcoRI methylation과 digestion을 피했으며, Sephadex G-100 gel filtration chromatography로 미반응 EcoRI adaptor를 제거하였다.

EcoRI sticky end를 가진 2중 가닥 cDNA를 $\lambda\text{gt} 11$ vector와 연결하기 위하여 약 1:20의 mass 비율로 수행하였으며,⁽²¹⁾ $\lambda\text{gt} 11$ 에 연결한 cDNA를 Promega사의 Packgene을 이용하여 *in vivo* packaging 한후 *E. coli* Y1090에 감염시켜 cDNA library를 조성하였다.

3. $\lambda\text{gt} 11$ Library의 선별

조성된 cDNA library로 부터 간암과 관련되어 특이하게 발현되는 표면항원에 대한 cDNA clone을 분리하기 위하여 간암세포 원형질막 표면항원에 대한 항체를 이용하여 다음과 같이 cDNA clone을 선별하였다.

E. coli Y1090을 0.2% maltose를 포함한 LB 배지에서 12시간 동안 배양한후 $200\mu\text{l}$ 의 *E. coli* Y1090에 $100\mu\text{l}$ 의 phage (5×10^4 pfu)를 첨가하여 37°C 에 20분간 흡착시킨후 85 mm plate에 3ml top agar와 함께 깔았다. 42°C 에서 3시간 30분동안 배양한 후 10mM

IPTG로 포화된 nitrocellulose paper를 덮고 37°C에서 4시간동안 배양하여 cDNA의 유전자가 발현되도록 하였다. Nitrocellulose paper를 걷어낸 후 western blotting과 같은 방법에 의하여 간암표면항원에 대한 cDNA clone을 선별하였다.

4. DNA 염기서열의 결정⁽²²⁾

DNA의 염기서열을 알고자 하는 부위를 적당한 제한효소로 처리한후 각 조각을 M13mp18과 mp19 RF DNA에 연결시켜 *E. coli* JM 103에 transfection시켰다. Transfection시켜 얻은 single plaque을 키워서 single stranded DNA를 sequencing reaction의 template DNA로 사용하였다.

분리한 single stranded DNA 1 μ g과 primer 그리고 reaction buffer를 넣고 섞은 후 68°C에서 3분간 denaturation한 후 서서히 온도를 내리면서 annealing하였다. Annealing된 mixture에 α -³⁵S-dATP와 labeling mixture 그리고 sequenase를 넣어 상온에서 5분간 방치하여 labeling reaction이 진행되도록 하였다. 그리고 4가지 termination mixture와 섞어 37°C에서 5분간 반응시킨 후 reaction stop solution을 넣어 반응이 끝나도록 하였다. Reaction mixture는 6% urea polyacrylamide gel에 loading하여 1600V, 40mA에서 전기영동한 후 그의 autoradiogram을 읽었다.

5. RNA-polymerase chain reaction

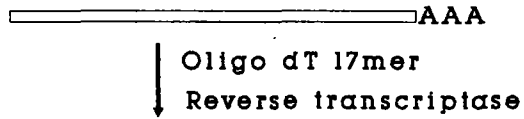
간조직 0.2g을 채취한후 가위로 잘게 썬후 2ml의 용액(4M

guanidium thiocyanate, 25mM Na citrate, 0.5% sodium sacrocin, 0.72% β -mercaptoethanol)을 넣고 homogenize하였다. 25게이지 주사바늘로 여러번 통과시킨 후 2M Na acetate(pH 4.0)를 250 μ l, water-saturated phenol을 2ml, 그리고 400 μ l의 chloroform과 isoamyl alcohol (49 : 1) 용액을 넣고 20초간 혼든후 얼음에 20분 방치하였다. 10,000rpm에서 20분간 원심분리하여 물층만을 새 튜브에 옮기고 2배의 에탄올과 섞어 얼음에 방치하였다. 원심분리하여 pellet을 얻고 70% 에탄올로 닦아주고 pellet은 공기중에서 말렸다. 말린 pellet을 Eppendorf tube로 옮겨 에탄올을 이용한 침전을 다시 시킨 후 260과 280nm에서의 absorbance를 측정하였다. 분리한 total RNA 1.5 μ g을 template로 하여 reverse transcriptase를 이용해 42 $^{\circ}$ C에서 20분간 first strand cDNA를 만들었다. 99 $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturation시킨 후에 Taq DNA polymerase와 sense 그리고 antisense primer를 25pmole씩어서 25cycle(95 $^{\circ}$ C for 1min, 55 $^{\circ}$ C for 2min, 72 $^{\circ}$ C for 3min)의 polymerase chain reaction을 한후 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 extension반응을 하였다.

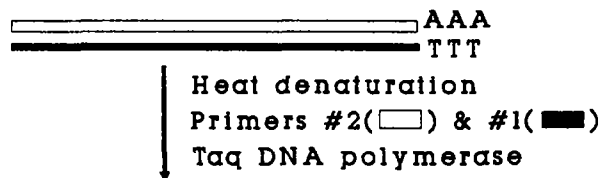
PCR product는 8% polyacrylamide gel에서 확인하였다. 자세한 RNA-PCR방법은 Fig. 2에 나타냈다.

- sense primer 5'GGGTTCACAGTTGAGG^{3'}-OH
- antisense primer 5'CACGGCGACGTCTAGGAG^{3'}-OH

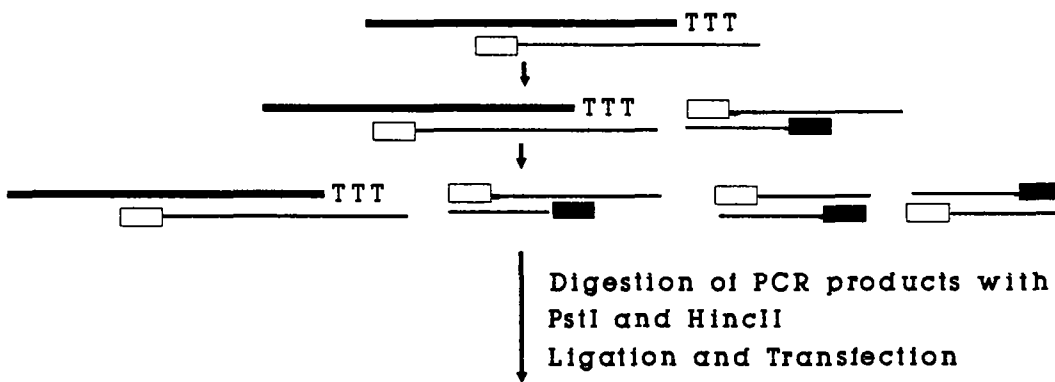
STEP 1. mRNA



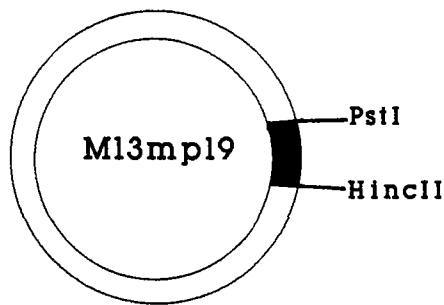
STEP 2. mRNA-cDNA Hybrid



STEP 3. PCR(25 CYCLES)



STEP 4. Subcloning of PCR products in M13 mp19



STEP 5. Sequencing reaction

Fig.2. Schematic representation of RNA-PCR and sequencing reaction

제 3 장 실험결과 및 고찰

제 1 절 간암특이항원을 코딩하는 cDNA 분리

약 8×10^4 개의 λ gt11 phage를 immunoscreening한 결과, 1개의 positive clone을 얻었고 2차, 3차 선별작업을 통해 뚜렷한 반응성을 보이는 plaque를 분리하였다(Fig.3). 1L LB broth에서 분리한 recombinant λ phage를 다량 배양한 후 10% polyethylene glycol 8000을 처리하고 CsCl gradient ultracentrifugation하여 λ phage particle만 순수하게 얻었다. 그로부터 λ DNA만을 순수하게 분리하여 EcoRI으로 처리한 결과 1.6 kb의 cDNA조각을 가지고 있음을 알았다(Fig.4A).

제 2 절 분리한 cDNA의 제한효소 지도 및 그의 염기서열

1.6 kb cDNA 조각내에 어떤 종류의 제한효소 부위가 위치하는지 알기위해 여러종류의 제한효소로 처리하여 그의 양상을 5% polyacrylamide gel에서 살펴보았다(Fig.4B). 그의 결과를 토대로 유전자 지도를 작성하였다(Fig.5). 분리한 cDNA가 어떤 유전자를 코딩하는지 알아보기 위해 그의 염기서열을 Sanger method로 결정하였다. Fig.3의 제한효소지도에 나타나있는 화살표는 염기서열을 결정

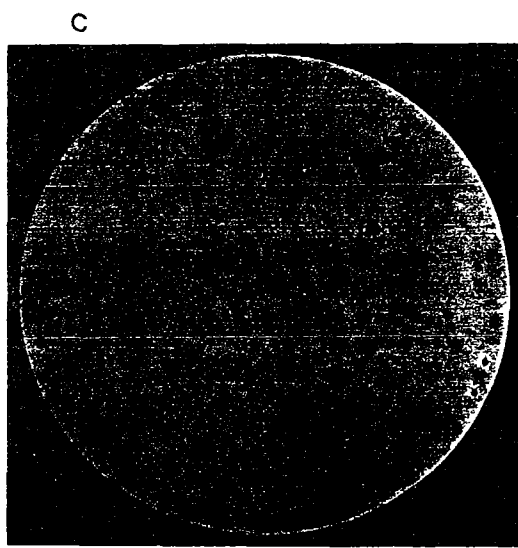
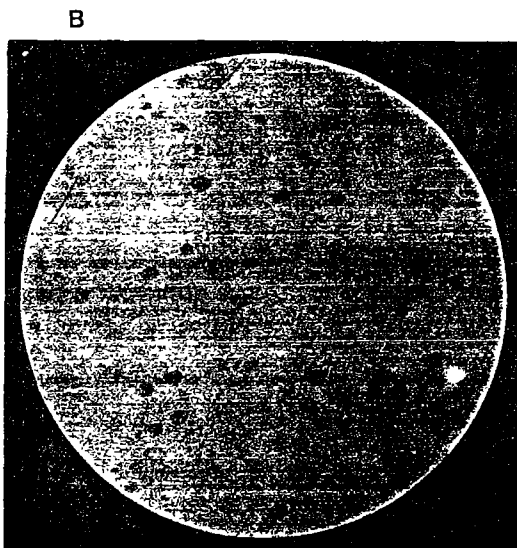
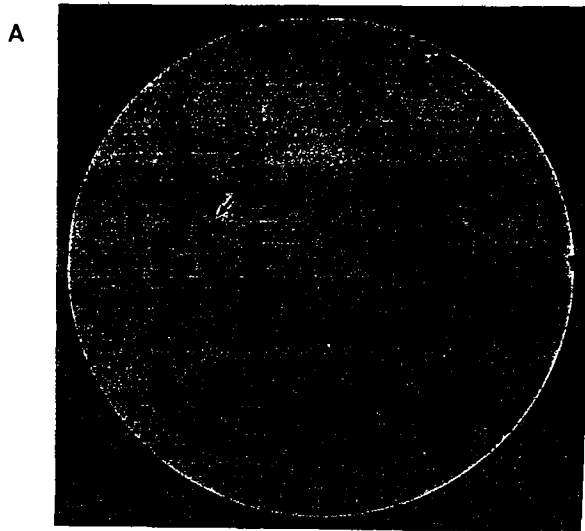


Fig.3. Immunoscreening of human hepatoma cDNA library
A : Primary B : secondary C : tertiary screening

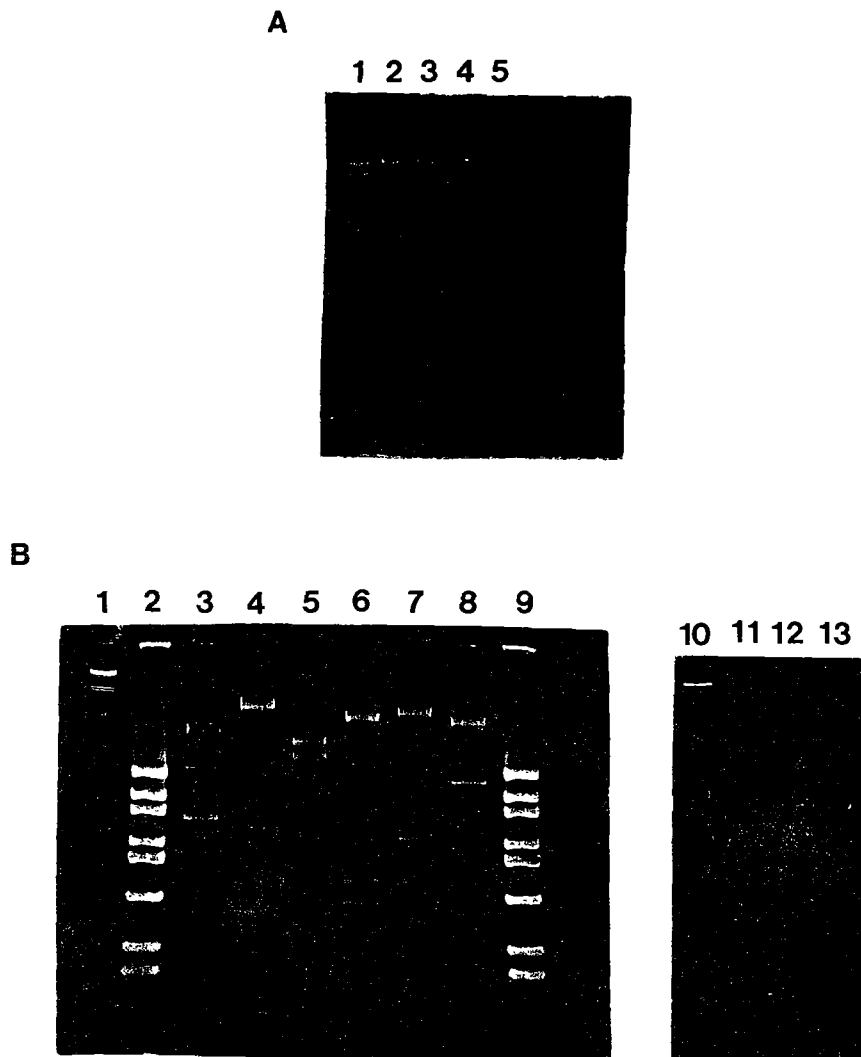


Fig.4. Isolation of recombinant λ gt11 DNA of one positive clone(A) and treatment with various restriction endonuclease(B).

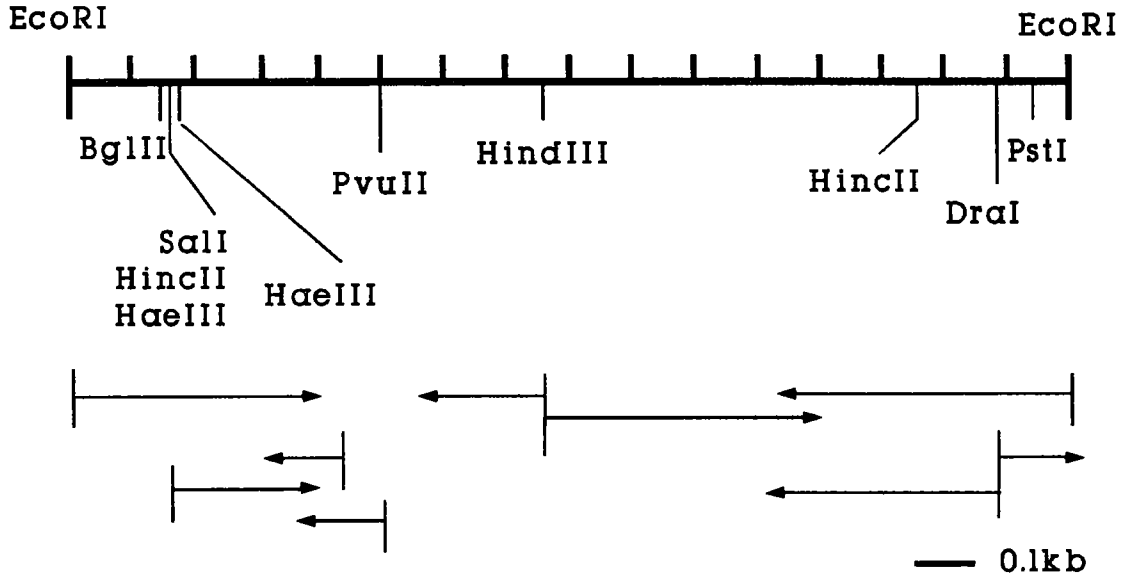


Fig.5. Restriction map and nucleotide sequencing strategy.

하기 위해 subcloning한 전략을 나타내고 있다. DNA 염기서열을 이제 까지 발표되어있는 여러 단백질의 것과 비교한 결과 이 cDNA clone은 human serum albumin의 partial clone이고 946개의 염기서열을 분석한 결과 6개의 염기가 변하였다(Fig.6.□). 변화된 6개의 염기 서열중에서 아미노산 서열까지 영향을 미친것은 exon 10에 위치한 396번째의 아미노산인 Lysine이었다(AAG, Lys→GAG, Glu Fig. 6.*□).

제 3 절 RNA-PCR을 이용한 염기서열 결정

서울대 의대 병원에서 얻어온 간암조직 8케이스와 전남대 의대 병원에서 얻어온 간암조직 2케이스(metastasis, hepatoma)로부터 RNA를 분리하여 sense와 antisense oligonucleotide를 primer로 사용하여 PCR해서 181bp 크기의 DNA조각이 만들어졌다.

PCR 반응물을 8% polyacrylamide gel상에서 보면 Fig.7과 같다. 이렇게 증폭된 181bp DNA조각을 Hinc II와 Pst I으로 처리한 후 mp19에 subcloning하여 DNA염기서열을 분석한 결과 처음의 경우와 동일하게 Lysine이 Glutamate로 변한 결과로 나타났다.

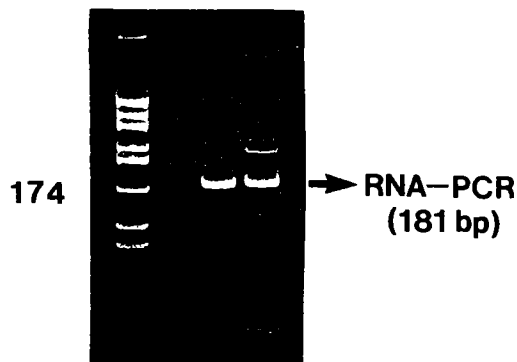


Fig.7. 8% polyacrylamide gel of RNA-PCR products

1122	CAT	CCT	GAT	TAC	TCT	GTC	GTG	CTG	CTG	CTG	AGA	CTT	GCC	AAG	1164
338	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	351
1165	ACA	TAT	GAA	ACC	ACT	CTA	GAG	AAG	TGC	<u>TGT</u>	<u>GCC</u>	<u>GCT</u>	<u>GCA</u>	<u>GAT</u>	1206
352	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	365
1207	<u>CCT</u>	<u>CAT</u>	GAA	TGC	TAT	GCC	AAA	GTG	TTC	GAT	GAA	TTT	AAA	CCT	1248
366	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	379
1249	CTT	GTG	GAA	GAG	CCT	CAG	AAT	TTA	ATC	AAA	CAA	<u>AAT</u>	<u>TGT</u>	GAA	1290
380	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	393
1291	CTT	TTT	<u>GAG</u>	CAG	CTT	GGA	GAG	<u>TAT</u>	AAA	TTC	CAG	AAT	GCG	CTA	1332
394	Leu	Phe	<u>Glu</u>	Gln	Leu	Gly	Glu	<u>Tyr</u>	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	407
			<u>A</u>					<u>C</u>							
			<u>Lys</u>												
1333	TTA	GTT	CGT	TAC	ACC	AAG	AAA	GTA	<u>CCC</u>	<u>CAA</u>	<u>GTG</u>	<u>TCA</u>	<u>ACT</u>	<u>CCA</u>	1374
408	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	421
1375	ACT	CTT	GTA	GAG	GTC	TCA	AGA	AAC	CTA	GGA	AAA	GTG	GGC	AGC	1416
422	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	435
1417	AAA	TGT	TGT	AAA	CAT	CCT	GAA	GCA	AAA	AGA	ATG	CCC	TGT	GCA	1458
436	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	449
1459	GAA	GAC	TAT	CTA	TCC	GTG	GTC	CTG	AAC	CAG	TTA	TGT	GTG	TTG	1500
450	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	463
1501	CAT	GAG	AAA	ACG	CCA	GTA	AGT	GAC	AGA	GTC	<u>ACC</u>	AAA	TGC	TGC	1542
464	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	477
											<u>A</u>				
1543	ACA	<u>GAA</u>	TCC	TTG	GTG	AAC	AGG	CGA	CCA	TGC	TTT	TCA	GCT	CTG	1584
478	Thr	<u>Glu</u>	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	491
		<u>G</u>													

1585	GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA	1626
492	Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu	505
1627	ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG	1668
506	Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys	519
1669	GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTT GTG	1710
520	Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val	533
1711	AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT	1752
534	Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val	547
1753	ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT	1794
548	Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala	561
1795	GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT	1836
562	Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu	575
1837	GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA CAT CAC ATT	1878
576	Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu TER	585
1879	TAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAAAAGC	1933
1934	TTATTCATCTGTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAGCCAACACCCCTGTCTAAAAAA	1988
1989	CATAAATTTCTTTAATCAAAAAGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAA	2043
2044	TGGAAGAATCT(A) ₁₃	2068

Fig.6. Comparison of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of the published human serum albumin cDNA and the cloned cDNA

제 4 장 결 론

사람의 간암조직의 원형질막 표면단백질 중 정상인 간조직에 비해 그의 양이 현저히 증가하는 66KDa 크기의 단백질(간암특이항원)을 코딩하는 cDNA를 분리하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 사람 간암조직의 cDNA library 8×10^4 개를 간암특이항원에 대한 단일 클론 항체로 immunoscreening한 결과, 1개의 positive clone을 얻었으며 그의 insert DNA의 크기는 1.6kb였다.
2. 분리한 cDNA의 염기분석결과 1.6kb중 약 950bp가 human serum albumin을 코딩하는 유전자였고 나머지 부분은 nonfunctional gene이었다. human serum albumin을 코딩하는 유전자 946bp중에서 6개의 염기서열에 변화가 있었고 그중 하나의 염기서열 변화는 아미노산서열의 변화까지 유발시켰다(Lys, AAG→Glu, GAG).
3. 간암조직 9케이스와 metastasis된 간조직 1케이스로부터 RNA-PCR하여 변화된 아미노산 주위의 DNA염기서열을 알아본 결과 모든 경우에서 Glutamate에 대한 염기서열을 갖고 있음을 알았다.

제 5 장 요약

간암이 유발되면서 세포막 표면단백질중에 그의 양이 증가하는 간암특이항원에 대한 분자생물학적인 연구로 다음과 같은 결과를 얻었다. 사람의 간암조직으로부터 cDNA library를 λ gt11에 만들어서 간암특이항원에 대한 단일클론 항체를 이용해 스크리닝한 결과 하나의 클론을 얻고 그의 DNA 염기서열을 결정하였다. 얻은 염기서열을 이제까지 발표된 여러 단백질에 대한 염기서열 데이터와 비교한 결과 그 cDNA는 human serum albumin의 partial clone이었으며 946개의 염기서열중 6개의 염기서열에 변화가 있었다. 그중 하나의 염기서열의 변화(396번째의 아미노산 잔기를 코딩하는)가 Lysine을 Glutamate로 변하게 하였다. 이와 같은 변화의 의의를 알아보기 위해서 간암조직 9케이스와 metastasis된 간조직 1케이스로부터 RNA-PCR을 통해 염기서열변화를 살펴보았더니 10케이스 모두에 있어서 Lysine이 Glutamate로 변한 결과를 얻었다. 현재 간암조직과 그 간암의 정상부위로 보이는 조직 두가지 경우에 있어서도 RNA-PCR실험을 하고 있으므로 그 결과에 따라 위에서 나타난 변화가 간암에 특이하게 나타나는 것인지에 대한 연구가 진행중이다.

참 고 문 헌

- (1) Gregoriadis, G., *Nature*, 265, 407 (1977)
- (2) Olsnes, S., *Nature*, 290, 84 (1981)
- (3) Ehrlich, P., The collected papers of Paul Ehrlich, Vol. II. Pergamon Press, London p. 550 (1957)
- (4) Baldwin, R.W., Barker, C.R., Embleton, M.J., Glaves, D., Moore, M., and Pimm, M.V., *Ann NY Acad Sci.*, 177, 268 (1971)
- (5) Fritze, D., Kern, D.H., Humme, J.A., Drogemuller, C.F., and Pilch, Y.H., *Int J Cancer*, 17, 138 (1976)
- (6) Jamasbi, D.J., and Nettesheim, P., *Cancer Res*, 37, 4059 (1977)
- (7) Leffel, M.S., and Coggin, J.H., *Cancer Res*, 37, 4112 (1977)
- (8) Galloway, D.R., Imai, K., Kerrone, S., and Reisfeld, R.A., *Fed Proc*, 40, 231 (1981)
- (9) Fortner, G.W., Takemoto, L.J., Shehi, L., and Hansen, J.S., *Cancer Res*, 42, 2371 (1982)
- (10) Eriksson, L.C., Torndal, V.B., and Anderson, G.N., *Cancer Res*, 43, 3335 (1983)
- (11) Astrom, A., DePierre, J.W., and Eriksson, L.C., *Carcinogenesis* 4, 577 (1983)
- (12) Kitahara, A., Satoh, K., and Sato, K., *Biochem Biophys Res Commun*, 112, 20 (1983)

- (13) Schor, N., Ogawa, K., Lee, G., and Farber, E., *Cancer Lett*, 5, 167 (1978)
- (14) Lindahl, R., Clart, R., and Evces, S., *Proc Am Assoc Cancer Res*, 24, 104 (1983)
- (15) Eriksson, L. C., Sharma, R.N., Roomi, M.W., Ho., R.K., Farber, E., and Murray R.K., *Biochem Biophys Res Commun*, 117, 740 (1983)
- (16) Roomi, M.W., Ho, R.K., Sarma, D.S.R., and Farber, E., *Cancer Res*, 45, 564 (1985)
- (17) Hahm, K.S., unpublished results.
- (18) 함경수, 김민영, 김종화, 이명규, 연구보고서, 과학기술처 BSN 70894-220-1 (1990).
- (19) Gubler, U., and Hoffman, B.J., *Gene* 25, 263(1983)
- (20) Feinberg, A.P., and Vogelstein, B., *Anal, Biochem.* 132, 6 (1983)
- (21) Hyunh, T.V., Young, R.A., and Davis, R.W., in 'DNA Cloning Techniques : A Pratical Approach', Glover, D. ed. IRL Press, Oxford, pp 49-65 (1985).
- (22) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463 (1977).

