

## 재조합 TIS21 단백질에 대한 Affinity-Purified 항혈청의 생산

아주대학교 의과대학 생화학교실

이 재 호 · 이 수 한 · 임 인 경

### Production of Affinity-Purified Polyclonal Antibody Against Recombinant TIS21 Protein

Jae-Ho Lee, Soo Han Lee and In Kyong Lim

Department of Biochemistry, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

For the study of TIS21 protein, a primary response gene product, we produced affinity-purified antisera against recombinant TIS21 protein. At first, hexahistidine-tagged recombinant TIS21 protein was produced by using bacterial expression system and was purified to near homogeneity using Ni<sup>2+</sup>-affinity column in the presence of urea. PBS-soluble and -insoluble TIS21 protein fractions were immunized into rabbits after dialysis. High-titer antiserum was obtained from one of the rabbits immunized with PBS-soluble fraction. Meanwhile, partially purified recombinant TIS21 protein was further purified by preparative SDS-PAGE and it was conjugated with the sepharose resin. The high-titer serum was applied to this affinity column and affinity-purified antiserum was obtained. This affinity-purified antiserum recognized TIS21 proteins expressed in bacteria as well as in mammalian cell when it was used in western blot. In addition, this affinity-purified antiserum recognized a constitutively expressed 40 kDa protein from NIH3T3, B9, C3H10T1/2 and 293 cell lines. Detection of this protein with the affinity-purified antiserum can be inhibited by recombinant TIS21 proteins prepared by our laboratory and other laboratory. Therefore this 40kDa protein can be an immunologically cross-reactive protein with TIS21 protein.

**Key Words:** TIS21, Recombinant protein, Affinity-purified polyclonal antibody, Cross reaction

## 서 론

강력한 tumor promoter인 tetradecanoyl phorbol acetate (TPA)<sup>1</sup>나 epidermal growth factor(EGF), fibroblast growth factor(FGF), platelet-derived growth factor(PDGF)등은 분열을 멈춘 상태의 NIH 3T3세포의 세포분열을 재개시킨다. 이러한 세포분열의 재개는 여러가지 세포내 변화를 동반하는데 그중 하나로 소위 "immediate-early"<sup>2</sup> 또는 "primary response"<sup>3-5</sup> gene이라고 하는 일군의 유전자가 발현되는 현상이 있다. 이 유전자들은 ligand와 수용체가 결합한 수

분후에 그 전사가 개시되며 이는 새로운 단백질의 합성이 억제된 상황에서도 기존의 전사 조절인자의 활성화에 의해 수행된다고 알려져 있다. 이러한 primary response gene으로서 암유전자인 c-fos<sup>7</sup>, c-jun<sup>7</sup>, c-myc<sup>6</sup>을 위시한 여러 가지 유전자들이 알려져 있다.

Herschman등은 tumor promoter인 TPA를 처리한 Swiss3T3 섬유아 세포주 library로부터 일군의 primary response gene을 cloning하고<sup>4</sup> 이를 TPA inducible sequences 즉 TIS 유전자라 명명하였다. TIS21 유전자는 이러한 TIS 유전자중의 하나로서 TPA뿐만 아니라 EGF, FGF 등의 여러 가지 세포성장인자에 의한 세포분열<sup>8</sup> 및 nerve growth factor(NGF)에 의한 분화유도<sup>9</sup>, electric convulsive shock (Park JB-personal communication)등의 다양한 자극에 의하

저자연락처: 임인경, (442-749) 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5, 아주대학교 의과대학 생화학교실, Tel (0331) 219-5051

여 세포주 및 동물 모델에서 발현이 유도됨이 알려졌다.

TIS21 단백질은 분자량이 17 kDa으로서<sup>10</sup> 세포질에 존재하며 핵내로 이동하거나 세포외로 분비되지 않는 것으로 알려져 있다<sup>11</sup>. 이 단백질의 기능은 현재까지는 잘 알려져 있지 않다. 그 아미노산 서열이 BTG-1이라는 세포분열 억제단백질<sup>12</sup>과 59% 일치하기 때문에<sup>13</sup> TIS21 단백질도 역시 세포분열 억제작용을 할 것이라는 기대하에 실험을 하였으나 그러한 작용이 없다는 결과를 얻었다고 한다 (Herschman-personal communication). 한편 마우스의 표피 세포에서 기원한 JB-6 세포주중 TPA에 의해 세포변형이 일어나는 아세포주와 TPA에 불감인 아세포주 사이에 TIS21 단백질의 발현이 크게 차이가 난다는 보고가 있어 이 단백질이 소실되는 것이 tumor promotion의 진행에 있어 중요한 의미가 있을 것이라는 주장도 있다<sup>14</sup>.

본 실험에서는 궁극적으로 TIS21 단백질의 기능을 밝히기 위하여 그간 mRNA의 발현을 주로 조사하였다. 그 결과 TIS21 유전자가 마우스의 몇몇 장기에서 항상 발현되어 있음을 보고하였고<sup>15</sup>, 자연적으로 흉선 상피세포암이 발생하는 SV-40 large T 항원 transgenic mouse에서 TIS21 유전자의 발현이 소실됨을 관찰하였다<sup>16</sup>. mRNA 발현 data를 보충하고 단백질의 발현부위 및 발현여부, 단백질 자체의 연구를 위하여는 민감도와 특이도가 높은 항체의 개발이 그 선결조건이라 하겠다. 본 논문에서는 재조합 TIS21 단백질을 만들고 이를 면역원으로 사용하여 affinity-purified 항혈청을 만들었음을 보고하는 바이다. 그에 더하여 여러 세포주에서 항상 발현되며 TIS21 단백질과 교차반응하는 단백질이 있어 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구재료

BSA(bovine serum albumin), Tween20, urea, glutathione, complete and incomplete Freund's adjuvant, horseradish peroxidase-labelled anti-rabbit IgG, NP-40등을 위시한 일반 시약들은 Sigma사(USA)에서 구입하였다. 제한 효소는 NEN사(USA)나 Bethesda Research Laboratories에서 구입하였고 ELISA plate는 Pierce사(USA)에서 구입하였다.

### 2. 재조합 TIS21 단백질의 제조

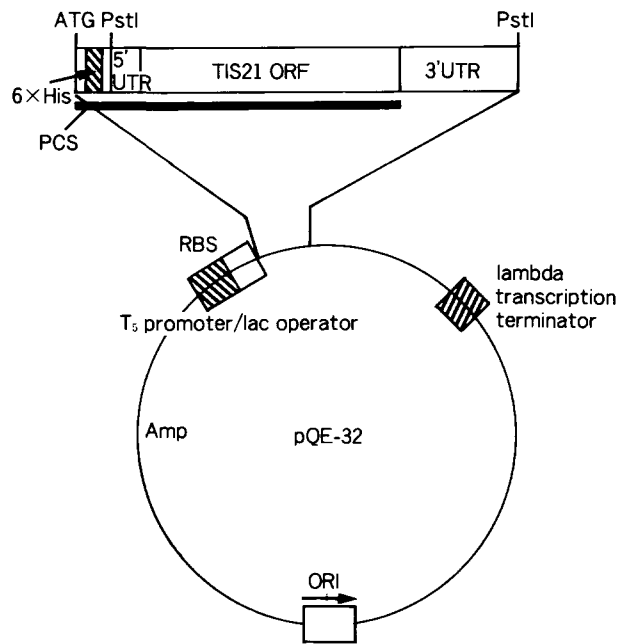
TIS21 cDNA중 PstI fragment(전 coding sequence +3' UTR)를 QLAexpress system(Qiagen)에서 사용하는 expression vector인 pQE-30 vector에 ligation하였다(Fig. 1).

Construct 중 sequencing 결과 frame이 맞는 construct를 M15[pREP4] E. coli host cell에 transformation한 후 2 mM

농도의 IPTG를 사용하여 TIS21 단백질의 발현을 유도하였다.

### 3. 재조합 TIS21 단백질의 정제

정제는 제조자(Qiagen)의 지시를 따랐다. IPTG로 induction한 후 E. coli pellet을 6 M guanidine HCl이 함유된 완충액 A(6 M GuHCl, 0.1 M Na/phosphate, 0.01 M Tris/HCl, pH8.0)로 상온에서 1시간 동안 방치하여 녹여냈다. 이를 원심분리하여 그 상층액을 얻고 여기에 미리 완충액 A로 평형화한 Ni<sup>2+</sup>-NTA resin(Qiagen)을 첨가하고 45분간 상온에서 저어주면서 반응시켰다. 이후 용액과 resin을 크로마토그래피 컬럼에 부하하고 각각 8 M urea를 함유한 0.1 M Na-phosphate, 0.01 M Tris/HCl, pH8.0 완충액과 0.1 M Na-phosphate, 0.01 M Tris/HCl, pH6.3 완충액으로 280 nm에서의 흡광도가 0.01 미만일 때까지 세척하였다. 용출은 역시 각각 8 M urea를 함유한 0.1 M Na-



**Fig. 1.** The structure of the TIS21 protein expression construct. A 1.76 kbp PstI fragment (polycloning site+5'UTR+TIS21 open reading frame+part of 3'UTR) was cloned into the pQE32 bacterial expression vector. The resulting expression construct contains the PstI fragment downstream of the hexahistidine sequence under the control of the T5 promoter and lac operator. The thick bar indicates expected recombinant protein. It consists of authentic TIS21 protein (158 aminoacids) plus N-terminal 40 additional aminoacid residues including hexahistidine residues.

phosphate, 0.01 M Tris/HCl, pH5.9 완충액과 0.1 M Na-phosphate, 0.01 M Tris/HCl, pH4.5 완충액으로 시행하였다.

#### 4. 항 TIS21 항혈청의 제조

재조합 TIS21 단백질을 면역원으로 사용하기 위하여 urea의 농도를 처음에는 0.1 M, 나중에는 0 M로 단계적으로 낮춘 완충액(1.5  $\mu$ M의 환원형 글루타치온이 포함된 10 mM Tris, pH7.0)으로 투석하고 그후 PBS로 투석하였다. 투석후 완충액에 녹은 단백질 및 녹지않는 단백질을 각각 2마리의 New Zealand White 토끼에 접종했다. 첫번 접종시에는 complete Freund's adjuvant를 사용하여 피하주사하고 그후 부터는 2~3주 간격으로 incomplete Freund's adjuvant와 섞어 근육주사하였다. 각각 접종 후 10일 후에 혈청을 채취하여 효소면역측정법으로 항체의 역가를 측정했다. 고역가에 다다랐을때 다량의 혈청을 얻었다.

#### 5. 효소면역 측정법

정제한 재조합 TIS21 단백질을 8 M urea가 함유된 0.1 M Na-phosphate, 0.01 M Tris/HCl, pH6.3 완충액으로 280 nm에서의 흡광도가 0.005가 되게 희석하였다. 희석한 용액을 well당 50  $\mu$ l씩 96-well plate에 분주하고 37°C에서 1시간 동안 정치하여 플라스틱 표면에 coating하였다. BSA가 0.5%(w/v) 함유된 PBS 용액을 well당 100  $\mu$ l씩 96-well plate에 분주하고 37°C에서 1시간 동안 정치하여 blocking하였다. 단계적으로 희석된 항혈청을 분주하고 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 Tween-20이 0.05% 함유된 PBS 용액으로 5회 세척한 후 O-phenylene diamine으로 발색시켰다. 흡광도는 Emax ELISA reader(Molecular Dynamics)를 사용하여 490 nm에서 측정하였다.

#### 6. Preparative SDS-PAGE

Ni<sup>2+</sup>-affinity column을 사용하여 정제한 재조합 TIS21 단백질에 약간의 contaminating protein이 존재하므로 affinity column을 제조하기 위한 재료로 쓰기 위하여 preparative SDS-PAGE를 시행하였다. 1.5 mm 두께의 SDS-PAGE gel에 preparative comb으로 well을 만들고 전기영동하였다. 전기영동후 rapid reversible stain(Sigma R-1136) 용액으로 gel을 염색하여 재조합 TIS21 단백질의 크기에 해당하는 20-21kDa에 해당하는 band를 면도칼로 잘라내고 electro-elution 하였다.

#### 7. 재조합 TIS21 affinity column의 제조

Preparative SDS-PAGE에 의하여 정제한 재조합 TIS21 단백질을 제조자의 지시에 따라 CNBr-activated sepharose 4B resin(Pharmacia)에 결합시켰다. 우선 resin을 과량의 1

mM HCl 용액에 15분간 부유시킨 후 gel gram 당 200 ml의 1 mM HCl로 세척하였다. 세척된 gel 용액에 결합완충액(0.5 M NaCl이 함유된 0.1 M 중탄산염 완충액, pH8.3)을 흘려 용액의 pH를 8.3으로 만든 후 신속하게 미리 결합완충액에 녹인 재조합 TIS21 단백질을 gel 1 ml당 5 mg 가량 첨가하여 상온에서 가볍게 흔들면서 반응시켰다. 그후 0.2 M glycine, pH8.0 용액을 가하여 남아있는 active group을 차단한 후 0.5 M NaCl이 함유된 0.1 M 초산염 완충액 pH4.0과 0.1 M 중탄산염 완충액 pH8.3으로 번갈아 3회 세척하였다. 최종적으로 0.5 M NaCl이 함유된 PBS로 평형화시켰다.

#### 8. Affinity-purified 항 TIS21 항혈청의 제조

재조합 TIS21 단백질이 결합된 resin을 column에 충전한 후 0.5 M NaCl이 함유된 PBS로 평형화하고 재조합 TIS21에 대한 항혈청을 부가했다. 0.5 M NaCl이 함유된 PBS로 column을 세척한 후 0.1 M glycine-NaOH 완충액(pH2.3)으로 용출했다. 용출 즉시 Pierce사의 Immunoglobulin binding buffer™ 1/10 vol.을 가하여 중성화하고 -20°C에 보관하여 이후의 실험에 사용하였다.

#### 9. Western blotting

세포를 NP-40 lysis완충액(150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris, pH8.0)속에서 균질화한 후 15% gel에서 SDS-PAGE를 시행했다. 전기영동 후 Towbin 완충액<sup>17</sup>속에서 electrotransfer하고 affinity-purified 항 TIS21 항혈청을 사용하여 immunodetection을 시도했다. 2차항체로는 horseradish peroxidase가 결합되어 있는 anti-rabbit IgG를 사용하였고 가시화의 방법으로는 ECL(Amersham)을 사용했다.

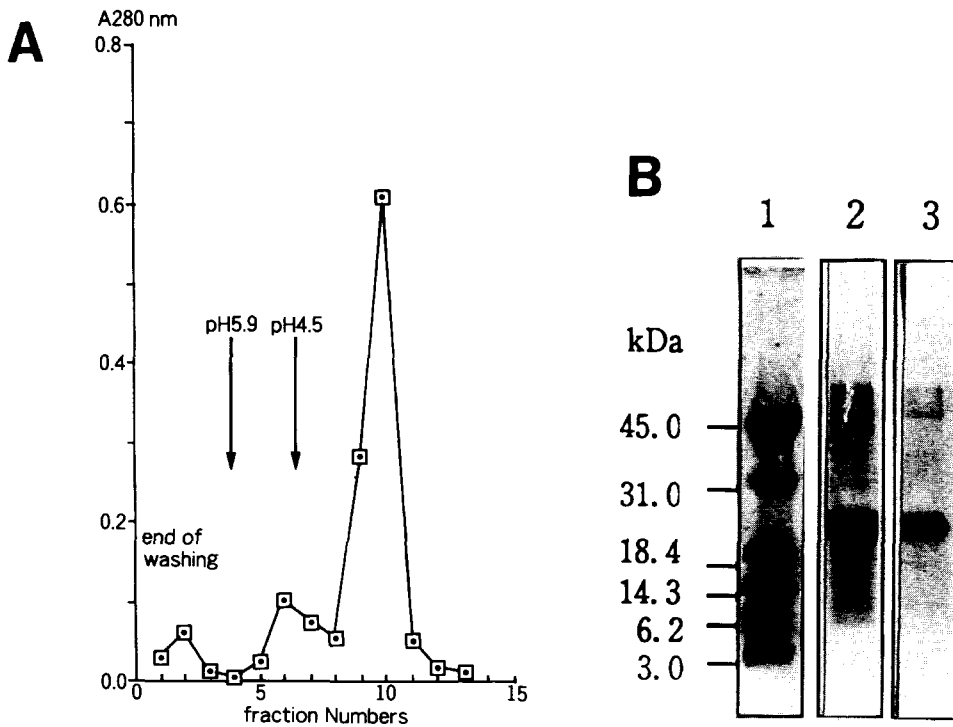
#### 10. 저해실험

세포 균질액을 전기영동하고 electrotransfer하였다. Affinity-purified 항혈청을 mole 농도가 140배 되는 재조합 TIS21단백질(Dr. Herschman 실험실 제조)과 상온에서 2시간동안 반응시켰다. 반응시킨 affinity-purified 항혈청을 이용하여 immunodetection을 시도했다.

## 결 과

#### 1. 재조합 TIS21 단백질의 정제

Fig. 2. A에서 보듯이 recombinant TIS21단백질을 urea 존재하에서 Ni<sup>2+</sup>-NTA column을 이용하여 정제하였다. Fig. 2. B에서 보듯이 90% 가량의 순도를 갖는 재조합 단백질을 얻을 수 있었다.



**Fig. 2.** A. Representative profile of Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity chromatography. E.coli cells harboring recombinant TIS21 construct were treated with 2mM IPTG for 4 hours and then lysed with buffer containing 8 M urea, pH8.0(buffer A). Lysate was centrifuged and the supernatant was mixed with the Ni<sup>2+</sup>-NTA resin. The resin was applied to a chromatography column and washed with buffer A followed by buffer containing 8M urea, pH6.3. Successive elutions were performed using 8M urea containing buffers with pH5.9 and pH4.5. B. Recombinant TIS21 protein From E.coli. The purified recombinant TIS21 protein and PBS-soluble form of it (immunogen) were separated on a 15% SDS-PAGE and stained with coomassie brilliant blue dye. The recombinant protein has larger molecular weight (~21kDa) than authentic TIS21 protein(~17kDa) observed in Swiss3T3 cells because of additional sequences containing polycloning site, hexahistidine residues and 5'-UTR sequences of TIS21 cDNA. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, NTA-purified recombinant TIS21 protein; lane 3, PBS-soluble recombinant TIS21.

**2. affinity-purified 항혈청의 제조**

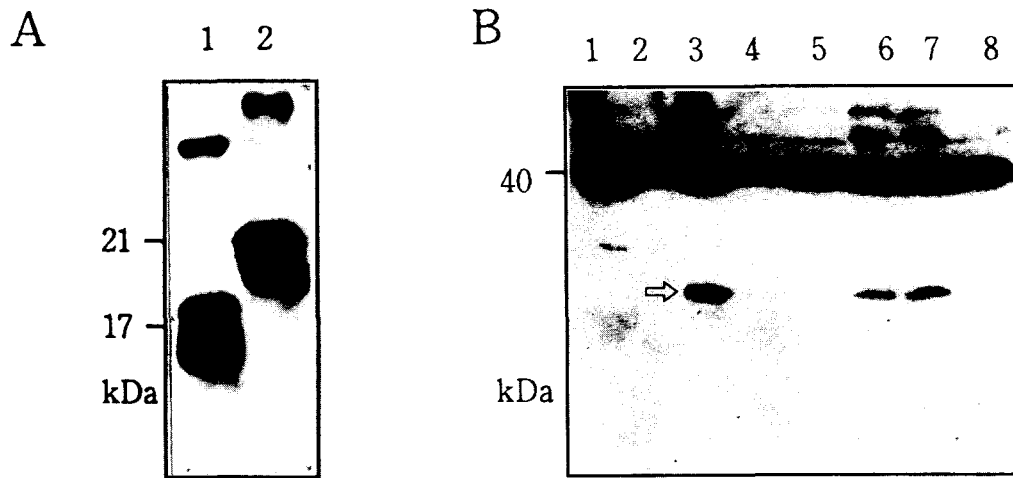
재조합 단백질을 투석을 통해 renaturation하였고 이를 면역원으로 사용하여 토끼에 주사하였다. 네마리의 토끼 중 한마리에서 Dr. Herschman에게서 얻은 항혈청보다 역가가 높은 항혈청을 얻었음을 효소면역측정법으로 확인할 수 있었다(data not shown). 다음 단계로 affinity-purified 항혈청을 얻기 위해 순도가 90% 정도인 재조합 TIS21 단백질을 preparative-SDS PAGE 방법으로 정제한 후 이를 CNBr-activated sepharose 4B resin에 결합시켰다. 이 affinity matrix를 이용하여 항혈청으로부터 affinity-purified 항혈청을 얻어냈다.

**3. TIS21 단백질 검출확인**

Affinity-purified 항혈청을 이용하여 본 연구실에서 만든 재조합 TIS21 단백질과 Herschman박사 실험실에서 만든 재조합 TIS21 단백질을 검출함을 확인하였다(Fig. 3A). 한편 본 실험실에서 TIS21 expression vector를 transfection시킨 stable transfectant(manuscript in preparation)로부터 cell lysate를 얻어서 affinity-purified 항혈청을 이용하여 immunoblotting을 시행한 결과 정방향의 construct를 transfection시킨 세포주에서만 17kDa의 TIS21 band를 관찰할 수 있었다(Fig. 3B).

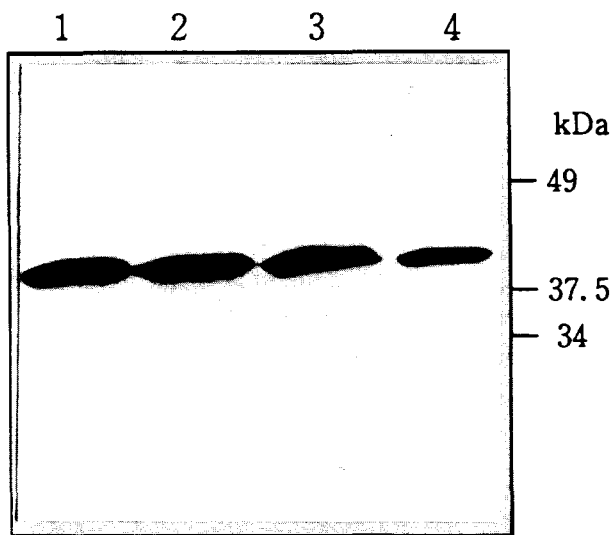
**4. 교차반응 단백질의 확인**

이 affinity-purified 항혈청을 가지고 몇 가지 세포주에서



**Fig. 3.** A. Anti-TIS21 affinity-purified antisera can recognize recombinant TIS21 proteins. Recombinant TIS21 proteins from our lab.(lane 2) and Dr. Herschman's lab.(lane 1) were separated on a 15% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose paper. The blots were analyzed by immunoblotting with the affinity-purified antisera. Immunoreactive bands were visualized by ECL(enhanced chemiluminescence).

B. Anti-TIS21 antisera can recognize overexpressed TIS21 protein in 293 cells. 293 cells were transfected with the pcDNA3 eukaryotic expression vector(In Vitrogen) containing TIS21 cDNA in right orientation(5'→3') and reverse orientations(3'←5'). Each clone of stable transfectant selected with G418 was extracted with the SDS-PAGE sample buffer and the extracts were analyzed by immunoblotting using the affinity-purified antisera. Immunoreactive bands were visualized by ECL. Arrow denotes the overexpressed TIS21 protein. A strong 40kDa band shown above is a cross-reacting protein. Lanes 3, 6, 7: 5' to 3' transfectants, lanes 4, 5, 8: 3' to 5' transfectants, lanes 1, 2: plasmid only.

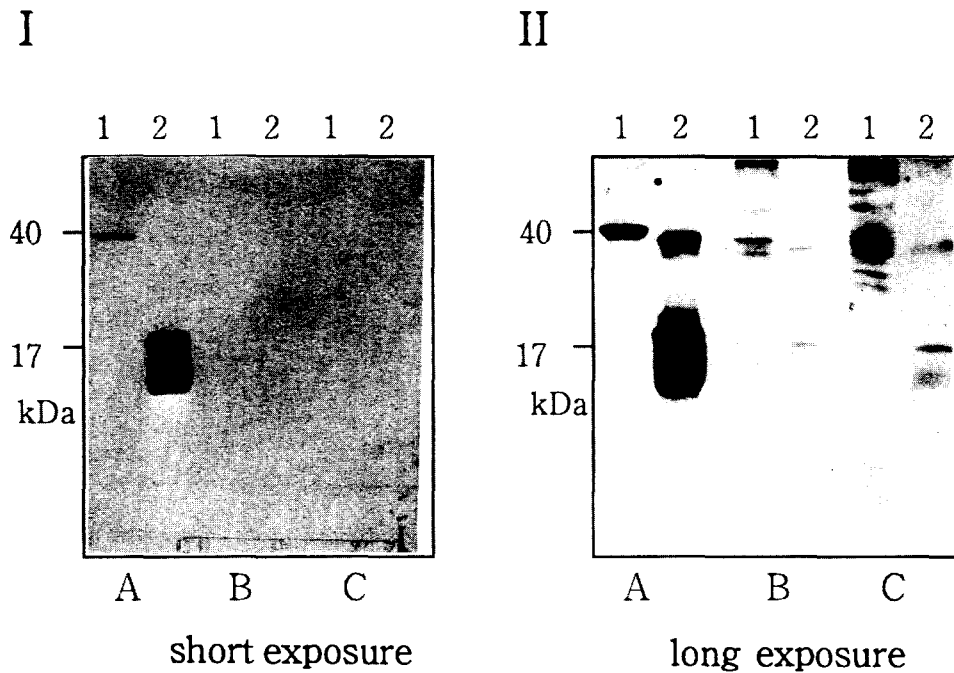


**Fig. 4.** Anti-TIS21 antisera recognize a 40kDa protein from several cell lines. NIH3T3(lane 1), C3H10T1/2(lane 2), 293(lane 3) and B9(lane 4) cells were extracted with the SDS-PAGE sample buffer. Extracts were separated on a 15% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose paper. The resulting blots were incubated with the affinity-purified antisera and subsequently visualized by ECL.

western blotting을 시행한 결과 Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 40kDa 단백질을 검출함을 알 수 있었다. 이 단백질이 항혈청에 특이적으로 반응하고 있는지 알기 위해 Dr. Herschman 실험실에서 만든 재조합 TIS21 단백질을 과량으로 사용하여 경쟁시켜 본 결과, Fig. 5A에서와 같이 반응이 거의 완전히 저해되었다. Fig. 5B에서 보듯 필름의 노출시간을 증가시키면 40kDa band가 재조합 단백질로 전처리한 경우에도 나타나는 것을 볼 수 있으나 이때도 그 signal이 현저히 줄어들음을 관찰할 수 있었다. 따라서 이 40kDa 단백질이 재조합 TIS21 단백질과 교차반응하고 있음을 알 수 있었다.

## 고 찰

TIS21 유전자는 tumor promoter인 TPA를 처리한 Swiss3T3 섬유아 세포주 library로부터 Herschman 등에 의하여 처음으로 cloning된 유전자이다. 이 유전자는 소위 primary response gene으로 알려졌고 이후 TPA뿐만 아니라 여러가지 세포성장인자 및 depolarization, electric convul-



**Fig. 5.** Immunological cross reaction of the 40kDa protein with recombinant TIS21. Extracts from NIH3T3 cells(lane 1) and recombinant TIS21 protein(lane 2) obtained from Dr. Herschman's laboratory were separated on a 15% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose paper. Blots were incubated with the affinity-purified(A), antisera preincubated with Dr. Herschman's recombinant TIS21 protein(B), or antisera preincubated with our recombinant TIS21 protein(C). Short and long exposure films are presented. Size of the cross-reacting protein is 40kDa and the recombinant TIS21 protein from Dr. Herschman's laboratory is 17kDa.

sive shock등의 다양한 자극에 의하여 세포주 및 동물 모델에서 발현이 유도됨이 알려졌다. TIS21 단백질은 분자량이 17kDa으로서 세포질에 존재하며 핵내로 이동하거나 세포외로 분비되지 않는 것으로 알려져 있다. 이 단백질의 기능이 무엇인지는 현재까지 잘 알려져 있지 않다.

본 실험실에서는 TIS21 단백질의 기능을 밝히기 위하여 그간 mRNA의 발현을 주로 조사하였다. 그 결과 TIS21 유전자가 마우스의 몇몇 장기에서 항상 발현되어 있음을 보고하였고, 자연적으로 흉선 상피세포암이 발생하는 transgenic mouse에서 TIS21 유전자의 발현이 소실됨을 관찰하였다. mRNA 발현 data를 보충하고 단백질의 발현부위 및 발현여부, 단백질 자체의 연구를 위하여 민감도와 특이도가 높은 항체의 생산을 목표로 본 연구를 진행하였다.

항원을 얻기 위하여 재조합 TIS21 단백질을 제조하였다. 용이한 정제를 위하여 N-말단에 hexahistidine이 결합되는 construct를 사용하였다. 만들어진 재조합 단백질은 불용성이어서 urea가 포함된 완충액으로 녹여낸 후 Ni<sup>2+</sup>-affinity column을 사용하여 정제하였다. 정제 결과

90% 이상의 순도를 갖는 재조합 TIS21 단백질을 얻을 수 있었다. 그런데 이 재조합 단백질에는 TIS21 단백질의 N-말단 앞쪽에 hexahistidine을 포함하여 40개의 아미노산이 추가로 포함되어 있다. 적당한 단백질 분해효소가 없기에 이 재조합 단백질을 면역원으로 사용하였다. 면역하기 전에 urea의 농도를 8 M에서 1 M, 0 M로 순차적으로 낮추며 renaturation을 시행하였다. 최종적으로 PBS에 가용성인 단백질과 불용성인 단백질을 분리하여 New Zealand White 토끼에 면역하였다. 이는 부분적으로 denaturation된 단백질이 가용상태의 항원에 비하여 더 면역원성이 커질 수 있다는 이론에 근거하였다<sup>18</sup>. 그러나 실제 결과는 PBS에 불용 상태인 재조합 단백질로 면역한 경우에 PBS에 가용성인 상태의 재조합 단백질로 면역한 경우와 비교할 때 면역반응성이 나아졌다고 볼 수는 없었다(data not shown).

항체의 특이도를 향상시키기 위하여 affinity column을 이용, affinity-purified 항혈청을 얻어 냈다. Affinity column을 제조하기 위하여 순도가 90% 정도인 재조합 TIS21을 시료로 사용하여 preparative SDS-PAGE를 시행하여 band를 electro-elution하였다. Elution된 단백질을 CNBr-activat-

ed sepharose 4B resin에 결합시켜 affinity column resin으로 활용하였다. Affinity column에 의해 정제된 affinity-purified 항혈청을 이용하여 western blotting을 시행하여 보니 본 실험실에서 제조한 재조합 TIS21 단백질 뿐만 아니라 Herschman 박사의 실험실에서 제조한 TIS21 단백질도 인지하는 것을 알 수 있었다. 또한 293 세포주에 TIS21 cDNA를 transfection시킨 세포 균질액으로부터 TIS21 단백질과 같은 크기의 단백질을 인지하는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 관찰 결과들을 종합할 때 본 실험실에서 만든 affinity-purified 항혈청은 TIS21 단백질을 western blot 방법으로 인지함을 알 수 있다.

한편 western blotting 실험중에 실험에 사용한 4개의 세포주 시료 모두에서 분자량 40kDa 정도의 단백질이 뚜렷이 인지되는 것을 볼 수 있었다. 이는 본 논문에서 면역원으로 사용한 재조합 단백질에 40개의 아미노산이 N-말단에 추가되어 있으므로 그 부위에 대한 항체가 40kDa 단백질을 인지할 가능성이 있다. 그러나 authentic TIS21 단백질에 비해 Met과 Ala 2개의 아미노산만을 추가로 갖고 있는 재조합 TIS21 단백질(Herschman 박사의 실험실에서 제조함)을 반응계에 과량으로 넣었을 때 affinity-purified 항혈청이 40kDa 단백질을 인지하는 것이 저해되었다. 따라서 40kDa 단백질을 인지하는 항체는 추가된 N-말단 부위에 대한 항체가 아니라 TIS21 단백질 부위를 인지하는 항체라고 할 수 있다. 즉, 40kDa 단백질은 재조합 TIS21 단백질과 교차반응하는 단백질이라고 할 수 있겠다. 물론 authentic TIS21 단백질과 교차반응하는지의 여부는 현재로서는 말하기 어렵다.

TIS21단백질과 면역학적으로 교차반응하는 단백질에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다. 이 40kDa 단백질이 authentic TIS21 단백질과 교차반응하는지, 이 단백질은 무엇이며 TIS21 단백질과는 어떤 관련이 있는지를 알기 위한 연구가 현재 진행되고 있다.

## 결 론

- 1) TIS21, cDNA를 이용하여 재조합 TIS21 단백질을 E. coli에서 만들고 이를 정제하였다.
- 2) 재조합 TIS21 단백질을 면역원으로 사용하여 항-TIS21 항혈청을 만들고 이로부터 affinity-purified 항혈청을 얻었다.
- 3) Affinity-purified 항혈청은 TIS21 단백질을 western blot 방법으로 인지하는데 사용할 수 있었다.
- 4) Affinity-purified 항혈청을 사용하여 몇 가지 세포주에서 항상 발현되며 재조합 TIS21 단백질과 교차반응하는

40kDa 크기의 단백질을 확인하였다.

## 감사의 말씀

본 논문안의 실험은 교육부(95-102호, 수혜자; 임인경) 및 아주대학교 연구비(수혜자; 이재호)의 지원을 받아 이루어졌다. TIS21 cDNA 및 비교실험을 위한 재조합 TIS21 단백질과 항-TIS21 항혈청을 제공하여 주신 Herschman 박사(미국, UCLA)께 감사드린다. 몇몇 실험을 위한 설비를 제공하고 기술적인 조언을 하여 주신 서울의대 생화학고실 박주배 교수께도 깊은 감사를 표한다.

## 참 고 문 헌

1. Cochran BH, Reffel AC and Stiles CD: Molecular cloning of gene sequence regulated by platelet-derived growth factor. Cell 33: 939-947, 1983
2. Lau LF and Nathans D: Identification of a set of genes expressed during the Go/G1 transition of cultured mouse cells. EMBO J 4: 3145-3151, 1985
3. Yamamoto KR and Alberts BM: Steroid receptors; elements for modulation of eukaryotic transcription. Annu Rev Biochem 45: 721-746, 1976
4. Lim RW, Varnum BC and Herschman HR: Cloning of tetradecanoyl phorbol ester induced "primary response" sequences and their expression in density arrested Swiss 3T3 cells and a TPA nonproliferative variants. Oncogene 1: 263-270, 1987
5. Herschman HR: Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. Annu Rev Biochem 60: 281-319, 1991
6. Greenberg ME and Ziff EB: Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos protooncogene. Nature 311: 433-438, 1984
7. Ryseck RP, Hirai SI, Yaniv M and Bravo R: Transcriptional activation of c-jun during the Go/G1 transition in mouse fibroblasts. Nature 334: 535-537, 1988
8. Lim RW, Varnum BC, O'Brien TG and Herschman HR: Induction of tumor promoter inducible genes in murine 3T3 cell lines and tetradecanoyl phorbol acetate-nonproliferative 3T3 variants can occur through protein kinase C-dependent and independent pathways. Mol Cell Biol 9: 1790-1793, 1989
9. Kujubu DA, Lim RW, Varnum BC and Herschman HR: Induction of transiently expressed genes in PC12 pheochromocytoma cells. Oncogenes 1: 257-262, 1987
10. Fletcher BS, Lim RW, Varnum BC, Kujubu DA, Koski RA and Herschman HR: Structure and expression of TIS-21, a primary response gene induced by growth factor and tumor promoters. J Biol Chem 266: 14511-14518, 1991
11. Varnum BC, Reddy ST, Koski RA and Herschman HR:

- Synthesis, degradation, and subcellular localization of proteins encoded by the primary response genes TIS7/PC4 and TIS21/PC3. *J Cell Physiol* 158: 205-213, 1994
12. Rouault JP, Rimokh R, Tessa C, Paranhos G, French M, Duret L, Garoccio M, Germain D, Samarut J and Magaud JP: BTG-1, a member of a new family of antiproliferative genes. *EMBO J* 11: 1663-1670, 1992
  13. Rouault JP, Samarut C, Duret L, Tessa C, Samarut J and Magaud JP: Sequence analysis reveals that the BTG1 antiproliferative gene is conserved throughout evolution in its coding and 3' non-coding regions. *Gene* 129: 303-306, 1993
  14. Cmarik JL, Herschman HR and Colburn NH: Preferential primary-response gene expression in promotion-resistant versus promotion-sensitive JB6 cells. *Mol Carcinogenesis* 11: 115-124, 1994
  15. Lim IK, Kim NK, Lee MS and Lee SH: Expression of TIS-21 gene during the development of Balb/c mice and the liver regeneration. *Kor J Biochem* 26: 169-175, 1994
  16. Lim IK, Lee MS, Lee NK, Jou IL, Seo JS and Park SC: Differential expression of TIS21 and TIS1 genes in the various organs of Balb/c mice, thymic carcinoma tissues and human cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 121: 279-284, 1995
  17. Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1976
  18. Harlow E and Lane D: *Antibodies -A laboratory manual*. 1st ed. New York, Cold Spring Harbor, 1988, p10-101.
-