

항-펩타이드 항체를 이용한 암유전자 N-myc 산물의 면역조직화학적 검출

전남대학교 의과대학 미생물학교실

이현철 · 이완주 · 안태휴

=Abstract=

Immunohistochemical Detection of N-myc Gene Product by Using Antiserum Against Synthetic Peptide

Hyun Chul Lee, Wan Joo Lee and Tai Hew Ahn

Department of Microbiology, Chonnam National University Medical School, Kwang Ju 500, Korea

N-myc, a DNA sequence related to the oncogene c-myc, was found to be amplified in untreated primary neuroblastomas and the amplification appeared to be associated with advanced disease at diagnosis and rapid tumor progression. Synthetic peptides have been useful immunogens for generating antisera and monoclonal antibodies to a number of native proteins. In order to identify myc-related protein in the tumor cells, an antiserum against a synthetic hexapeptide (-Glu-Asp-Ile-Trp-Lys-Lys-), whose sequence corresponds to a part of the exon 2 of oncogene N-myc, was prepared by immunizing a rabbit with BSA-conjugated peptide. After ammonium sulfate precipitation and affinity column chromatography, it appeared to be specific to the peptide. Strong nuclear staining in immunoperoxidase method using this serum was observed in both human promyeloid leukemic cell line, HL-60 (containing high c-myc copy number), and human neuroblastoma cell line, LA-N-5 (containing high N-myc copy number), whereas LA351 (human lymphoid cell line) cells did not react with the serum. This reaction was completely abrogated by incubating the antiserum with soluble excess peptide. These data suggest that the protein encoded by N-myc could be localized in the nucleus as c-myc protein and this antiserum can be used to detect myc-related tumor cells in clinical samples and to determine if the N-myc expression correlates with genomic amplification in cell lines, untreated primary tumors, and untreated metastases.

Key Words: synthetic peptide, N-myc, neuroblastoma, oncogene expression.

서 론

암은 심장질환과 함께 인류를 가장 크게 위협하고 있고, 현대의학이 아직 해결하지 못한 가장 큰 과제중의 하나이며, 이에 대한 각 분야에서 헤아릴 수 없을 정도의 많은 연구가 진행되고 있다. 암의 원인에 대해선 여러가지 학설이 주장되어 있으나 최근 들어선 암유전자설이 가장 크게 대두되고 있다¹⁾. 인체세포의 염색체내에는 정상적으로 proto-oncogene들이 존재한다. 그런데 이 proto-oncogene들이 보통은 비활성화된 상태로 존재하고 있다가 re-

troviral infection, genomic amplification, mutation 및 chromosomal translocation 등에 의해서 활성화되어 암이라는 형태로 발현된다고 알려지고 있다²⁾. 이미 이러한 암유전자들이 40여종 발견되었고 각 종양에 특이하게 발현되고 있음이 밝혀지고 있다³⁾. 암유전자들에 의한 형질전환은 결국 최종적으로 유전자산물인 암유전자단백 (oncogene protein)의 작용에 의한 것이므로 이들에 대한 연구가 최종목표라고 생각할 수 있으나 대부분의 암유전자특이단백 항원의 분리와 이에 대한 항체생산의 어려움으로 암유전자단백들의 발현 및 세포내 위치 그리고 암유전자 DNA 및 mRNA와의 상관관계에 대한 연구

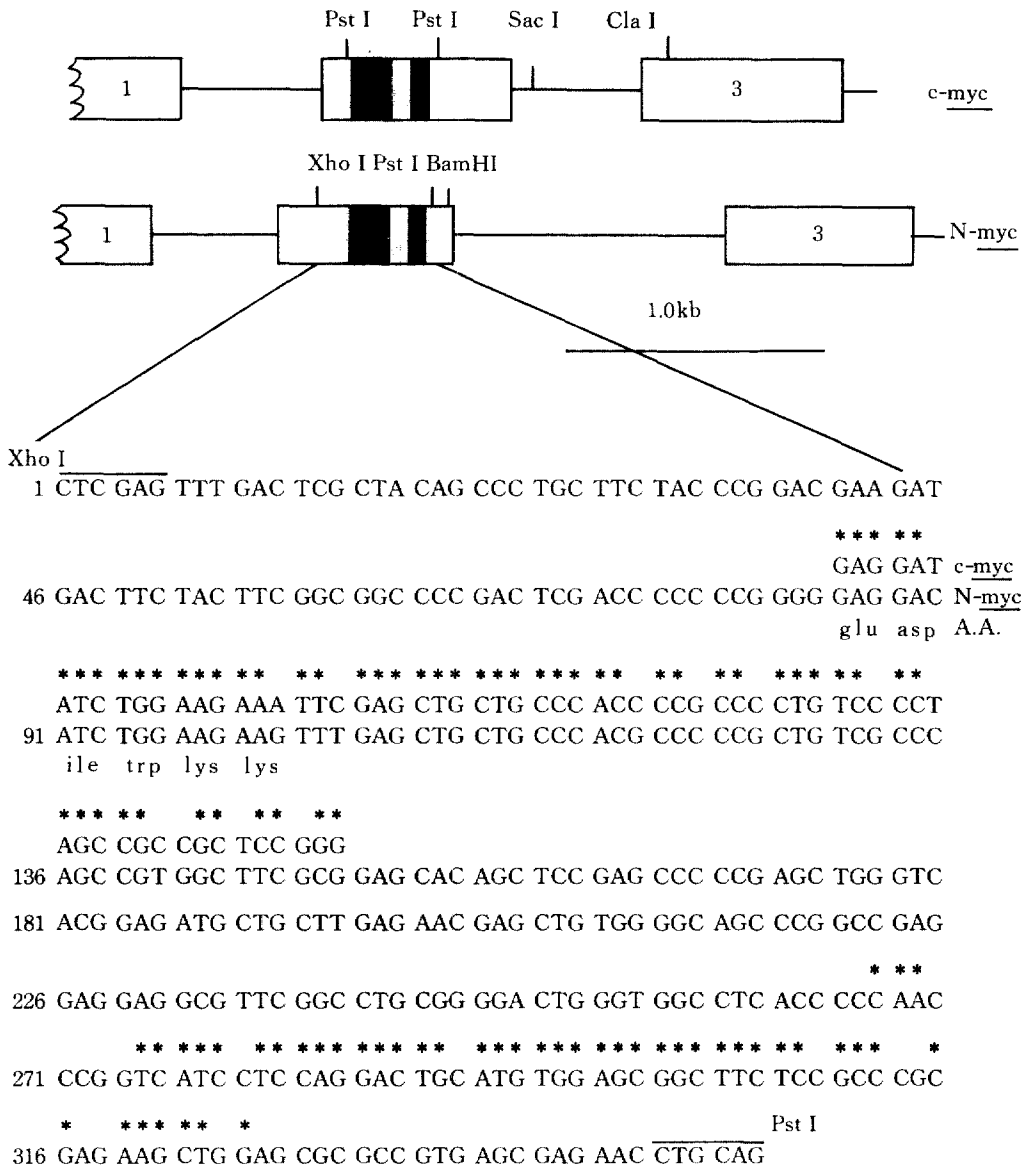


Fig. 1. Nucleotide sequences of exon 2 of N-myc and a peptide sequence used in this experiment. A structural comparison of N-myc and c-myc is shown at the top of the figure. Exons are indicated by large rectangles. The regions of homology are indicated by solid boxes in both diagrams. The genes are oriented 5'-exon1-exon2-exon3-3'. Asterisks indicate homology between human N-myc and human c-myc; numbers refer to the nucleotide positions in c-myc in according to ref. 4.

가 큰 진전을 보지 못하고 있다. 암유전자 N-myc은 neuroblastoma^{4,5,6}와 일부 small cell lung carcinoma⁷ 그리고 retinoblastoma⁸에서 특이하게 증폭된다고 알려지고 있으며 최근에는 현재 밝혀진 암유전자 중에서 독특하게 tumor aggressiveness 및 환자의 예후와 밀접한 관계가 있음이 증명되어 중요한 예후관정인자가 되었다⁹. 최근들어서 생물학적으로 중요한 자연단백들에 대한 항혈청이나 단크

론항체들을 얻기 위하여 아미노산 갯수가 몇개 안 되는 합성펩타이드가 면역원으로 이용가능성을 보여 분자생물학의 새로운 연구도구로 등장하였다^{11,12,13}. 이에 본 연구에서는 human neuroblastoma를 model system으로 하고 암유전자 N-myc에 특이한 합성펩타이드를 이용, 가토를 면역하여 항-펩타이드항혈청을 제조하고, affinity column을 이용하여 정제한 후 이를 신경아세포종세포주 및 hu-

man promyelocytic leukemic cell line에서의 암유전자단백의 위치를 immuno-peroxidase 법으로 관찰하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

합성펩타이드

이미 밝혀진 암유전자 *N-myc*의 nucleotide (pNb-1) 배열순서^{6,7}에 입각하여 미국 Applied Biosystem사의 Dr. Geiser가 butyloxycarbonyl-cystein (MBz 1)-O-resin과 N-t-Boc 아미노산들을 이용한 standard solid-phase synthesis 법에 의해서 제조하여 제공한 것으로 Fig. 1에서와 같이 6개의 아미노산으로 구성되어 있으나 운반체단백(carrier protein)에의 접합을 위하여 cysteine을 추가로 부착시켰다. 이는 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)에 의해 95% 이상의 순도를, 그리고 amino acid sequencer에 의해 정확한 배열순서가 확인된 것으로, exon 2에 위치하고, 강한 친수성을 나타내어 antigenic determinant로 작용하리라 추측되는 부분으로 그 배열순서는 *c-myc*과 완전 일치한다.

항-펩타이드 항체생산

항혈청을 제조하기 위해 합성펩타이드를 Grandgenett 등¹⁴이 사용한 방법에 따라 BSA에 결합시켰다. BSA-conjugated peptide (520 µg peptide/1 ml PBS)와 complete Freund adjuvant를 혼합하여 1ml의 유탁액을 제조하고 이를 생후 3개월된 암컷 가토의 피내 및 근육내 10여곳에 주사하였다. 3주후 같은 가토에 BSA conjugated peptide와 incomplete Freund adjuvant로 만든 유탁액으로 추가면역하였고 3주 간격으로 2차반복 하였다. 최종면역 7일후 채취한 혈청을 면역혈청으로, 같은 가토의 면역전 혈청을 음성대조군으로 사용하였다.

면역혈청의 정제

면역혈청을 정제하기 위해 맨 먼저 포화유안용액(4°C, pH7.2, 최종농도 50%)으로 침강시키고 원침으로 분리한 다음 원액의 용적 1/5의 phosphate buffered saline(PBS)에 재용해하였다. 침강후 단백용액은 같은 완충액내에서 충분히 투석시켰다. Affinity matrix는 CNBr-activated sepharose 4B (Pharmacia, 3.5 ml)와 15mg peptide 용액(0.1 M NaHCO₃, -0.5 M NaCl, pH8.3)을 혼합하고, 0.2M glycine (pH8)으로 잔여 활성군을 차단시킨 후 미흡착 peptide를 수세 제거하여 만들었다. 이어 이렇게 만든

affinity column에 면역혈청을 통과시키고 다시 수세후 thiocyanate 용액으로 용출하였다. 최종적으로 PBS로 투석후 280 nm에서 단백농도를 측정하고 다음 실험에 사용하였다. 한편 잔여 항-BSA 항체를 제거키 위해 면역혈청에 BSA (1.0 mg/ml)를 가하여 4°C 48시간 반응시킨후 원침(100,000 ×g, 1시간)하여 면역침강물을 제거하였다.

세포주 및 세포배양

세포주로 human neuroblastoma cell line인 LA-N-1 및 LA-N-5와 human promyelocytic leukemia cell line인 HL-60, 음성대조군으로 lymphoblastoid cell line인 LA 351를 배양하여 사용하였다. 이들 LA-N-1 및 LA-N-5 세포주를 배양하기 위해서는 15% fetal calf serum(FCS), glutamine, gentamicin이 함유된 Libovitz 15 medium(L 15, Flow Laboratories)를 사용하였고 HL-60 및 LA 351을 배양키 위해서는 10% FCS, glutamin, gentamicin이 함유된 RPMI 1640(Flow Laboratories)를 이용하여 5% CO₂와 37°C 온도를 유지하면서 배양하였다. 배양 용기는 25 cm² 및 75 cm² plastic tissue culture flask(Falcon, USA)를 주로 사용하고 70%의 confluency가 되었을때 한주일에 두번씩 0.01% trypsin/EDTA를 사용해 제대배양 하였다.

Radioimmunoassay (RIA)

합성펩타이드에 특이한 가토항체를 정량점사키 위해서 96 well을 가진 polystyrene microtiter plate (Titeritek, flat bottom, hard plate)에 40 µg peptide/1ml PBS 용액 (pH7.2) 및 40 µg BSA/1ml PBS 용액 (pH7.2)을 각 well 당 50 µl씩 분주한 다음 실온에서 1주야 방치하고 RIA 완충액 (PBS + 1% BSA, pH7.4)으로 충분히 3회세척 및 차단하였다. 면역혈청과 음성대조혈청 각종 희석액 (50 µl)을 각각 반응시킨 다음 (45 min, 실온), 차례로 50 µl goat anti-rabbit IgG + M(Cappel Lab, 1:400 희석액, 45 min, 실온)와 50 µl ¹²⁵I-SPA (4-5 × 10⁶ cpm/ml, 45 min, 실온)로 처리하고 충분히 세척한 후 건조시킨다. 건조된 plate는 plastic film을 분사하고 각well을 가위로 분리하여 gamma counter (Beckman) 로 측정하였다.

Immunoperoxidase Technique

암유전자산물의 발현을 관찰하기 위해 배양한 암세포들을 사용하였다. 배양세포들이 70%의 confluency가 되었을때 0.01% trypsin/EDTA를 사용해 박리후 세포액을 만들고 (1,000,000 cells/ml), cy-

tocentrifuge (Shandon Cytospin2)를 이용하여 cover glass에 부착시켰다(100,000cells/slide). 이 세포들을 2% para-formaldehyde PBS용액(4°C, 20분간)으로 고정하고 PBS로 3차례 수세한 다음 endogenous peroxidase를 차단하기 위해 phenylhydrazine (50 µl/50ml PBS)에 37°C, 1시간동안 처리시키고 PBS로 3차례 수세한 후, 항-펩타이드 항혈청으로 반응(실온, 1주야)시키고, biotin 부착 goat anti-rabbit IgG(1:200, 1시간, 실온), avidin-biotin 복합체(ABC, Vector Inc.) 순으로 반응시켰다. 마지막으로 Diaminobenzine(DAB)으로 발색하고 헤마톡실린으로 후염색한 후 검경하였다. 한편 세포질내 NSE를 관찰하기 위해 표식자인 항-NSE 가토혈청(1:3000 희석액, 미국 NIH의 Dr. Marangos로부터 공급받음)으로 실온, 1주야 처리,

biotinylated horse anti-rabbit IgG, avidin-biotin complex, DAB 순으로 반응시켰다.

성 적

항-펩타이드 면역혈청생산

합성 펩타이드가 분자생물학의 새로운 연구도구로 등장하여 면역원으로 이용이 가능하며, 강한 친수성을 나타내는 아미노산들의 집합부위가 항원결정소가 된다고 알려져 있으므로^{11,12}, Fig. 1에서와 같이 암유전자 *N-myc*의 exon2내에서 친수성이 강한 부위의 hexapeptide를 사용하였는데, 이는 저분자량물질이므로 자체만으로 항체생성이 불가능하다. 따라서 운반체단백인 BSA에 접합시킨다음 이를 면역원으로 사용하였다. 4차에 걸쳐 면역한 가토로부터 얻은 혈청은 Table 1에서 보는 바와 같이 항-펩타이드 반응뿐 아니라 항-BSA 반응을 함께 나타내었다. 이를 일차항체로 하여 세포주 LA-N-5, HL-60 및 LA351에 각각 반응시키고 그 반응여부를 immunoperoxidase 법으로 관찰하면 Table 2에서 보는 바와같이 LA-N-5와 HL-60에서는 양성 핵질 및 세포질 반응을 나타내었고 LA351에서는 양성 세포질반응만을 나타내었다. 이 면역혈청을 50% 유안으로 침강시키면 항체역가는 증가되었으나 항-펩타이드 반응과 항-BSA 반응을 함께 나타내었다. 이어 특이펩타이드가 부착된 affinity column을 통과시키면 Table 1의 결과에서와 같이 고역가의 펩타이드특이항-펩타이드반응을 나타내는 면역혈청을 얻을 수 있었다. 이 면역혈청에 다시 일정량의 BSA(1mg/ml)를 반응시켜 항-BSA항체를 침강하여 제거하면 보다 강한 항-펩타이드 특이성을 정하였다.

Table 1. Affinity purification of rabbit anti-peptide antiserum

Antiserum	Specific activity (CPM per mg protein × 10 ⁴)*	
	Anti-peptide	Anti-BSA
1. Crude rabbit anti-BSA-peptide serum	40	60
2. After precipitation of # 1 with 50% ammonium sulfate	220	240
3. After affinity purification of # 2 on Separose-peptide column	2740	450
4. # 3 but with precipitation of anti-BSA antibodies	3065	279

*Binding activity of antiserum, which was raised by immunization with BSA-peptide, was assayed by coating microtiter plates with peptide or BSA, washing, incubating with antiserum, washing, adding ¹²⁵I-protein A, washing, and then counting each well in a gamma counter. Antiserum at each level of purification was tested under conditions of antigen excess.

면역조직화학적 반응

암유전자 *c-myc*의 암유전자단백은 *c-myc* 증폭을 정하는 암세포의 핵질내에서 발현한다고 알려져

Table 2. Immunoperoxidase staining pattern of anti-peptide serum on different cell lines

Serum	Cell line					
	LA-N-5		HL-60		LA 351	
	N*	C**	N	C	N	C
1. Pre-immune serum (1:50)	-	-	-	-	-	-
2. Crude anti-peptide serum(1:50)	+	+	+	+	-	+
3. After column and BSA absorption (30µg/ml)	+	-	+	-	-	-
4. #3 after peptide (100µg) blocking	-	-	-	-	-	-

*Nuclear staining

**Cytoplasmic staining

Fig. 2. Immunohistological staining of human neuroblastoma (LA-N-5), human promyelocytic leukemia (HL-60) and lymphoblastoid (LA 351) cells with anti-peptide serum. Cytocentrifuged cells on coverslips were fixed and stained by the immunoperoxidase methods with affinity purified anti-peptide (#4 in Table 1) or with anti-NSE serum. Nuclear and nucleolar staining was observed in HL-60 (A) and LA-N-5 (C) cells (30ug/ml anti-peptide) but negative in LA 351 cells (B). When anti-peptide (30ug/ml) was preincubated with peptide, the nuclear and nucleolar staining in LA-N-5 was totally eliminated (C, anti-peptide only; D, anti-peptide plus peptide). Preincubation of anti-NSE serum (1:4000 dilution) with peptide had no effect on the staining of NSE in LA-N-5 (E, anti-NSE only; F, anti-NSE plus peptide) $\times 1000$ all.

있으나¹⁵, N-myc 특이단백질에 대해서는 확실한 연구보고가 없다. 본 실험에서는 N-myc 특이합성펩타이드로 면역하여 얻은 면역혈청을 유안침강법, affinity chromatography 등을 이용하여 정제하고 최종적으로 정제된 면역혈청 (30 µg/ml)을 배양한 세포주 LA-N-5, HL-60 및 LA 351에 각각 반응시켜 그 결과를 immunoperoxidase 법으로 관찰하였다. LA-N-5와 HL-60에서는 양성 핵질 및 핵소체반응을 나타냈는데 그 염색상의 정도는 세포에 따라 달라 heterogeneity를 보였고, 세포질은 음성을 나타내었다 (Table 2, Fig. 2A 및 Fig. 2C 참조). LA351에서는 핵질, 핵소체 및 세포질 모두 음성반응을 나타내었다 (Table 2와 Fig. 2B). LA-N-5와 HL-60에서만 특이하게 나타나는 핵질 및 핵소체반응을 항-펩타이드 항체에 의한 반응임을 증명하기 위하여 같은 면역혈청 (30 µg/ml)을 세포에 반응시키기 전, 펩타이드로 전처리 (200 µg peptide 첨가후 4°C에서 2시간 반응)하면 Fig. 3D와 같이 핵질 및 핵소체의 양성반응은 완전 소실되었다. 한편 이 펩타이드와의 전처리 침강시험이 비특이 반응을 아님을 증명하기 위해, 같은 방법으로 항-NSE 혈청 (1 : 4000 희석액)을 합성펩타이드로 전처리한 후 세포에 반응시켰던 바 NSE 양성 표준세포주 LA-N-5에서의 세포질내 NSE 염색반응은 변화되지 않았다 (Fig. 2E와 Fig. 2F).

고 찰

최근에 와서 암의 원인은 암유전자설이 크게 대두되고 있다. 암유전자가 처음으로 retrovirus에서 발견되어 (v-onc), 그 유래가 virus로 생각되었으나 v-onc와 상동한 유전자들이 정상동물세포내의 염색체내에 비활성화된 상태로 존재하며 (proto-oncogene), 이들이 amplification, translocation, mutation 및 retroviral infection 등으로 활성화되어 암을 유발한다고 믿고있다¹. 현재까지 40여종의 암유전자들이 발견되었고¹⁷, 각 종양에 특이하게 발현되고 있음이 밝혀지고 있다³. 암유전자들에 의한 암세포형질전환은 결국 최종적으로는 유전자산물인 암유전자단백의 작용에 의한 것이므로 이들에 대한 연구가 최종목표라고 생각할 수 있으나 대부분의 암유전자특이단백항원의 분리와 이에 대한 항체생성의 어려움으로 암유전자단백들의 발현 및 세포내 위치 그리고 암유발기전연구에 큰 진전을 보지 못하고 있다. N-myc 유전자는 c-myc과 부분적 상동성을 가진 일종의 proto-oncogene으로서^{4,5,6}, 염색체에 homogeneously staining region (HSR)과 double mi-

nute (DM)¹⁸를 나타내는 human neuroblastoma cell line에서 처음 발견되었다. 전혀 치료하지 않은 암환자의 primary tumor들을 이용한 연구에서 N-myc 증폭은 암의 stage와 관계있으며 stage I과 stage II에서는 전혀 일어나지 않았으나, stage III와 stage IV tumor의 50%에서 증폭을 나타내었다⁹. 이어 보고된 보다 광범위한 연구에서 N-myc 증폭은 stage와 관계없이 rapid tumor progression 및 poor clinical prognosis와 밀접한 상관관계가 있다고 보고하였다¹⁰. 이러한 일련의 연구는 이 유전자가 일부 인체암의 발생에 관계가 있음을 암시하고 있다. N-myc 유전자의 발현은 neuroblastoma¹⁹ 뿐 아니라 retinoblastoma⁴ small cell lung carcinoma⁷, teratocarcinoma 및 mouse embryo²⁰ 등에서 일어난다고 보고하였고 neuroblastoma의 경우 미분화암세포를 retinoic acid 처리로 분화시키면 N-myc RNA 발현이 저하됨을 관찰하였다²¹. 또 Nau 등⁷은 small cell lung carcinoma에서 증폭된 N-myc을 가진 세포들과 single copy의 N-myc을 가진 세포들에서 모두 고도의 N-myc RNA를 나타낸다고 보고하였고, Lee 등⁸은 single N-myc copy number를 가진 retinoblastoma 세포들에서도 N-myc RNA가 높게 발현됨을 관찰하였다. 이러한 결과들은 N-myc 증폭이 인체암에서 N-myc RNA를 발현시키는 유일한 기전은 아니며 single copy의 N-myc으로부터 RNA 전사를 조절하는 또 다른 기전이 있음을 암시하고 있는 듯 하다. 이제까지의 N-myc의 발현은 DNA : RNA 및 RNA : RNA hybridization에 기초를 둔 암유전자특이 mRNA를 측정하였으나 N-myc 단백질의 발현을 연구한 보고는 최근에 이 N-myc 단백을 연구하기 위해 Slamon 등²²이 gene cloning을 이용하여 LA-N-5 세포로부터 얻은 cDNA clone을 대장균내에서 발현시켜 N-myc 특이단백을 제조하고 이를 가토에 면역하여 만든 항체로 연구하였는데, 이 실험에 의하면 특이항체는 62-64 kilo-dalton의 단백질과 반응하였고 이는 핵내의 nuclear matrix에 주로 존재하며 그 단백질의 half life는 pulse-chase labeling method로 측정하면 30분~50분이었다고 보고하였다. 암유전자 N-myc 증폭이 환자의 예후와 밀접한 관계가 있다고 밝혀짐¹⁰에 따라 환자의 primary tumor를 사용하거나, stage IV 환자의 경우, 보다 간편한 방법으로는 골수만을 채취하여 이를 단세포군항체와 magnetic immunobead를 사용하여 암세포만을 enrich시킨다²³ 이들 세포내의 N-myc copy number를 측정하여 그 환자의 진단은 물론, 치료에 있어서 conventional therapy를 할 것인지, supralethal chemotherapy와 total body irradiation 후 골수이식술을 할

것인지 치료의 guide로써 사용하고 있다. 그러나 DNA의 조작은 복잡한 과정을 거쳐야 하며 DNA의 증폭과 mRNA의 발현 및 단백질발현은 서로 밀접한 상관관계가 있고, 또 암세포내에서의 암유전자에 의한 변화는 결국 암유전자에 의해 생산된 특이단백에 의한 것으로 추정되며, 단백질조각이 DNA조작보다 간편하므로 암유전자단백의 연구와 이를 위한 첫단계인 특이 항체생산은 그 의의가 크다고 사료된다. 본 연구에서는 N-myc 암유전자 단백질에 대한 특이항체를 생산키 위해 이미 밝혀진 N-myc 서열중 antigenic determinant가 될수있는 부위를 찾기 위해 exon 2내에서 강한 친수성을 나타내는 아미노산 집합부위를 선택하였다. 펩타이드에만 특이한 반응을 나타내는 정제된 면역혈청은(Table 1 참조) 높은 N-myc 증폭을 나타내는 표준세포주인 LA-N-5와, c-myc 증폭을 보이는 HL-60 세포주에서 전형적인 양성핵질염색반응을 나타내었는데(Table 2 및 Fig. 2 참조), 이는 본 실험에 사용한 hexapeptide가 면역원으로 작용되었을 뿐 아니라 암유전자의 한 antigenic determinant와 반응할수 있는 항체를 만들 수 있다고 추측할 수 있었으며, LA-N-5세포에서 뿐 아니라 HL-60세포에서도 양성반응을 보인 결과는 사용한 펩타이드의 서열이 Fig. 1에서와 같이 c-myc과 일치하는 것으로 예측된 결과이었다. 또 LA-N-5와 HL-60에서의 핵질내반응은 Slamon 등의 연구결과²³⁾와 일치하며 이 면역혈청이 N-myc의 단백질 발현연구에 새로운 도구로 이용될 수 있는 가능성을 보여주고 있다. N-myc 증폭의 정도가 특이단백질의 발현의 정도와 비례한다면 N-myc 증폭이 환자의 예후와 밀접한 관계가 있으므로, 복잡한 DNA 조작대신 보다 간단한 면역조직화학적방법으로 neuroblastoma 세포의 진단뿐 아니라 암유전자의 발현을 세포단위에서 관찰될 수도 있으리라 전망한다.

결 론

암유전자 N-myc의 핵산서열의 일부와 일치하는 합성펩타이드를 bovine serum albumin에 접합시킨 후 가토를 면역하여 항-펩타이드항혈청을 제조하고 이를 affinity column을 이용하여 정제한 후 neuroblastoma cell line인 LA-N-5, human promyelocytic leukemic cell line인 HL-60 및 lymphoid cell line인 LA 351 등과 반응시켜 면역조직화학적 방법으로 각 cell line내에서의 암유전자단백과의 반응을 관찰하여 아래와 같은 성적을 얻었다.

1. 6개의 아미노산으로 합성펩타이드(Glu-Asp-

Ile-Trp-Lys-Lys)는 BSA와 접합후 항체를 생산할 수 있었으며 이 면역혈청은 항-펩타이드 반응과 항-BSA 반응을 함께 나타내었다.

2. Affinity column 사용으로 정제된 항혈청은 N-myc을 증폭하는 LA-N-5와 c-myc을 증폭하는 HL-60 세포주에서 핵질 및 핵소체 반응을 정하였으며 그 반응정도는 세포에 따라 달라 heterogeneity를 보였고, LA 351에서는 음성이었다.

3. LA-N-5와 HL-60 세포들의 핵질에서 나타난 양성반응은 항혈청과 특이펩타이드를 전처리, 흡수시키면 소실되었으나 동일펩타이드는 anti-NSE 혈청과의 전처리 흡수로는 LA-N-5의 세포질내 NSE 염색반응에 전혀 영향을 주지 못하였다.

참 고 문 헌

- 1) Bishop JM: Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann. Rev. Biochem.*, **52**: 301-354, 1983.
- 2) Rovigatti UG and Astrin SM: Cellular oncogenes: Enhancement of their expression in animal and human tumors. In: Pearson ML and Sternberg NL, eds. *Gene Transfer and Cancer*. New York: Raven Press; 207-218, 1984.
- 3) Slamon DJ, deKernion JB, Verma IM and Cline MJ: Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science*, **224**: 256-262, 1984.
- 4) Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur GM, Goldstein M and Trent J: Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*, **305**: 245-248, 1983.
- 5) Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert K and Alt FW: Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell*, **35**: 359-367, 1983.
- 6) Kohl NE, Legouy E, DePinho RA, Nisen P E, Smith RK, Gee CE and Alt FW: Human N-myc is closely related in organization and nucleotide sequence to c-myc. *Nature*, **319**: 73-77, 1986.
- 7) Nau MM, Brooks BJ, Carney DE, Gazdar A F, Battey JF, Sausville EA and Minna JD:

- Human small cell lung cancers show amplification and expression of the N-*myc* gene. *Proc. Natl. Acad. USA*, **83**:1092-1096, 1986.
- 8) Lee WH, Murphee AL and Benedict WF: Expression and amplification of the N-*myc* gene in primary retinoblastoma. *Nature*, **309**: 48-60, 1984.
 - 9) Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE and Bishop JM: Amplification of N-*myc* in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*, **224**: 1121-1124, 1984.
 - 10) Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel S, Wong K and Hammond D: Association of multiple copies of the N-*myc* oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N. Engl. J. Med.*, **313**: 1111-1116, 1985.
 - 11) Sutcliffe JG, Shinnick TM, Green N and Lerner RA: Antibodies that react with predetermined sites on proteins. *Science*, **219**: 660-666, 1983.
 - 12) Hopp TP and Woods KR: Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 3824-3828, 1981.
 - 13) Walter G and Doolittle RF: Antibodies against synthetic peptides. In: Setlow JK and Hollaender A, eds. Genetic Engineering. Vol.5. New York: Plenum Press; 1983.
 - 14) Grandgenett DP, Knaus RJ and Hippenmeyer PJ: Antibodies against a synthetic peptide of the avian retrovirus pp32 protein and the B DNA polymerase subunit. *Virology*, **130**: 257-262, 1983.
 - 15) Persson H and Leder P: Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human *c-myc* oncogene. *Science*, **225**: 718-721, 1984.
 - 16) Alitalo K: Amplification of cellular oncogenes in cancer cells. *Med. Biol.*, **62**: 304-317, 1984.
 - 17) Weinberg RA: The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science*, **230**: 770-776, 1985.
 - 18) Malenbaum GB and Gilbert F: Double minute chromosomes and the homogeneously staining regions in chromosomes of a human neuroblastoma cell lines. *Science*, **198**: 739-741, 1977.
 - 19) Michitsch RW, Montgomery KT and Melera PW: Expression of the amplified domain in human neuroblastoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, **4**: 2370-2380, 1984.
 - 20) Jakobovits A, Schwab M, Bishop JM and Martin GR: Expression of N-*myc* in teratocarcinoma, stem cells and mouse embryos. *Nature*, **318**: 188-191, 1985.
 - 21) Thiele CJ, Reynolds CP and Israel MA: Decreased expression of N-*myc* precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature*, **313**: 404-406, 1985.
 - 22) Slamon DJ, Boone TC, Seeger RC, Keith D E, Chazin V, Lee HC and Souza LM: Identification and characterization of the protein encoded by the human N-*myc* oncogene. *Science*, **232**: 768-772, 1986.
 - 23) Lee H, Brodeur GM, Reynolds CP, Sather H and Seeger RC: Genomic amplification of N-*myc* in neuroblastoma cells that have metastasized in bone marrow. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **5**: 25, 1986.