

DMBA 매식과 방사선 조사로 유발된 백서 악하선 암에 존재하는 단백질에 관한 연구

서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학 교실

오 성 욱 · 최 순 철 · 박 태 원 · 유 동 수

목 차

- I. 서 론
- II. 연구재료 및 연구방법
- III. 연구성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록
- 사진부도설명
- 사진부도

I. 서 론

정상세포의 세포막은 단백질과 지질로 구성되어 있으며, 특히 세포막 표면 단백질은 당단백질로서 세포막의 수용체, 효소, 세포내외의 물질 운반, 세포와 세포의 상호작용, 그리고 항원으로서의 기능을 수행하는 역할을 하고 있다¹⁻³⁾. 이러한 정상세포가 변형세포로 되는 과정에서 원형질막 표면 단백질에 이상이 초래된다는 사실은 여러 학자들⁴⁻⁶⁾에 의하여 보고되었다. 이와 같은 표면 단백질의 변화는 세포가 변형되기 전과 다른 성질을 가지게 하며, 특히 암세포는 세포막에 나타

나는 항원성이 특이하여 이질 항원으로 인식될 수 있다는 Paul Ehrlich⁷⁾의 주장 이후로, 정상세포에서는 볼 수 없는 신생항원, 즉 종양특이항원이라는 새로운 단백질이 악성 변형 과정 중에 세포 표면에 노출된다고 보고되었다⁸⁻¹¹⁾. 최근 여러 학자들에 의하여 종양 세포막 표면에 발생하는 종양특이항원에 대한 분리, 정제 및 특성 규명을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다¹²⁻¹⁷⁾. 화학발암제에 의한 간암 유발시 발생하는 종양특이항원에 대한 연구로서 4-dimethylaminoazobenzene (DAB)에 대한 연구^{12,14)}, 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-MeDAB)에 대한 연구^{18,19)} 등이 보고되었으며, 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)에 의해 유발된 백서 피부암에서도 종양특이단백질이 존재함이 보고되었다^{20,21)}. 특히 Baldwin 등¹⁴⁾은 DAB로 유발시킨 백서의 간암을 백서 복강내에 이식시킨 후 papain으로 처리하여 원형질막 종양특이항원을 분리, 그 분자량이 55 KDa이라고 발표한 바 있으며, Natori 등¹⁵⁾은 생쥐에서 methylcholanthrene (MCA)에 의해서 유발된 섬유육종 원형질막으로부터 Nonidet P-40을 이용하여 종양특이항원을 분리, 분자량이 70 KDa이라고 보고하였다. Pellis 등²²⁾은 같은 섬유육종 원형질막으로부터 3M KCl 추출 전에 trypsin으로 처리하여 분자량 40 KDa과 75 KDa에 해당하는 2가지 종양특이항원을 보고한 바 있다. 그러나 이러한 연구결과는

* 본 연구 논문은 1996년도 서울대학교병원 지정진료 공동연구비 지원에 의한 것임

그 분리과정에서 papain으로 처리하거나 비극성 용매나 trypsin으로 처리한 다음, 그 특성의 일부를 보고하였을 뿐으로, 이들에 의하여 분리된 종양특이항원은 완전한 형태의 것이 아닌 종양특이항원의 일부일 것으로 생각되고 있다^{26,27)}. 또한 이와 관련된 연구로서 Stevens 등²³⁾은 방사선조사에 의해 유도된 백서 소장암과 DMBA 매식에 의해 유도된 백서 대장암으로부터 형성된 공통 oncofetal 단백질을 확인하였고, Stonehill²⁴⁾은 생쥐에서 자연적으로 발생하거나 RNA 바이러스와 화학발암제 뿐만 아니라 방사선조사에 의해 유도되는 종양에서도 암관련 태아 항원(tumor-associated fetal antigen; TFA)이 발견될 수 있음을 보고하였다.

이와 같이 정상세포가 악성종양으로 변형되는 과정에서 세포표면에 존재하는 항원의 변화가 일어난다는 사실은 현재까지 많이 알려져 있다. 종양세포에서 발현되는 종양세포 표식 인자를 찾아내고 그 성질을 밝히려는 많은 노력이 계속되고 있으며 이러한 노력으로 종양으로 변형되는 과정을 근본적으로 이해하고 이 종양특이항원을 이용하여 암의 진단과 치료에 사용하려는 연구가 대단히 활발하다³⁶⁻⁴¹⁾.

화학 발암제나 방사선에 의해 유발되는 종양이나 혹은 자연적으로 발생하는 종양에서는 종양특이항원이 매우 다양하여 서로간에 교차반응이 거의 관찰되지 않는 것으로 보고되었고²⁵⁻²⁷⁾ oncogenic virus에 의해 유발되는 종양인 경우에만 교차 반응하는 종양특이항원이 있는 것으로 알려져 있었으나^{28,29)} 최근 몇 년간에 화학 발암제 및 방사선에 의해 유발된 종양이나 자연 발생된 종양에서도 역시 교차 반응하는 종양특이항원이 발견되었다고 보고되었다³⁰⁻³⁵⁾. 이러한 종양 공통 특이항원에 대한 항체를 abrin³⁶⁾, ricin³⁷⁻³⁹⁾, diphtheria toxin의 A-chain⁴⁰⁾과 결합시켜 immunotoxin을 만들거나 항암제를 함유하는 liposome⁴¹⁾에 삽입시켜 이것을 종양을 일으킨 동물에 투여함으로써 숙주동물에 독성을 줄이면서 종양세포에 항암제를 선택적으로 전달시켜 항암작용을 높이려는 연구가 활발하다.

그러나 이와 같은 많은 관심과 노력에도 불구하고 아직까지 종양특이항원의 생화학적 특성뿐

만 아니라 물리, 화학적 특성에 대해 밝혀진 것은 많지 않다. 그 중 지금까지 밝혀진 것으로는 자연 발생된 사람의 난소암에서 당단백질로서 분자량 48 KDa인 종양특이항원이 존재한다고 보고되었고¹⁶⁾, 사람의 흑색종과 급성 백혈병에서 당단백질로서 분자량 90 KDa인 종양특이항원이 나타난다고 보고되었다¹⁷⁾. 또한 화학발암제인 2-acetylaminofluorene (AAF), diethylnitrosamine (DNA)과 3'-MeDAB의 유도에 의해 생성된 백서의 간암에서 분자량 66 KDa (pI 6.79), 73 KDa (pI 7.58)과 73 KDa (pI 7.81)인 종양특이항원이 발견되었다고 보고하였다¹⁹⁾.

본 실험에서는 화학 발암제인 DMBA매식과 방사선 조사를 병행하여 암 발생 시기를 단축시키고 발생 빈도를 증가시키며 이때 유도 발생된 악하선 종양 조직의 세포막 단백질에 종양특이항원 단백질이 존재함을 증명하고 이 단백질의 특성을 규명하고자 본 실험을 실시하였다.

II. 연구재료 및 연구방법

1. 실험동물

체중 100g 내외의 Sprague-Dawley계 웅성 백서를 실험 동물로 사용하였으며 실험 기간 중 쥐 사료(제일제당)를 투여하였다.

2. 악하선 종양 유발

Cataldo와 Shklar⁴²⁾의 방법에 따라 외과적 수술처리에 의해 vesicle이나 carrier 없이 40 mg의 DMBA를 순수한 형태로 백서 악하선에 매식하고 방사선 조사는 Guerrero 등⁴³⁾과 Yuan 등⁴⁾의 방법으로 방사선 조사기 (Philips linear accelerator SL-75-5)를 사용하여 실온에서 선량을 350 cGy/min 으로 20 Gy를 매주 1회씩 3주 동안 총 조사량 60 Gy를 조사하여 종양 유발 기간을 단축하고 종양 발생 빈도를 높이고자 하였다.

DMBA 매식과 방사선 조사 4주 후부터 30주까지 매주 백서를 희생시켜 암 발생을 유도한 악하선과 정상 악하선을 떼어 냈다.

3. 백서 악하선 세포로부터 세포막 단백질 추출 및 정량

가) 단백질 추출

세포막 표면 단백질은 Stevens 등⁴⁵⁾의 방법에 따라 3M KCl 용액으로 추출하였다. 악하선을 절단한 후 혈액과 고름을 제거하기 위하여 생리식염수로 여러 번 세척하였고 무게를 측정 한 다음, 멸균된 수술용 가위로 잘게 절단하였다. Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 용액을 가하여 Sorvall 원심분리기 (Du Pont Co., U.S.A.)에서 SS-34 rotor를 이용하여 5,000 × g로 세 번 세척하여 PBS에 녹아 나온 여러 물질과 세포질 용액을 제거하고 남아 있는 침전물에 PBS, pH 7.4 용액에 녹인 3M KCl 용액을 조직 g당 2ml씩 가하고 4°C에서 18시간 진탕하였다. 같은 원심분리기에서 SS-34 rotor를 이용하여 20,000 × g에서 50분간 원침한 다음 상층액을 초원심분리기 (Hitachi Koki Co., Tokyo, Japan)에서 RP-80T-3 rotor를 이용하여 110,000 × g에서 90분간 원침하여 상층액을 4°C에서 18시간 투석하였다. 이 때 500 volumes의 PBS, pH 7.4 용액을 세 번 교환하여 투석하였다. 투석된 용액은 초원심분리기에서 동일한 원심분리법을 사용하여 110,000 × g에서 90분간 원침시켜 상층액을 2ml씩 분주하여 -70°C에서 보관하였다.

나) 단백질 정량

Bradford⁴⁶⁾의 방법에 따라 단백질 추출액을 적당량 (단백질 양이 10-100 µg 사이) 취하여 증류수로 100 µl가 되게 조정 한 다음 단백질 시료 5 ml를 가하고 5분 후에 분광광도계로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 용액으로는 bovine serum albumin용액을 사용하였다. 단백질 시료는 Coomassie brilliant blue G-250 100 mg을 95% ethanol 50 ml에 녹이고, 여기에 85% (W/V) phosphoric acid 100 ml를 가한 후 1 l까지 증류수로 희석하였다.

4. Polyacrylamide gel(PAG) 전기영동 및 Sodium dodecyl sulfate(SDS)-PAG 전기영동

Polyacrylamide gel 전기영동은 Smith⁴⁷⁾의 방

법으로 slab gel을 사용하여 PROTEIN II Slab 과 Tube Electrophoresis Cell (Bio-Rad Lab., Calif., U.S.A.)를 사용하여 실시하였다. 분리된 gel (12%, 70 ml)은 monomer용액 [30% acrylamide, 0.8% N,N'-methylene-bis-acrylamide (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)] 28.0 ml, 1.5 M Tris-HCl 완충액 (pH 8.8) 8.1 ml, 재증류수 23.7 ml를 혼합하여 진공펌프로 공기를 제거한 후 tetramethylethylenediamine [TEMED (Bio-Rad Lab., Calif., U.S.A.)] 0.07 ml, 20% ammonium persulfate 0.175 ml를 첨가하여 실온에서 중합시켰다. 누적된 gel (4%, 20ml)은 monomer 용액 2.6 ml, 0.5 M Tris-HCl 완충액 (pH 6.8) 2.5 ml, 재증류수 14.9 ml를 넣어서 공기를 제거한 후, TEMED 0.01 ml, 20% ammonium persulfate 0.05 ml를 첨가하고, 분리된 gel위에 comb를 설치한 후 누적된 gel 용액을 부어 중합시키고, comb를 제거하고 well을 영동조 완충액 (0.063 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3)으로 씻었다. 단백질 시료는 시료완충액 [0.125 M Tris-HCl 완충액 (pH 6.8), 10% glycerol, 0.024% bromophenol blue] 0.2 ml와 혼합하여 잘 섞은 후 전기영동하였으며 전기영동은 20 mA의 일정 전류로 4°C에서 시행하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)으로 염색하였으며 30% methanol-10% acetic acid 용액에서 탈색하였다.

단백질의 분자량을 조사하기 위해 SDS-PAG 전기영동을 시행하였으며 그 과정은 SDS만 제외하고 PAG 전기영동과 동일하였다. 이때 분리된 gel (12%)과 누적된 gel (4%) 및 영동조 완충액의 SDS 농도가 0.1% 되게 하였으며 시료 완충액은 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol이 되도록 하고 단백질 시료는 시료 완충용액과 혼합한 후 100°C에서 2분간 처리한 후 전기영동을 하였다.

5. 종양 관련 단백질의 분리

종양 관련 단백질의 분리는 Abramovitz 등⁴⁸⁾의 reverse polarity elution 방법으로 분리하였다.

악하선 종양 세포로부터 3M KCl로 추출된 원형 질막 표면 단백질을 PAG 전기영동한 후 PAG 전기영동상에서 확인된 종양관련 단백질에 해당하는 단백질대를 각각 잘라낸다. reverse polarity elution을 하기 위해 두께 3.0 mm slab gel model SE 600 (Hoefer Scientific Instruments., San Francisco, U.S.A.)을 사용하였다. Tris-glycine 영동조 완충액 (0.192 M glycine, 0.05 M Tris, pH 8.6)으로 5% supporting gel을 만든 후 종양관련 단백질대를 그 위에 올려놓고 5% acrylamide gel로 굳혔다. 그리고 투석막을 유리판 위에 올려놓고 용액이 새지 않도록 잘 조인 후 10 mA의 일정 전류로 4°C에서 18시간동안 시행하였다. 이때 전류는 lower buffer chamber는 “+”로, upper buffer chamber는 “-”로 일반적인 전기영동과 반대방향으로 가하였다.

6. 토끼의 항혈청 분리

체중 2kg이상 되는 뉴질랜드 백색 웅성 토끼를 사용하였다.

가) 항원접종

Reverse polarity elution 방법을 통해 분리한 종양 관련 단백질을 complete Freund's adjuvant와 잘 섞어 유제를 만든 후 토끼의 피하조직에 주사하였다. 일차접종 2주후 단백질을 각각 incomplete Freund's adjuvant와 잘 섞어 유제를 만든 후 피하 주사하였고 다시 일주일 간격으로 삼차, 사차접종을 했다.

나) 항혈청 분리

사차접종 일주일 후에 18시간 금식시킨 후 채혈하여 5,000 × g에서 10분간 원심분리하여 항혈청을 분리하였다.

7. Double immunodiffusion

84 mm × 94 mm 수평 유리판 위에 0.02% sodium azide가 함유된 PBS 용액에 녹인 1% agarose 용액을 붓고 고정시킨 후 outwell 6개와 center well 1개를 만들었다. 3M KCl로 추출된

막 단백질과 토끼에서 만들어진 항혈청을 이용하여 double diffusion을 실시하여 항원 단백질들간의 면역학적 특성을 조사하였다. Outwell에는 10-40 μg씩 가하고 humidity chamber에서 48시간동안 상온에서 확산시켰다. 확산이 끝난 후 0.1 M NaCl 용액으로 agarose plate를 세척하여 침전되지 않은 단백질을 제거하고 여러 겹의 여과지를 agarose plate 위에 놓고 가압하여 수분이 제거된 얇은 필름을 만들었다. 45% ethanol-10% glacial acetic acid 용액에 녹인 0.5% Coomassie brilliant blue R-250 염색용액으로 5-10분간 염색한 후 45% ethanol-10% glacial acetic acid 용액으로 탈색하였다.

8. Immunoelectrophoresis (IEP)

84 mm × 94 mm 수평 유리판 위에 0.02% sodium azide가 함유된 PBS 용액에 녹인 1% agarose 용액을 붓고 고정시킨 후 LKB Bromma well set의 Tygon Class VI puncher로 well을 만들었다. 3 M KCl로 추출한 막단백질을 20 μg씩 well에 가하였다. 영동 완충액은 0.06 M sodium barbital, pH 8.6 용액을 사용하였으며, LKB사의 Multiphor II system을 사용하여 horizontal electrophoresis를 시행하였다. 여과 흡수지를 양극에 연결한 후 plate cm당 10 V의 전압을 가하여 2시간 동안 음극에서 양극으로 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝난 후 agarose plate의 well 사이에 trough (2 mm × 52 mm)를 만들고 항혈청을 2배 희석하여 100 μl씩 가한 후 humidity chamber 안에서 48시간동안 상온에서 확산시켰다. 그 이후의 과정은 double immunodiffusion과 동일하게 시행하였다.

9. Western blotting

PAG 전기영동 후 gel의 반을 절단하여 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 나머지 반은 Towbin 등⁴⁹⁾의 방법에 따라 nitrocellulose (NC) paper에 electroblotting 하였다. 즉 전기영동이 끝난 후, gel을 transfer buffer (0.02 M Tris, 0.19 M glycine, 20% methanol, pH

8.3)에 넣고 60분간 서서히 흔들어 준 후 transfer buffer로 충분히 적신 NC paper를 올려놓고 이것을 transfer buffer가 들어 있는 tank에 넣고 NC paper로 단백질이 transfer되도록 gel쪽은 “-”로 NC paper는 “+”로 전극을 연결하였다.

10. Alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody의 반응

NC paper에 Western blotting한 후 alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody (APCA) 반응을 Blake 등⁵⁰⁾의 방법을 수정하여 시행하였다. 즉 NC paper를 0.5% Tween 20, 0.5% bovine serum albumin (BSA)이 포함된 PBS-Tween-BSA에 30분씩 두 번 담가두었다. PBS-Tween-BSA 용액으로 토끼의 항혈청을 1/500로 희석한 용액에 NC paper를 담가 3시간 동안 상온에서 서서히 흔들어 준 후 PBS-Tween-BSA 용액으로 5분 간격으로 세 번 세척하였다. PBS-Tween-BSA 용액으로 alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody (Sigma Chemical Co., St Louis, U.S.A.)를 1/500로 희석하여 NC paper와 2시간 동안 상온에서 서서히 흔들어 항원 항체 반응을 시킨 후 PBS-Tween 용액으로 5분 간격으로 세 번 세척하였고 그후 0.15 M veronal acetate (pH 9.6), 0.5 mg/ml 5-bromo-4-chloro-indoxyl phosphate, 0.1 mg/ml 4-nitrotetrazolium, 4 mM MgCl₂ 용액으로 37°C에서 10분간 시행하였다.

III. 연구성적

1. 종양유발 및 병리학적 소견

백서 악하선에 DMBA를 매식시키고 방사선을 조사한 8주 후부터 악하선의 크기가 증가하였고 시간이 경과할수록 그 크기는 점점 더 증가하였으며 DMBA 매식 및 방사선 조사를 시행한 모든 악하선에서 악성 종양이 유발되는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 1).

2. Polyacrylamide gel(PAG) 전기영동 및 SDS-PAG 전기영동

악하선으로부터 3M KCl을 이용하여 세포 원형질막 단백질을 추출한 후 PAG 전기영동과 SDS-PAG 전기영동하였을 때 DMBA매식과 방사선 조사 8주 후부터 단백질대의 양상이 일정함을 관찰할 수 있었다 (그림 2와 3). DMBA 매식 후 PAG 전기영동상에 단백질 A가 4주 경과 후부터 나타나기 시작하였으며 10주 경과 후부터 단백질 B가 새로 나타나는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 2). SDS-PAG 전기영동상에서 69 KDa, 50 KDa, 43 KDa, 35 KDa, 및 32 KDa에 해당하는 새로운 단백질대가 나타났으며 고분자량을 갖는 단백질대가 증가하는 현상을 관찰할 수 있었다 (그림 3).

3. 종양 관련 단백질의 분리 및 분자량

DMBA매식 및 방사선 조사에 의해 유발된 악하선 종양에서 새롭게 나타나는 단백질 (그림 2 - A와 B)은 reverse polarity elution으로 두 번 반복하여 각각 분리 확인하였다 (그림 4). 분리한 종양 관련 단백질은 SDS-PAG 전기영동을 실시하여 Weber 및 Osborn⁵¹⁾의 방법에 따라 분자량을 조사했을 때 단백질 A는 69,000과 35,000 dalton인 두 개의 단백질대가, 단백질 B는 50,000 dalton으로 한 개의 단백질대가 관찰되었다. (그림 5).

4. Double immunodiffusion 및 immunoelectrophoresis(IEP)

토끼에서 종양 관련 단백질의 항혈청을 채혈하여 정상적인 악하선과 DMBA 매식 및 방사선 조사에 의해 유도된 악하선 종양에서 3M KCl로 추출한 막단백질과 double immunodiffusion을 시행했을 때 종양에서만 연결된 침전대가 나타났다 (그림 6). 또한 IEP를 시행했을 때도 종양에서만 침전대가 형성되었다 (그림 7). 정상백서와 19일된 태내백서의 여러 조직에서 추출한 단백질과 항혈청 A에 double immunodiffusion을 실시했을 때 침전대는 형성되지 않았으나 항혈청 B의 경우에는 정상 백서의 간과 태내 백서

의 간에서 추출한 단백질에서 침전대가 형성되었다 (그림 8).

5. Alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody (APCA) 반응

Double immunodiffusion과 IEP 방법으로 조사한 종양 관련 단백질의 항원성과 분자량을 APCA 반응으로 확인하였다. APCA 반응으로 나타난 NC paper 위의 단백질대 위치와 PAG 전기영동상의 단백질대의 위치가 동일하게 나타났으며 (그림 9) 분자량을 조사하기 위해 실시한 SDS-PAG 전기영동상의 위치와도 동일하게 나타났다 (그림 10). 종양 관련 단백질 A를 APCA 반응시켰을 때 PAG 전기영동상의 위치보다 더 천천히 이동한 단백질대가 하나 더 나타났는데 (그림 9 ←) 아마도 종양 관련 단백질 A는 이 단백질의 소단위이거나 용해가 덜 된 것으로 추정된다.

6. Native protein A와 B의 분자량 조사

Hedrick과 Smith⁵²⁾의 방법에 따라 gel 농도 6-12%하에서 PAG 전기영동을 실시하여 native proteins의 분자량을 조사하였다. 분자량과 상대적 이동거리의 관계로부터 얻은 기울기와 분자량의 대수 값을 이용하여 standard curve를 그렸을 때, native protein A는 분자량 96,000, native protein B는 53,000 dalton으로 조사되었다 (그림 11).

IV. 총괄 및 고안

악성 종양은 자연적으로 발생할 수 있을 뿐 아니라 여러 종류의 화학 발암제 및 방사선 조사에 의해서 유도될 수 있다. 화학발암제 및 방사선 조사에 의한 악성 종양 유발은 각종실험 동물의 제기관에서 관찰되었다. DAB, MCA, 3'-MeDAB, 또는 DMBA 등의 화학발암제와 방사선 조사에 의해 간암이 유발될 수 있으며 DMBA와 방사선 조사에 의해서 피부암과 소장암도 유발될 수 있다.

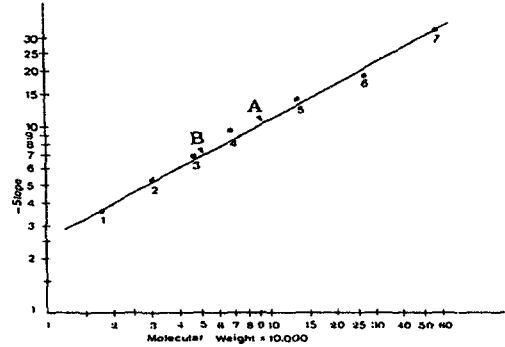


Figure 11.

Analysis of protein molecular weights by PAGE. Molecular weights of protein A and B were 96,000 and 53,000 dalton respectively. 1: α -lactalbumin (14,200), 2: carbonic anhydrase (30,000), 3: egg albumin (45,000), 4: bovine albumin (monomer: 66,000), 5: bovine albumin (dimer: 132,000), 6: urease (trimer: 272,000), 7: urease (hexamer: 545,000)

이와 같이 화학 발암제 및 방사선 조사에 의한 악성 종양의 발생이 Kotin⁵³⁾은 다음과 같이 6단계를 거쳐 형성된다고 보고하였다.

- 제1단계 : 화학발암제 및 방사선에 의한 핵에서의 상호작용
- 제2단계 : 효과적인 수복과정
- 제3단계 : genome의 변형에 의한 비정상적인 단백질의 생성
- 제4단계 : 악성 변형의 진행과 세포 손상의 심화
- 제5단계 : 변형 세포에서 악성 종양으로 이행되기 위해서 세포피가 형성되는 결정적 시기
- 제6단계 : 종괴 형성 이후, 종양의 자연스러운 과정을 거친다.

이러한 악성 종양으로 변형되는 과정 중에 나타나는 비정상적인 단백질이 종양특이항원으로 작용할 수가 있다.

본 실험에서 백서의 악하선에 DMBA를 매식하고 방사선을 조사한 후 8주 후에 외형적으로 종괴가 인식되고 병리학적으로 악성 종양조직으로 판명되었으며(그림 1) 4주와 8주 사이에서는

정상과 다르며 악성 종양과도 다른 전기영동상이 관찰되었는데(그림 2와 3) 아마도 이 시기가 Kotin⁵³⁾이 제안한 중간단계의 시기이기 때문으로 사료된다. 또한 DMBA 매식 및 방사선 조사 4주 후부터 종양 관련 단백질 A가 나타나 28주까지 그 양이 거의 일정하였으나 종양 관련 단백질 B는 8주 후부터 나타나기 시작해서 24주 후까지는 증가현상을 보이다가 그 이후부터 그 양이 감소하는 경향을 보였다(그림 2). 이같은 이유는 단백질 A는 종양으로 되는 과정 중 매우 빠른 시기에 표현되고 안정된 단백질이지만 단백질 B는 악성 종양이 된 후부터 합성되고 시간이 지남에 따라 양이 적어지거나 빨리 분해되는 것으로 생각된다.

이러한 정상세포의 종양화에 따라 종양특이항원이 나타나는 데도 몇 가지 경우를 생각할 수가 있다. 첫번째, 종양세포에만 존재하며 특히 숙주 개체나 동계 동물의 개체발생의 과정에서 한 번도 나타난 적이 없는 새로운 종양 항원이 출현하는 경우^{17,18,20)}, 두번째, 개체 발생의 초기에는 존재하였으나 성숙동물에서는 없는, 즉 적어도 종양이 발생하는 시점에서는 볼 수 없었던 항원이 역분화의 과정에서 미분화 세포가 다시 출현하는 tumor-associated fetal antigens (TAFA)의 경우^{14,54,55)}, 세번째, 종양이 발생한 정상 조직에서는 존재하지 않지만 다른 조직에서 존재하는 tissue type specificity를 가지는 경우^{56,57)}, 네번째, 종양 숙주 자체나 동계의 동물에는 존재하지 않으나 다른 동물에는 정상으로 존재하는 항원이 나타나는 경우 등이 있다. 그러나 첫번째의 경우를 제외하고 나머지는 종양 숙주 자체에 대해서는 특이성이 있다고 할 수 있으나 엄밀한 의미에서는 첫번째 경우에만 종양특이항원이라 할 수 있다. 따라서 첫번째를 제외한 경우에는 tumor associated antigen이며 이것을 지배하는 유전자가 정상세포에서는 silent gene으로 존재하나 일단 종양으로 변하면 나타나는 것으로 간주되기 때문이다.

화학발암제 및 방사선 조사에 의해 유발된 종양에서 종양특이항원은 MCA로 유발된 육종에서 처음 보고되었으며⁵⁸⁻⁶⁰⁾, 그후 Klein 등⁶¹⁾에 의해 종양특이항원이 존재함이 증명되었고 전자의

실험이 종양과 숙주 사이의 조직 적합성에서 기인하지는 않는 것임을 확인하였다. 그러나 화학 발암제와 방사선 조사에 의해 유발된 종양에서는 종양특이항원이 각 개체마다 서로 다르다고 알려졌으며 똑같은 세포에서 유래된 종양에서도 서로 다른 종양 특이 단백질을 갖고 있어 공통항원이 없다고 하였다⁶⁰⁾. 이와는 달리 화학 발암제에 의해서 유발된 종양에서도 종양특이항원이 공통항원으로 존재한다는 보고도 있다⁶²⁻⁶⁵⁾. 본 실험에서 악하선 종양으로부터 분리된 단백질 A는 SDS-PAG 전기영동상에서 분자량 69,000과 35,000 dalton인 두 개의 소단위로 나타났지만 PAG 전기영동상 (native한 상태)에서는 분자량 96,000 dalton으로 조사되었다. 그러나 단백질 B는 SDS-PAG 전기영동상에서 분자량 50,000 dalton이지만 PAG 전기영동상 (native한 상태)에서는 53,000 dalton으로 조사되었다. APCA 반응 결과에 나오는 것으로 미루어 아마도 단백질 A는 분자량 69,000과 35,000 dalton인 두 개의 소단위로 구성되어 있고 단백질 B는 분자량 50,000-53,000 dalton인 하나의 소단위로 구성된 것으로 생각된다. 분자량 96,000 dalton인 단백질 A (SDS-PAG상에서는 68,000 + 35,000 = 103,000)와 분자량 53,000 dalton인 단백질 B (SDS-PAG상에서는 50,000)의 항원성 조사를 위해 뉴질랜드 백색토끼에서 항혈청을 얻은 후 IEP와 double immunodiffusion을 시행한 결과 단백질 A는 정상백서와 태내백서의 여러 기관에는 존재하지 않는 종양특이항원으로 확인되었고 단백질 B는 정상 백서와 태내백서의 간에서만 특이하게 나타나는 암 관련 단백질로 확인되었다.

V. 결 론

화학 발암제인 DMBA 매식과 방사선 조사로 유발된 백서 악하선 종양에서 종양 세포의 원형질막 표면 단백질의 변화를 규명하기 위해 3M KCl 용액으로 추출한 악하선 종양세포의 표면 단백질로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 종양세포의 원형질막 단백질을 추출하여 PAG 및 SDS-PAG 전기 영동을 시행한 결과

- 정상 악하선에서 나타나지 않는 단백질 A와 B가 새롭게 나타났다.
2. 단백질 A는 악하선에 DMBA매식과 방사선 조사를 시행한 4주 후부터 나타나기 시작하여 28주까지 그 양이 거의 일정하였으며 단백질 B는 10주 후부터 나타나기 시작하여 24주가 경과한 후에 사라졌다.
 3. 단백질 A는 PAG 전기 영동상에서 분자량 96,000 dalton으로 SDS-PAG 전기 영동상에는 그 분자량이 각각 69,000과 35,000 dalton에 해당하는 2개의 소단위로 구성되어 있었다. 단백질 B는 PAG 전기 영동상에서 분자량 53,000 dalton으로 SDS-PAG 상에서는 50,000 dalton으로 나타났고 하나의 소단위로 구성되어 있었다.
 4. Immunoelectrophoresis 및 double immunodiffusion 시행 결과 단백질 A는 정상 백서 및 태내백서의 여러 기관에서는 발견되지 않는 종양특이단백질로, 단백질 B는 정상 백서 및 태내백서의 간에서도 나타나는 암 관련 단백질로 조사되었다.

참고문헌

1. Hirst GK: Absorption of influenza hemagglutinins and virus by red blood cells. *J Exptl Med* 76:195-203, 1942.
2. Talmidge KW, Burger MM: Biochemistry of carbohydrates. Whelan WJ, ed. Butterworth, London, 1975, p42.
3. Hughes RC: Membrane glycoproteins. Butterworth London. 1976.
4. Wu HC, Meezan E, Black PH, Robbins PW: Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. I. Glucosamine-labeling patterns in 3T3, spontaneously transformed 3T3, and SV-40-transformed 3T3. *Biochemistry* 8:2509-2517, 1969.
5. Reutter W, Bauer C: Mechanisms of regulation. In Morris hepatoma. Morris HP, Cariss WE (eds), Plenum, New York, 1978, p405.
6. Vischer P, Reutter W: Specific alterations of mucoprotein biosynthesis in the plasma membrane of Morris hepatoma. *Eur J Biochem* 84: 363-368, 1978.
7. Ehrlich P: Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. In the Collected Papers of Paul Ehrlich. Vol II, Pergamon Press, London, 1957, p550.
8. Old LJ, Boyse EA: Immunology of experimental tumors. *Ann Rev Med* 15:167-197, 1964.
9. Sjögren HO: Transplantation methods as a tool for detection of tumor specific antigens. *Prog Exptl Tumor Res* 6:289-322, 1965.
10. Klein G: Tumor-specific transplantation antigens. *Cancer Res* 28:625-635, 1968.
11. Law LW: Studies of the significance of tumor antigens in induction and repression of neoplastic diseases. *Cancer Res* 29:1-21, 1969.
12. Baldwin RW, Barker CR, Embeton MJ, Glaves D, Moore M, Penim MV: Demonstration of cell-surface antigens on chemically induced tumors. *Ann N Y Acad Sci* 177:268-278, 1971.
13. McCollester DL: Isolation of meth A cell surface membrane processing tumor-specific transplantation antigen activity. *Cancer Res* 30:2832-2840, 1970.
14. Baldwin RW, Harris JR, Price MR: Fractionation of plasma membrane-associated tumor-specific antigen from an aminoazo dye-induced rat hepatoma. *Int J Cancer* 11:385-397, 1973.
15. Natori T, Law LW, Appella E: Biological and biochemical properties of Nonidet P-40 solubilized and partially purified tumor-specific antigens of the transplantation type from plasma membranes of a methylcholanthrene-induced sarcoma. *Cancer Res* 37:3406-3413, 1977.
16. Bhattacharya M, Chatterjee SK, Barlow JJ: Identification of a human cancer-associated antigen defined with monoclonal antibody. *Cancer Res* 44: 4528-4534, 1984.
17. Real FX, Furukawa KS, Mattes MJ, Gusik SA, Cordon-Cardo C, Oettgen HF, Old LJ, Lloyd KO: Class 1 (unique) tumor antigens of human melanoma: Identification of unique and common epitopes on a 90-KDa glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci* 85:3965-3969, 1988.
18. Lim IK: A study of plasma membrane surface proteins of transformed rat liver cells induced by 3'-methyl 4-dimethyl-aminoazobenzene(Thesis). Seoul, Yonsei University, 1982.
19. Kim YS, Hahm KS, Kim KS, Lee NJ: Characterization of tumor specific antigens on the plasma membrane surface of rat hepatomas induced 3'-MeDAB and identification of the common tumor specific antigens from rat hepatomas induced by different chemical hepatocarcinogens. *Yonsei Med J* 29:17-28, 1988.

20. Ménard S, Colnaghi MI, Della Porta G: In vitro demonstration of tumor-specific common antigens and embryonal antigens in murine fibrosarcomas induced by 7,12-dimethylbenz [a]anthracene. *Cancer Res* 33:478-481, 1973.
21. Park KK, Kim YS: Tumor associated proteins of rat skin tumor induced by 7,12-dimethylbenz [a]anthracene. *Yonsei Med J* 30:219-234, 1989.
22. Pellis NR, Shulan DJ, Kahan BD: Specificity of tumor immunity induced with soluble materials: purification of antigens inducing tumor resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 1251-1258, 1976.
23. Stevens RH, Cole DA, Cheng HF: Identification of a common oncofetal protein in X-ray and chemically induced rat gastrointestinal tumors. *Br J Cancer* 43:817-825, 1981.
24. Stonehill EH, Benedich A: Retrogenetic expression: The reappearance of embryonal antigens in cancer cells. *Nature* 229:370-381, 1970.
25. Foley EJ: Antigenic properties of methylcholanthrene induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res* 13:835-837, 1953.
26. Prehn RT: Failure of immunization against tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* 26:223, 1961.
27. Kellen JA, Lo AC, Kolos TO: Immunoelectrophoretic analysis of DMBA-induced rat mammary tumors. *Oncology* 25:401-409, 1971.
28. Rapp F, Butel JS, Tevethia SS, Katz M, Melnick JL: Antigenic analysis of tumor and sera from animals inoculated with paraadenovirus populations. *J Immunol* 97:833-839, 1966.
29. Klein G: Defense reactions in action. In immunology the science of self-nonsel self discrimination. New York, Wiley-Interscience Publication, 641, 1982.
30. Fritze D, Kern DH, Humme JA, Drogemüller CR, Pilch YH: Detection of private and common tumor-associated antigens in murine sarcomas induced by different chemical carcinogens. *Int J Cancer* 17:138-147, 1976.
31. Economou GC, Takelchi N, Boone CW: Common tumor rejection antigens in methylcholanthrene-induced squamous cell carcinomas of mice detected by tumor protection and a radioisotopic footpad assay. *Cancer Res* 37:37-41, 1977.
32. Jamasbi RJ, Nettesheim P: Demonstration of cross-reacting tumor rejection antigens in chemically induced respiratory tract carcinoma in rats. *Cancer Res* 37:4059-4063, 1977.
33. Leffell MS, Coggin JH: Common transplantation antigens on methylcholanthrene-induced murine sarcomas detected by three assays of tumor rejection. *Cancer Res* 37:4112-4119, 1977.
34. Galloway DR, Imai K, Ferrone S, Reisfeld RA: Molecular profiles of human melanoma-associated antigens. *Fed Proc* 40:231-236, 1981.
35. Fortner GW, Takemoto LJ, Shehi L, Hansen JS: Identification of tumor-associated antigens of ultraviolet light-induced tumors using antitumor antibodies developed in ascites fluid. *Cancer Res* 42:2371-2374, 1982.
36. Weissmann G, Bloomgarden D, Kaplan R: A general method for the introduction of enzymes, by means of immunoglobulin-coated liposomes, into lysosomes of deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:88-92, 1975.
37. Houston LL, Nowinski RC: Cell-specific cytotoxicity expressed by a conjugate of ricin and murine monoclonal antibody directed against thy 1.1 antigen. *Cancer Res* 41:3913-3917, 1981.
38. Raso V, Ritz J, Basala M, Schlossman SF: Monoclonal antibody-ricin A-chain conjugate selectively cytotoxic for cells bearing the common acute lymphoblastic leukemia antigen. *Cancer Res* 42:457-464, 1982.
39. Vitetta ES, Krolick KA, Miyama Inaba M, Cushley W, Uhr JW: Immunotoxins: a new approach to cancer therapy. *Science* 219:644-650, 1983.
40. Bernhard MI, Foon KA, Oeltmann TW, Key ME, Hwang KM, Clarke GC, Christensen WL, Hoyer LC, Hanna MG, Oldham RK: Guinea pig line hepatocarcinoma model: characterization of monoclonal antibody and in vivo effect of unconjugated antibody and antibody conjugated to diphtheria toxin A-chain. *Cancer Res* 43: 4420-4428, 1983.
41. Shin YS, Paik EM, Ahn YH, Kim BS, Kim YS: Anticancer effect of liposome incorporated with methotrexate and antibody against tumor specific surface antigen of rat hepatoma. *Yonsei Med J* 30:246-255, 1989.
42. Cataldo E, Shklar G: Chemical carcinogenesis in the hamster submaxillary gland. *J Dent Res* 43:53, 1977.
43. Guerrero I, Calzada P, Mayer A, Pellicer A: A molecular approach to leukemogenesis: mouse lymphomas contain an activated c-ras oncogene. *Proc Natl Acad Sci* 81:202-205, 1984.
44. Yuan J, Yeasky TM, Rhee MC, Glazer PM: Frequent T:A→G:C transversion in X-irradiated mouse cells. *Carcinogenesis*, 16:83-88, 1995.
45. Stevens RH, Englund CW, Osborne JW, Richerson HB, Cheung HF: Circulating onco-fetal protein accompanying radiation induced small bowel adenocarcinoma in the rat. *J Natl Cancer Inst* 55:1011-

1013, 1975.

46. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.
47. Smith BJ: SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In *Method in Molecular Biology Vol. I Proteins*. Walker JM(ed), Humana Press, New Jersey, 1984, p 41.
48. Abramovitz AS, Randolph V, Mehra A, Christakos S: Recovery of native proteins from preparative electrophoresis gel slices by reverse polarity elution. *Prepara Biochem* 14:205-221, 1984.
49. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 76:4350-4354, 1979.
50. Blake MS, Johnston KH, Russell-Jones GJ, Gottschlich EC: A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* 136:175-179, 1984.
51. Weber K, Osborn M: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244: 4406-4412, 1969.
52. Hedrick JL, Smith AJ: Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch Biochem Biophys* 126:155-164, 1968.
53. Kotin P: Carcinogenesis Dose-response relationship and threshold concepts. *Ann NY Acad Sci* 271:22-28, 1976.
54. Borsos T, Richardson AK, Ohanian SH, Leonard EJ: Immunochemical detection of tumor-specific and embryonic antigens of diethylnitrosoamine induced guinea pig tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1955-1960, 1973.
55. Evans DL, Parker DV, Frank MK: Biochemical and physical characterization of tumor- associated fetal antigens. *Cancer Res* 39:2006- 2015, 1979.
56. Hellström I, Hellström KE, Sjögren HO, Warner GA: Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasms of various histological types. *Int J Cancer* 7:1-16, 1971.
57. Hellström I, Sjögren HO, Warner GA, Hellström KE: Blocking of cell-mediated tumor immunity by sera of patients with growing neoplasms. *Int J Cancer* 7:226-237, 1971.
58. Gross L: Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res* 3:326, 1943.
59. Skerrow D: The structure of prekeratin. *Biochem Biophys Res Commun* 59:1311-1316, 1974.
60. Prehn RT, Main JM: Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 18:768, 1957.
61. Klein G, Sjögren HO, Klein E, Hellström KE: Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 20:1561-1572, 1960.
62. Koldvsky P, Svoboda J: Cross-reaction between benzpyrene-induced tumors in rat and mice. *Folia Biol* 9:233, 1963.
63. Reiner J, Southam CM: Evidence of common antigenic properties in chemically induced sarcomas of mice. *Cancer Res* 27:1243-1247, 1967.
64. Holmes EC, Morton DL, Schidlovsky G, Trahan E: Cross reacting tumor-specific transplantation antigens in methylcholanthrene-induced guinea pig sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 46:693-700, 1971.
65. Forbes JT, Nakao Y, Smith RT: Tumor-specific immunity to chemically induced tumor: Evidence for immunologic specificity and shared antigenicity in lymphocyte responses to soluble tumor antigens. *J Exptl Med* 141:1181-1200, 1975.

-ABSTRACT-

TUMOR-ASSOCIATED PROTEINS IN RAT SUBMANDIBULAR GLAND INDUCED BY DMBA AND IRRADIATION

Sung-Ook Oh, Soon-Chul Choi, Tae-Won Park, Dong-Soo You

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Seoul National University

This study was performed in order to identify changes of the plasma membrane proteins in rat submandibular gland tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene [DMBA] and X-irradiation. Two kinds of tumor associated membrane proteins (protein A and B) were isolated with 3 M KCl extraction from rat submandibular gland tumors induced by DMBA and X-irradiation. To identify their antigenicities, immunoelectrophoresis and double immunodiffusion was carried out with various proteins extracted from liver, heart, skin and pancreas of adult rats and from embryonic liver, heart and skin.

The rabbit antisera against the protein A did not cross-react with any of the proteins extracted from the above mentioned tissues, suggesting that protein A might be tumor specific antigen. However, the rabbit antisera against protein B was precipitated with proteins extracted from the liver of adult and embryonic rats.

Polyacrylamide gel electrophoresis of these two proteins (A and B) showed that protein A was a dimer with molecular weights of 69,000 and 35,000 dalton, whereas protein B was a monomer with molecular weight of 50,000 dalton.

Key words : Irradiation, DMBA, Tumor associated membrane proteins, Immunoelectrophoresis, Double immunodiffusion, Tumor specific antigen

논문사진부도 설명

- Figure 1.** Histopathologic findings of normal submandibular gland and transformed submandibular gland.
Panel I: Normal submandibular gland
Panel II: Transformed submandibular gland by DMBA implantation and irradiation for first three weeks (Total dose : 60 Gy). (H. E., x 100)
- Figure 2.** Patterns of PAGE of the proteins extracted from normal and transformed submandibular gland.
The rats were sacrificed from fourth week (T4) to twenty eighth week (T28) after treatment with DMBA and irradiation.
- Figure 3.** Patterns of SDS-PAGE of normal and transformed submandibular gland.
Lane N: Normal submandibular gland.
Lane T4-T28: Transformed submandibular gland.
Lane S: Standard molecular weight marker. a: bovine serum albumin (67,000), b: egg albumin (45,000), c: carbonic anhydrase (30,000), d: trypsinogen (20,000)
Arabic numbers (1, 2, 3, 4, and 5): Newly appeared protein bands on the SDS-PAGE.
- Figure 4.** Protein patterns on the PAGE.
The proteins were eluted with reverse polarity method.
Lane N: Normal submandibular gland.
Lane T: Transformed submandibular gland.
Lane U: Eluted samples from protein A
Lane L: Eluted samples from protein B
- Figure 5.** Protein patterns on the SDS-PAGE.
The proteins were eluted with reverse polarity method.
Protein A is a dimer with molecular weights of 69,000 (A1) and 35,000 (A2) dalton and protein B is a monomer with molecular weight of 50,000 dalton.
Lane N: Normal submandibular gland. Lane T: Transformed submandibular gland. Lane U: Gel eluted samples from protein A. Lane L: Gel eluted sample from protein B. Lane S: Standard molecular weight markers. a, phosphorylase b (94,000); b, bovine serum albumin (67,000); c, ovalbumin (43,000); d, carbonic anhydrase (30,000); e, trypsin inhibitor (20,000); f, α -lactalbumin(14,400).
- Figure 6.** Patterns of double immunodiffusion between antisera and membrane proteins extracted from normal and transformed submandibular gland.
Results of double immunodiffusion show that membrane proteins (t) extracted from transformed submandibular gland cross-react only with the rabbit antisera (A and B) against protein A and B.
Panel I: Double immunodiffusion with anti-protein A antisera.
Panel II: Double immunodiffusion with anti-protein B antisera.
c : Membrane proteins extracted from normal submandibular glands.
t : Membrane proteins extracted from transformed submandibular gland.
- Figure 7.** Patterns of immunoelectrophoresis between antisera and membrane proteins extracted from normal and transformed submandibular gland.
Membrane proteins of transformed submandibular gland cross-react with antisera A and B.
A: Antisera against protein A.

B: Antisera against protein B.

c: Membrane proteins extracted from normal submandibular glands.

t: Membrane proteins extracted from transformed submandibular glands.

Figure 8. Patterns of double immunodiffusion between antisera and membrane proteins of various tissues of rats.

The rabbit antisera against protein A cross-react only with membrane proteins of transformed submandibular gland (Panel I, II), antisera B cross react not only transformed submandibular gland but also normal adult and embryonic rat liver (Panel III, IV).

Panel I: c, normal submandibular gland: t, transformed submandibular gland : h, normal rat heart: k, normal rat kidney: l, normal rat liver: p, normal rat pancreas.

Panel II: e, nineteen days old embryo: h, embryonic heart: l, embryonic liver: s, embryonic skin

Panel III: h, normal rat heart: l₁, normal rat liver: l₂, embryonic liver: k, normal rat kidney

Panel IV: h, embryonic heart: l₁, normal rat liver: l₂, embryonic liver: s, embryonic skin

Figure 9. Western blotting of protein A and B after PAGE.

The extracted membrane proteins were analyzed by 10% PAGE, and transferred to NC paper. After final reaction with alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody, antigenic protein bands (A and B) were detected.

Panel I: Patterns of 10% PAGE and its transfer to NC paper.

Panel IIa: Western blotting of protein A

Panel IIb: Western blotting of protein B

Figure 10. Western blotting of protein A and B after SDS-PAGE.

The extracted membrane proteins were analyzed by 12% SDS-PAGE and transferred to NC paper. After final reaction with alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody, protein A1, A2 and B were detected.

Lane S: Standard molecular weight marker

Lane N: Membrane proteins extracted from normal submandibular glands

Lane T: Membrane proteins extracted from transformed submandibular gland.

Lane Ae: Eluted sample of protein A

Lane Be: Eluted sample of protein B

Panel I: Patterns of SDS-PAGE

Panel II: Western blotting of protein A and B after SDS-PAGE

논문사진부도 ①

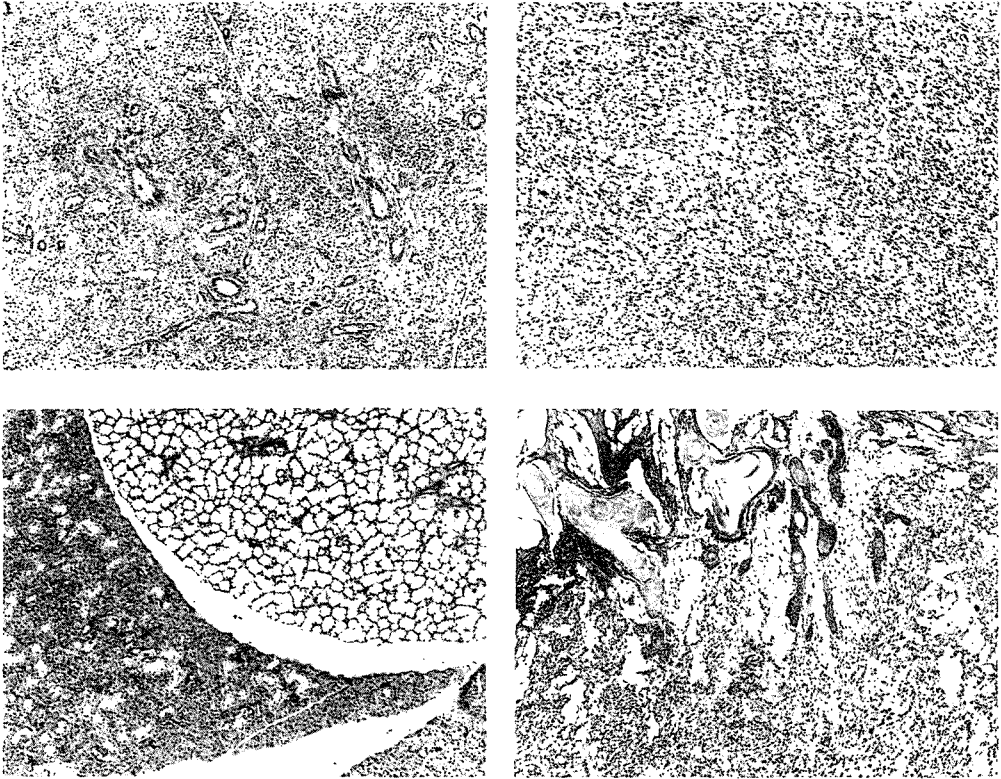


Figure 1

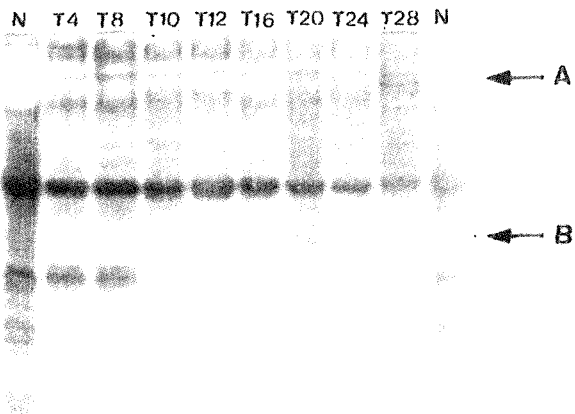


Figure 2

논문사진부도 ②

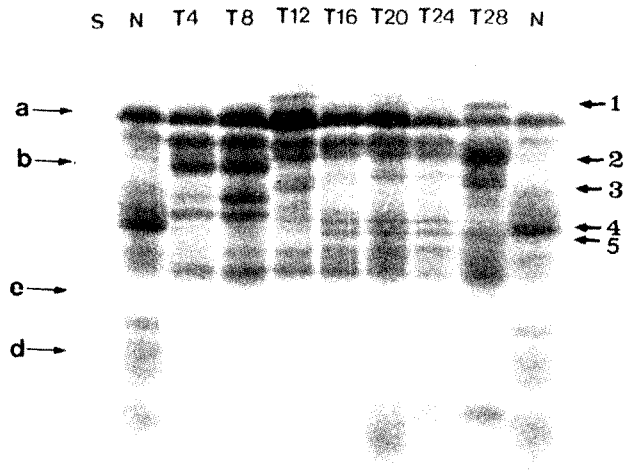


Figure 3

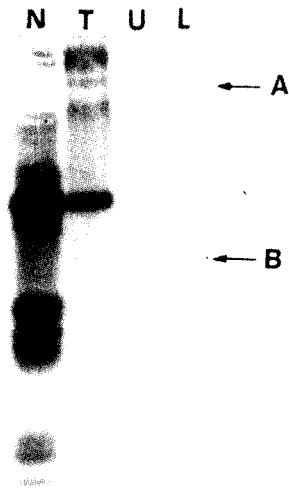


Figure 4

논문사진부도 ③

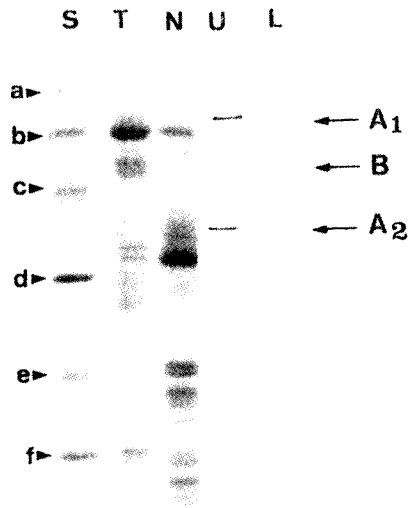


Figure 5

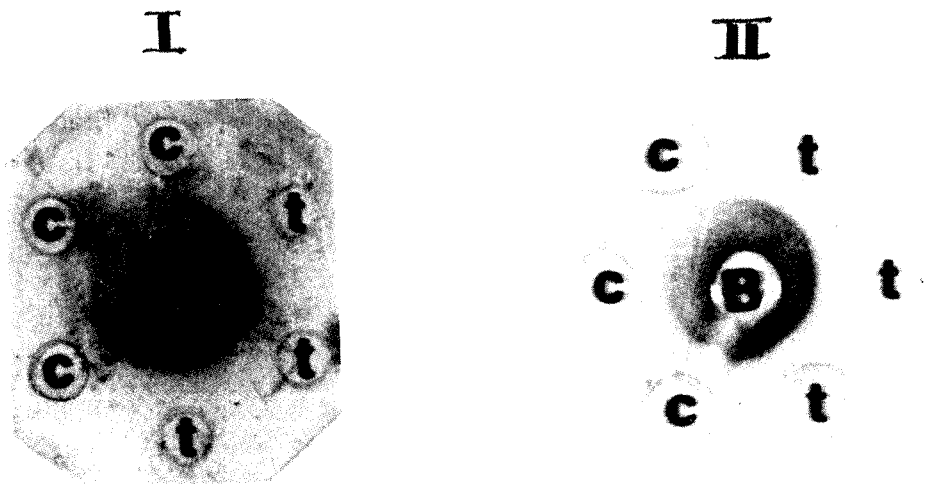


Figure 6

높은차진부도 ④

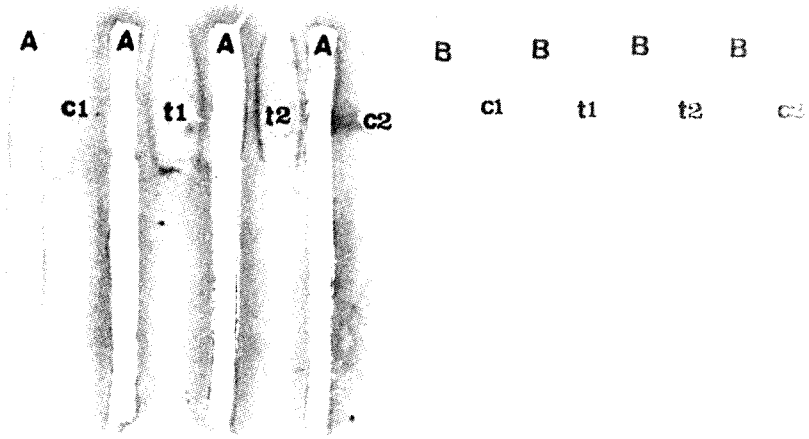


Figure 7

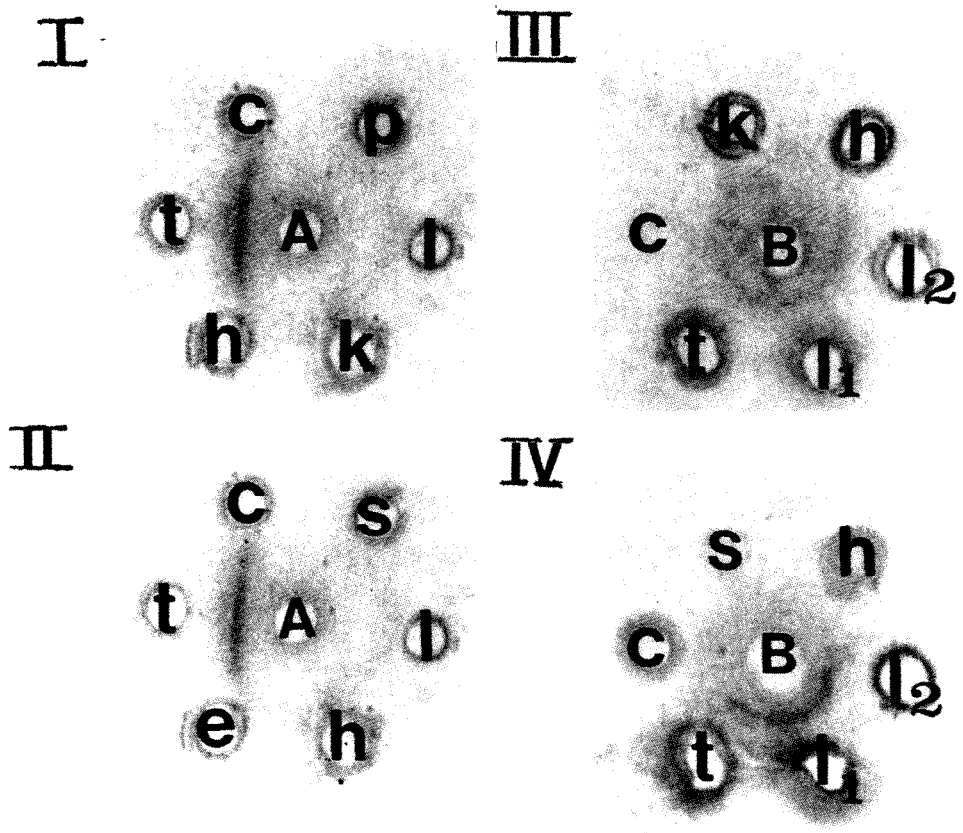


Figure 8

논문사진부도 ⑤

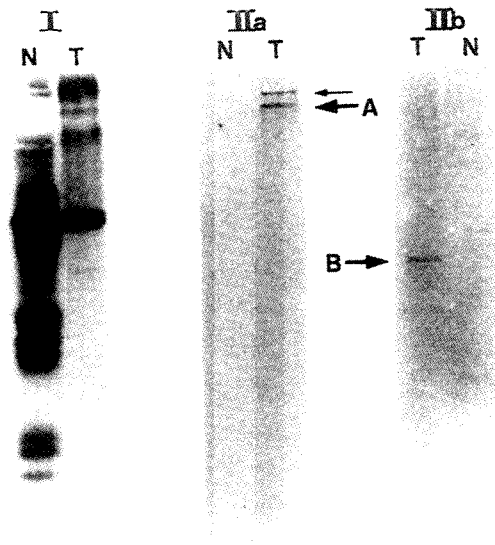


Figure 9

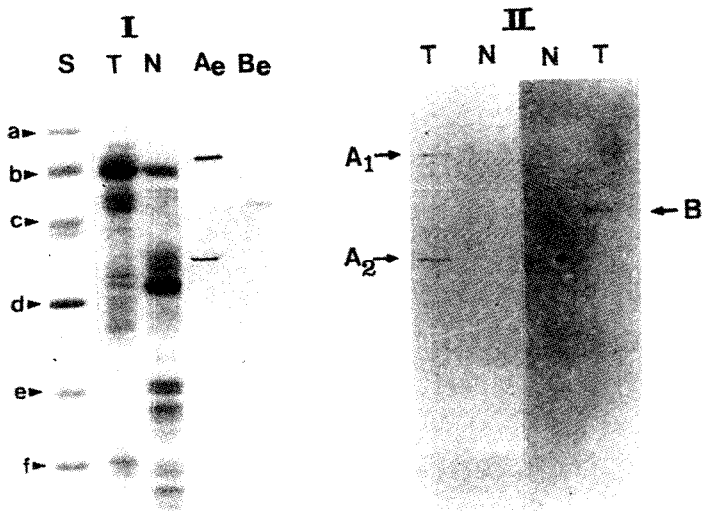


Figure 10