



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0013213
(43) 공개일자 2018년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57484 (2013.01)
G01N 33/57438 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0096587
(22) 출원일자 2016년07월29일
심사청구일자 2016년07월29일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김기광
충청남도 청양군 장평면 묵은논길 67
(74) 대리인
최규환

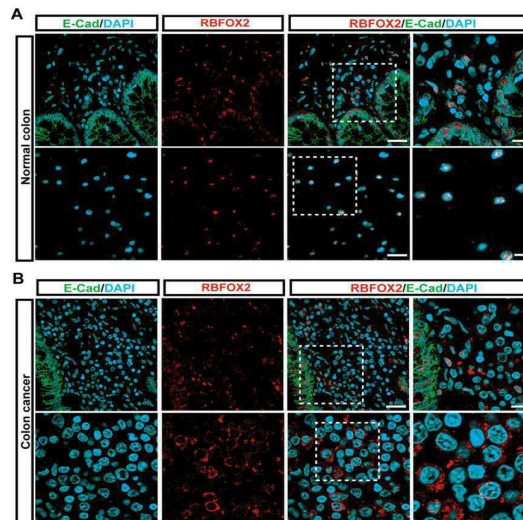
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 알비폭스 2 단백질 항체를 유효성분으로 함유하는 소화기계 암 진단용 조성물 및 키트

(57) 요약

본 발명은 알비폭스 2 단백질 항체를 유효성분으로 함유하는 소화기계 암 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용하는 진단 방법에 관한 것으로, 상세하게는 정상세포에서는 핵에서만 발현되는 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질이 소화기계 암세포에서는 핵뿐 아니라 세포질에서 발현되는 것을 이용한 소화기계 암 진단용 조성물과 이를 이용한 소화기계 암 진단방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 혈액 내의 단백질 발현량을 측정하는 방법에 비해 의심되는 암 조직 및 그 주변조직의 세포질 내에 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량을 확인하는 방법으로 보다 높은 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)를 갖는 소화기계 암 진단을 가능케 하였다. 따라서 소화기계 암 진단에 매우 효과적일 뿐만 아니라, 새롭게 발굴되는 다른 암종의 후보마커로 적용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/57446 (2013.01)

G01N 33/6854 (2013.01)

G01N 2800/50 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

검체에 함유되어 있는 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 유효성분으로 포함하는 소화기계 암 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 검체는 소화기계 암이 의심되는 환자로부터 분리한 조직인 것을 특징으로 하는 소화기계 암 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질은 암세포 발생에 의해 핵에서 세포질로 이동하는 것을 특징으로 하는 소화기계 암 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 소화기계 암은 위암, 대장암, 간암, 췌담도암, 식도암 및 구강암 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 소화기계 암 진단용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체는 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 특이적인 폴리클로날 또는 모노클로날 항체; 또는 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 결합도메인을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 항체의 일부 절편;인 것을 특징으로 하는 소화기계 암 진단용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 특이적으로 인식하는 항체에 결합하는 2차 항체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 소화기계 암 진단용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 소화기계 암 진단용 조성물을 포함하는 소화기계 암 진단용 키트.

청구항 8

- (1) 소화기계 암 의심 환자로부터 암이 의심되는 조직 및 정상조직으로 추정되는 그 주변조직을 획득하는 단계;
- (2) 상기 획득된 암이 의심되는 조직 및 그 주변조직에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 특이적으로 인식하는 항체와 반응시키는 단계;
- (3) 상기 단계 (2)의 반응으로부터, 암이 의심되는 조직 및 그 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 각 함량을 측정하는 단계; 및
- (4) 상기 단계 (3)에서, 암이 의심되는 조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량과 암이 의심되는 조직의 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량을 비교하여, 암이 의심되는 조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 함량이 그 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량보다 높을 경우, 암으로 판별하는 단계;를 포함하는 소화기계 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 단계(3)에서 암이 의심되는 조직 및 그 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 함량은 항원-항체반응을 통해 측정하는 것을 특징으로 하는 소화기계 암 진단에 필요한 정보를 제공하

는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 항원-항체 반응은 면역형광현미경분석법(immunofluorescent microscopy)을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 소화기계 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알비폭스 2 단백질 항체를 유효성분으로 함유하는 소화기계 암 진단용 조성물 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 소화기계 암은 소화기계에 발생한 암으로 소화기계는 구강에서 시작하여 인두, 식도, 위, 소장과 대장 및 항문을 포함한다. 국가 암 정보센터의 암 통계 자료에 의하면 2013년 한국에서 가장 자주 발생한 암은 갑상선암이었으며, 이어서 위암, 대장암, 폐암, 유방암, 간암, 전립선암의 순으로 발생하는 것으로 나타났다. 또한, 남자의 경우에는 위암, 대장암, 폐암, 간암 및 전립선암 순으로, 여자의 경우에는 갑상선암, 유방암, 대장암, 위암 및 폐암 순으로 발생하였다. 이와 같이 소화기계인 위장과 대장에서 발생하는 소화기계 암은 한국에서 빈번하게 발생하는 것으로 나타났다.

[0003] 또한, 세포는 열 등의 스트레스를 받았을 때, 번역과정을 잠시 멈춤으로써 생리활성을 조절하는데, 이는 스트레스 상황에서는 번역과정에 오류가 생길 위험이 크므로 번역과정을 정교하게 조절하기 위해서 번역이 일어나지 않는 것이다. 이러한 조절과정은 주로 번역과정의 초기에 이루어지며, eIF2 α 의 활성 조절이 중요한 것으로 알려져 있다. 즉 세포가 스트레스를 받았을 때, eIF2 α 의 인산화가 일어나고, eIF2 α 의 인산화는 세포 내의 mRNA, 번역개시자 및 다양한 리보핵산 결합 단백질들이 스트레스 그라눌(Stress granule; SGs)이라는 세포질 내의 부위에 모이게 함으로써 세포의 번역과정을 억제 및 조절하게 하는 것이다.

[0004] 일반적으로, 고형 암의 발달과정에서 암세포는 기존의 혈관에 의지하여 빠르게 증식하며, 이에 따른 빠른 대사과정은 공급되는 산소와 영양분을 초과하게 되므로, 암세포는 저 산소, 고 삼투압 및 영양분의 고갈 등 어려운 환경에 처하게 된다. 또한, 빠른 증식속도와 단백질 생합성의 조절장애로 인하여 ER 스트레스가 발생하며, 이는 단백질의 잘못된 접힘(misfolding)을 발생시킨다.

[0005] 또한, 암세포는 저 산소, 고 삼투압 및 영양분 고갈 등의 어려운 환경에 대하여 짝 풀림 해당과정(uncoupling glycolysis)을 통하여 적응하게 되며, 이로 인하여 높은 수준의 활성산소(reactive oxygen species; ROS)가 발생하게 되며, 스트레스 그라눌(SG)을 통한 전사 후 조절과정(post-transcriptional mechanism)은 암세포가 혹독한 환경을 살아남는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Stress granules, P-bodies and cancer., Biochim Biophys Acta. 2015 Jul;1849(7):861-70.).

[0006] 한편, 전구체 mRNA(pre mRNA)의 대체 스플라이싱(alternative splicing)은 하나의 유전자에서 다양한 mRNA를 생산하고 이를 통하여 하나의 유전자에서 아주 약간씩 다른 동위체의 단백질을 만든다. 이러한 대체 스플라이싱은 세포의 종류, 세포의 발생단계, 또는 외부환경에 따른 cis-조절인자(regulatory element)와 리보핵산 결합 단백질(RNA-binding protein; RBP)에 의해 조절된다.

[0007] 알비폭스(RNA-binding Fox; Rbfox) 군(family)은 대체 스플라이싱(alternative splicing)을 조절하는 리보핵산 결합 단백질(RBP) 중 하나이며, 중추신경계 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 알비폭스(RNA-binding Fox; Rbfox) 군(family)은 알비폭스 1(Rbfox1), 알비폭스 2(Rbfox2), 알비폭스 3(Rbfox3)으로 구성된다. 알비폭스 1(Rbfox 1) 또는 알비폭스 3(Rbfox3)이 특정조직에서만 발현되는 것과는 달리 알비폭스 2(Rbfox 2)는 다양한 조직에서 줄기 세포단계(stem cell stage)에서부터 발현되는 특징을 나타낸다(Isoform-specific proteasomal degradation of Rbfox3 during chicken embryonic development., Biochem Biophys Res Commun. 2014 Aug 8;450(4):1662-7).

[0008] 알비폭스 단백질 관련 기술의 일례로, 미국공개특허 제2015-0167082호에 알비폭스 1(Rbfox1)의 SNP 분석을 통한 자폐 발생 경향 혹은 발생 여부를 진단하는 방법을 개시하고 있으나, 본 발명의 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 항체를 유효성분으로 함유하는 소화기계 암 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용하는 진단방법에 대한 기술은 개시

된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 알비폭스 2 단백질 항체를 유효성분으로 함유하는 소화기계 암 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용하는 진단 방법을 제공하고, 상기 유효성분인 알비폭스 2(Rbfox2)가 암 조직에서는 핵에서 세포질로 이동하여 세포질에서 발현이 증가한다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 검체에 함유되어 있는 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 유효성분으로 포함하는 소화기계 암 진단용 조성물을 제공하며, 이를 포함하는 소화기계 암 진단용 키트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 (1) 소화기계 암 의심 환자로부터 암이 의심되는 조직 및 정상조직으로 추정되는 그 주변조직을 획득하는 단계;

[0012] (2) 상기 획득된 암이 의심되는 조직 및 그 주변조직에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 특이적으로 인식하는 항체와 반응시키는 단계;

[0013] (3) 상기 단계 (2)의 반응으로부터, 암이 의심되는 조직 및 그 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 각 함량을 측정하는 단계; 및

[0014] (4) 상기 단계 (3)에서, 암이 의심되는 조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량과 암이 의심되는 조직의 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량을 비교하여, 암이 의심되는 조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 함량이 그 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량보다 높을 경우, 암으로 판별하는 단계;를 포함하는 소화기계 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 검체에 함유되어 있는 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 유효성분으로 포함하는 소화기계 암 진단용 조성물 및 이를 이용한 소화기계 암 진단방법에 관한 것으로, 상세하게는 정상세포에서는 핵에서만 발현되는 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질이 대장암 세포에서는 핵뿐 아니라 세포질에서 발현되는 것을 이용한 소화기계 암 진단용 조성물과 이를 이용한 소화기계 암 진단방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 혈액 내의 단백질 발현량을 측정하는 방법에 비해 소화기계 암 세포질 내의 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 발현 양상을 확인하는 방법으로 보다 높은 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)를 갖는 소화기계 암 진단을 가능케 하였다. 따라서 소화기계 암 진단에 매우 효과적일 뿐만 아니라, 새롭게 발굴되는 다른 암 종의 후보 마커로 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1의 (A)는 헬라(HeLa) 세포에 아비산염을 처리하여 스트레스를 가하였을 때, 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질은 핵뿐 아니라, 세포질에서 발현하는 것을 확인한 것으로, SFPQ 단백질(splicing factor, poly-glutamine rich)은 대조구로서, 알비폭스 2와는 달리 스트레스의 여부에 따른 변화가 없다는 것을 확인한 결과이고, 도 1의 (B)는 헬라(HeLa) 세포에 아비산염을 처리하였을 때, 스트레스 그레놀을 특징짓는 TIA-1 단백질과 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질이 세포질의 같은 위치에서 발현하는 것을 확인한 결과이며, 도 1의 (C)는 헬라(HeLa)세포에 아비산염을 처리하였을 때, 스트레스 그레놀을 특징짓는 G3BP1 단백질과 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질이 세포질의 같은 위치에서 발현하는 것을 확인한 결과이다.

도 2의 (A)는 정상 대장조직의 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질이 핵 내에 발현함을 확인한 결과이며, 도 2의 (B)는 대장암 조직의 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질이 핵뿐 아니라 세포질 내에서 발현하는 것을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 검체에 함유되어 있는 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 유효성분으로 포함하는 소화기계 암 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 상기 소화기계 암은 위암, 대장암, 간암, 췌담도암, 식도암 및 구강암 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 아니한다.
- [0019] 상기 '검체'는 암 발병에 의해 암 진단 마커 단백질(본 발명에서는 특히 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질) 발현이 핵에서 세포질로 이동하는 것을 나타내는 조직; 전혈, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨 등의 체액;인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않으며, 더 바람직하게는 암이 의심되는 환자로부터 분리한 병소(종양) 부위의 조직 및 그 주변조직일 수 있다.
- [0020] 또한, 상기 '암이 의심되는 환자로부터 분리한 병소(종양) 부위의 조직 및 그 주변조직'은 당 업계에 공지된 생체검사(biopsy) 방법에 의해 채취될 수 있다.
- [0021] 상기 알비폭스 2(Rbfox2)는 FOX2, fox-2, HNRNPBP2, HRNPBP2, RBM9, RTA, dj106I20, fxx으로도 알려져 있으며, NCBI gene ID 23543일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 상기 알비폭스 2(Rbfox2)는 정상세포에서는 핵 내에 발현되나, 대장암 세포에서는 세포질의 스트레스 그레눌(SG)에서도 발현되는 것이 특징이다.
- [0023] 상기 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 발현 여부를 측정하는 물질은 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 특이적인 항체 또는 앵타머인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 항체이지만 이에 한정하지 않는다. 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질과 특이적으로 결합하는 물질 또는 대장 조직 또는 혈청 내에 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 측정할 수 있는 것이라면, 어느 것이든 무방하게 사용할 수 있다.
- [0024] 본 발명에서의 항체는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 임의의 이소타입, 예컨대 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE의 모노클로날 항체(전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체, 키메라 항체 및 항체 단편을 포함한다. 특정 항원과 반응성인 항체는 재조합 방법, 예컨대 파지 또는 유사 벡터 내의 재조합 항체의 라이브러리의 선별에 의해, 또는 항원 또는 항원-코딩 핵산으로 동물을 면역화시킴으로써 생산할 수 있다. 바람직한 항체는 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 특이적으로 인식하는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체, 또는 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 결합 도메인을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 항체의 일부 절편이지만, 이에 한정하지 않는다.
- [0025] 또한, 본 발명에서 특이적으로 결합하는 1차 항체 이외에 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 특이적으로 인식하는 항체에 결합하는 2차 항체를 더 포함할 수 있으며, 본 발명의 항체는 감지 또는 검출하는 효소, 형광물질, 방사선 물질 및 단백질 등과 같은 다양한 분자와 결합하여 변형될 수 있다. 변형된 항체는 화학적으로 항체를 변형하여 수득할 수 있고, 이러한 변형 방법은 당 업계에 통상적으로 사용되는 방법이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 소화기계 암 진단용 조성물을 포함하는 소화기계 암 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0027] 상기 소화기계 암 진단용 키트는 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질과 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 (1) 소화기계 암 의심 환자로부터 암이 의심되는 조직 및 정상조직으로 추정되는 그 주변조직을 획득하는 단계;
- [0029] (2) 상기 획득된 암이 의심되는 조직 및 그 주변조직에 중 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질을 특이적으로 인식하는 항체와 반응시키는 단계;
- [0030] (3) 상기 단계 (2)의 반응으로부터, 암이 의심되는 조직 및 그 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 각 함량을 측정하는 단계; 및
- [0031] (4) 상기 단계 (3)에서, 암이 의심되는 조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량과 암이 의심되는 조직의 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량을 비교하여, 암이 의심되는 조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 함량이 그 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량보다 높을 경우, 암으로 판별하는 단계;를 포함하는 소화기계 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관

한 것이다.

- [0032] 상기 단계 (3)에서, 암이 의심되는 조직 및 그 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량은 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질과 특이적으로 결합하는 물질의 상호작용을 측정하는 일반적인 항원-항체 반응에 의해 탐지될 수 있다. 이러한 일반적 항원-항체반응에 따른 분석방법으로는 면역크로마토그래피(immunochromatography), 면역조직화학적 염색법(immunohistochemical staining), 효소면역항체법(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA), 효소면역분석법(enzyme immunoassay, EIA), 형광면역측정법(florescence immunoassay, FIA), 섬광면역측정법(luminescence immunoassay, LIA), 웨스턴 블랏팅(Western blotting), 단백질 칩(protein chip), 형광 활성화 세포선택장치(fluorescence activated cell sorter, FACS)법 및 면역형광현미경분석(immunofluorescent microscopy) 중에서 선택된 어느 하나의 방법으로 측정할 수 있는 것이 특징이다.
- [0033] 바람직하게는 상기 단계 (3)에서, 암이 의심되는 조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량과 암이 의심되는 조직의 그 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질 함량을 비교하는 방법은 암이 의심되는 조직 및 그 주변조직의 세포질에 함유된 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질에 대한 면역형광현미경분석을 수행하여, 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 세포질 함량을 육안으로 대조하는 것이다.
- [0034] 상기 방법에 의하면, 암 조직과 정상조직의 구분이 가능한 것이 특징이다. 즉 암 병변부위의 세포질에서 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질에서 발현되는 반면, 정상조직에서는 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질이 핵에서만 발현되어, 암 발병 판단에 필요한 정보를 제공하는 것이다.
- [0035] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.
- [0036] **실시예 1. 헬라(HeLa) 세포주의 배양**
- [0037] 헬라(HeLa) 세포주(ATCC로부터 구입)은 10%(v/v) 소 태아 혈청(fetal bovine serum)을 포함한 DMEM 배지를 이용하여 37℃, 5%(v/v) 이산화탄소 조건에서 배양 및 유지하였다.
- [0038] **실시예 2. 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 스트레스 그라눌에서의 발현 확인**
- [0039] 상기 실시예 1의 헬라(HeLa) 세포주에 아비산염 0.5mM을 30분간 처리한 후, PBS(phosphate buffered saline, pH7.4)로 아비산염이 처리된 헬라(HeLa) 세포주를 세척해준 후, 10%(v/v) 소 태아 혈청(fetal bovine serum)을 포함한 DMEM 배지를 이용하여 37℃, 5%(v/v) 이산화탄소 조건에서 24시간 동안 배양 및 유지하였다.
- [0040] 상기 실시예 1의 헬라(HeLa) 세포주 및 아비산염을 처리한 헬라(HeLa) 세포를 4% 파라포름알데히드로 10분 동안 고정한 후, 0.5%(v/v) 트리톤 X-100(triton X-100)을 15분간 처리하여 세포의 투과성을 증가시킨 후, non-reactive blocking 염색은 5%(w/v) 소 혈청 알부민이 포함된 Tris-buffered saline(pH 6.0)으로 1시간 처리함으로써 차단하였다.
- [0041] SFPQ 단백질에 대한 1차 염소 다중클론 항체를 PBS(phosphate buffered saline, pH7.4)에 1:1,000의 비율로 희석시킨 것을 4℃에서 24시간 배양하였다. 또한, G3BP1 단백질에 대한 1차 염소 다중클론항체를 PBS(phosphate buffered saline, pH7.4)에 1:100의 비율로 희석시킨 것을 4℃에서 24시간 배양하였고, TIA-1 단백질에 대한 1차 염소 다중클론항체를 PBS(phosphate buffered saline, pH7.4)에 1:100의 비율로 희석시킨 것을 4℃에서 24시간 배양하였으며, 인간 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질에 대한 1차 염소 다중클론항체를 PBS(phosphate buffered saline, pH7.4)에 1:1,000의 비율로 희석시킨 것을 4℃에서 24시간 배양하였다.
- [0042] 각 단백질들에 대한 1차 염소 다중클론항체를 처리한 헬라(HeLa) 세포들에 대하여, PBS로 행군 후에 상온에서 Alexa-488 또는 Alexa-594가 접합된 2차 항체를 함께 배양하였고, 다시 PBS로 행구었다. 또한, 핵 내 DNA는 DAPI(4',6'디아미노-2-페닐인들)로 염색하였고, 이후, 면역형광현미경분석(immunofluorescent microscopy)으로 각 단백질들의 발현을 확인하였다.
- [0043] 그 결과, 헬라(HeLa) 세포에서 아비산염을 처리하였을 때, 스트레스 그라눌이 형성되었으며, 스트레스 그라눌이 형성된 위치에 알비폭스 2(Rbfox2)가 발현됨을 확인하였다(도 1).
- [0044] **실시예 3. 대장암 조직을 이용하여 알비폭스 2(Rbfox2)의 세포질에서의 발현 확인**
- [0045] 암 조직 근처(암 조직으로부터 적어도 1cm 이상 떨어진 부위)의 정상적인 대장 점막 조직(colon mucosa tissu

e)이 normal control로 사용되었다.

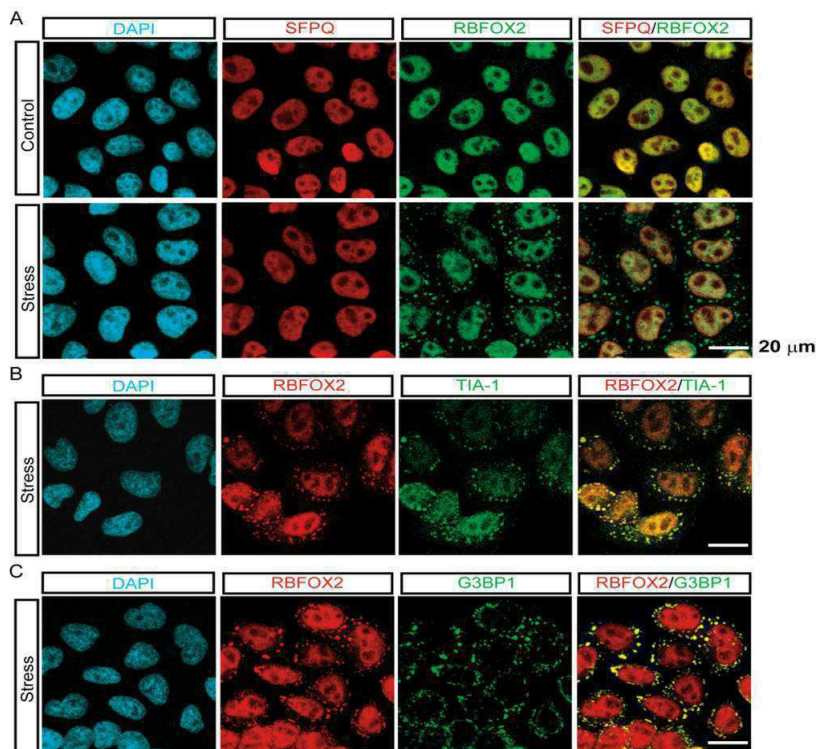
[0046] 대장암 조직 및 정상 대장 점막조직을 4% 파라포름알데히드로 10분 동안 고정한 후, 0.5%(v/v) 트리톤 X-100(triton X-100)을 15분간 처리하여 세포의 투과성을 증가시킨 후, non-reactive blocking 염색은 5% 소 혈 청 알부민이 포함된 Tris-buffered saline(pH 6.0)으로 1시간 처리함으로써 차단하였다.

[0047] 이 후, 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질에 대한 1차 염소 다중클론항체를 PBS(phosphate buffered saline, pH7.4) 완충용액에 1:1,000의 비율로 희석시켜, 4℃에서 24시간 배양하였다. PBS로 행균 후에 상온에서 Alexa-488 또는 Alexa-594가 접합된 2차 항체를 함께 배양하였고, 다시 PBS로 세척하였으며, DNA는 DAPI(4',6' 디아미노-2-페닐 인돌)로 염색하였다. 이후, 면역형광현미경분석(immunofluorescent microscopy)으로 알비폭스 2(Rbfox2) 단백질의 발현을 확인하였다.

[0048] 그 결과, 정상 대장조직에서는 알비폭스 2(Rbfox2)가 핵에서만 발현되지만, 대장암 조직에서는 알비폭스 2(Rbfox2)가 주로 세포질에서 발현됨을 확인하였다(도 2).

도면

도면1



도면2

