



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년08월05일
(11) 등록번호 10-1542139
(24) 등록일자 2015년07월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0047005
(22) 출원일자 2012년05월03일
심사청구일자 2013년11월22일
(65) 공개번호 10-2013-0123688
(43) 공개일자 2013년11월13일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020090122946 A
Rajiv L. Joshi 등. FEBS Letters. Vol. 585,
No. 11, 페이지 1573-1578 (2011)

(73) 특허권자
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
김진우
대전광역시 유성구 대학로 291 카이스트 생명과학
과
이은정
대전광역시 유성구 대학로 291 카이스트 생명과학
과
알란 프로시앙
11, 막쉴랭 베후플로 광장 - 75231 파리 세텍스
05, 프랑스
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 5 항

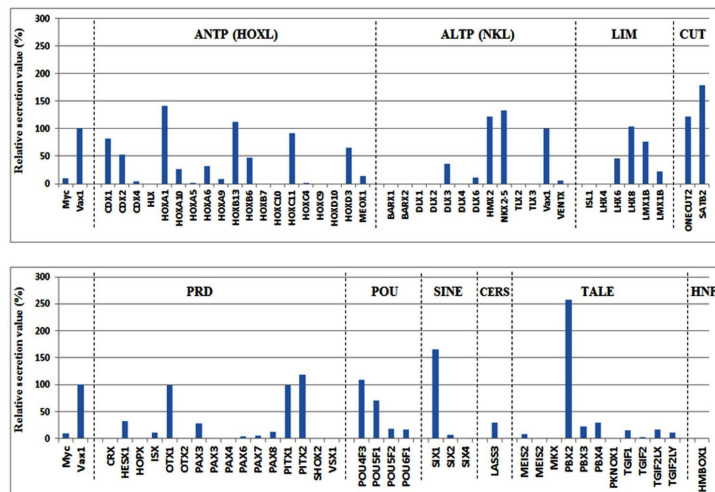
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 세포 간 단백질 전달을 위한 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 호메오도메인 전사인자들 중 세포외로 분비 가능한 전사인자를 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 인간 호메오도메인 전사인자 105개를 벡터에 각각 도입하여 벡터 라이브러리를 제작하였으며, 각각의 벡터들을 293T 세포에 형질전환한 뒤 배양 배지로 분비된 단백질과 세포내에 남아있는 단백질의 양을 분석하여 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자를 결정하였으며, 분비되는 호메오도메인 전사인자의 양을 양성 대조군과 비교하여 상대적 분비 비율을 확인하였으므로, 호메오도메인 전사인자의 용도에 따른 적정 분비량을 고려한 전사인자의 선택에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-00424

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 과학기술국제화사업(글로벌연구실사업)

연구과제명 세포 간 전사인자 이동에 의한 신경세포 운명 동조 현상 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2009.07.01 ~ 2012.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 호메오도메인 전사인자(HM-TF) 또는 VAX1 양성대조군을 발현 벡터에 각각 클로닝하는 단계;
- 2) 단계 1)의 발현 벡터를 세포에 형질전환하는 단계;
- 3) 단계 2)의 세포를 배양하여 배양 배지 및 세포를 수득하는 단계;
- 4) 단계 3)의 배지에 분비된 호메오도메인 전사인자 및 세포내의 호메오도메인 전사인자를 각각 확인하는 단계;
- 5) 단계 4)의 배지에 분비된 호메오도메인 전사인자의 양(분비값 2)을 세포내의 호메오도메인 전사인자의 양(분비값 1)으로 나눈 값을 분석하는 단계; 및
- 6) 단계 5)의 분비값 2/분비값 1의 값을 VAX1 양성 대조군과 비교하여 상대적 분비 비율을 판정하는 단계를 포함하는 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자의 스크리닝 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 전사인자의 확인은 웨스턴 블롯 및 닷 블롯 분석을 이용한 것을 특징으로 하는 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자의 스크리닝 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 발현 벡터는 선택 표지로서 작동 가능하게 연결된 V5, His(histidine), Myc, HA(hemagglutinin) 및 FLAG으로 이루어진 군으로부터 선택되는 에피토프 태그(epitope tag) 유전자를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자의 스크리닝 방법.

청구항 4

제 1항의 단계 2)의 세포로의 벡터의 형질전환 후에 헤파린을 추가로 처리하는 것을 특징으로 하는 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자의 스크리닝 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 단계 5)의 비교 정량은 Multi Gauge V3.0 소프트웨어를 이용하는 것을 특징으로 하는 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 세포 간 이동성을 갖는 호메오도메인 전사인자를 이용하기 위하여 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 호메오도메인 전사인자(Homeodomain transcription factors, HM-TFs)는 보존된 60-아미노산 DNA 결합 도메인인 호메오도메인에 의해 특정된다. 호메오도메인은 호메오박스라고 불리는 180bp의 DNA 서열에 의해 암호화되며, 초파리 계통에는 100개 이상의 호메오박스 서열이 있다(Morata, G. (2001). Nat Rev Mol Cell Biol 2(2): 89-97). 호메오박스 유전자들은 클래스(class), 그룹(group) 및 패밀리(family)로 분류될 수 있다. 최근 235개의 인간 호메오박스 유전자들이 호메오도메인 서열, 염색체상의 위치 및 도메인 구성의 계통 발생학적 분석에 기초하여 11개 유전자 클래스(class)(ANTP, PRD, LIM, POU, HNF, SINE, TALE, CUT, PROS, ZF 및 CERS) 및 100개 이상의 유전자들이 패밀리(family)로 분류되었다(Holland, P. W., H. A. Booth, et al. (2007). BMC Biol 5: 47, Takatori, N., T. Butts, et al. (2008). Dev Genes Evol 218(11-12): 579-590).

[0003] HM-TF는 공간적 및 시간적 발현을 통해 배아 형태화(embryonic patterning), 세포 분화 및 기관의 발달에서 중요한 역할을 한다. 특히, HM-TF는 전-후 축(anterior-posterior axis)에 따른 배아 부위의 특성을 결정하기 위해 필수적이다. 초파리에서, HM-TF 유전자들은 두 분리된 연결된 유전자들의 클러스터(cluster)로 재배열된다: 다섯 개의 호메오 유전자를 포함한 안테나페디아 복합체(Antennapedia Complex, ANT-C, 더듬이가 다리로 변한 Antp 돌연변이 후에 명명된) 및 세 개의 호메오 유전자를 포함한 바이소락스 복합체(Bithorax Complex, bx-c, 평형곤이 날개로 변한 돌연변이 후에 명명한다)가 그것이다. 또한, HM-TF의 복합적 발현은 척추동물 신경기관에서 인접한 영역의 형성에도 필수적이다.

[0004] HM-TF는 전자의 조절자로 기능을 하기 때문에, HM-TF는 그들을 발현한 세포의 핵 안에서 존재할 것이라고 믿어져 왔다. 놀랍게도, 여러 HM-TF들은 최근 예상외로 신경기관의 발달에서 비-세포 자발적인 기능을 한다고 밝혀졌다(Kiecker, C. and A. Lumsden (2005). Nat Rev Neurosci 6(7): 553-564). Otx2, Engrailed, Hoxa5, Hoxb4, Hoxc8, Emx1, Emx2 및 Pax6를 포함한 HM-TF들은 그들의 전사물을 발현한 세포에서 밖으로 분비될 수 있으며 심지어 그들의 전사물을 발현하지 않은 주변 세포내로 들어갈 수 있다(Torero Ibad, R., J. Rhee, et al. (2011). J Neurosci 31(14): 5495-5503, Joshi, R. L., R. Torero Ibad, et al. (2011). FEBS Lett 585(11): 1573-1578, Xu, X. M., J. Wang, et al. (2011). Science 333(6046): 1141-1144). 이러한 HM-TF의 예상 밖의 특성은 호메오도메인에 의해 매개되며, 호메오도메인의 분비 및 침투는 핵 분비(Sec) 및 침투(Pen) 신호에 증폭되는 아미노산 서열을 필요로 한다. Pen 서열은 핵산(즉, DNA 및 RNA), 단백질 및 화학물질과 같은 극성 고분자물질의 세포내로의 운반을 위해 광범위하게 이용되고 있으며, 이와 같은 호메오도메인의 기능을 약물 및 거대 분자의 이동 수단으로서 적용하기 위한 연구들이 진행되고 있다. Sec 및 Pen 서열은 인간 계통에서 약 260개인 대부분의 HM-TF에 보존되어 있으나, 모든 HM-TF들이 이러한 독특한 생물물리학적 특성들을 가지는지는 밝혀지지 않았다.

[0005] 호메오도메인을 포함하는 전사인자들은 세포의 분화과정에서 해당 세포의 특징을 결정짓는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 최근 특정 호메오도메인 전사인자 cDNA를 도입함으로써 해당 세포를 역분화(reprogramming) 또는 직분화(trans-differentiation) 하는 것으로 알려진 바가 있다. 또한, Engrailed2와 같은 호메오도메인 전사인자의 경우에는 신경세포의 번역조절을 통해 신경세포돌기의 성장을 조절하는 특징이 보고된바 있다(Brunet et al. Nature (2005) 438: 94-98). 따라서, 호메오도메인 전사인자들 중 세포 외부 분비 효율이 높은 전사인자들은 다른 세포의 내부 및 핵으로 이동할 수 있어 해당 세포의 특성을 전환할 수 있을 것으로 여겨지고 있다.

[0006] 따라서, 본 발명의 호메오도메인 전사인자의 스크리닝을 이용하여 발굴한 새로운 분비형 호메오도메인 전사인자들을 포집하여 다양한 세포 내부로 도입하여 해당 세포의 특징을 호메오도메인 유전자의 도입 없이도 변화시킬 수 있는 비유전적 세포 형질전환 기술을 개발할 수 있다. 더 나아가 이들 분비형 호메오도메인 전사인자들의 특징을 이용하여 고효율의 핵산, 단백질, 케미칼과 같은 거대분자의 세포내로의 수송을 위해 이용될 수 있을 것이다.

[0007]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자의 스크리닝 방법을 이용하여 100여 개의 인간 호메오도메인 전사인자 중에서 세포외로 분비되는 특성을 가진 호메오도메인 전사인자를 구분하였으며, 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자들의 상대적 분비 비율을 확인하여 정량화하였으므로, 호메오도메인 전사인자의 용도에 따른 적정 세포의 분비량을 고려한 전사인자의 선택에 유용하게 사용할 수 있으며, 세포 외부로 분비되는 호메오도메인 전사인자들을 신경세포를 포함한 다양한 세포의 성장과 사멸 등을 조절하는 인자로도 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 destination vector인 pcDNATM6.2/cLumioTM-DEST의 벡터맵이다.
 도 2는 HM-TF를 삽입하여 V5-epitope-tagged-HM-TF 발현 벡터를 만드는 과정을 나타내는 도식이다.
 도 3은 V5-epitope-tagged-cMyc 발현 벡터에 사용된 pcDNATM6.2/nLumioTM-GW/p64의 벡터맵이다.
 도 4는 V5-epitope-tagged-HM-TF들 각각의 세포 배양 배지 및 세포 파쇄물을 웨스턴 블롯 및 닷 블롯 분석을 수행한 도이다:
 Neg. ctrl. (c-Myc): 음성대조군인 V5-epitope-tagged-cMyc;
 Pos. ctrl. (VAX1): 양성대조군인 V5-epitope-tagged-VAX1;
 Pos. ctrl. (VAX2): 양성대조군인 V5-epitope-tagged-VAX2; 및
 HM-TF_1, HM-TF_2 및 HM-TF_3: 실험군인 V5-epitope-tagged-HM-TF.
 도 5는 양성대조군인 VAX1의 분비값을 100으로 하여 HM-TF의 세포외 분비 비율을 상대적으로 정량한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0013] 본 발명은

[0014] 1) 호메오도메인 전사인자(HM-TF)를 발현 벡터에 클로닝하는 단계;

[0015] 2) 단계 1)의 발현 벡터를 세포에 형질전환하는 단계;

[0016] 3) 단계 2)의 세포를 배양하여 배양 배지 및 세포를 수득하는 단계;

[0017] 4) 단계 3)의 배지에 분비된 호메오도메인 전사인자 및 세포내의 호메오도메인 전사인자를 각각 확인하는 단계; 및

[0018] 5) 단계 4)의 배지 및 세포내의 호메오도메인 전사인자의 양을 비교 분석하여 대조군과 비교 정량하는 단계를 포함한 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0019] 상기 전사인자의 확인은 웨스턴 블롯 및 닷 블롯 분석을 이용한 것인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0020] 상기 단계 1)의 세포외의 벡터의 형질전환 후에 헤파린을 추가적으로 처리하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

- [0021] 상기 단계 5)의 비교 정량은 Multi Gauge V3.0 소프트웨어를 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0022] 본 발명자들은 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자를 선별하기 위하여 16,000개의 인간 ORFeome 중 105개의 호메오도메인 전사인자들을 선택하였다(표 1 참조). 선별한 호메오도메인 전사인자들을 게이트웨이 클로닝 시스템을 이용하여 벡터 라이브러리를 제작하였다. 제작한 호메오도메인 전사인자 벡터들을 각각 293T 세포에 형질전환하고 헤파린을 처리하여 호메오도메인 전사인자의 분비량을 증가시켜 배양 배지로 분비된 전사인자의 양과 세포내에 남아있는 전사인자의 양을 닷 블롯과 웨스턴 블롯을 수행하여 각각 확인하였다(도 4 참조). 각각의 호메오도메인 전사인자에 대한 배지에 분비된 전사인자의 양과 세포내의 전사인자의 양을 Multi Gauge V3.0 소프트웨어를 이용하여 분비값을 결정하였고, 상기 값을 분비되는 호메오도메인 전사인자로 알려진 양성대조군 VAX1 및 음성대조군과 비교하여 상대적인 분비량을 정량하였다(표 2 참조).
- [0023] 그러므로, 본 발명의 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자 스크리닝 방법을 통해 호메오도메인 전사인자들 중 세포외로 분비될 수 있는 것과 없는 것을 세포 수준에서 구분할 수 있으며, 분비되는 호메오도메인 전사인자들의 상대적 분비 비율을 밝힐 수 있으므로, 단백질의 세포간 전달에 이용하기 위한 세포외로 분비되는 호메오도메인 전사인자들을 선별할 수 있으며, 그들의 상대적 분비량을 밝힐 수 있으므로 용도에 알맞은 호메오도메인 전사인자의 선택에도 유용하게 사용될 수 있다.
- [0024] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0025] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0026] **<실시예 1> HM-TF 발현 벡터 라이브러리 제작**
- [0027] 본 발명자들은 분류한 105개의 호메오도메인 전사인자(human homeodomain transcription factor, HM-TF)들의 세포외 분비 여부를 확인하기 위하여 벡터를 제작하였다.
- [0028] 구체적으로, 16,000개의 인간 ORFeome(Dana Farber Cancer Research Institute, Harvard medical school) 중 105개의 HM-TF ORFeome을 선별하였다(표 1). 이와 같이, 하기 표 1에 분류된 HM-TF ORFeome entry clone(Dana-Farber Cancer Institute)들과 destination vector인 pcDNATM6.2/cLumioTM-DEST(Invitrogen)(도 1)를 LR Clonase(Invitrogen, Cat.11791)를 사용한 게이트웨이 클로닝 시스템(Gateway cloning system)(Invitrogen, Cat.12589)을 이용하여 벡터 라이브러리를 제작하였다.
- [0029] 그 결과, 105개의 HM-TF가 각각 삽입된 V5-epitope-tagged-HM-TF 발현 벡터 라이브러리를 제작하였다(도 2).

표 1

ANTP class		PRD class (19)	LIM-class (8)	ZF class (8)	TALF-class (10)
HOXL subclass (26)	NKL subclass (17)				
CDX1	BARHL2	ALX1	ISL1	ADNP	MEIS2
CDX2	BARX1	CRX	LHX4	HOMEZ	MKX
CDX4	BARX2	HESX1	LHX5	ZEB1	PBX2
HLX	DLX1	HOPX	LHX6	ZEB2	PBX3
HOXA1	DLX2	ISX	LHX8	ZFH3	PBX4
HOXA2	DLX3	MIXL1	LHX9	ZHX1	PKNOX1
HOXA3	DLX4	OTX1	LMX1A	ZHX2	TGIF1
HOXA5	DLX5	OTX2	LMX1B	ZHX3	TGIF2
HOXA6	DLX6	PAX3			TGIFLX
HOXA9	HHEX	PAX4			TGIFLY
HOXA10	HMX2	PAX6			
HOXB1	NKX2-5	PAX7			
HOXB5	TLX2	PAX8	POU-class (6)	CERS-class (4)	HNF-class (1)
HOXB6	TLX3	PITX1	POU2F1	LASS2	HMBOX1
HOXB7	VAX1	PITX2	POU2F2	LASS3	
HOXB9	VAX2	SHOX2	POU4F3	LASS4	
HOXB13	VENTX	TPRXL	POU5F1	LASS6	
HOXC4		VSX1	POU5F2		
HOXC9		VSX2	POU6F1		
HOXC10					
HOXC11					
HOXD3			SINE-class (3)	CUT-class (3)	
HOXD10			SDX1	ONECUT2	
HOXD12			SDX2	SATB1	
MEOX1			SDX4	SATB2	
MEOX2					

[0030]

<실시예 2> HM-TF 분비 여부 스크리닝

[0031]

<2-1> V5-epitope-tagged-HM-TF 발현 벡터 라이브러리의 형질전환

[0032]

본 발명자들은 105개의 HM-TF가 세포 밖으로 분비되는지 여부를 확인하기 위하여 293T 세포에 각각의 벡터들을 형질전환하였다.

[0033]

구체적으로, 293T 세포들을 6 웰 배양 플레이트에 분주한 뒤, 10% FBS(JRS, Cat.No.43640) 및 1% 항생제 (GIBCO, Cat.No.15140)가 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, HyClone, Cat.No.SH30243.01) 배지에서 5% CO₂, 37 °C 조건하에서 배양하였다. 293T 세포들이 70 내지 80%의 함류(confluency)에 이를 때, 6 웰 플레이트의 웰 당 6 µg의 PEI(polyethylenimine, Polysciences, Cat.No.23966), 상기 <실시예 1>에서 제조한 각각의 V5-epitope-tagged-HM-TF 발현 벡터 1 µg 및 pGL3 루시퍼레이즈 리포터 벡터(Luciferase Reporter vector)(Promega) 1 µg을 293T 세포에 형질전환하였다. 대조군으로 pcDNA3.1 벡터를 사용하였으며, 양성대조군으로 <실시예 1>에서 VAX1 및 VAX2를 도입한 V5-epitope-tagged-VAX1 벡터 및 V5-epitope-tagged-VAX2 벡터를 사용하였고, 음성대조군으로 V5-epitope-tagged-cMyc 발현 벡터(Invitrogen, pcDNATM6.2/nLumioTM-GW/p64)(도 3)를 사용하였다. 형질전환 6시간 후 배지를 새로 교체하고 18시간 동안 추가 배양하였다. 배양 배지 내의 HM-TF의 양을 증가시키기 위하여 형질전환 24시간 후 PBS로 1회 씻어준 뒤 6 웰 플레이트 웰당 10 mg/ml의 헤파린(Acros Organics, Cat.No.411210010)이 포함된 혈청과 페놀 레드(phenol red)가 없는 배양 배지(GIBCO, Cat.No.12338) 1.8 ml을 처리하여 3시간 동안 추가 배양하였다.

[0034]

<2-2> 세포내 V5-epitope-tagged-HM-TF 확인

[0035]

본 발명자들은 세포내에 존재하는 V5-epitope-tagged-HM-TF의 양을 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0036]

구체적으로, 상기 실시예 <2-1>에서 헤파린을 처리하여 배양한 293T 세포의 배양액은 따로 수득한 뒤, 세포에 약한 파쇄 버퍼(10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 7.4 100 mM Tris, protease inhibitor(Roche,

[0037]

Cat.No.11 836 145 001), phosphatase inhibitor(Roche, 04 906 837 001))를 처리하여 세포내의 총 단백질을 추출하였다. 단백질 정량 후 일부의 세포 파쇄액에 5×SDS 샘플 버퍼(250 mM Tris.Cl, pH 6.8, 10% sodium dodecyl sulfate, 0.5% bromophenol blue, 50% glycerol, 500 mM dithiothreitol)를 첨가하였다. 상기 시료의 총 단백질 양이 20 µg이 되도록 취해 SDS-PAGE 겔에 로딩하여 전기영동을 수행하였다(SDS-PAGE running buffer: 25 mM Tris.Cl, pH 8.3, 250 mM Glycine, 0.1% (w/v) SDS). 전기영동 후 단백질들은 PVDF 막에 20 V에서 1시간 동안 트랜스퍼(BIO-RAD, Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell)되었다. 트랜스퍼 후 5% 스킵밀크(w/TBST (25 mM Tris.Cl, pH 7.4, 3 mM KCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween20))로 상온에서 1시간 동안 차단하였고, 1:5000으로 희석한 일차 항체인 항-V5 항체(Invitrogen, Cat.No.R96025)를 4 °C에서 하룻밤 동안 처리하였다. 그 후, 1:5000으로 희석한 이차 항체(Jackson Immuno Research, Cat.No.115 035 146)를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 이차 항체와 반응시킨 뒤 막과 ECL 용액(Thermo scientific, Cat.No.NCI4080KR)을 5분 동안 반응시킨 후 발색을 확인하였다.

[0038] 그 결과, 세포내에 존재하는 V5-epitope-tagged-HM-TF들 각각의 양을 확인할 수 있었다(도 4의 Cell lysate).

[0039] <2-3> 세포의 분비된 V5-epitope-tagged-HM-TF 확인

[0040] 본 발명자들은 세포외에 존재하는 V5-epitope-tagged-HM-TF의 양을 확인하기 위하여, 닷 블롯 분석을 수행하였다.

[0041] 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>에서 헤파린을 처리하여 배양한 293T 세포의 배양액을 수득(배지 S1)한 뒤, 500g에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었다(S2). 얻은 상등액 S2를 2,000g에서 30분 동안 원심분리하여 상등액 S3를 얻었다. 닷 블롯 시스템(Schleicher&Schuell, Cat.No.27510)의 웰 하나 당 상기 얻은 상등액 S3 450 µl로 닷 블롯을 수행하였다. 5% 스킵밀크를 이용하여 차단한 뒤, 1:5000으로 희석한 항-V5 항체를 처리하였으며, 그 후 1:5000으로 희석한 이차 항체를 처리하였다. 항체와 반응시킨 막을 ECL 용액과 5분 동안 반응시킨 후 발색을 확인하였다.

[0042] 그 결과, 점의 밀도(dot density)를 통해 각각의 V5-epitope-tagged-HM-TF가 배지로 분비된 정도를 확인할 수 있었다(도 4의 Media).

[0043] <실시예 3> 세포의 분비값 측정

[0044] 본 발명자들은 Multi Gauge V3.0 software(Fuji, Tokyo, Japan)를 사용하여 HM-TF의 세포의 분비 여부를 확인하여 분비값을 측정하였다.

[0045] 구체적으로, Multi Gauge V3.0 software(Fuji, Tokyo, Japan)를 사용하여 실시예 <2-2>에서 웨스턴 블롯으로 확인한 밴드의 밀도(band density)(분비값 1) 및 <2-3>에서 닷 블롯 분석을 통해 확인한 점의 밀도(dot density)(분비값 2)를 동시에 측정하여 하기 표 2와 같이 분비값 1 및 분비값 2를 얻었다. 상기의 값이 HM-TF_2의 경우와 같이 음성대조군의 분비값 2보다 높게 측정된다면 HM-TF는 세포 밖으로 분비되는 HM-TF라고 판단할 수 있으며, HM-TF_3의 경우와 같이 웨스턴 블롯의 분비값 1은 측정되지만 닷 블롯의 분비값 2는 측정되지 않거나 음성대조군의 분비값 2보다 낮게 측정되면 HM-TF는 세포 밖으로 분비되지 않는 HM-TF라고 판단할 수 있으므로, 분비값 1 및 분비값 2의 비교를 통해 상대적인 분비값을 구하였다(표 2). 이와 같이 구한 양성대조군인 VAX1의 상대적인 분비값을 100으로 하여 각각의 HM-TF의 상대적인 세포의 분비값과 비교한 결과, 각각의 HM-TF의 세포의 분비 비율을 상대적으로 정량할 수 있었다(도 6).

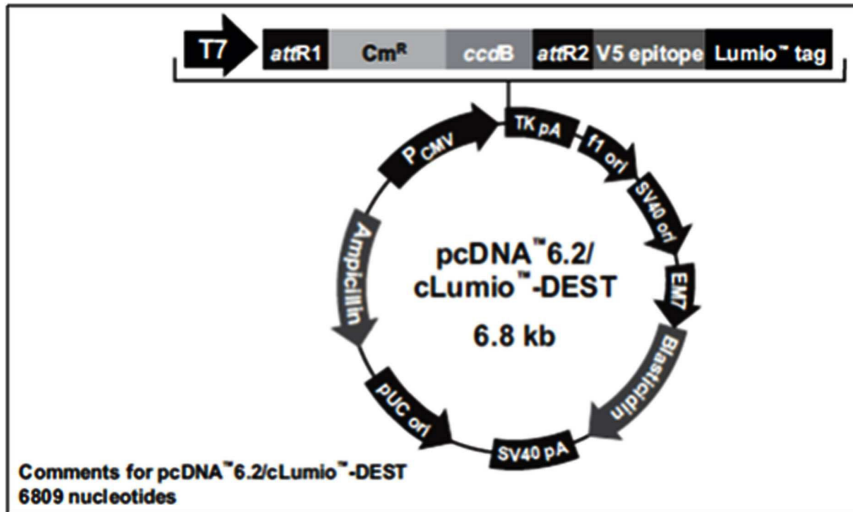
표 2

[0046]

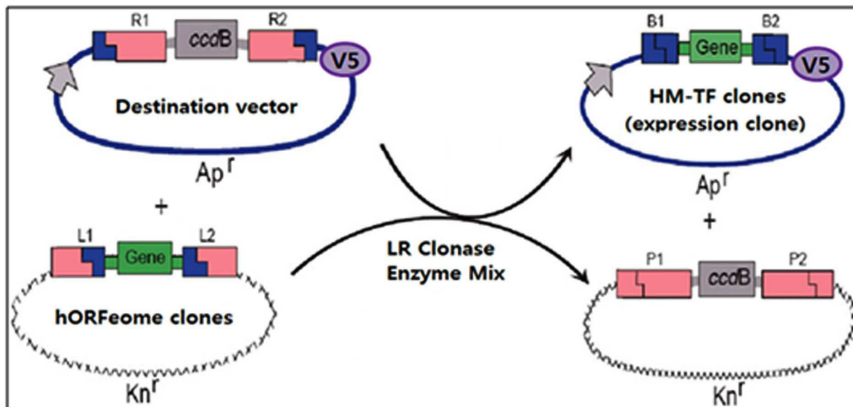
	음성대조군 (cMyc)	양성대조군 (VAX1)	양성대조군 (VAX2)	실험군1 (HOXC10)	실험군2 (HOXC11)	실험군3 (HOXC4)
배지 닷 블롯 밀도 (분비값 2)	0.0	97.962	26.149	0.0	77.275	0.0
세포 파쇄물 밴드 밀도 (분비값 1)	38.706	79.888	90.726	137.822	73.777	46.708
상대적인 분비값 (분비값 2/분비값 1, %)	0.0	100.0	23.5	0.0	85.4	0.0

도면

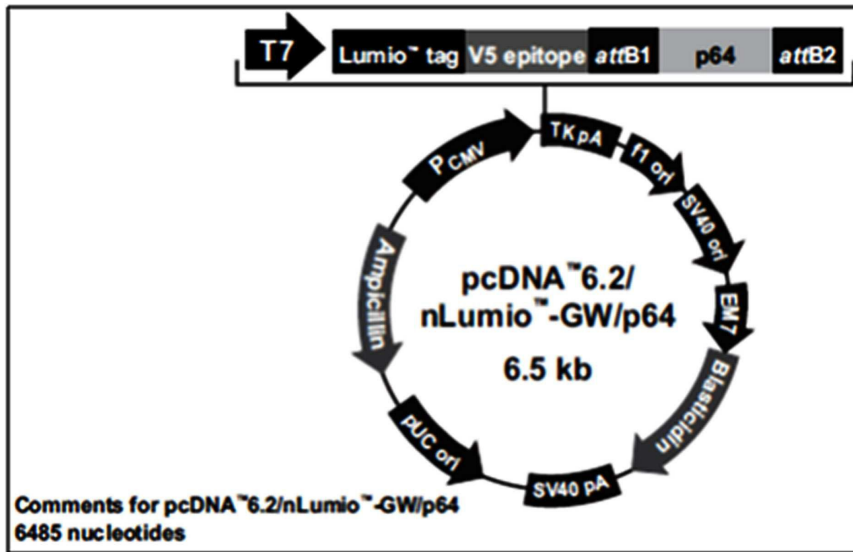
도면1



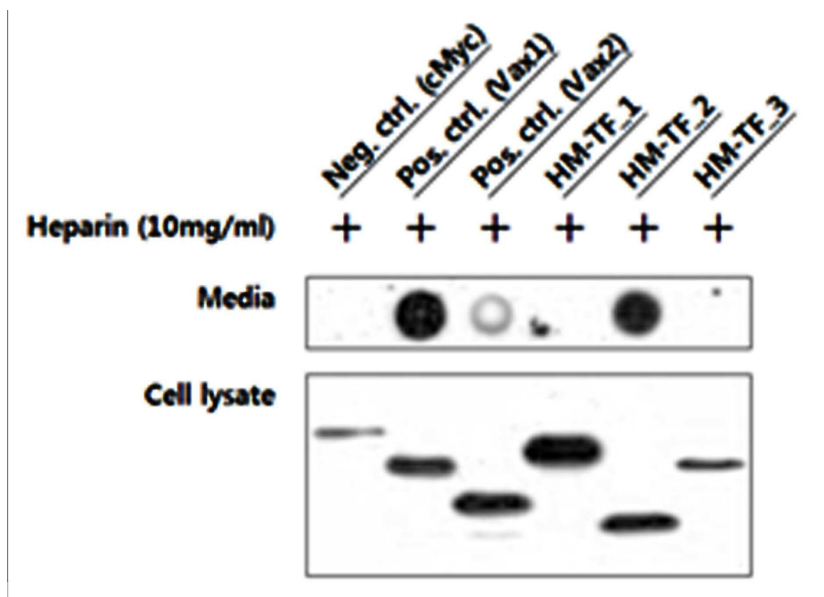
도면2



도면3



도면4



도면5

