

Anti Mouse Osteocalcin, Polyclonal 항체

Anti-Mouse Osteocalcin, Polyclonal, Rabbit (mOC (1-20))

TaKaRa Code M173 0.1 mg

Osteocalcin(OC)은 분자내에 γ -carboxyl glutamin acid(Gla)을 2~3잔기 포함하는 골기질 단백질로 골아세포의 동정과 분화의 지표로서 사용되고 있다. 골아세포는 배의 발생과정에 있어서 미분화의 간엽계 세포로부터 분화하고 분화의 진행에 따라 alkaline phosphatase, I 형 collagen, osteopontin, osteocalcin 유전자가 단계적으로 발현되어간다고 여겨진다. 따라서 OC는 골아세포의 분화의 진행도의 최종단계를 나타내는 marker라고 말할 수 있다.

TaKaRa에서는 이미 bovine · Osteocalcin 특이항체를 수증 판매하고 있다. 이들 항체는 소의 OC와 반응할 뿐만 아니라 각종동물(사람, 토끼, 쥐, 돼지, 말, 염소, 양, 개, 물모트)의 OC와도 교차반응하는 것이 확인되어 있다. 그러나 어느쪽도 mouse의 OC에 대해서는 충분한 교차반응성이 없었으므로, 새롭게 mouse OC에 반응하는 항 mouse · Osteocalcin polyclonal 항체를 발매하게 되었다. 여기서는 본제품의 개요와 그것을 사용한 실험예를 소개하겠다.

■ 본 제품에 대해서

본 제품은 mouse · Osteocalcin(OC)의 N말단(1-20)서열을 인식하는 토끼 유래의 polyclonal 항체이다. 본제품은 이하에 나타내는 방법에 의하여 조제된 것이다.

【조제법】

Mouse · Osteocalcin N말단(1-20)서열에 상당하는 peptide YLGASVSPDPLEPTREQCE를 합성하고, 그 분자내의 시스테인을 이용하여 KLH에 가교하고 그것을 항원으로서 토끼(일본 백색종)에 면역하였다. 얻어진 항혈청을 protein A column에서 정제하여 IgG 화분을 모아 그 화분을 항원 peptide를 고정시킨 column을 사용하여 affinity 정제를 하였다. 또, 본 항체를 면역조직에 염색할 경우, 0.7~2 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 사용하는 것이 바람직하다.

■ 실험예

본 제품을 사용한 mouse 턱뼈의 면역조직염색실험을 오사카대학 대학원 치학 연구과 턱구강 병인병태 제어학 강좌의 Toyozawa 선생님에게 의뢰하였다.

【방법】

● 조직절편의 조제

재 료 : 생후 3주된 mouse의 턱뼈

- 조작순서 : 1) 4% Para aldehyde 용액에 의한 고정
2) 10% EDTA에 의한 탈탄 4℃, 1주간
3) 알코올에 의한 탈수
4) Xylene 투명(clearing)
5) 파라핀 포매
6) 얇게 자름

● 면역조직염색

1차항체 : 항 mouse OC(1-20) · 토끼 polyclonal 항체 사용농도 0.7 $\mu\text{g/ml}$

조직절편 : Mouse의 EDTA 탈탄 파라핀 절편

검출방법 : sABC system(DAKO 사)

조작순서 : 1) 탈 파라핀

- 2) 항원부활법 : trypsin으로 37℃, 20분 처리 (trypsin 용액의 조성 : trypsin 25 mg, CaCl₂ 25 mg, 0.01M PBS 100 ml)
3) 비특이적 단백질의 blocking
4) 1차 항체 4℃, 하룻밤
5) biotin 표식 2차 항체 실온 30분
6) 내인성 peroxidase의 blocking
7) Strept ABCComplex 실온 30℃
8) DAB 반응
9) 대비염색(methyl green)
10) 탈수 · 투철 · 투입

Size	50 aa,	Select	1
HUMAN	1	YLYQWL	GAPV
BOVINE	1	YLDHWL	GAPA
CAT	1	YLAP	GLGAPA
CHICKEN	1	HYAQDS	SGVAG
RABBIT	1	QLING	QGAPA
RAT	1	YLNNG	LGAPA
MOUSE	1	YLDHWL	GAPD

10	20	30	40	50
PYPDPLEPRR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQE	AYR-RFYGPV	
PYPDPLEPKR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQE	AYR-RFYGPV	
PYPDPLEPKR	EICEELNPDCD	ELADHIGFQD	AYR-RFYGTV	
APPNPIEAQR	EVCELSPDEN	ELADELGFQE	AYQRRFYGPV	
PYPDPLEPKR	EVCELNPDCD	ELADQVGLQD	AYQ-RFYGPV	
PYPDPLEPHR	EVCELNPDCD	ELADHIGFQE	AYKRIYGTTV	
-----PLEPTR	EQCELNPACD	ELSDQYGLKT	AYKRIYGTTI	

그림1 각종 동물 osteocalcin의 아미노산 서열

【결과】

Mouse 턱뼈조직(A~C) 및 mouse 윗턱절치조직(D~F)의 면역염색의 결과를 그림 2에 나타내었다.

A : 턱뼈의 골량을 따라서 보이는 골아세포(ob)에 강한 양성반응을 보인다.

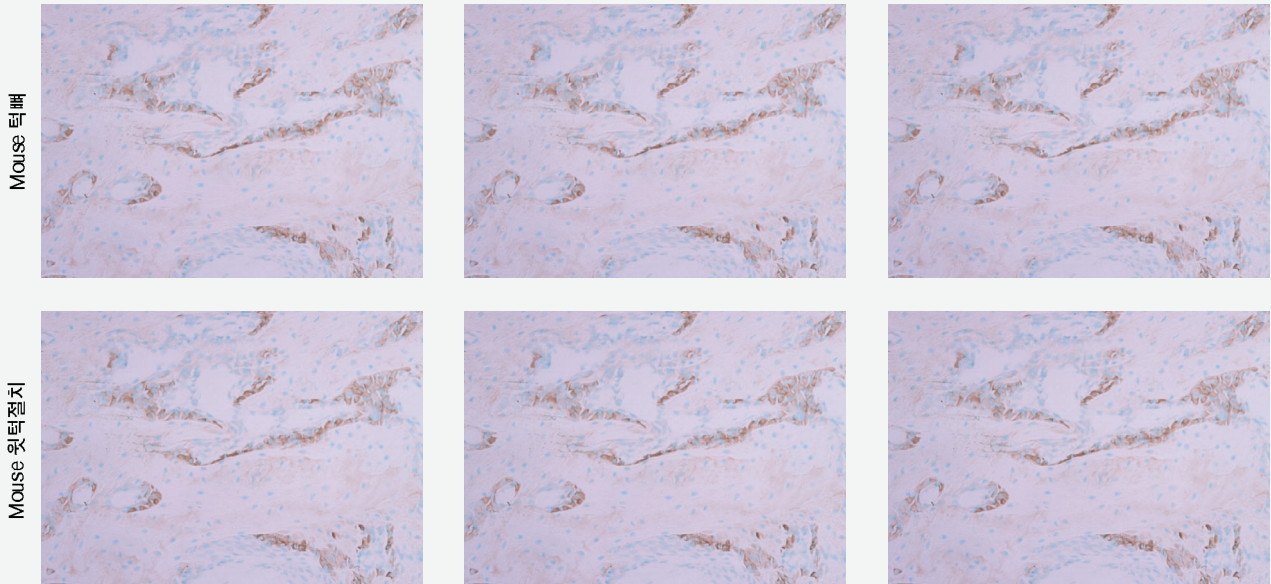
B : A의 골아세포의 확대

C : 골기질(b)에 면역반응이 인정된다.

D : 윗턱 절치근 침공 부근. 앞상아세포(pod)에서 분화된 상아아세포(od)에 강한 양성반응을 보인다.

E : D의 상아아세포에 확대.

F : 윗턱절치의 D에서 절단층의 상아아세포에 강한 양성반응을 보인다.



사진내의 약어 b : bone ; ob : osteoblast ; pod : preodontoblast ; od : d : dentin ; odontoblast ; e : enamel ; am : ameloblast ; pu : pulp

그림 2 항 mouse osteocalcin(1-20) · 토끼 polyclonal 항체를 사용한 면역조직염색

【관련제품】

Monoclonal Anti-Bovine Osteocalcin

Clone 번호	epitope 영역	TaKaRa Code	subclass	용량
OC4-30	17위의 γ -carboxyl glutamine acid(Gla) 부근 (탈탄산 osteocalcin에는 반응하지 않음)	M041	IgG _{2a}	0.1 mg
OCG2	45~49잔기	M042	IgG ₂	0.1 mg
OCG3	21~31잔기	M043	IgG ₃	0.1 mg
OCG4	4~9잔기	M044	IgG ₄	0.1 mg

Monoclonal Anti-Bovine Osteocalcin

Clone 번호	epitope 영역	TaKaRa Code	subclass	용량
OC4-5	21위와 24의 탈탄산 glutamine산(Glu)부근 (γ -carboxyl osteocalcin에는 반응하지 않음)	M171	IgG ₁	0.1 mg

* 항체 제작 · 정제 · 수식

당사는 각종 항원(protein, peptide, nucleic acid, carbohydrate)에 대한 Polyclonal Antibody 및 hybridoma 제작을 통한 Monoclonal Antibody(Hybridoma)를 제작하여 드리고 있습니다.

1. 항체 제작

● Polyclonal Antibody 제작

Rabbit, Mouse, Rat, Guinea pig, Goat 등을 사용하여 항혈청을 제작합니다.

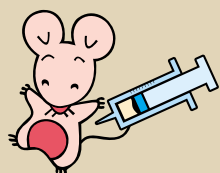
- 항원을 준비하여 주시면 면역으로부터 혈청 채취 및 분리 정제까지의 작업은 당사가 실시합니다.
- 면역 항원의 양이나 순도, 면역기간, Hapten(분자량이 5,000 이하의 peptide) 항원의 경우 carrier 선택 등에 관해서 전문 연구원이 상담하여 드립니다.
- 토끼의 항혈청 제작은 면역 전, 면역기간 도중의 boosting 전 부분채혈과 최종 면역후의 부분채혈 혈청을 각각 채취하여 Direct ELISA Assay 방법으로 titration(반정량)을 체크하여 항원에 대한 적정 또는 원하시는 titer의 항체 생산을 확인한 다음 최종 채혈합니다.
- 합성 펩타이드에 대한 항혈청을 제작하는 경우는 당사 독자의 기술인 Solid ELISA 방법을 통하여 합성 펩타이드에 대한 항체 생산 유무를 확인합니다
- 혈청 채취 후 정제, 단편화, 표식 등의 서비스에 대해서는 별도의 요금이 필요합니다.
- 항원의 종류에 따라 제작한 항체의 역가가 희망하는 수준에 이르지 못하는 경우가 있으므로 양해해 주시기 바랍니다.

이 용 동 물 (Developed in)	토끼, 기니아 피그 (5 mon/2.5kg)	Rat (SD/12W)	쥐 (BALB/c/10W)
		1마리	2마리
항원 필요량	2 mg	1 mg	1 mg
항원 1회 투여량	0.005~1.0 mg	0.01~0.2 mg	0.01~0.1 mg
혈청 추출량	보 통	30 ml 이상	1~2 ml
	최 대	50 ml	3 ml
면역원 투여 부위	SC or ID Subcutaneous: 피하주사 Intradermal: 근육주사	SC Subcutaneous: 피하주사	SC or IP Subcutaneous: 피하주사 Intraperitoneal: 복강주사
	TITER	· Serum 1,000배 이상 dilution 측정 가능 역가 (by ELISA Assay) · 항원에 따라 위 역가가 불가능 할 경우도 있음.	
· 주문자 희망 역가 요구시 할증료 (Serum)			
5,000배 이하		5,000 초과 10,000배 이하	10,000배 이상
면역 간격 및 기간	6~10주	6~8주	
	적응기간 1주	적응기간 (1주)	
	면역간격 2주	면역간격 (10일)	
	· 1차 면역는 Complete adjuvant에 섞어서 Injection하며 2차 면역부터는 Incomplete adjuvant를 이용(Adjuvant vol : antigen Vol= 1:1 또는 2:1) · 보통 3차 면역, 그러나 2차 면역 후 부터는 ELISA로 항체 역가 점검하여 serum 채취나 추가 boosting 결정. · 최종면역 후 5~14일 뒤 전혈 채혈. · 혈청분리.		

● Monoclonal Antibody 제작

BALB/c mouse를 사용하여 monoclonal antibody 생산을 위한 hybridoma 세포를 제작합니다.

- 항원을 직접 제공하여 주시거나 아미노산 및 단백질(>100,000 Da) 서열에 관한 정보를 제공하여 주시면 그 후의 단백질 구조 분석 및 peptide합성, hybridoma 제작 작업은 당사에서 직접 실시합니다.
- 제작된 hybridoma 세포는 동결상태로 제공해 드리거나, 복수를 채취 후 분리, 정제하여 제공해 드립니다.
- 하나의 항원에 대한 monoclonal antibody 생산 hybridoma 세포 제작의 기본 납기는 3~6개월이나 항원의 종류 및 세포의 상태에 따라 다소 다를 수 있습니다.
- 항체 그 자체의 제작(복수제작을 포함)과 정제, 표식 등의 작업은 별도 요금으로 hybridoma 제작 공정에 포함되어 있지 않습니다.



2. Carrier 단백질 부착

- 50 amino acid(5,000 Da) 이하의 peptide(hapten)는 면역반응이 약하거나 반응을 일으키지 않으므로 면역반응 유발 또는 촉진을 위하여 분자량이 큰 carrier protein을 부착시켜 주어야 합니다.
- 보유하고 있는 peptide에 BSA, KLH(Keyhole Limpet Hemacyanin: MW: 5,000,000), OVA, 혈청알부민(토끼, 쥐, Rat 등에서 분리 정제) 등을 사용하며, 이외에 합성 peptide-(Lysine-(β -Alanine)-Lysine)-합성 peptide를 사용하여 조제합니다.

3. 항체 정제

Mouse 복수(monoclonal antibody) 또는 동물 혈청 등으로부터 IgG 분리 정제 및 항체생성, 분리 유무를 확인합니다.

4. 항체 특이적 항체 분리 정제

항혈청에서 항원에 대하여 친화성 있는 항체만을 분리 정제합니다.

5. 항체 표식

보유하고 있는 항체(정제한 것)를 효소(HRP(Horseradish peroxidase), AP(Alkaline phosphatase), Biotin, FITC)로 표식합니다. 효소 외 colloidal gold particle 표식도 가능합니다(size, 색상 조절 가능 5~1,000 nm).

6. 항체 단편화

보유하고 있는 항체(정제한 것)를 pepsin과 papain 효소로 단편화 합니다.

Antibody 제작 납기

수탁 내용		납기 일	기 타		
1	Polyclonal Antibody 제작-(Anti Serum)	6~10주	토끼	1마리	
			쥐	2마리	
			랫트	2마리	
			기니아 피그	1마리	
			염소	50 ml	
2	Monoclonal Antibody 제작	3~5개월	상담 후 결정		
3	복수 채취	2주	5 ml		
4	정제	이온교환수지 정제	1주	복수, 혈청 10 ml 이하	
		FPLC Mono-Q 정제	1주	복수, 혈청 10 ml 이하	
		Protein A, G 정제	1주	복수, 혈청 10 ml 이하	
		Gel filtration	1주	복수, 혈청 10 ml 이하	
		항원 특이적 항체 정제 (With CNBr-activated Sepharose FF)	1주	복수, 혈청 10 ml 이하	
5	Agarose gel에 항원, 항체 Conjugation	1주	Ab, Ag 10 mg 이하		
6	Antibody 단편화 (Pepsin, Papain을 이용한 소화법)	1주	Ab 10 mg 이하		
7	Ab (Ag) Labelling	HRP (Peroxidase)	Periodic Acid법	10일	Ab 10 mg 이하
			Glutaraldehyde법	10일	Ab 10 mg 이하
		FITC		10일	Ab 10 mg 이하
		Biotin		10일	Ab 10 mg 이하
		Colloidal Gold(Color, size 선택)		1주	Ab 10 mg 이하
		Alkaline Phosphatase		10일	Ab 10 mg 이하
8	Peptide Conjugation	Peptide - Carrier protein (BSA, OVA, KLH) Conjugation		5일	Peptide 2 mg 이하 Peptide 5 mg 이하
		Peptide-Lys- β Ala-Lys-Peptide (Linker 이용)한 연결		1주	Peptide 2 mg 이하 Peptide 5 mg 이하
9	Freezing dry	5일	10ml (50 mg / Ab)		

· 납기는 항원, 항체, hybridoma에 따라 약간 다를 수 있습니다.
· 항체의 대량조제, peptide 항원의 합성에 관해서는 별도로 상의하여 주시기 바랍니다.
· 단, 가격은 시료의 의뢰 내용에 따라 다르므로 별도문의 하시기 바랍니다.

