

Anti Heme Oxygenase-1 Monoclonal Antibody(GTS-1, GTS-3)

Anti Heme Oxygenase-1 Monoclonal Antibody(GTS-1)	TaKaRa Code M174	0.1 mg
Anti Heme Oxygenase-1 Monoclonal Antibody(GTS-3)	TaKaRa Code M175	0.1 mg

신체의 각 장기는 환경에서 오는 다양한 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위하여 즉각적으로 반응한다.

카드뮴, 납, 수은과 같은 중금속이나 endotoxin이 체내에 들어오거나, heat shock, 자외선, 활성산소, 저산소 상태에 노출되면, 장기는 스트레스에 대한 반응으로 다양한 단백질과 효소가 유도되면서 생체방어 작용이 일어난다.

대표적인 예로 헤모글로빈을 비롯한 Heme 단백질의 보결분자족인 heme을 담즙색소(biliverdin, bilirubin)와 일산화탄소와 환원철(Fe^{2+})로 분해하는 Heme Oxygenase를 들 수 있다(그림 1). Bilirubin은 강력한 radical 보조 작용을 통한 항 염증작용이 있고, 일산화탄소는 혈관확장 작용을 통한 장기의 혈류유지 작용과 스트레스시 정자 발달기능을 억제한다⁴⁾.

Heme Oxygenase는 최소 두 가지의 Isozyme(Heme Oxygenase-1과 Heme Oxygenase-2)이 보고되고 있다. Heme Oxygenase-2는 구성형 효소이고, Heme Oxygenase-1은 각종 스트레스원에 반응하여 세포내에서 유도 발현되는 효소로 이 효소의 반응을 조사하여 스트레스 검출에 이용할 수 있다.

TaKaRa에서는 Anti Human 및 Rat · Heme Oxygenase-1 Monoclonal Antibody(GTS-1, GTS-3)를 신발매하였으며, 이 항체는 human 및 rat의 heme Oxygenase-1과 결합하여 효소활성을 저해하는 것으로 확인되었다⁴⁾.

본 제품을 파라핀 절편 면역조직염색에 이용할 경우, human 조직에는 GTS-1, rat 조직에는 GTS-3가 적합하며, 현재 이 두 가지 항체로 샌드위치 타입의 ELISA법 Heme Oxygenase-1 측정 Kit을 개발 중이다.

■ 기원

1) 면역원: Rat 간세포에서 RT-PCR법으로 Heme Oxygenase-1(HO-1) cDNA를 조제하여 EF-1a promoter를 갖는 plasmid vector pEFneo에 도입하였다. 이 재조합 plasmid vector를 mouse 유래 T세포주(WR19L)에 도입하여 형질전환세포(WR19LrHO-1)를 만들어 이 세포의 microsome을 면역원으로 사용하였다.

Heme
 ↓ Heme Oxygenase
 Biliverdin + 철 + 일산화탄소
 (담즙색소) (Fe^{2+}) (CO)
 ↓ Biliverdin reductase
 Bilirubin(Radical Scavenger)

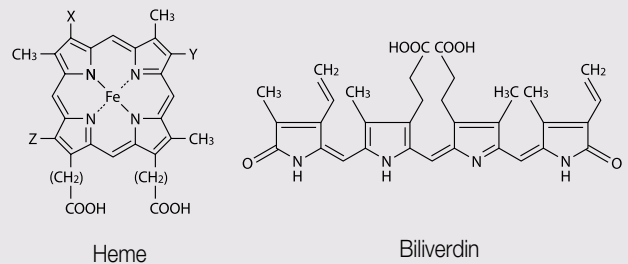


그림 1 Heme Oxygenase의 반응

- 1)에서 면역시킨 mouse 장기와 mouse myeloma(P3X63-Ag8U.1) 세포를 polyethylene glycol로 세포 융합하였다.
- WR19LrHO-1 세포를 고정된 plate에 특이항체를 생산하는 hybridoma를 선별하여 GTS-1 clone과 GTS-3 clone를 얻었다.
- Clone화 한 hybridoma를 prestain한 mouse 복강내에서 대량 배양하여 복수를 얻었다. 유안염색(Ammonium persulfate를 이용한 투석법), protein A 및 이온 교환 chromatography로 IgG를 정제하였다.

■ 항체 특이성

- GTS-1, GTS-3 항체는 human 및 rat의 Heme Oxygenase-1과 반응하고 Heme Oxygenase-2와는 교차반응 하지 않는다.
- GTS-1, GTS-3 항체는 human 및 rat의 Heme Oxygenase-1의 반응을 저해한다⁴⁾.

【제품 형상과 조성】

동결건조품 0.1 mg/vial
 (1% BSA 함유 PBS(방부제 포함 안됨)로 항체를 용해하여 0.22 μm filter로 여과한 후 동결건조)
 복원 후 표준농도 2 mg/ml (멸균수 50 μl에 용해)

【항체 subclass】

GTS-1: mouse IgG₁ κ사
 GTS-3: mouse IgG₁ κ사

【GTS-1, GTS-3 항체 사용농도】

Western Blot/환원조건(비색법): 5~10 μg/ml
 면역조직염색: 5~10 μg/ml
 * Human · 파라핀 절편의 경우, GTS-1 항체가 유효.
 * Rat · 파라핀 절편의 경우, GTS-3 항체가 유효.

■ GTS-1, GTS-3 항체를 이용한 Western Blot assay의 예
【방법】

6주령 SD rat의 뇌, 폐, 심장, 비장, 신장, 간장을 추출하여, 습중량 0.25 mg당 1 ml 비율로 1% NP40/PBS를 첨가하여 가용화한 후, 원심분리(10,000 rpm)하여 상청을 얻었다. 일부를 10% SDS polyacrylamide gel(환원조건)로 전기영동한 다음, PVDF막에 transfer하였다. GTS-1, GTS-3 항체를 5 μg/ml의 농도로 반응시키고, peroxidase 표식 rabbit anti mouse IgG 항체를 이용하여 면역 염색하였다.

【결과】

GTS-1, GTS-3 항체의 경우, 비장 조직에서 분자량 31,000부근에서 Heme Oxygenase-1 단백질 band가 검출되었다(사진 1). 비장을 제외한 조직에서는 Western Blot법에서의 검출농도 이하였다. Heme Oxygenase-1은 비장에서 가장 많은 분포하고 있음을 알 수 있었다.

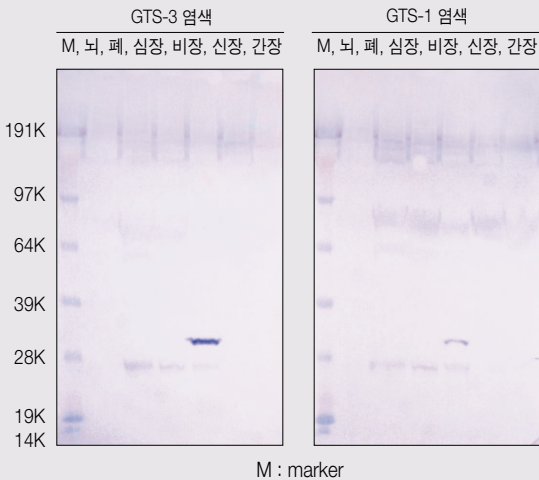


사진 1 Western Blot Assay 예
 좌: GTS-3 항체사용 ; 우: GTS-1 항체사용

■ GTS-1, GTS-3 항체를 이용한 면역조직염색의 예
실험 예 1(human · 파라핀 절편)

- 일차항체: GTS-1, GTS-3, 200배 희석 (10 μg/ml)
 조직절편: 시판(DAKO) human · 파라핀 절편 (Normal · Tumor)
 검출방법: ENVISION plus(DAKO)
 조작순서: 1) 탈 파라핀
 2) 부활처리(Proteinase K 처리) Proteinase K(0.4 μg/ml) 실온, 6분
 3) 내인성 peroxidase의 blocking 3% H₂O₂ 10분
 4) 비특이성 blocking Block Ace(원액) 60분
 5) 일차 항체반응 실온, 60분
 6) ENVISION plus 실온, 30분
 7) DAB 발색
 8) 핵염색(methly green)
 9) 탈색 · 투철 · 봉입



사진 2-1 Small intestine, GTS-1 항체



사진 2-2 Small intestine, GTS-3 항체

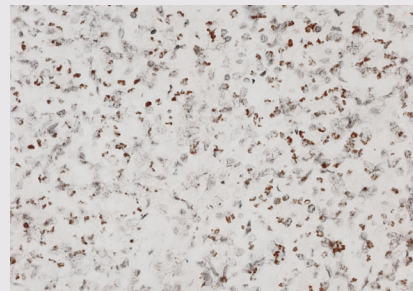


사진 3-1 Pancreas, GTS-1 항체

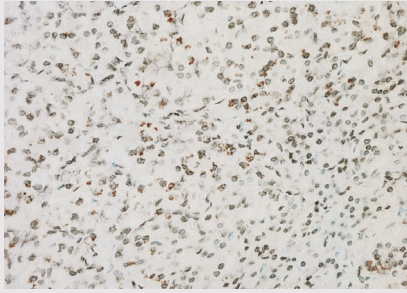


사진 3-2 Pancreas, GTS-3 항체

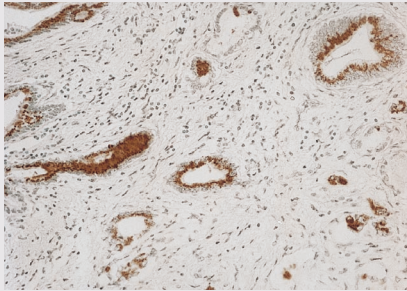


사진 4-1 Pancreatic carcinoma, GTS-1 항체

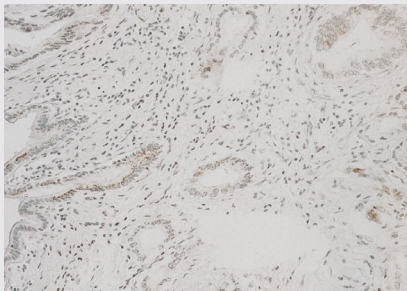


사진 4-2 Pancreatic carcinoma, GTS-3 항체

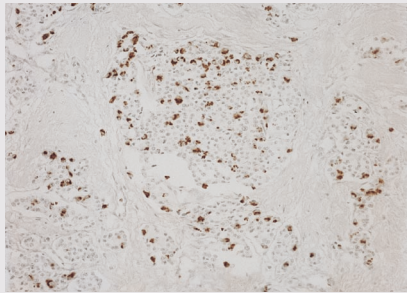


사진 5-1 Thyroid carcinoma, GTS-1 항체



사진 5-2 Thyroid carcinoma, GTS-3 항체

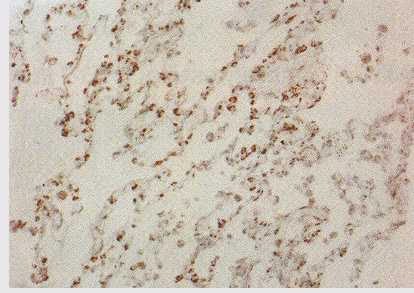


사진 6-1 Lung adenocarcinoma, GTS-1 항체

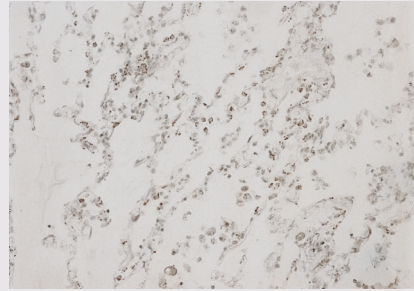


사진 6-2 Lung adenocarcinoma, GTS-3 항체

실험 예 2(Rat 신선동결 절편)

일차항체: GTS-1, GTS-3, 200배 희석 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

조직절편: Rat 비장

검출방법: LSAB2 Kit/HRP Rat 조직세포 표본용

조작순서: 1) 동결절편

2) 아세톤 고정 4 $^{\circ}\text{C}$, 10분

3) 내인성 biotin block

4) 내인성 peroxidase의 blocking

0.3% $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MeOH}$ 30분

5) 비특이성 Blocking

Block Ace(원액) 20분

6) 일차 항체반응 실온, 60분

7) Biotin 표식 이차항체 실온, 15분

8) POD 표식 streptoavidin 실온, 15분

9) DAB 발색

10) 핵염색(methyl green)

11) 탈수 · 투철 · 봉입

실험 예 3(Rat · 포르말린 고정 파라핀 절편)

일차항체: GTS-1 또는 GTS-3, 200배 희석(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

조직절편: Rat 비장

검출방법: LSAB2 Kit/HRP Rat 조직세포 표본용

조작순서: 1) 탈 파라핀

2) 부활처리(Proteinase K 처리)

Proteinase K(0.4 mg/ml) 실온, 5분

3) 내인성 biotin block

4) 내인성 peroxidase의 blocking 3% H_2O_2 5분



사진 7-1 Rat spleen, GTS-1 항체

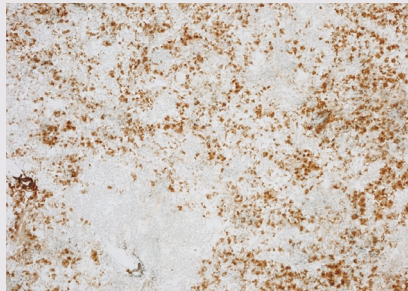


사진 7-2 Rat spleen, GTS-3 항체



사진 8-1 Rat spleen, GTS-1 항체

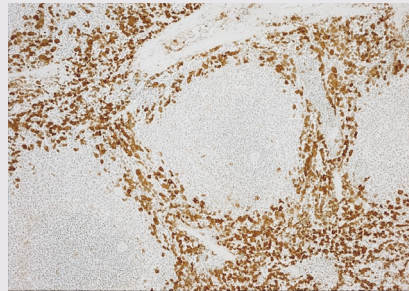


사진 8-2 Rat spleen, GTS-3 항체

- 5) 비특이성 blocking
Block Ace(원액) 20분
- 6) 일차항체반응 실온, 60분
- 7) Biotin 표식 이차항체 실온, 15분
- 8) POD 표식 streptavidin 실온, 15분
- 9) DAB 발색
- 10) 핵염색(methyl green)
- 11) 탈수 · 투철 · 봉입

【참고문헌】

1) Goda, N. *et al.* (1998) Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver: microtopographic basis for carbon monoxide-mediated sinusoidal relaxation. *J. Clin. Invest.* **101**, 604-612.
 2) Hayashi, S. *et al.* (1999) Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ. Res.* **85**, 663-671. 457-467

3) Makino, N. *et al.* (2001) Altered expression of heme oxygenase-1 in the livers of patients with portal hypertensive diseases. *Hepatology* **33**, 32-42.
 4) Ozawa, N. *et al.* (2002) Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *J. Clin. Invest.* **109**, 457-467.