

Rat Heme Oxygenase-1 EIA Kit (precoated)

Rat Heme Oxygenase-1 EIA Kit (precoated)
TaKaRa Code MK124 96회

스트레스 marker 효소인 Rat Heme Oxygenase-1을 측정하는 Rat Heme Oxygenase-1 EIA Kit (precoated)를 출시하였다. 본 kit은 2종의 anti-rat heme oxygenase 1 monoclonal antibody (GTS-1, GTS-3)를 조합하여 구축한 sandwich type의 ELISA kit이다. Rat의 혈청이나 조직 또는 rat의 배양 세포나 배양상층에 나타난 rat heme oxygenase-1을 간편하게 측정할 수 있으며 (human의 항원은 측정할 수 없음) 조작 시간은 2시간 30분이다.

Heme Oxygenase

Hemeoxygenase는 hemoglobin을 비롯한 heme 단백질의 보결분자체인 heme을 담즙색소 (biliverdin, bilirubin)와 일산화탄소 (CO) 그리고 환원철 (Fe^{2+})로 분해하는 효소이다. Hemeoxygenase는 최소 두 가지의 isozyme (Heme Oxygenase-1, Heme Oxygenase-2)이 보고되고 있다. Heme Oxygenase-2는 구성형 효소이고, Heme Oxygenase-1 (HO-1)은 각종 스트레스원 (중금속, endotoxin, 자외선, heat shock, 활성 산소, 저산소 상태)에 반응하여 세포내에서 유도 발현되는 효소이다. Heme Oxygenase에 의해 heme이 분해되어 생성되는 bilirubin에는 강력한 radical 보조작용을 통한 항 염증작용이 있고, 동시에 생성되는 일산화탄소는 혈관확장을 촉진하여 장기의 혈류를 유지한다고 보고되고 있다.

Kit를 구성하는 항체에 대해서

본 kit에 포함된 2종의 monoclonal antibody (GTS-1, GTS-3)는 케이오 대학 의학부 의화학 교실 Suematsu Makoto 교수에 의해 개발된 항 Heme Oxygenase-1 Antibody로 두 항체 모두 rat 및 human의 항원에 반응한다 (Life Science & Biotechnology 25호 참조). 이 두 항체는 Rat Heme Oxygenase-1을 발현하는 형질전환 세포 (WR19LrHO-1)의 microsome을 면역원으로 하여 제작된 mouse hybridoma cell 유래이다. 이들 2종의 항체를 조합하여 Rat Heme Oxygenase 1을 정량할 수 있는 sandwich type의 ELISA를 구축하였다. 또한, human 항원에 대해서는 두 항체의 특성상 측정이 불가능하다.

Kit의 내용 (96회분)

Anti-rat HO-1 Monoclonal Antibody Plate	96 well (8 well × 12 strips)
Peroxydase-labeled rat HO-1 Antibody (동결건조품)	11 ml 용
Standard (rat HO-1, 동결건조품)	5 ml 용
Sample Diluent	11 ml × 2
Substrate Solution (TMBZ; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)	12 ml
Stop Solution (1N H ₂ SO ₄)	12 ml
Cell Extraction Buffer	11 ml

실험 방법

시료 100 μ l antibody plate에 첨가
↓ 20 ~ 30°C (실온)에서 1시간 반응
세정 3회
↓
POD-labeled antibody 100 μ l 첨가
↓ 20 ~ 30°C (실온)에서 1시간 반응
세정 4회
↓
Substrate Solution 100 μ l 첨가
↓ 20 ~ 30°C (실온)에서 15분 반응
반응정지, 흡광도 450 nm 측정

성능

(1) 측정 범위 및 검출 감도

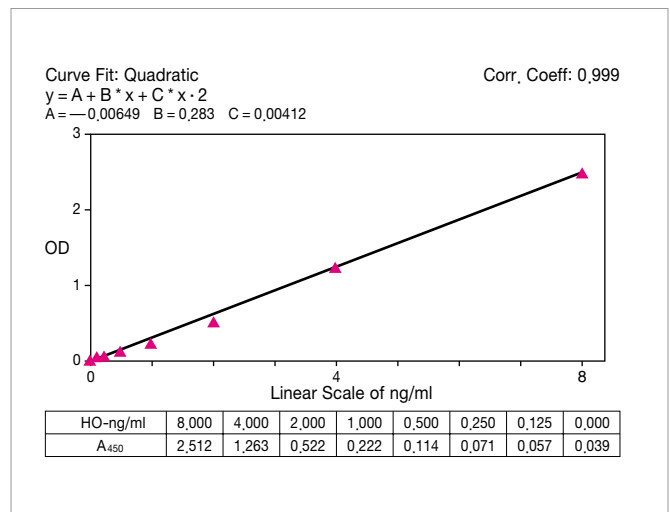


그림 1 측정 범위 및 검출 감도

(2) 재현성

동시재현성: 3 농도, n=16으로 측정 CV= 2.3 ~ 6.1%

일차재현성: 3 농도에서 3일간 측정 CV= 8% 이하

(3) 첨가회수율 88 ~ 111%

특이성

Rat Heme Oxygenase-1에 대해 특이적으로 반응하며 Rat Heme Oxygenase-2에는 반응하지 않는다.

Human 항원, rabbit 항원, guinea pig 항원, mouse 항원은 측정 대상이 되지 않는다.

실험상의 주의

- 1) Rat 조직 추출물 및 rat 혈청을 시료로 사용할 경우 스트레스의 정도에 따라 Heme Oxygenase-1의 발현량이 크게 다르므로, 예를 들면 2배 희석한 계열 등을 조제한 후 측정하여 검량선 내에 들어가는 값을 이용하여 농도를 환산한다.
- 2) 원액을 시료로서 사용할 경우의 측정값은 혈청이나 조직 중에 존재하는 고농도의 단백질로 인해 2배 희석액을 시료로 이용하는 경우의 측정값보다 낮은 값으로 측정되는 경향이 있다. 연속적으로 실험을 수행할 경우 항상 동일한 희석 배율로 측정할 것을 권장한다.
- 3) 주사 시 수행하는 ether 마취도 충분한 스트레스 요인이 되므로 영향을 최소화하기 위하여 반드시 마취 control 개체에 대해서도 동시에 측정하도록 한다.

실시 예 1: 측정 시 용혈성분에 의한 영향

시료 측정 시 용혈이 미치는 영향에 관하여 검토하였다.

●방법

에테르 마취를 하고 즉시 rat의 비장과 간장을 각각 추출하여 1개의 비장과 1/5개의 간장을 각각 개별적으로 으깨어 세포를 분산시켰다. 원심분리 (minicentrifuge 3,000 rpm)하여 세포를 모아 10 ml의 PBS로 1회 현탁하여 세정한 후 다시 원심 분리하여 세포를 회수하였다. 이 세정 조작을 총 2회 반복한 후 rat 비세포 및 간세포의 PBS 현탁액 (10 ml)을 각각 2개의 15 ml centrifuge tube에 5 ml 씩 분주하였다. 하나의 tube는 원심 분리하여 상청을 제거한 후 염화암모늄 (NH₄Cl)을 포함하는 용혈제를 5 ml 첨가하여 실온에서 5분간 반응하여 적혈구를 파괴시켰다. 원심 분리하여 세포를 모아 PBS로 1회 세정한 후 1 ml의 세포추출용 완충액을 첨가하여 현탁하였다 (용혈처리 시료). 다른 하나의 tube는 그대로 원심 분리하여 세포를 모은 후 1 ml의 세포 추출용 완충액을 더해 현탁하였다 (미처리 시료). 이 시료들은 본 kit를 이용하여 측정하였다.

표 1

시료의 희석율		×5	×25	×125	×625	공백
비장	미처리	4,173	1,298	0,164	0,083	0,043
	용혈처리	4,000	1,536	0,220	0,082	0,044
간장	미처리	1,782	0,243	0,073	0,053	0,044
	용혈처리	1,575	0,189	0,067	0,053	0,046

*수치는 A₄₅₀의 값을 나타낸다.

●결과

표 1의 결과로부터 혼입된 용혈 성분에 의한 극단적인 반응 저해는 없는 것으로 생각된다.

실시 예 2: 스트레스원으로 카드뮴 (cadmium; Cd)의 영향 (Rat 배양 세포에서의 카드뮴 투여 시험)

●방법

NRK49F 세포 (rat 정상 신장세포)와 3Y1 세포 (rat 섬유아세포) 2종류의 배양 세포를 각각 사용하여 다음의 실험을 수행하였다.

세포를 배지에 현탁하여 24 well plate에 1 ml 씩 넣고 염화카드뮴 (CdCl₂)을 최종농도 20 μM이 되도록 첨가한 후 (대조군으로 PBS를 이용) 72시간 배양하였다.

배양 시간에 따라 배양 상청과 세포를 회수·추출 하였다. 세포의 회수·추출은 well로부터 상청을 제거한 후 kit 중의 세포 추출용 완충액을 1 ml 첨가하여 가볍게 pipetting 하였다. 각 시료는 측정할 때까지 -20℃에서 보존하였다.

각 시점에서 시료 (상청 및 세포추출액)를 모두 회수한 후 이 중 Heme Oxygenase-1의 생산량을 본 kit를 이용하여 한 번에 측정하였다.

●결과

카드뮴(또는 PBS) 투여 시점과 72 시간 후의 세포수를 표 2에서, 각 시료 중의 Heme Oxygenase-1의 측정값을 그림 2에 나타내었다.

표 2 카드뮴 투여 시간과 72 시간 후의 세포수

세포	시간 카드뮴 투여시 (0 시간)	72 시간후	
		카드뮴 투여군	PBS 투여군 (대조군)
NRK49F	9×10 ⁴	43×10 ⁴	44×10 ⁴
3Y1	1.4×10 ⁴	55×10 ⁴	63×10 ⁴

*수치는 1 well(배지 1 ml) 중의 세포수를 나타낸다.

표 2에 나타낸 바와 같이 카드뮴 투여군과 PBS 투여군 (대조군)의 세포수에는 큰 차이가 없으며 카드뮴 (20 μM) 투여에 의한 증식 저해는 없다고 생각된다.

그림 2로부터는 카드뮴 투여에 의해 heme oxygenase-1의 생산량이 증대되는 것을 확인할 수 있다. 그러나 2종류의 배양 세포에서는 카드뮴을 투여할 경우 Heme Oxygenase-1의 생산량 및 시간에 따른 생산 pattern이 달라 세포의 종류에 따라 스트레스 응답이 다를 수 있음을 추측할 수 있다.

그림 2 또한, NRK49F 세포에서는 카드뮴 투여 52시간 이후에 배양 상청에서 Heme Oxygenase-1이 검출되었지만 이것은 세포로부터 배양기속으로 방출된 것이라고 생각된다.

실시 예 3:카드뮴의 첨가량과 Heme Oxygenase-1 생산량

NRK49F 세포 (rat 정상 신장세포)를 이용하여 카드뮴의 첨가량과 Heme Oxygenase-1 생산량과의 관계를 조사했다.

●방법

염화카드뮴의 2배 희석 계열을 만들어 최종농도가 0 ~ 20 μM이 되도록 여러 가지 농도의 염화카드뮴을 NRK49F 배양세포 (배지량 1 ml/well)에

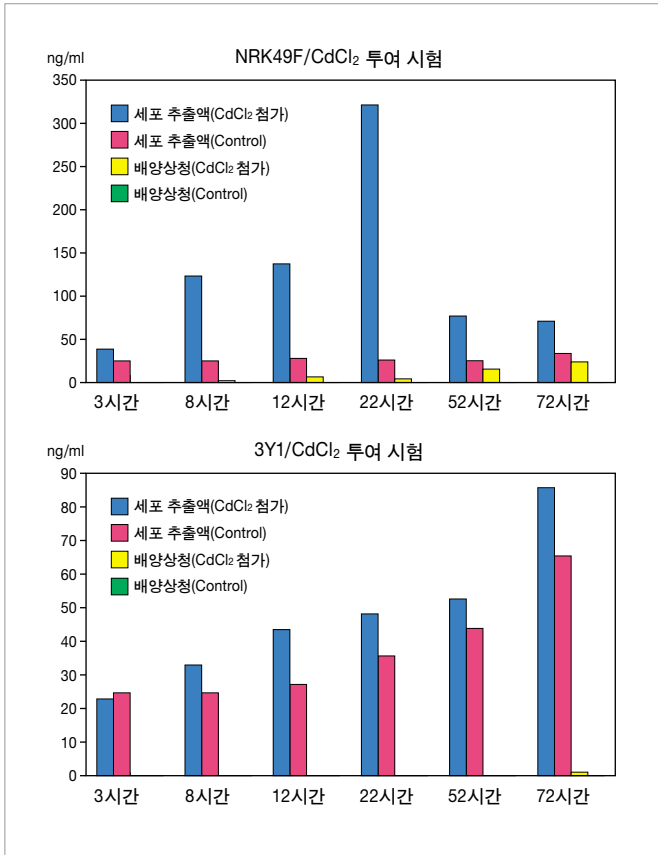
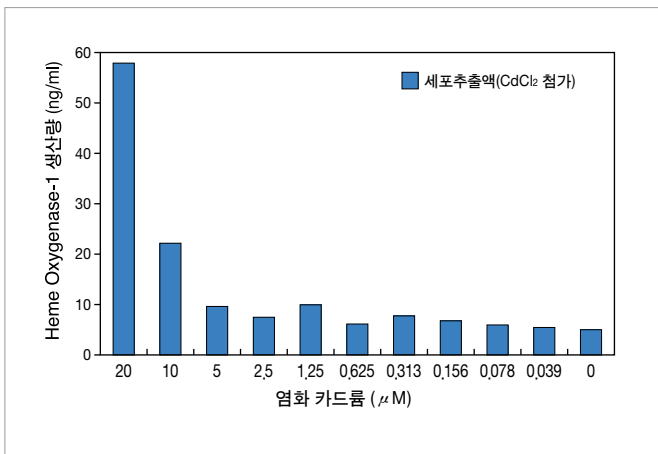


그림 2 배양세포에서의 카드뮴 투여 시험
Y축은 Heme Oxygenase-1의 생산량 (ng/ml)을 나타낸다.

첨가하여 배양하였다. 16시간 후 배양상청을 회수하여 kit 중의 세포 추출 완충액을 1 ml 첨가한 후 세포를 회수·추출하였다. 이 세포 추출액과 배양상청 중 Heme Oxygenase-1의 양을 본 kit를 이용하여 측정하였다.

●결과

세포 추출액 중 Heme Oxygenase-1의 측정 결과를 그림 3에 나타내었다. 16시간 후 배양상청 중에는 Heme Oxygenase-1은 검출되지 않았다.



실시 예 4: 카드뮴 투여에 따른 rat의 각종 장기의 Heme Oxygenase-1 유도

염화카드뮴을 스트레스원으로 rat의 복강 내에 투여하여 각종 장기 중에서 Heme Oxygenase-1의 생산량 변화를 조사하였다.

●방법

염화카드뮴 (20 μmol/kg 체중) 또는 PBS (대조군)를 rat의 복강 내에 투여하고 16시간 후에 마취하여 각종 장기를 추출하였다. Kit 중의 세포 추출 완충액을 각 장기에 0.25 mg (장기습중량)/ml 이 되도록 첨가하여 homogenize 하였다. 본 kit를 이용하여 이들 homogenate 중에 Heme Oxygenase-1의 양을 측정하였다.

●결과

측정 결과를 그림 4에 나타내었다.

각 장기에 따라 스트레스 응답 (response)이 다르게 나타났다.

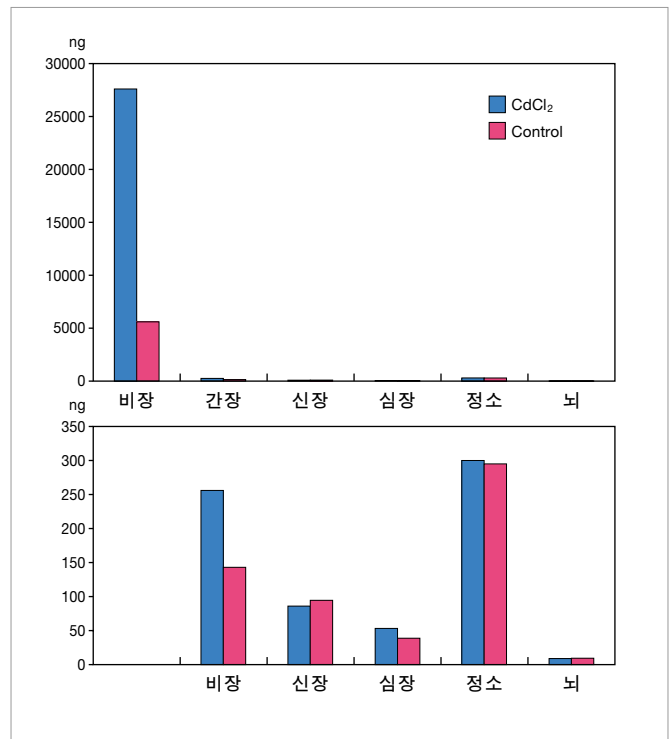


그림 4 Rat 각 장기의 Heme Oxygenase-1의 생산량
Y축은 장기 0.25 mg (습중량)당 Heme Oxygenase-1의 함유량 (ng)을 나타낸다.