

Vitronectin EIA Kit (precoated)

TaKaRa Code MK 102 96 assays

세포외 matrix 단백질의 하나인 vitronectin의 ELISA Kit를 간편하게 사용할 수 있는 precoated형으로서 새로 발매하였다. 하루 전부터의 plate coating 처리와 blocking 처리가 필요없어 바로 측정할 수 있으며, 조작시간은 약 2시간 15분이다. 사람 또는 토끼의 혈장(헤파린 혈장은 제외), 혈청 또는 배양세포 상청 속의 vitronectin을 높은 재현성으로 간단하게 측정할 수 있다.

Vitronectin에 대해

Vitronectin (VN)은 fibronectin이나 laminin 등과 마찬가지로 강한 세포 접착활성을 갖는 혈장 당단백질이다. 사람의 vitronectin은 분자량 약 75,000으로 1차 구조는 1985년에 결정되었다¹⁾. 아미노산 458개로 된 single strand polypeptide 구조를 하고 있으며, Arg-Gly-Asp (RGD) 서열을 세포 결합부분에 가지고 있다. 이외에 콜라겐 결합 domain과 헤파린 결합 domain을 포함하고 있다. 혈액 속에는 C 말단부분의 80 아미노산 (약 10 kDa)이 결손된 것도 많이 존재하므로 혈청 속에서 헤파린 column으로 정제하면 분자량 75,000과 65,000의 두 종류의 vitronectin 혼합물을 얻을 수 있다.

Vitronectin은 vitronectin receptor를 보유하는 세포에 대해 접착활성을 갖는 것 외에 헤파린, 콜라겐, 보체 (complement)의 membrane aggressive complex, plasminogen 활성화 저해인자-1, thrombin-anti thrombin III complex,

β -endorphin 등과 결합한다. 생리 기능으로는 세포접착 외에 혈액응고, 보체(complement)의 기능조절이 알려져 있다.

Kit의 내용 (96 회분)

anti-human · vitronectin monoclonal antibody plate	96 well (8 well × 12 strips)
Peroxidase 표식 anti-human · vitronectin monoclonal antibody (동결건조품)	11 ml-용
표준품 (human · vitronectin 함유 표준물질, 동결건조품)	1 ml-용
검체 희석액	11 ml × 2
기질용액 (TMBZ; 3,3',5,5' -tetramethylbenzidine)	12 ml
반응 정지액(1 N 황산)	12 ml

1 step법 의한 측정

본 kit은 1 step법으로 측정하도록 기본 설계가 되어 있다. 그러나 검체 속에 이물질이 포함되어 있는 경우에는 protocol을 약간 변형하여 2 step법으로 측정할 수 있다.

(1) 조작법 (1 step)

- Peroxidase 표식항체 (100 μ l)
- 시료 (50 μ l) 동시 첨가 (2개 연속)
 - ↓ 20 ~ 30°C, 2시간 반응
- 세정 4회
 - ↓
- 기질용액 (100 μ l) 첨가
 - ↓ 20 ~ 30°C, 15분 반응
- 반응정지액 (100 μ l) 첨가
 - ↓
- 450 nm에서 흡광도 측정

(2) 성능

- 1) 검출감도
 - 최소 검출감도 5 ng/ml
 - 표준적인 검량선을 그림 1에 나타내었다.

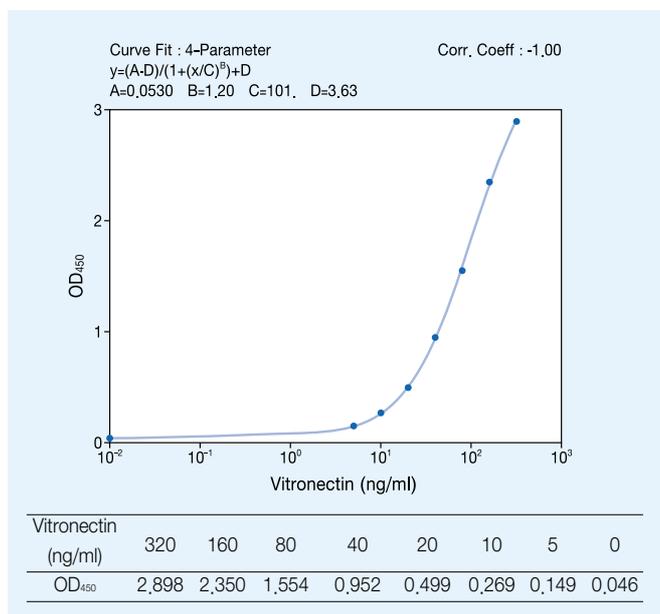


그림 1 1 step법의 검출량

2) 재현성

동시 재현성: 3 농도, n=16에서 실시 CV 4.9 ~ 6.3%
 일차 재현성: 3 농도에서 3 일간 측정 CV 2.2 ~ 9.6%

3) 측정대상

동물 종류: 사람, 토끼
 시료: 혈장*, 혈청, 배양세포 상층

* Vitronectin은 헤파린에 결합하므로 헤파린 혈장은 검체로서 사용할 수 없으니 주의하기 바란다.

4) 권장하는 희석비율

혈장과 혈청 속의 vitronectin량은 수100 ug/ml 대로 예상된다. 그러므로 측정 시료는 500 ~ 1,000배 희석한 것을 사용한다. 일례로 사람 (3 시료)과 토끼의 혈청을 이용하여 희석 직선성을 조사한 결과를 그림 2에 나타낸다.

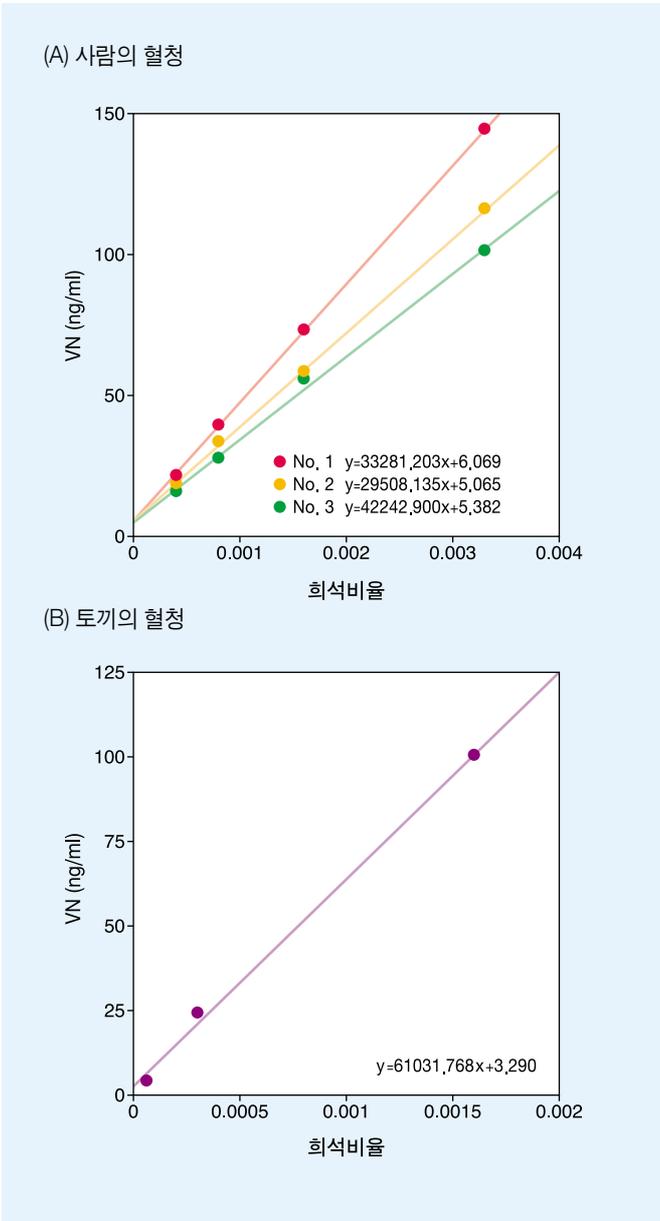


그림 2 희석 직선성

2 step법에서의 사용

시료에는 예측하지 못한 이물질이 포함되어 있는 경우가 있다. 또한 방부제 (sodium azide)가 첨가되어 있는 시료를 사용할 경우, 1 step법에서는 표식항체가 실활하므로 측정할 수 없다. 이 경우에는 2 step법으로 측정할 수 있다.

2 step으로 함으로써 시료의 필요량은 1 well당 100 μl가 된다. 또한 2 step의 효과로서 검출감도가 향상하기 때문에 상당히 미량인 vitronectin을 측정할 경우에도 2 step법을 권장한다.

(1) 조작법 (2 step)

- 시료 (100 μl) 첨가 (2개 연속)
- ↓ 20 ~ 30°C, 1 시간 반응
- 세정 3회
- ↓
- Peroxidase 표식항체 (100 μl) 첨가
- ↓ 20 ~ 30°C, 1 시간 반응
- 세정 4회
- ↓
- 기질용액 (100 μl) 첨가
- ↓ 20 ~ 30°C, 15 분 반응
- 반응정지액 (100 μl) 첨가
- ↓
- 450 nm에서 흡광도 측정

(2) 성능

- 1) 2 step법에서 검량선의 최고농도 80 ng/ml
- 2) 검출감도 1.25 ng/ml

참고 문헌

1) Suzuki, S. et al. (1985) EMBO. J., 4, 2519-2524