

# 항 Dentin Matrix Protein 1 peptide 항체

TaKaRa Code M176 0.1 mg

Dentin Matrix Protein 1 (DMP1)에 대한 peptide 항체를 출시하였다. 지금까지 DMP1은 치아의 상아질에 특이적인 단백질로서 연구되었지만 골 세포의 새로운 marker로도 명확해졌다. 이 peptide 항체는 조직 내 DMP1의 분포를 조사하거나 골 추출물에서의 western blot assay에 사용한다.

## Dentin Matrix Protein 1 (DMP1)에 대해<sup>1~5)</sup>

Dentin Matrix Protein 1 (DMP1)은 치아의 상아질 cDNA library에서 동정된 분비성 산성 인산화 단백질이다. 이 유전자는 사람 염색체에서는 4q21에 위치하고, 그 부근에 위치하는 Osteopontin, MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein), Bone Sialoprotein (BSP) 등의 유전자와 함께 유전자 family를 형성하고 있다.

최근, DMP1은 골 조직에서의 발현이 주목을 받아, *in situ* hybridization과 면역조직 염색으로 골아세포에서 DMP1이 검출되지 않지만 골기질에 매입된 골 세포에서 특이적으로 생산되는 골기질이라고 알려지고 있다. 골 세포는 성숙한 골 중에 1 mm<sup>2</sup>당 25,000개나 존재하고 있다고 한다. 이 숫자는 골 표면의 골아세포 수의 10배에 이르며, 골 대사에 있어서 중요한 활동을 담당하는 것으로 생각되어지나, 특이적 marker가 없어 골 세포의 연구는 좀처럼 진행되지 않고 있다. 그러나 DMP1은 골 세포의 특이적 marker가 되기 때문에 DMP1에 대한 항체는 골 세포 연구에 유효하다고 판단된다.

또한 DMP1은 아미노산 서열에 의해 조직 속에서 (-)전하를 나타내어, 이것이 칼슘이온과 결합하므로 석탄화와 깊게 관련하는 것으로 판단된다. 실제로 DMP1의 골아세포주로의 유전자 도입 실험에서는 석탄화 촉진기가 나타나고 있는 경우가 보고 되어, DMP1은 골의 석탄화 연구에 중요한 분자일 가능성이 제시되고 있다.

## 본 제품에 대해

### [Peptide 항체의 제작방법]

#### (1) Epitope이 되는 합성 아미노산의 선택

오사카대학대학원 치학연구과 악구강 병인병태(顎口腔病因病態) 제어학 강좌의 논문<sup>3)</sup>에 따라 Rat의 DMP1 아미노산 서열 90-111 site: SGDDTFGDEEDNGPGPEERQWGG를 epitope으로 하였다. 번역시에는 아미노산의 N말단 끝에 conjugation용 cysteine을 1잔기 도입하고, 23개 아미노산으로서 80% 순도, 10 mg을 합성하였다.

#### (2) 항체 제작 및 친화력 정제

위에서 합성한 peptide 2 mg을 maleimide화 KLH와 conjugation하고, fluid complete adjuvant와 혼합하여 흰 토끼에게 2주 간격으로 4회의 피하투여를 수행하여 peptide에 대해 10,000배의 역가가 있는 항혈청을 얻었다. Protein A column으로 IgG를 분리하고, 이어서 peptide 5 mg을 고정화한 affinity column에 의해 항원 특이항체를 고순도로 정제하였다.

#### ●제품의 형태

· 항체량

0.1 mg/vial (carrier antibody를 제외한 특이항체만) 동결건조품 (1% BSA 함유하는 PBS (방부제 포함하지 않음)에 용해 후, 동결건조)



그림 1 DMP1의 peptide alignment

- 항체의 복원  
동결건조품을 50  $\mu$ l의 순수한 물로 용해하면 2 mg/ml의 농도가 된다.
- 표준 사용농도 2 ~ 5 mg/ml  
희석용액으로는 1% BSA 함유하는 PBS 또는 25% Block Ace™ 함유하는 PBS를 권장한다.

● 교차반응성

Homology 검색의 결과 (그림 1)를 보면 Rat DMP1의 90 ~ 111 site의 아미노산 서열은 Rat, human에 대해 상동성이 높게 나타난다. 실제로 이런 동물종의 DMP1에 대한 반응성은 조직염색의 결과에서도 확인되고 있다.

실험 예: Western blot assay

Toyosawa의 보고<sup>3)</sup>에 의하면 항 DMP1 (90-111)을 epitope로 하는 peptide 항체는 대장균에서 발현시킨 Rat DMP1 단백질에 반응하고, 또한 Rat 골 추출액 속의 천연형 DMP1 단백질에 반응하는 것이 확인되고 있다. 여기에서는 Mouse의 두개골에서 EDTA로 추출한 시료에 대해 본 peptide 항체를 이용하여 western blot assay를 실시한 예를 소개하겠다.

● 방법

(1) 골 추출 시료의 조제

- ① 생후 24일된 SD Rat (암컷), 70개체의 두개골에서 주의하여 결합조직을 제거하고, 두개골을 PBS로 세척하여 회수하였다 (회수량 20 g).
- ② 약 1 L의 액체질소 속에서 분쇄한 후, 곧바로 100 ml의 0.5 M EDTA · 2Na를 함유하는 추출 시약을 넣고 4℃에서 72시간 추출하였다.  
[추출액의 조성]  
0.5 M EDTA · 2Na  
5 mM benzamidine  
30  $\mu$ M PMSF  
10 mM aminocaproic acid  
1  $\mu$ g/ml Leupeptin  
20 mM Tris-HCl (pH7.8)
- ③ 추출물을 원심 분리 (9,000 rpm)하고, 그 상청을 5 L의 증류수에 2일 동안 4회 투석하였다
- ④ 투석한 액 (약 100 ml)을 -80℃에서 보존하고, 일부는 western blot assay의 시료로 사용하였다.

(2) Western Blotting

면역 전의 토끼 혈청 (control), 정제 전의 anti DMP1 peptide 항혈청, protein A 정제 항체, affinity 정제 항체 (본 제품)와 토끼에서 정제한 IgG (control)를 각각 사용하여 실시한 후 결과를 비교하였다.

- ① 시료를 환원, 가열 처리한 후, 5 ~ 20% SDS gradient gel의 각 lane에 10  $\mu$ l씩 loading하고, 위의 방법에 따라 SDS-PAGE 전기영동을 수행하였다.
- ② 전기영동 후, gel 위의 단백질을 PVDF막에 transfer하였다.
- ③ Block Ace™ (원액)에서 blocking한 후 PVDF막을 lane마다 잘라, 아래의 용액에 각각 담구어 실온에서 1시간 반응하였다.

- A: 면역 전의 토끼 혈청 (1,000배 희석액)
- B: 정제 전의 항 DMP1 펩티드 항혈청 (1,000배 희석액)
- C: Protein A 정제 항체 (10  $\mu$ g/ml)
- D: Affinity 정제 항체 (10  $\mu$ g/ml)
- E: 토끼 정제 IgG (10  $\mu$ g/ml)

④ 0.1% Tween 함유 PBS에서 진동 세척한 후, 항 토끼 IgG-POD 표식 항체 (ICN)의 500배 희석액에 막을 담그고, 실온에서 1시간 반응하였다. 다시 0.1% Tween 함유 PBS에서 진동 세척한 후, 발색기질 TrueBlue™에 의해 발색시켰다.

● 결과

정제 전의 항혈청과 정제항체를 사용하였을 경우에서 분자량 23,000 부근에서 명확한 밴드를 확인하였다 (그림 2). 그러나 검출된 밴드는 이론적인 크기보다 훨씬 작으므로 골 추출물의 조제 과정에서 DMP1 단백질의 분해가 일어난 것으로 판단된다.

항체의 특이성은 정제 수준을 높일수록 향상한다는 것이 확인되었다. Protein A 정제 항체의 경우에는 저분자의 위치에서 비특이적인 밴드를 확인하였으나 affinity 정제 항체 (본 제품)의 경우에는 단일 밴드를 확인하였다.

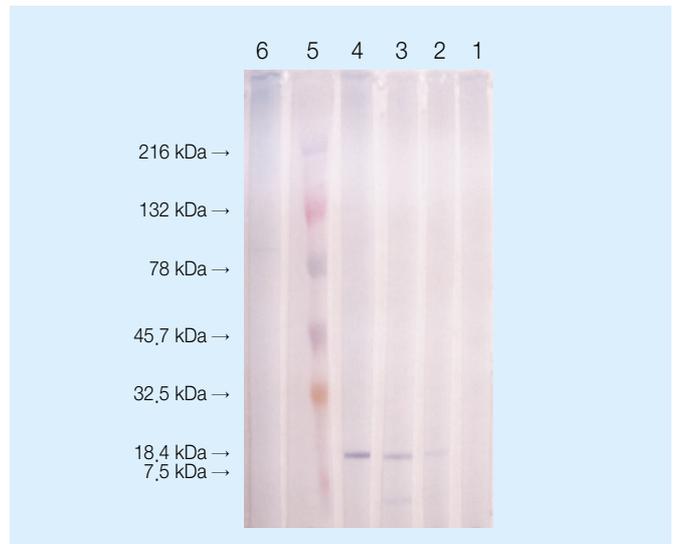


그림 2 Western Blotting Lane

- 1: 면역 전의 토끼의 혈청 (× 1,000)
- 2: 정제 전의 anti DMP1 peptide 항 혈청 (× 1,000)
- 3: Protein A 정제 항체 (10  $\mu$ g/ml)
- 4: Affinity 정제 항체 (10  $\mu$ g/ml)
- 5: 분자량 marker
- 6: Control 토끼 정제 IgG (10  $\mu$ g/ml)

실험 예 : 면역조직 염색

본 제품을 이용한 면역염색 실험 예를 소개하겠다.

● 방법

- 조직 절편의 조제  
시료 : 생후 3주된 Rat의 골 조직

- 조작순서: 1) 4% paraformaldehyde 용액으로 고정  
 2) 10% EDTA 탈회 (4°C, 1주일)  
 3) 알코올 탈수  
 4) Xylene 투철  
 5) 파라핀 함유  
 6) 박절 (薄切)  
 7) 면역염색

- 3) 비특이성 단백질의 blocking  
 4) 1차 항체 4°C, overnight  
 5) Biotin 표식 2차 항체 실온, 30분  
 6) 내인성 peroxidase의 blocking  
 7) Strept ABCComplex의 반응 실온, 30분  
 8) DAB 반응  
 10) 탈수, 투철(透徹), 봉입

· 면역조직 염색

1차 항체: 토끼 anti Rat DMP1 (90-111)

Polyclonal antibody (1,000배 희석)

조직절편: Rat의 EDTA 탈회 파라핀 함유 조각

검출방법: sABC 시스템 (DAKO사)

면역순서: 1) 탈 파라핀

2) 항원부활법:

Trypsin 용액에서 37°C, 20분 처리

[Trypsin 용액]

Trypsin 25 mg

CaCl<sub>2</sub> 25 mg

0.01 M 인산 완충 식염수 (PBS) 100 ml

● 결과

본 제품을 사용하여 Rat의 골 조직을 면역 염색한 결과를 그림 3에 나타내었다.

악골과 경골의 피질(皮質) 골 부분에서 골 세관을 포함한 골 세포의 주위 기질에 특이적으로 강한 양성반응이 나타났고, 유골(類骨) 부분에 해당하는 골량(骨梁) 주위 부분에는 반응이 나타나지 않았다.

참고문헌

- 1) George, A. et. al (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 12624-12630.
- 2) Toyosawa, S. et. al (2000) *J. Mol. Evol.*, **50**, 31-38.
- 3) Toyosawa, S. et. al (2001) *J. Bone Miner. Res.*, **16**, 2017-26.
- 4) Narayanan, K. et al (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4516-4521.
- 5) Toyosawa, S. et. al (2002) *Tissue Engineering for Therapeutic Use* **6**, 83-94

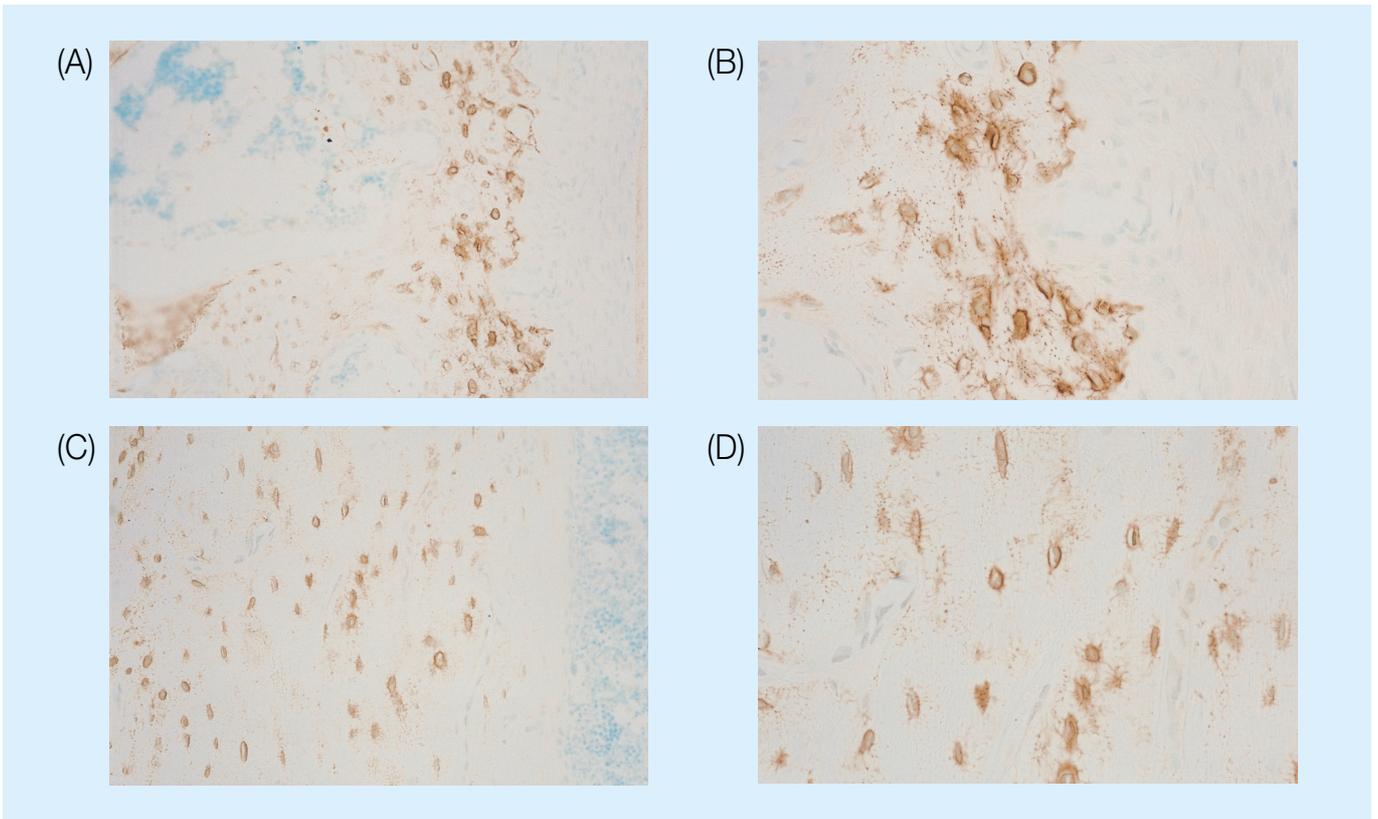


그림 3 본 제품을 이용한 면역조직염색의 예

A: Rat 악골 (× 66)

악골에 있으면서 골 세관을 포함하는 골세포의 주위 기질에 특이적으로 강한 양성 반응이 나타났다. 많은 골 부위에 상당하는 골량주위부에서 면역 반응은 볼 수 없었다.

B: A의 확대(× 132)

C: Rat 경골의 피질 골 부분 (× 66)

경골의 피질 골 부분에 있으면서 골 세관을 포함하는 골세포의 주위 기질에 특이적으로 강한 양성 반응이 나타났다. 많은 골 부위에 상당하는 골량주위부에서 면역 반응은 볼 수 없었다.

D: C의 확대 (× 132)