

Mouse Heme Oxygenase-1 측정예!!

Mouse Heme Oxygenase-1 EIA Kit(Precoated)

TaKaRa Code MK125 96 회용

- Mouse 혈청이나 조직, mouse 배양세포나 배양상청 중에 스트레스에 의해 유도된 heme oxygenase-1(HO-1)를 간편하게 측정하는 EIA Kit 이다.
- 총 조작시간은 2 시간 30 분이다.
- Human, rabbit, guinea pig의 HO-1과는 교차반응 하지 않는다(Rat의 HO-1과는 교차반응을 한다).

Heme oxygenase에 대하여

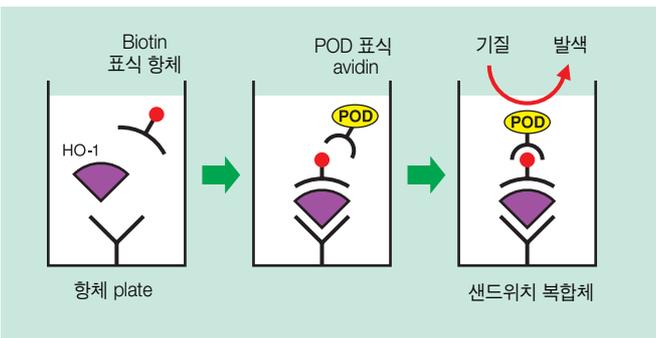
생물은 외적 환경으로부터 자외선, heat shock, 저산소 상태, 활성산소, endotoxin, 증급속 등 끊임없이 각종 스트레스를 받고 있다. 이런 스트레스로 인해 생체 내의 heme 단백질은 분해되어 heme을 발생하는데, heme oxygenase는 이 heme을 더욱 분해하여 담즙 색소(biliverdin, bilirubin)와 CO, Fe로 분해한다. 이 효소에 의해 생성된 bilirubin은 강력한 radical 포착작용이 있으며, CO는 활성산소의 제거작용이 있다. Oxygenase에는 2 개의 isozyme이 있으며 스트레스에 의해 세포 내에 유도되는 형태가 I형(HO-1)이고, constitutive하게 발현되는 형태가 II형(HO-2)이다.

본 Kit는 HO-1을 측정하기 위한 kit이다.

Heme
 ↓ Heme oxygenase
 Biliverdin(담즙 색소)+철(Fe)+일산화탄소(CO)
 ↓
 Bilirubin(radical scavenger)

측정원리

본 kit는 고상항체에 anti mouse HO-1 monoclonal antibody(GTS-1)를 사용하고 있으며, 검체속의 HO-1(항원)을 plate상에 포착한다. 동시에



biotin을 표식한 anti mouse · rat HO-1 rabbit polyclonal antibody를 첨가한 후 plate상에 포착된 HO-1과 결합시킨다. 이 복합체에 peroxidase 표식 avidin을 결합시키고 기질 발색반응을 실시하여 항원항체 반응을 가시화한다. 고상항체에 사용하는 GTS-1은 게이오 대학에서 개발된 anti HO-1 monoclonal antibody로, mouse, rat, human 항원에 반응한다. 표식 항체로 anti mouse, rat HO-1 rabbit polyclonal antibody를 사용함으로써 mouse의 HO-1을 측정한다. Rat의 HO-1 표준품을 조합시킴으로써 rat HO-1 측정도 가능한데, 이 목적으로는 두 가지 monoclonal antibody를 사용한 Rat Heme Oxygenase-1 EIA Kit(TaKaRa Code MK124) 사용을 권장한다.

Kit의 내용(96 회용)

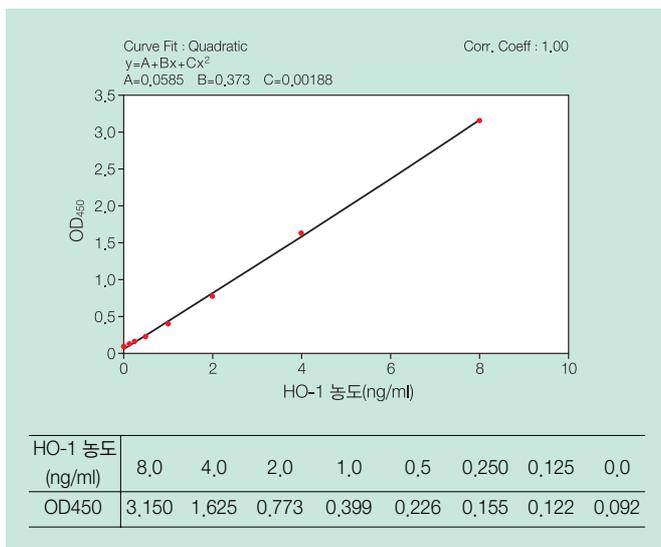
Anti mouse HO-1 monoclonal antibody plate (96 well: 8 well × 12 strips)	1 plate
Biotin-labeled anti mouse, rat HO-1 rabbit polyclonal antibody(동결건조품)	11 ml용
Peroxidase-labeled avidin(동결건조품)	11 ml용
Standard(mouse HO-1 함유 비장 추출물)(동결건조품)	1 ml용
Sample Diluent	11 ml × 2
Substrate Solution(TMBA: 3,3', 5,5' -tetramethylbenzidine)	12 ml
Cell Extraction Buffer	11 ml
Stop Solution(1N 황산)	12 ml

조작방법

- 항체 plate에 시료와 표준품(100 μl)을 첨가하고, biotin 표식 anti HO-1 polyclonal antibody(100 μl) 첨가
 - ↓ 20~30 ℃ (실온), 1 시간 반응
- 세정 3회(0.1 % Tween/PBS)
 - ↓
- Peroxidase labeled avidin(100 μl) 첨가
 - ↓ 20~30 ℃ (실온), 30 분 반응
- 세정 4회(0.1 % Tween/PBS)
 - ↓
- Substrate Solution(100 μl) 첨가
 - ↓ 20~30 ℃ (실온), 15 분 반응
- Stop Solution(100 μl) 첨가
 - ↓
- 450 nm의 흡광도 측정

성능

(1) 측정범위 및 검출감도



(2) 특이성

Mouse와 rat HO-1에 반응하고 HO-2에는 반응하지 않는다. Human과 rabbit, guinea pig HO-1에 대해서는 반응하지 않는다.

(3) 재현성

동시 재현성: 3 농도, n=16에서 측정 CV=6.5~8.1 %

일차 재현성: 3 농도, 3 일간 측정 CV=8 % 이하

(4) 첨가 회수율

90~110 %

측정시 주의사항

- (1) 스트레스 정도에 따라 유도되는 HO-1의 발현량이 크게 달라지므로 (예를 들면 시료 측정시에는 2 배 희석액을 조제한 후 측정하고)검량선 내로 들어간 부분에서 농도를 환산한다.
- (2) 한 실험에서는 가능한 한 동일한 희석배율로 측정하고 상대평가를 권장한다.
- (3) 주사에 사용하는 에테르 마취 등도 강력한 스트레스 요인이 되므로 그 영향을 확인하기 위하여 대조군으로 마취 control을 설정하도록 한다.

실험 예 1: Mouse 배양세포에서의 카드뮴 확인실험

【방법】

3T3L1 세포(Mouse Swiss albino, embryo)와 ST2 세포(mouse · stroma cell)를 사용하여 아래의 실험을 하였다. 계대용에 trypsin으로 분산시킨 세포를 FBS를 포함하는 배지에서 현탁하고 24 well plate의 각 well에 1 ml씩 첨가하였다. 그리고 FBS 배지에서 조제한 20 μM 염화카드뮴 용액을 1 ml씩 첨가하여(마지막 농도 10 μM) 72 시간 배양하였다. 또한 FBS 배지를 대조군으로 사용하였다. 일시적(0, 9, 27, 52, 72 시간)으로 well 내의 배양상청 회수와 세포추출액 조제를 실시하였다. 세포추출액 조제는 well에서 상청을 회수한 후, kit 내의 세포추출용 완충액을 well에 0.2 ml 첨가하여 가볍게 pipetting함으로써 실시하였다. 각 시료는 측정시까지

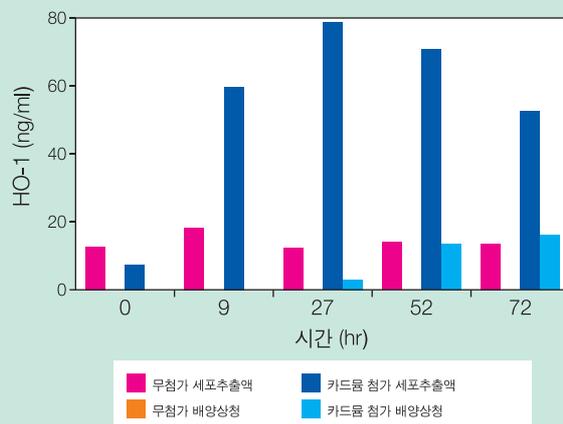
지 -20 ℃에서 보존하였다.

일정한 시점의 시료(상청 및 세포추출액)를 준비하고, 시료 내의 HO-1 생산량을 한 번에 측정하였다. 측정 시에는 농도 예측을 할 수 없기 때문에 3 배 희석액을 조제하여 측정하고, 검량선 측정범위에 들어간 희석 시료의 농도 환산치를 데이터로서 선택하였다.

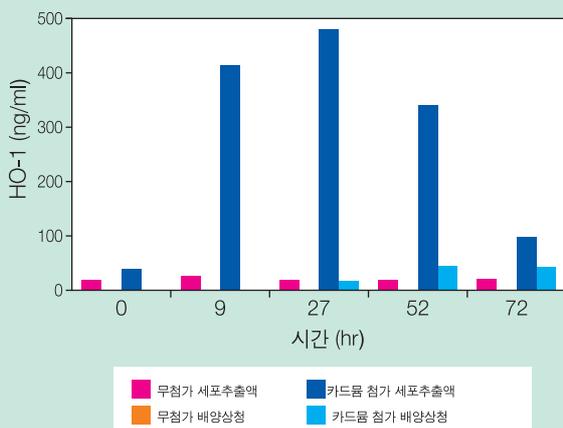
【결과】

두 종류 세포 모두 염화카드뮴 첨가 9시간 후에 세포 내에 HO-1의 강한 유도가 나타났다. 현미경으로 관찰하면 모든 세포에서 카드뮴에 의한 손상이 관찰되고 세포 수는 증가하지 않는다. 반대로 ST2세포에서는 감소가 확인되었다.

3T3L1세포



ST2세포



실험 예 2: 용혈성분에 의한 측정의 영향

용혈성분의 혼합으로 측정이 영향을 받는지 여부를 검토하였다.

【방법】

Mouse의 비장 5 개를 10 ml PBS를 포함하는 stainless mesh에서 분쇄하고, 원심분리(탁상원심기 3,000 rpm)하여 세포를 침전시켜 10 ml의 PBS에서 현탁하여 세정한 후, 다시 침전하여 회수하였다. 이 세정 조작을 총 2 회 반복한 후, mouse의 비장 세포 현탁액을 각각 2 개의 15 ml 원심 tube에 5 ml씩 분주하였다.

한쪽 tube에는 원심분리하여 상청을 제거한 후, 염화암모늄을 포함하는 용혈제를 5 ml 첨가하고 실온에서 5 분 방치하여 적혈구를 선택하였다. 원심분리하여 세포를 모으고 PBS로 1회 세정 후, 1 ml의 세포추출용 완충액을 첨가하여 현탁하였다(용혈처리 시료: 용혈성분을 포함하지 않음).

다른쪽 tube는 그대로 원심분리하여 세포를 모으고 1 ml의 세포추출용 완충액을 첨가하여 현탁하고(미처리 시료: 용혈성분 포함), 측정을 하였다.

【결과】

용혈성분 혼합으로 약간의 반응 억제(저측정치)가 나타났다(표 1). 따라서 측정시에는 시료 상태에 주의해야 한다.

표 1 용혈성분에 의한 측정으로의 영향

시료 희석률		×5	×25	×125	×625	×3125
Mouse	미처리	3,449	1,084	0,304	0,157	0,099
비장세포	용혈처리	3,575	1,736	0,616	0,234	0,107

* 수치는 OD₄₅₀의 값을 나타낸다.

실험 예 3: 카드뮴의 복강내 투여로 mouse의 혈중 HO-1 유도

염화카드뮴을 스트레스윈으로 mouse의 복강 내에 투여하여 혈중 HO-1의 생산량을 조사하였다.

【방법】

염화카드뮴(20 μmol/kg 체중)을 mouse(평균체중 25 g)의 복강 내에 투여하고 경시적으로 1 개체씩부터 전체 채혈을 실시하였다. 혈청을 모아 측정시까지 -80 °C에서 보관하고, 측정시에 혈청 시료의 5 배 희석액을 제작하여 측정에 사용하였다. 5배 희석물의 실제측정값을 선택하여 농도 환산치를 산출하였다.

【결과】

투여 후, 6 시간 이후에 혈중 HO-1이 상승하고, 30 시간 이후에 HO-1의 소실이 나타났다. 이번 측정에서는 1 개체의 시료만을 사용하여 개체 차이의 영향이 나올 가능성이 있지만 투여 후 8 시간부터 24 시간 사이에 HO-1의 유도 정점이 존재할 것으로 판단되었다.

표 2 카드뮴의 복강내 투여로 mouse 혈중 HO-1의 유도

	카드뮴 투여 후의 시간(hr)									
	0	1	2	4	6	8	10	24	27	30
실측치	0,074	0,323	0,131	0,323	0,232	2,867	3,003	2,269	0,900	0,631
환산치	0,370	1,615	0,655	1,615	1,160	14,335	15,015	11,345	4,500	3,155

*실측치: OD₄₅₀, 환산치의 단위: ng/ml

관련 신제품

Anti-Heme Oxygenase-1(GTS-1) Monoclonal, POD

TaKaRa Code M177 0.05 mg

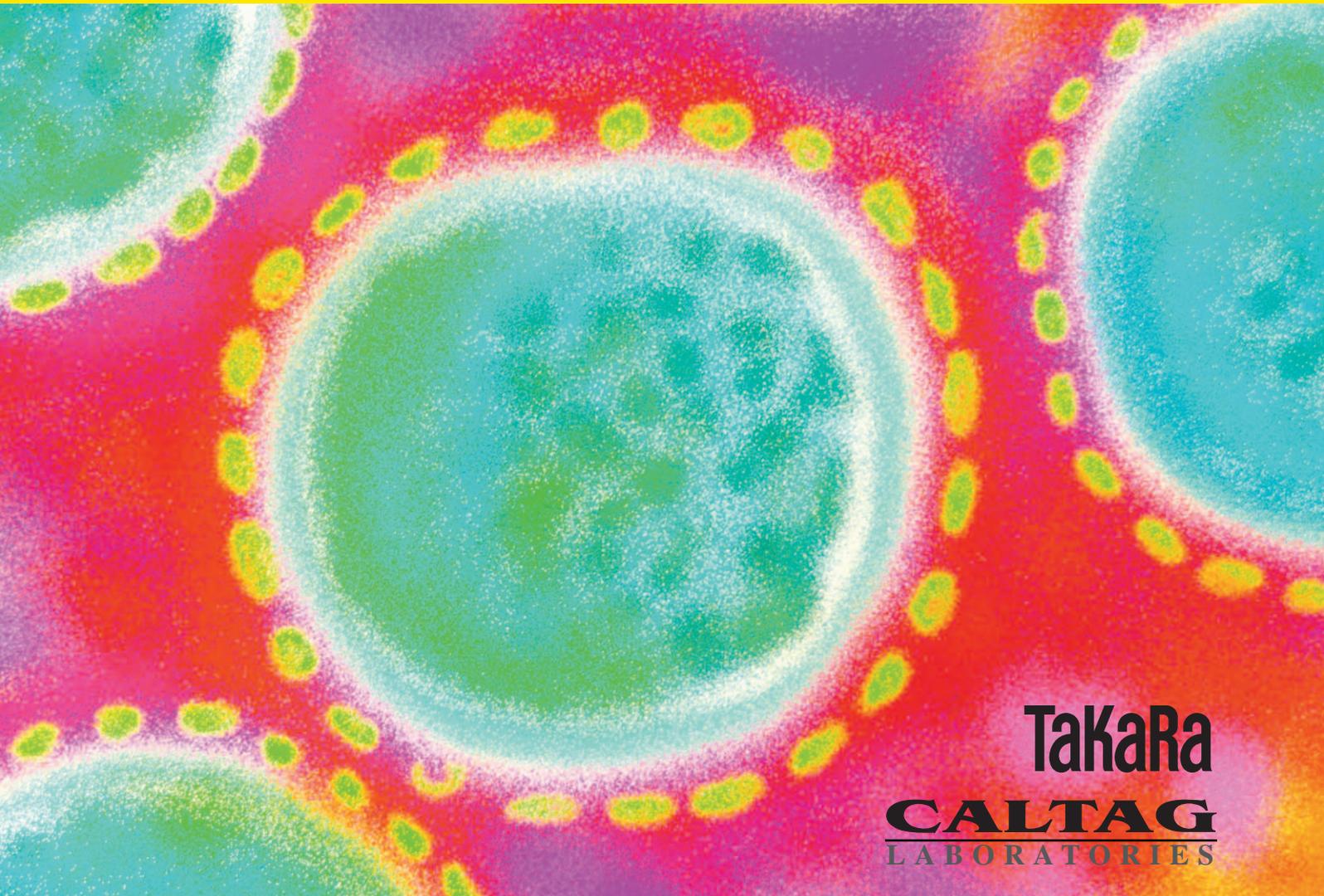
- Mouse, rat, human의 Heme Oxygenase-1(HO-1)에 반응하는 monoclonal antibody(GTS-1)를 peroxidase 표식한 제품이다.
- GTS-1을 POD로 직접 표식하고 있어 표식 2차 항체를 필요로 하지 않으며, 백그라운드가 낮다.
- Mouse, rat, human 유래의 HO-1의 Western Blot 해석 등에 유용하다.

Flow Cytometry antibody 분야의 선두주자!

CALTAG Antibody series

고품질(동일 Clone)! 저렴한 가격!!

더 이상 비싼 제품을 사용할 필요가 있습니까?



TaKaRa

CALTAG
LABORATORIES