

세포 내 면역형광염색을 위한 ZAP-70 antibody

Mouse Anti-ZAP-70

MHZAP7004-4(R-PE)

400 tests

ZAP-70의 활용

ZAP-70은 protein tyrosine kinase로 Syk family에 속하는 약 70 kDa에 해당하는 단백질이다. ZAP-70은 기본적으로 T 림프구 및 NK 세포에서 발현되며, T 림프구 수용체를 경유하는 신호전달에서 중요한 역할을 한다. 최근에는 만성 림프구성 백혈병(Chronic lymphocytic leukemia, CLL)의 경우 ZAP-70과 깊은 관계를 가진다는 보고가 있어 만성 림프구성 백혈병 환자의 예후를 확인하는 목적으로 사용되고 있다.

만성 림프구성 백혈병은 IgVH 유전자상의 돌연변이 유무에 따라 두 가지 유형으로 나눌 수 있다. B 림프구의 IgVH(immunoglobulin heavy-chain variable region) 유전자에 돌연변이(somatic mutation)를 가지고 있는 백혈병 환자의 경우 변이가 없는 환자에 비하여 상대적으로 예후가 좋으며, 보다 긴 생존기간을 가진다. 따라서 IgVH 유전자에 돌연변이가 있는 것은 만성 림프구성 백혈병 환자에게는 긍정적인 예후의 징표가 될 수 있다. 그러나 대부분의 임상 실험실에서 IgVH의 유전적 변이를 검출하는 것은 불가능하며, 가능할지라도 비용 및 소요 시간의 측면에서 접근이 어려운 단점을 가진다.

최근 IgVH 유전자에 돌연변이를 가지지 않는 만성 림프구성 백혈병 환자의 경우 ZAP-70의 발현이 증가하는 현상이 알려졌다. 따라서 IgVH 유전자 돌연변이를 직접 분석하지 않고 ZAP-70 발현 정도를 측정하여 IgVH 유전자 돌연변이 유무를 손쉽게 판별할 수 있게 되었다. 만성 림프구성 백혈병 환자의 경우 ZAP-70의 발현이 증가한 세포 수가 증가한 것은 IgVH 유전자에 변이가 없다는 것을 뜻하기 때문에 좋지 않은 예후로 간주된다.

본 고에서는 면역형광 염색법을 이용하여 손쉽게 만성 림프구성 백혈병 환자의 예후를 판별하거나 면역학적 연구에 사용할 수 있는 항 ZAP-70 항체 및 Fix & PERM[®]을 소개하고자 한다. Caltag사에서 판매하고 있는 1E7.2 항체는 사람과 쥐의 ZAP-70에 특이성을 보이며, flow cytometry 및 western blotting에 사용 가능하다.

세포내 면역형광 염색법

Monoclonal antibody를 사용한 flow cytometry 분석 기법은 세포 표면 항원에 국한되어왔기 때문에 cytokine 및 cytoplasmic/nuclear protein과 같은 세포 내 기관에 대한 분석은 할 수 없었다. 그러나 세포의 파괴없이 세포 내부로 항체가 접근할 수 있도록 하는 제품(Fix & PERM[®])이 등장함에 따라 형광이 부착된 항체를 이용하여 세포 내부 물질을 flow cytometry를 이용하여 분석할 수 있게 되었다.

Caltag사에서 판매하고 있는 Fix & PERM[®]은 세포를 고정하기 위한 Reagent A 와 세포 내부로 항체가 이동 할 수 있도록 하는 Reagent B로 구성되어 있다. Fix & PERM[®]은 항체 침투를 가능하게 하는 permeabilization 과정을 포함하고 있으나 세포의 형태적 산란 특성에 영향을 미치지 않도록 고안되었으며, permeabilization과 항체를 동시에 첨가할 수 있는 독특한 조성으로 이루어져 background staining을 최소화 하였다.

실험방법 1(Fix & PERM[®])

1. 세포 표면 항원에 대한 항체 및 Isotype control을 tube(5ml, 12×75 mm)에 분주한다.
2. 항체가 분주된 tube에 세포(1×10^6)를 첨가한다.
3. 부드럽게 섞어주고 15 분간 암실에서 방치한다.
4. Fixation Medium(Reagent A)를 100 μ l 씩 첨가하여 암실에서 15분간 방치한다.
5. 5% FBS, 0.1% sodium azide가 포함된 PBS를 3 ml 첨가한 뒤 원심분리 (300 g, 5분)하여 상층액을 제거하고 cell pellet을 완전히 풀어준다.
6. Permeable Medium(Reagent B)를 100 μ l 씩 첨가하고, 세포 내부 염색용 항체 및 Isotype control을 각각의 tube에 첨가한다.
7. 1~2 초간 vortex하고, 20분간 암실에서 방치한다.
8. 원심분리(300g, 5분)하여 상층액을 제거한다.
9. Sheath fluid에 현탁하여 곧 바로 분석하거나, 0.1% paraformaldehyde fixative solution 0.5 ml에 현탁하여 암실에서 냉장보관 할 수 있다. 분석은 24시간 이내에 이루어 져야 한다.

실험방법 2(Methanol modification)

1. 분석할 세포(1×10^6)를 tube(5 ml, 12×75 mm)에 분주한다.
2. Fixation Medium(Reagent A) 100 μ l 를 각각의 tube에 분주하고, 2~3 분간 상온에서 방치한다.
3. Precooled absolute methanol(0~4°C) 2~4 ml을 각각의 tube에 첨가하고, vortex하여 10 분간 0~4°C에서 방치한다.
4. 5% FBS, 0.1% sodium azide가 포함된 PBS를 3 ml 첨가한 뒤 원심분리 (300 g, 5분)하여 상층액을 제거하고 cell pellet을 완전히 풀어준다.
5. Permeable Medium(Reagent B)를 100 μ l 씩 첨가하고, 세포 내부 염색용 FITC 부착 항체 및 Isotype control을 tube에 첨가한다.
6. 1~2 초간 vortex하고, 20분간 암실에서 방치한다.

7. 원심분리(300g, 5분)하여 상층액을 제거한다.
 8. Sheath fluid에 현탁하여 곧 바로 분석하거나, 0.1% paraformaldehyde fixative solution 0.5ml에 현탁하여 암실에서 냉장보관 할 수 있다. 분석은 24시간 이내에 이루어 져야 한다.
- Methanol modification은 ki-67, BrdU, PCNA와 같은 cell cycle antigen에 대한 FITC 부착 항체에 유용하게 사용되나 PE 부착 항체의 경우 권장 사항은 아니다.

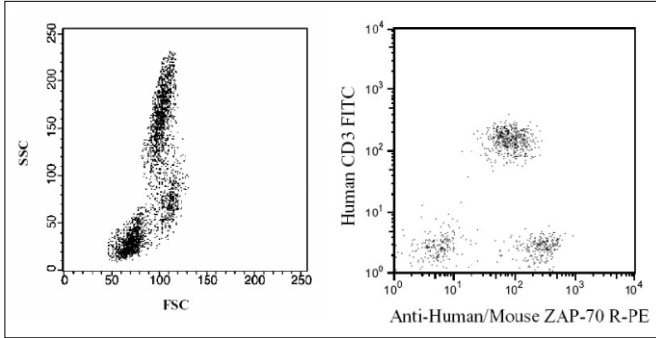


그림 1 정상인에서 말초혈액을 채취하여 anti-CD3-FITC 및 anti-ZAP 70-R-PE를 실험방법 1에 따라 염색하고 BD FACSCalibur를 이용하여 분석하였다.

관련제품

제품명	TaKaRa Code	Form	용량
Mouse Anti-Human CD3	MHCD0301	FITC	100 tests
Mouse Anti-ZAP-70	MHZAP7000	Purified	100 ug
Mouse Anti-ZAP-70	MHZAP7004	R-PE	100 tests
Mouse Anti-ZAP-70	MHZAP7004-4	R-PE	400 tests
Mouse Anti-ZAP-70	MHZAP7018	PE-Cy5.5	100 tests
Mouse Anti-ZAP-70	MHZAP7020	Alexa Fluor 488	100 tests
Mouse IgG1 /Mouse IgG1	GIC201-50	FITC/R-PE dual color	50 tests
Fix & PERM [®]	GAS-003		50 tests
Fix & PERM [®]	GAS-004		200 tests
Fixation Medium-Bulk	GAS001S-5		50 tests
Fixation Medium-Bulk	GAS001S-100		1000 tests
Permeabilization Medium-Bulk	GAS002S-5		50 tests
Permeabilization Medium-Bulk	GAS002S-100		1000 tests

참고문헌

1. ZAP-70 Expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical, and distinct gene expression profile, A. Wisetner *et al*, in *Blood* 2003;**101**:4944-51
2. Expression of ZAZ-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia, L. Chen *et al*, in *Blood* 2002;**100**:4609-14.
3. Flow Cytometric analysis of cell surface and intracellular antigen in leukemia diagnosis, *Cytometry*(Communication in clinical cytometry) 1994;**18**:187-198.

한국분자 세포생물학회 추계학술대회 정기 학술대회

2005년 TaKaRa Symposium

일시: 2005년 10월 17일 오전 10시

장소: 코엑스 컨퍼런스 센터