

Precoat type Osteonectin detection kit

Osteonectin EIA Kit(Precoated)

주문 생상품 96 회

- 소와 사람의 Osteonectin을 항원으로, 두 종류의 monoclonal antibody 를 이용한 precoat type Osteonectin 정량용 ELISA Kit이다.
- 사람, 소, 토끼의 Osteonectin에 특이적으로 반응한다. 이런 동물류의 세포 배양상청이나 체액 시료(혈청, 혈장, 관절액)의 Osteonectin을 간편하게 정량 할 수 있다.
- 실험 전날, 항체의 coating이나 blocking을 하지 않고 곧바로 측정 단계로 들어갈 수 있다.
- 발색 기질에는 폐기 제한이 없는 고감도 기질 TMBZ를 사용하고 있다.

Osteonectin에 대하여

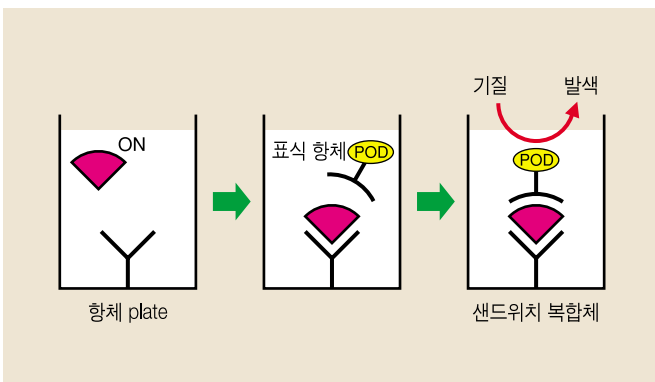
Osteonectin(Osteonectin, ON)은 분자량 43 kDa의 산성 인산화 당 단백질이다. 이 단백질은 17개의 아미노산 signal 서열과 283~287개의 아미노산(동물 종류에 따라 다르다)으로 이루어진 1 개의 polypeptide로, 4 개의 functional domain(I ~IV)으로 구성되어 있다. Domain I 은 염기성으로, 여러 개의 저친화성 칼슘 결합 domain을 가지고 있다. Domain II는 10 개의 시스테인 잔기, Domain III은 protease 감수성 부위, Domain IV에는 1 개의 친화성 칼슘 결합부위가 포함되어 있다.

Osteonectin은 SPARC(Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) 또는 BM-40(Basement Membrane 40 kDa molecule)이라고도 한다. 처음에는 골조직에 포함된 비콜라겐성 단백질로 알려졌지만, 이후 다양한 연구를 통하여 연조직과 혈소판, 혈관 내피세포에도 존재하고 각종 배양세포에 의해서도 분비되는 것으로 밝혀져 세포 외 matrix와 세포와의 결합 조절이나 세포 증식에도 관여하고 있는 것으로 알려지고 있다.

또한 류마티스 환자의 관절액에는 고농도의 Osteonectin이 존재하여 관절염을 진단하는 새로운 마커로서 사용될 수 있을 것으로 보여진다.*

*: Nakamura,S,et al,(1996)Arthritis & Rheumatism, 39(4), 539-551.

측정원리



Kit의 내용(96 회용)

Anti-ON monoclonal antibody plate(96 well: 8 well×12 strips)	1plate
Peroxidase-labeled anti-ON monoclonal antibody(동결건조품)	11 ml용
Standard(Purified cow ON)(동결건조품)	1 ml용
Sample Diluent	11 ml×2
Substrate Solution(TMBZ: 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine)	12 ml
Stop solution(1N sulfuric acid)	12 ml

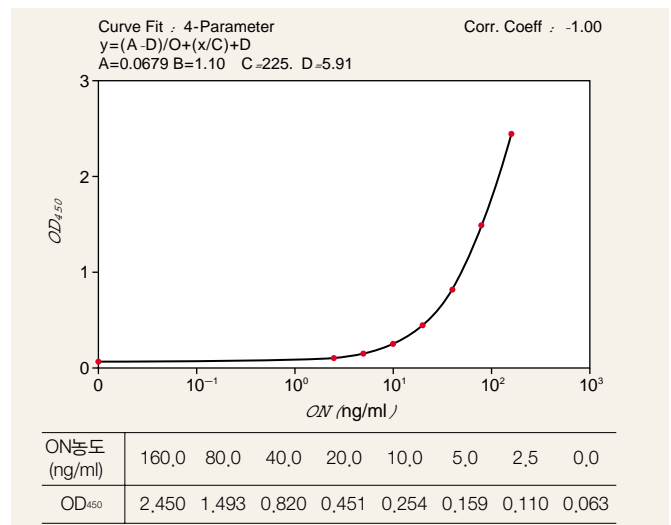
조작법

- 항체 plate에 시료와 standard(100 μl) 첨가
 - ↓ 20~30 ℃, 1 시간 반응
- 세정 3회
 - ↓
- Peroxidase-labeled anti-ON monoclonal antibody(100 μl) 첨가
 - ↓ 20~30 ℃, 1 시간 반응
- 세정 4회
 - ↓
- Substrate Solution(100 μl) 첨가
 - ↓ 20~30 ℃, 15 분 반응
- Stop solution(100 μl) 첨가
 - ↓
- 450 nm의 흡광도 측정

성능

(1) 표준곡선(Standard Curve)

대표적인 표준곡선 예를 나타낸다.



(2) 재현성

〈동시 재현성 시험(n=19)〉

Calf Serum(CS)을 희석하여 제조한 3종류의 농도 대조군을 이용하여 재현성 시험을 실시하였다.

검체(n=19)	평균치(ng/ml)	CV(%)
Control A	90,86	2,348
Control B	41,38	2,141
Control C	20,11	3,131

〈일자별 재현성 시험(n=3)〉

3 일간에 걸쳐 3 종류의 농도 대조군을 정량해 재현성 시험을 실시하였다.

검체(n=19)	평균치(ng/ml)	CV(%)
Control A	92,82	1,63
Control B	42,01	1,29
Control C	20,50	1,57

(3) 첨가 회수 시험

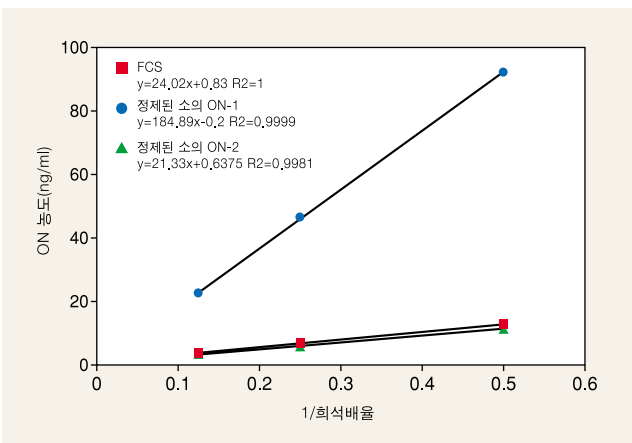
다양한 농도의 검체 시료를 동량 혼합하여 예상되는 이론값과 실제측정값에서 회수율을 조사하였다.

첨가회수율	86,9~117,8 %
-------	--------------

(4) 희석 직선성(Dilution linearity)

Fetal Cow Serum(FCS) 시료와 정제한 소의 ON을 사용한 희석곡선의 예를 아래에 나타낸다.

혈청 시료의 측정에는 일반적으로 원액을 사용한다. 관절액 등은 높은 값이 예상되므로 serial dilution하여 측정해야 한다.



(5) 시료의 동결 용해 영향

동결 용해의 ON 농도에 대한 영향을 조사하였다. FCS를 serial dilution하여 제작한 시료를 사용하여 25 ℃ ↔ -80 ℃를 반복하고, 용해 때마다 시료를 채취하고 최종 시료를 얻은 후 동시에 정량하였다. 아래 표와 같이 시료의 동결 용해 반복에도 비교적 영향을 받지 않는 것으로 판단된다.

용해횟수	혈청농도		
	고	중	저
1	84,95	37,22	17,14
2	89,11	38,71	17,06
3	91,76	40,87	17,90
4	89,21	40,51	18,07
5	87,65	38,98	17,39
6	85,41	39,35	17,26
7	84,32	35,78	17,20
CV(%)	2,89	4,27	2,10

실험 예: 토끼 혈청 중의 Osteonectin과 Gla형 Osteocalcin의 측정

항체 제작용 토끼의 혈청을 시간에 따라 채혈하여 측정 시까지 -20 ℃에서 동결 보존하였다. 본 kit을 사용하여 Osteonectin을 측정하고, Gla-Type Osteocalcin(Cla-OC) EIA Kit(Precoated)(TaKaRa Code MK111)를 사용하여 Gla형 Osteocalcin을 동시에 측정하였다.

Osteonectin의 경우는 원액으로, Gla형 Osteocalcin의 경우는 5배 희석하여 측정하였다. 아래는 검량선에서의 농도 환산값이다.

일령	Osteonectin	Gla형 Osteocalcin	
63	17.5	46.5	
73	17.0	34.5	
80	14.4	44.0	
87	-	28.5	
93	11.6	24.5	
101	15.7	21.0	
108	16.0	27.5	
115	11.7	20.5	
122	15.9	13.0	
129	12.1	7.5	
136	10.2	8.0	
143	14.5	8.5	
150	10.1	5.5	
157	10.4	4.0	
164	12.4	8.5	
199	42.9	8.5	면역 ←
220	164.7	15.5	면역 ←
241	246.9	18.4	면역 ←
262	92.6	13.5	면역 ←
283	21.2	10.3	면역 ←
293	13.1	8.0	

단위 ng/ml

Gla형 Osteocalcin은 유아기(infancy)일 때 수치가 높고 나이가 들수록 수치가 낮아지지만, Osteonectin에서는 그 경향이 나타나지 않고 나이에 관계없이 거의 일정하였다. 중간에 Freund's Complete Adjuvant를 포함하는 항원을 면역한 결과, 혈청 중 Osteonectin 양이 급속히 상승하였다. 이 결과의 원인 중 하나는 면역 조작에 의한 염증 영향에 의한 것으로 보인다.