

“Bone metabolism (골대사)” 관련 Antibody & EIA kit

TaKaRa에서는 20년전부터 각종 monoclonal antibody, polyclonal antibody 및 EIA kit를 개발하여 판매하고 있으며, 연구자들 사이에서 널리 이용되고 있다. 본 내용에서는 TaKaRa가 독자적으로 개발한 bone metabolism (골대사) 관련 제품을 소개하고자 한다.

■ 서론

뼈를 구성하는 유기질 성분의 90%는 콜라겐으로 이루어져 있으며, 나머지 10%는 Osteocalcin, Osteonectin, α -HS glycoprotein, bone cyanoprotein, fetuin 등의 비콜라겐성 단백질이다. TaKaRa에서는 이들 유기질 성분중에서 콜라겐과 osteocalcin을 중점적으로 연구개발 중에 있다. Bone metabolism은 osteoblasts (골아세포)에 의한 뼈형성과 osteoclasts (골파세포)에 의한 뼈흡수의 상호조절로 이루어지며, TaKaRa에서는 osteoblasts의 marker 효소인 alkaline phosphatase (ALPs)와 osteoclasts의 maker 효소인 tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) 검출을 위한 시약도 판매하고 있다.

■ Procollagen I형 C-말단 peptide 측정에 의한 I형 콜라겐 생성 모니터링

콜라겐은 대표적인 섬유질 단백질로 피부, 뼈, 연골, 혈관 등의 결합 조직에 다량으로 존재하는 세포 외 매트릭스의 주성분이며, 몇가지 종류의 형태가 있는 것이 알려져 있다. 그 중에서 fibroblast (섬유아세포), 상아세포 및 osteoblast에서 분비되는 I형 콜라겐은 뼈조직의 주성분으로 뼈에 포함되는 단백질의 90%를 차지한다. I형 콜라겐은 세포 내에서 I형 procollagen으로 생합성되어 세포 외로 분비되어 콜라겐 섬유로 중합한다. 이때 procollagen N-말단 및 C-말단의 propeptide가 endopeptidase에 의해 유리되는 것으로 밝혀졌다.

양 말단 propeptide는 가용성이며 생체내의 콜라겐 합성량을 반영하는 생화학적 지표로서 주목 받고 있다.

Procollagen Type I C-Peptide (PIP) EIA Kit (TaKaRa Code MK101)는 monoclonal antibody를 이용하여 human procollagen type I C-말단 peptide (PIP)를 정량하는 EIA kit로 생체내의 콜라겐 생성을 모니터링하는데 유용하다. 본 EIA kit는 안과학이나 구강치과학, 피부과학, 화장품관련, 의약품관련, 식품관련 연구에 널리 이용되고 있다.

■ 실험예 1: Human mesenchymal stem cell (hMSC)의 osteoblasts 유도 모니터링

【방법】

Human mesenchymal stem cell (Lonza)을 osteoblast로 유도하는 실험에서 본 kit를 사용하여 배양상청액 중 I형 procollagen의 생산량을 측정하였다. 샘플의 희석배율을 정하기 위하여 사전에 control 세포와 분화세포의 배양상청액을 serial dilution하여 예비실험을 하였다. 또한, 배지에 포함되는 bovine serum 유래 PIP 성분의 영향도 고려하여 최종적으로 36배 (729배) 희석과 37배 (2,187배) 희석으로 측정하였다.

【결과】

분화 유도와 함께 procollagen 생산량이 매우 증가하는 것이 관찰되었다 (표 1).

■ 실험예2: Human Osteoblast (NH0st) 배양상청액 중 I형 procollagen 생산량의 측정

【방법】

정상 Human osteoblast (Lonza)를 10% 소태아혈청(FCS)을 포함하는 배지 (Osteoblast Growth Medium, OGM 배지)에서 배양하고, 상청액 중에서 콜라겐량의 변화를 조사하였다. 배지는 1주일에 한 번씩 교환하고, 샘플 측정을 위한 희석 배율은 예비실험을 토대로 20배와 40배로 설정하였다.

【결과】

세포의 성장에 맞춰서 상청내액의 procollagen 농도가 증가하였다 (표 2).

표 1. Human mesenchymal stem cell (hMSC)의 osteoblast 유도 모니터링

샘플명	측정배율	실제측정 값		(A)-(B)
		샘플 (A)	분화배지 (B)	
hMSC	$\times 3^6$	16.67	2.72	14
3 days control	$\times 3^7$	4.73	0.00	5
hMSC	$\times 3^6$	19.24	2.72	17
3 days 뼈형성유도	$\times 3^7$	8.56	0.00	9
hMSC	$\times 3^6$	82.18	2.72	79
7 days 뼈형성유도	$\times 3^7$	35.57	0.00	36
hMSC	$\times 3^6$	63.67	2.72	61
10 days 뼈형성유도	$\times 3^7$	31.74	0.00	32
hMSC	$\times 3^6$	111.50	2.72	109
14 days 뼈형성유도	$\times 3^7$	54.51	0.00	55
hMSC	$\times 3^6$	161.10	2.72	158
21 days 뼈형성유도	$\times 3^7$	74.44	0.00	74

* 분화배지 (B) : hMSC 전용 배지의 측정값을 나타낸다.

표 2. Human osteoblast (NH0st) 배양상청액의 I형 procollagen 생산량 측정

샘플명	희석 배율	측정값		(A)-(B)
		샘플(A)	OGM (B)	
NH0st	$\times 20$	111.50	41.66	70
day 10	$\times 40$	74.88	20.76	54
NH0st	$\times 20$	181.80	41.66	140
day 14	$\times 40$	108.10	20.76	87
NH0st	$\times 20$	989.40	41.66	362
day 3	$\times 40$	201.60	20.76	181

* OGM (B) : Human osteoblast 전용 배지의 측정 값을 나타낸다.

“Bone metabolism (골대사)” 관련 Antibody & EIA kit

Continued...

* PIP EIA Kit (TaKaRa Code: MK101)를 사용한 Citation

- 1) Kawaguchi Y., et al. : Intracellular IL-1alpha-binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1alpha in systemic sclerosis fibroblasts(2006). *Proc, Natl, Acad, Sci, USA.*, **103**, 14501-14506.
- 2) Bourgier C., et al. : Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression (2005). *Gut.*, **54**, 336-343.
- 3) Hu B., et al. : A nuclear target for interleukin-1alpha: interaction with the growth suppressor necdin modulates proliferation and collagen expression (2003). *Proc, Natl, Acad, Sci, USA.*, **100**, 10008-10013.
- 4) Barroga EF., et al. : Influence of vitamin D and retinoids on the induction of functional differentiation in vitro of canine osteosarcoma clonal cells (2000). *Vet J.*, **159**, 186-193.

■ Bone metabolism marker인 acid phosphatase와 alkaline phosphatase의 모니터링

Phosphatase는 지방족 · 방향족의 phosphoric acid monoester를 가수분해하여 인산을 유리시키는 효소이다. 적정 활성 pH가 알칼리 영역인 alkaline phosphatase와 산성 영역인 acid phosphatase가 알려져 있다.

Acid phosphatase는 많은 세포와 조직에 존재한다고 알려졌으나, 1959년 Burstone은 osteoclasts에는 강한 acid phosphatase 활성이, osteoblasts에는 alkaline phosphatase 활성이 있음을 보고하였다. 후속 연구에서 osteoclasts의 acid phosphatase 활성은 tartrate 존재 하에서도 활성을 잃지 않는 tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) 임이 밝혀졌다. 현재는 TRACP의 활성이 osteoclasts로서의 조건이 되고 있다.

Alkaline phosphatase는 생체막에 결합하여 존재하는 당 단백질로 intestinal type, placental type, placental-like type, tissue non-specific type의 4종류로 분류할 수 있다. Tissue non-specific type 중 bone specific type isozyme은 bone type alkaline phosphatase라고 불린다. 이 효소는 osteoblast 막에 결합되어 있으며, pyrophosphates를 분해하여 뼈형성을 촉진시킨다. Pyrophosphates는 석회화 (calcification)를 저해하고, 무기인산 농도를 증가시키기 위해 유기인산 ester를 분해한다. 따라서 bone type alkaline phosphatase는 bone cycle metabolism에서 뼈형성의 marker로서 사용된다.

TRACP & ALP Assay Kit (TaKaRa Code MK301)는 수용성기질인 pNPP (p-nitro-phenyl phosphate)를 이용하여 acid phosphatase (ACP) 및 alkaline phosphatase (ALP)의 활성을 각각 검출하는 kit이다. Acid phosphatase 검출계는 tartaric acid를 첨가하므로써 osteoclast의 marker 효소 중 하나인 tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP)의 활성을 검출할 수 있다.

TRACP & ALP double-stain Kit (TaKaRa Code MK300)은 TRACP 및 ACP의 안정적인 발색기질과 함께 osteoclast의 다핵화를 가시화하기 위한 핵염색 시약을 세트로 한 bone metabolism 관련 세포염색 kit로, 뼈형성과 흡수라는 2개의 지표를 동시에 검출하므로, 뼈관련 세포의 분화나 뼈조직에 있어서의 분포를 조사하는 것이 가능하다.

■ 실험예1: 혈액 샘플 조제 방법에 따른 TRACP 및 ALP의 활성값 비교

【방법】

3개체의 토끼로부터 동시에 혈액을 채취하고, 3종류의 처리 방법(citrate plasma (구연산혈장), serum (혈청), hemolysis serum (용혈혈청))으로 분리하였다. 각각의 샘플을 희석한 용액 50 µl에 기질 용액 50 µl를 혼합하고, 37 °C에 30분간 반응한 후 stop solution 50 µl를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, plate reader에서 흡광도 (405 nm)를 측정하였다. 모든 샘플은 혈액조제 당일에 동시 측정하였다 (측정에는 TRACP & ALP Assay Kit를 사용).

【결과】

동일개체라도 샘플 조제 방법에 따라 효소활성값이 바뀌므로, 샘플 채취 조건을 획일화 할 필요가 있다 (표 3-1, 3-2).

표 3-1. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) 활성측정

TRACP	구연산혈장 (PPP)			혈청			용혈혈청		
	ID No.	x20	x40	x80	x20	x40	x80	x20	x40
1	0.82	10.420	0.247	0.831	0.487	0.309	0.834	0.487	0.300
2	1.045	0.520	0.311	0.704	0.422	0.268	1.066	0.582	0.360
3	0.702	0.370	0.237	1.000	0.579	0.535	0.768	0.360	0.275

A₄₀₅ 측정 값

표 3-2. Alkaline phosphatase (ALP) 활성측정

ALP	구연산혈장 (PPP)			혈청			용혈혈청		
	ID No.	x20	x40	x80	x20	x40	x80	x20	x40
1	0.514	0.321	0.217	0.801	0.469	0.295	1.074	0.599	0.374
2	0.471	0.299	0.206	0.528	0.327	0.217	0.801	0.483	0.304
3	0.348	0.231	0.165	0.718	0.431	0.275	0.650	0.398	0.252

A₄₀₅ 측정 값

■ 실험예2 : 정상 mouse의 골수유래 단핵세포의 활성 염색

【방법】

정상 mouse의 골수로부터 조제한 골수세포를 10% FCS/RPMI 1640 배지를 이용해 24 well culture plate에서 배양하며 그 경과를 관찰하였다. 세포의 상태를 조사하기 위하여 TRACP & ALP double-stain Kit를 이용하여 TRACP & ALP의 2중 염색을 실시하였다.

【결과】

자연 분화한 osteoblast는 처리 후 4일째부터 두드러지게 형성되었다. 또한, osteoclast-like cell과 osteoblast-like cell은 서로 근접하게 관찰할 수 있었다.

“Bone metabolism (골대사)” 관련 Antibody & EIA kit

Continued...

*TRACP & ALP double-stain Kit (TaKaRa Code : MK300)을 사용한 citation

- 1) Wang Y., *et al.* : Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome FGFR2+/S252W mouse (2005). *Development.*, **132**, 3537–3548
- 2) Miwa S., *et al.* : The bisphosphonate YM529 inhibits osteolytic and osteoblastic changes and CXCR-4-induced invasion in prostate cancer (2005). *Cancer Res.*, **65**, 8818-8825
- 3) Kaifu T., *et al.* : Osteopetrosis and thalamic hypomyelinosi with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice (2003). *J Clin Invest.*, **111**, 323-332.

■ Bone metabolism 관련 제품

Osteoblast의 대표적 marker 물질인 osteocalcin은 뼈로 결합이 가능한 Gla형 osteocalcin (Gla-OC)과 결합 능력이 없거나 저하된 Glu형 osteocalcin (Glu-OC)의 2종이 존재한다. TaKaRa에서는 2종류의 monoclonal antibody를 이용하는 sandwich EIA법에 의해 human, bovine, rabbit 등의 검체에서 Gla-OC, 또는 Glu-OC 만을 고감도로 측정하는 Gla-OC EIA Kit 및 Glu-OC EIA Kit를 판매하고 있다. 또한, rat 등의 osteocalcin에 교차 반응이 가능한 항체 1종류 만으로 경합반응하여 rat, horse, guinea pig의 Gla형 및 Glu형 osteocalcin을 분별 정량하는 Rat Gla-OC Competitive EIA Kit 및 Rat Glu-OC Competitive EIA Kit도 제공하고 있다.

■ 관련제품

제 품 명	용 량	TaKaRa Code
Gla-Type Osteocalcin (Gla-OC) EIA-Kit (Precoated)	96 회	MK111
Undercarboxylated osteocalcin (Glu-OC) EIA Kit (Precoated)	96 회	MK118
Gla/Glu-Osteocalcin (Gla/Glu-OC) EIA Kit (Precoated) (MK111+MK118)	각 48회	MK130
Rat Gla-OC Competitive EIA Kit	96 회	MK121
Rat Glu-OC Competitive EIA Kit	96 회	MK122
Rat Gla/ Glu-OC Competitive EIA Kit (MK121 + MK122)	1set	MK123
Rat Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit	96 회	MK126

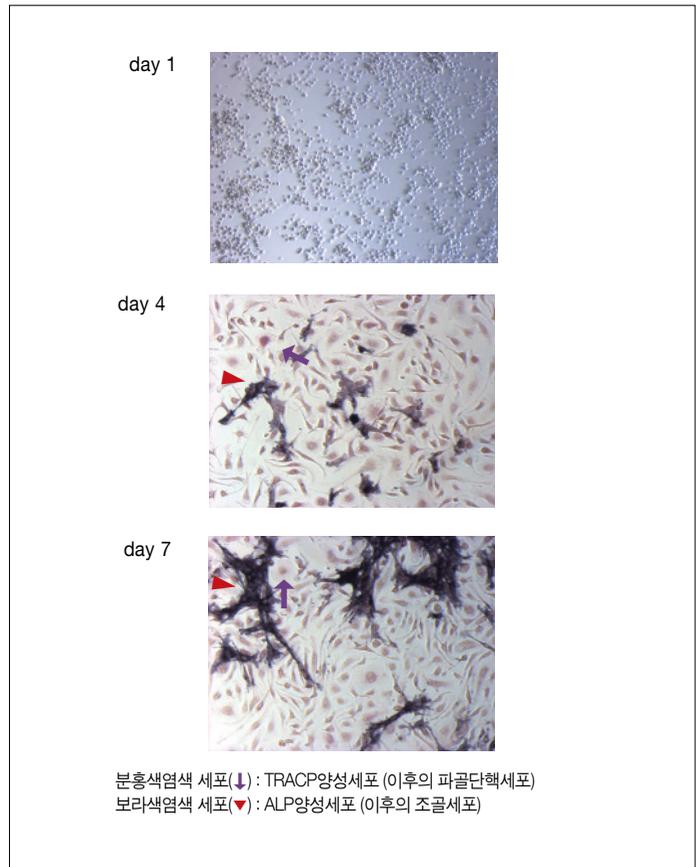


그림1. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) 활성 염색과 alkaline phosphatase (ALP) 활성 염색

Cell 관련 제품도 이젠 다카라에서!! TaKaRa Cell Proliferation & EIA Kits 시리즈

● Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System

(TaKaRa Code MK400 : 386,000원)

- ELISA Reader를 이용한 세포증식 및 생존능력 측정
- 동위원소, 유기용매를 사용하지 않아 안전
- 멸균 처리된 Premix type으로 바로 사용이 가능
- Washing 단계 및 추가적인 시약이 불필요

● Bone Research EIA Kit

PIP (Procollagen type I C-Peptide)EIA Kit	MK101
Gla-Osteocalcin EIA Kit	MK111
Rat Gla-OC Competitive EIA Kit	MK121
Rat Glu-OC Competitive EIA Kit	MK122
Undercarboxylated-Osteocalcin EIA Kit	MK118
Gla/Glu-Osteocalcin EIA Kit	MK130

● Other Proliferation and Apoptosis Kit

LDH Cytotoxicity Detection Kit	MK401
<i>In situ</i> Apoptosis Kit	MK500
ApopLadder Ex [®] Kit	MK600
ApoPrimer Set (Bcl-2 family)	6623

● Proliferation and Viability EIA Kit

Rat Heme Oxygenase-1 EIA Kit	MK124
Mouse Heme Oxygenase -1 EIA Kit	MK125
Universal Tyrosine Kinase Assay Kit	MK410
Universal Tyrosine Phosphatase Assay Kit	MK411
TRACP & ALP Assay Kit	MK301
TRACP & ALP Double Stain Kit	MK300

● Cell Adhesion EIA Kits

Fibronectin EIA Kit	MK115
Laminin EIA Kit	MK107
Vitronectin EIA Kit	MK102
GMP-140 EIA Kit	MK112
E-cadherin EIA Kit	MK117
Active EGF Receptor EIA Kit	MK119
Heparan Degrading Enzyme EIA Kit	MK412

■ Kit Attributes for MK400

Range of Assay :

1×10^3 - 5×10^4 cells/well (depending on cell type)

Assay Sensitivity : More sensitive than MTT method

Assay Duration :

0.5-4 hours, depending upon cell type and concentration

Test Specimen Type : 96-well plate cell culture; 0.1 - 5×10^4 cells/well

Sample Volume per Well : 100-200 μ l cultured cells/well

Detection Method : Colorimetric

Dilution : 1:10

Number of Assays per Kit : 2,500 assays

