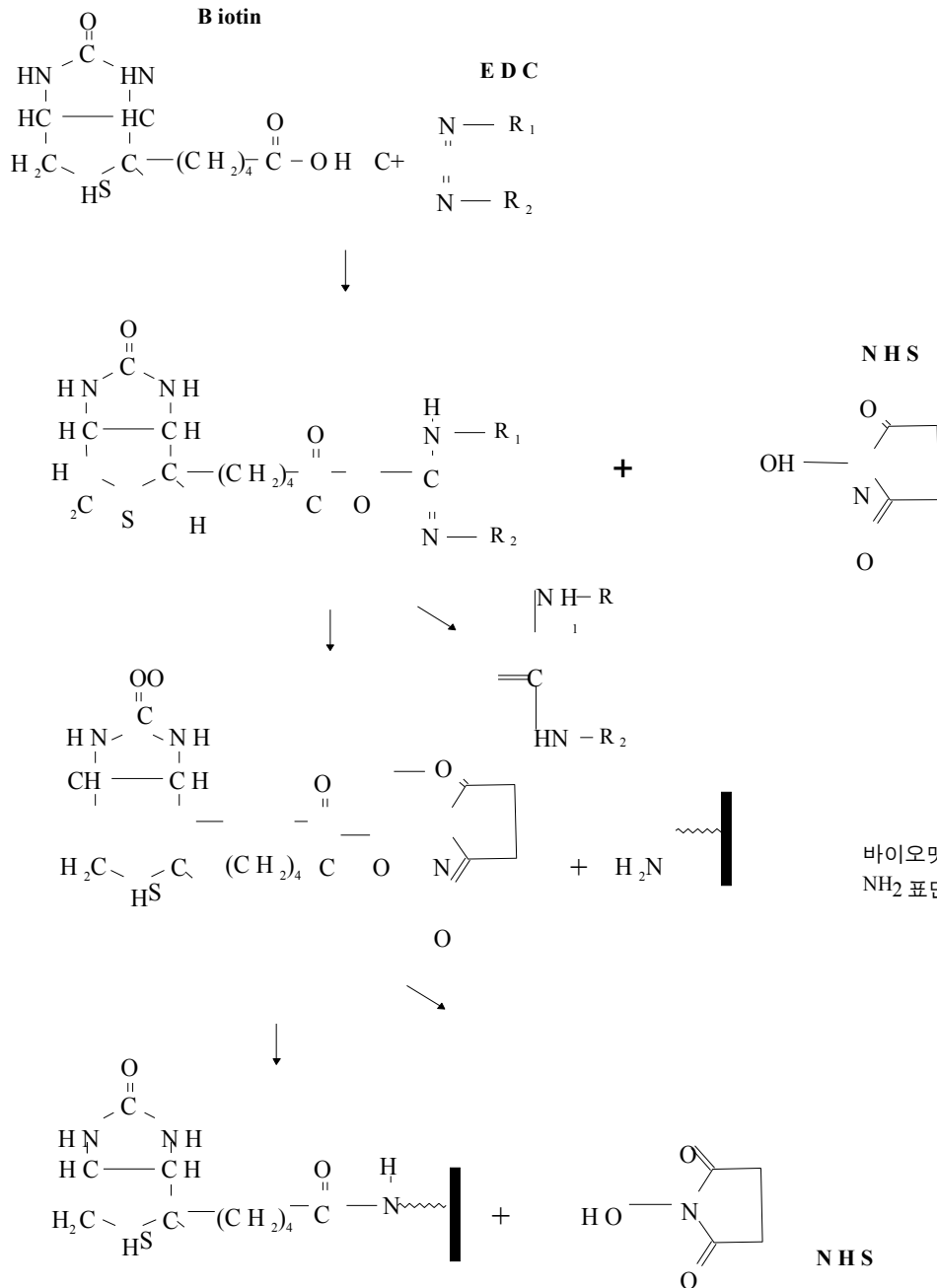
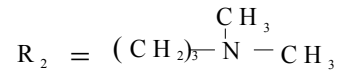


# 바이오맷

## 2. 카르복실 그룹에 있는 합텐이나 펩티드를 바이오맷 NH/NH<sub>2</sub> 표면에 결합하기.

합텐이나 펩티드 같이, 분자량이 낮은 분자로 이루어진 카르복실 그룹이, 분자 안의 카르복실 그룹과 carbodiimide 와 N-hydroxysuccinimide결합 행동에 의한 표면 아미노 그룹 사이의 아미드 결합의 형성하여 바이오맷 NH/NH<sub>2</sub> 표면과 결합한다.

그림 3.은 결합 가능한 카르복실 그룹과 합텐, 펩티드사이의 반응 도식이다.





# 바이오맷

시약과 완충제의 준비

## 재료

Solid phase:	Biomat plates	MT02F-AM1 (primary amino groups)
d-Biotin	Sigma	MT01F-HB (high binding capacity) Cat. No. B 4501
1-Ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl)- carbodiimide ( EDC )	Sigma	Cat. No. E 1769
Sulfo-N-hydroxysuccinimide (sulfo-NHS)	Fluka	Cat. No. 56485
Dimethylsulfoxide ( DMSO )	Merck	Cat. No. 2931
Tween <sup>®</sup> 20	Merck	Cat. No. 822184
Streptavidin	BIO-SPA	Cat. No. S002-60
Streptavidin-peroxidase conjugate	BIO-SPA	Cat. No. SB01-61
BSA	Intergen	Cat. No. 3100
TMB peroxidase substrate	Kirkegard & Perry	Cat. No. 50-76-05

### Biotin stock solution

d-Biotin	7,8 mg
DMSO	0,5 ml
Distilled water	0,5 ml

### Biotin/NHS solution

Biotin stock solution	500 $\mu$ l
Sulfo-NHS	3,45 mg.
Distilled water - 0,30% Tween <sup>®</sup> 20	to 10 ml

### EDC solution

EDC	5,8 mg
Distilled water	to 10 ml

### Streptavidin-mix

Streptavidin

50 $\mu$ g Streptavidin-peroxidase	
1 $\mu$ g PBS-BSA 1%	10ml

## 실험

1. 칼럼(표의 세로 란) 2에 있는 well 이외에도, 각 well에 증류수 50  $\mu$  l을 추가한다. 그런 후, 칼럼 2에 있는 모든 well 에 비오틴-NHS 용액 100 $\mu$  l를 추가한다.
2. 칼럼 2에 있는 well에서 50  $\mu$  l를 칼럼 3으로 옮겨 희석하고, 칼럼 3의 50 $\mu$  l을 칼럼 4로 옮기고, 이렇게 섞고, 옮기는 방법으로 칼럼 12까지 진행한다.
3. 반응을 시작시키기 위해: 각 칼럼에 50  $\mu$  l의 EDC 용액을 첨가한다. 공란인 실험(칼럼 1)에는 EDC대신 증류수를 50 $\mu$  l 첨가한다.
4. 실내온도로 2시간 동안 배양한다.
5. Well을 비우고, 0.1M PBS-0.05%Tween<sup>®</sup> 20 pH 7,2로 4번 세척한다.
6. 각각의 well에 streptavidin믹스를 100 $\mu$  l 추가하고, 실내온도에서 30분간 배양한다.



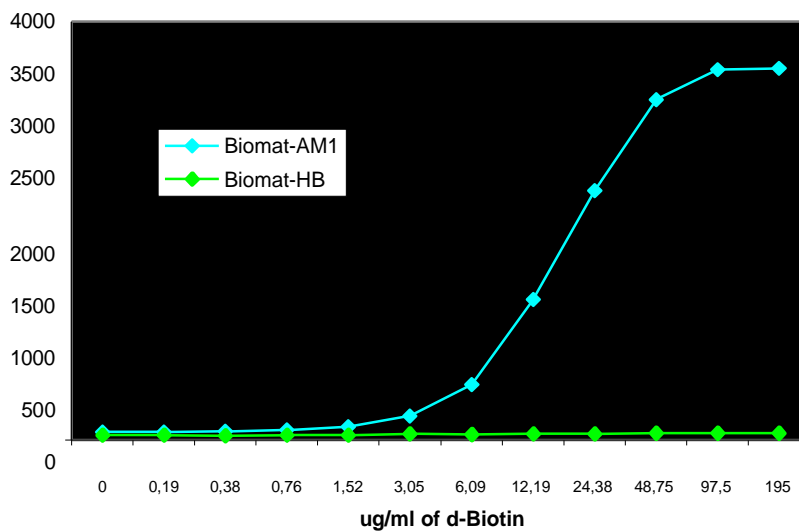
# 바이오맷

7. well을 비우고, 0.1M PBS-0.05%Tween<sup>®</sup> 20 pH 7,2로 4번 세척한다.
8. TMB 기질 용액 100 $\mu$  l을 각 well에 추가하고, 실내온도에서 10분간 배양한다.
9. 황산 1 N 100 $\mu$  l를 첨가하여 기질 반응을 멈춘다. 시각적 밀도 값은 450nm에서 측정한다.

## 결과

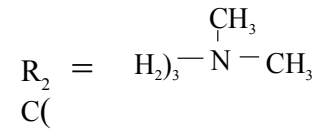
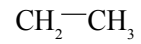
이 실험의 결과는 (그림 4.) 바이오맷 HB에서는 인식되지 않는 반면, 바이오맷 NH<sub>2</sub> (cod. AM1)는 감지될 수 있는 방법으로 분자(비오틴)가 결합함을 명백하게 보여준다. 이 결과는 비오틴 내의 카르복실 그룹과 바이오맷 NH<sub>2</sub>에 결합된 1차 아미노 그룹 사이에서 공유 결합이 일어났음을 보여준다. 결과(나타나지 않은 자료)는 carbodiimide를 추가 하지 않고는 비오틴의 공유결합이 일어나지 않음을 지적한다.

그림.4

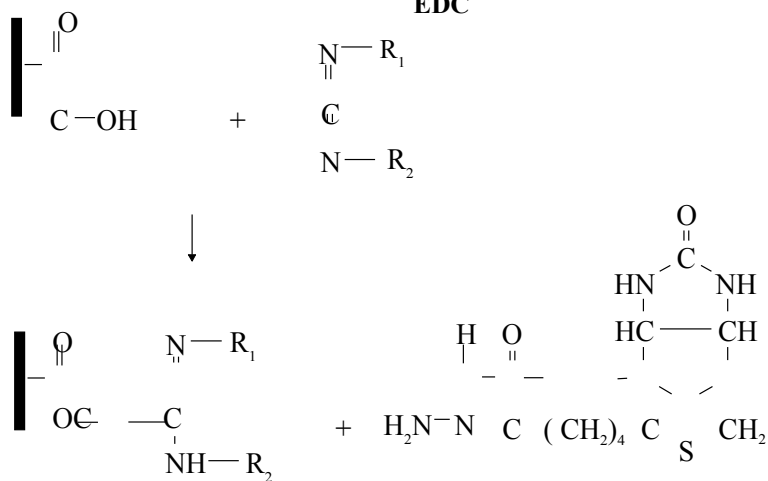


펩티드나 단백질 같은 분자 안에 있는 아미노 그룹이, carbodiimide의 활동에 의해 분자에 있는 아미노 그룹과 표면 카르복실 그룹 사이의 아미드 결합의 형성을 통해 바이오맷 COOH와 결합한다.

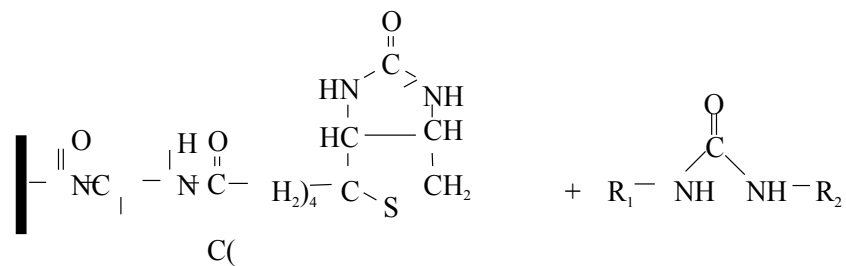
그림 6.은 결합 가능한 아미노 그룹에 의해 결합하는 합텐과 비오틴-하이드라지드의 반응 도식이다.



바이오맷COOH 표면



비오틴-하이드라지드



H

Urea

바이오맷 COOH 표면에 결합한 비오틴-하이드라지드



# 바이오맷

시약과 완충제의 준비

재료

Solid phase:	Biomat plates	MT04F-COOH
Biotin-Hydrazide	Sigma	MT01F-HB (high binding capacity) Cat. No. B 7639
1-Ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl)- carbodiimide ( EDC )	Sigma	Cat. No. E 1769
2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES)	Fluka	Cat. No. 69889
Dimethylsulfoxide ( DMSO )	Merck	Cat. No. 2931
Tween <sup>®</sup> 20	Merck	Cat. No. 822184
Streptavidin	BIO-SPA	Cat. No. S002-60
Streptavidin-peroxidase conjugate	BIO-SPA	Cat. No. SB01-61
BSA	Intergen	Cat. No. 3100
TMB peroxidase substrate	Kirkegard & Perry	Cat. No. 50-76-05

## Biotin-hydrazide stock solution

Biotin-hydrazide 5 mg  
DMSO to 5 ml

## Biotin-hydrazide solution 100 $\mu$ g/ml

Biotin-hydrazide stock solution 1000  
 $\mu$  l EDC 10 mg  
MES 0.1M pH 6,0 to 10 ml

## Biotin-hydrazide solution 50 $\mu$ g/ml

Biotin-hydrazide stock solution 500  
 $\mu$  l EDC 10 mg  
MES 0.1M pH 6,0 10 ml

## Biotin-hydrazide solution 10 $\mu$ g/ml

Biotin-hydrazide stock solution 100  
 $\mu$  l EDC 10 mg  
MES 0.1M pH 6,0 10 ml

## Biotin-hydrazide solution 1,0 $\mu$ g/ml

Biotin-hydrazide stock solution 10  $\mu$  l  
EDC 10 mg  
MES 0.1M pH 6,0 10 ml

## Biotin-hydrazide solution 0,5 $\mu$ g/ml

Biotin-hydrazide stock solution 5  $\mu$  l  
EDC 10 mg  
MES 0.1M pH 6,0 10 ml

## Biotin-hydrazide solution 0,25 $\mu$ g/ml

Biotin-hydrazide stock solution 2,5  $\mu$  l  
EDC 10 mg  
MES 0.1M pH 6,0 10 ml

## Biotin-hydrazide solution 0,1 $\mu$ g/ml

Biotin-hydrazide stock solution 1,0  $\mu$  l  
EDC 10 mg  
MES 0.1M pH 6,0 10 ml

## Streptavidin-mix

Streptavidin 50  $\mu$  g  
Streptavidin-peroxidase 0,5  
 $\mu$  g PBS-BSA 1% 10 ml

# 바이오맷

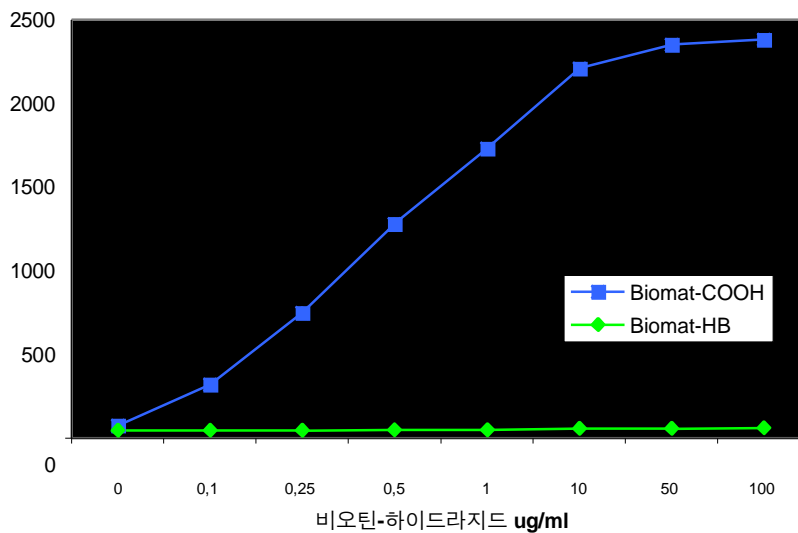
## 실험

1. 100  $\mu$  l의 비오틴-하이드라지드 용액 100-50-10-1-0,5-0,25-0,1  $\mu$  g/ml와 100  $\mu$  l 0,1 M MES pH 6,0를 0  $\mu$  g/ml로 well에 추가하고,(카르복실화 되고, HB는 활성화되지 않았다.) 증발을 막기위해 접착 테이프로 well을 밀봉한다.
3. well을 비우고 0.1 M PBS-0.05%Tween<sup>®</sup> 20 pH 7,2로 4번 세척한다.
4. streptavidin- mix 100  $\mu$  l를 각 well에 추가하고, 실내온도에서 30분간 배양한다.
5. well을 비우고 0.1 M PBS-0.05%Tween<sup>®</sup> 20 pH 7,2로 4번 세척한다.
6. TMB 기질 용액 100  $\mu$  l을 각 well에 추가하고, 실내온도에서 10분간 배양한다.
7. 황산 1 N 100  $\mu$  l을 첨가해 기질 반응을 멈추고, 시각적 밀도 값을 450nm에서 측정한다.

## 결과

이 실험의 결과는(그림. 5) 바이오맷 HB에서는 인식되지 않는 반면, 바이오맷 COOH (cod. AM1 )에서는 감지될 수 있는 방법으로 분자(비오틴-하이드라지드)가 결합함을 명백하게 보여준다. 이 결과는 비오틴-하이드라지드 내의 아미노 그룹과 바이오맷 COOH에 결합된 카르복실 그룹 사이에서 공유 결합이 일어났음을 보여준다. 이 결과(나타나지 않은 자료)는 carbodiimide를 추가 하지 않고는 비오틴-하이드라지드의 공유결합이 일어나지 않음을 지적한다.

그림.5



#### 1.2차 아민 상의 DNA 결합

인산화와 캡처 프로브의 표시

carbodiimide중재 결합에 사용되는 DNA는 T<sub>4</sub> 폴리뉴클레오티드 키나아제로 5'엔드에서 인산화되었고, 약수는 Sephacryl 200 spin column(1 ml) (Pharmacia,Uppsala,Sweden)의 색층분석에 의해 <sup>32</sup>P-ATP로 방사선동위원소 식별법에 의해 식별되었다. DNA 농도는 그 후에 Hoechst H33258 화합물 (Labarca and Paigen, 1980)을 사용한 형광에 의해 측정되었다.

부분의 순도는 아가로스 젤의 전기이동에 의해 확인 될 수 있다. 방사선동위원소로 식별된 DNA는 실험상의 방사능 레벨을 낮추기 위해 저온 DNA와 1:10의 비율로 섞는다.

#### DNA 결합

DNA의 공유결합은 플라스틱의 활성화된 아미노 그룹에 5'end 인산염의 고정으로 이루어진다. (Zamattoo *et al.*,1996) (그림 1). 인간 거세포바이러스 감지를 위한 인산화된 캡처 프로브는 100°C에서 10분, 얼음에서 10분을 통해 변성되고, 얼음같이 찬 물에서 희석된다.(1.54 ng/ul). 얼음같이 찬 0.1 M 1-methylimidazole, pH 7.5가 최종 1-methylimidazole 농도인 10 mM을 얻기위해 추가되었다. 변성된 DNA 용액은 얼음 위에 놓인 microwell에(75 μ l/well, 0.7 pmol/well)투여된다. 10 mM 1-methylimidazole 내의 0.04 M 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)의 신선한 용액이 각 well에 추가되었다. (25 μ l/well, 50°C에서 5시간 동안 배양되었다.)

배양 후, well은 세척버퍼 (0.4 N NaOH, 0.25% Tween 20로 3번 세척한다.

50°C) 200 μ l/well로, 세척 버퍼로 5분간 배양되고, 마지막으로 다시 3번 세척된다. Microwell은 4°C에서 건조되어 보관된다. 결합 후, well은 절단되고, well에 결합된 <sup>32</sup>P-labelled DNA의 양이 액체섬광 카운팅에 의해 측정된다.

#### 2.1차 아민 상의 펩티드 결합

펩티드는 succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) (Yashida *et al.*,1979; Hashida *et al.*,1984) (그림 2)같은 이형-이중기능의 시약을 사용한 시퀀스로 혼합된 시스테인의 자유티올 그룹을 매개로 하여 1차 아미노 그룹에 화학적으로 결합할 수 있는데, 그런 시약은 Pierce Chemical Company (Rokford, USA)로부터 구매할 수 있다. 이 가교제는 NHS 에스테르와 스페이서 암과 연결된 maleimide그룹으로 이루어져 있다. NHS 에스테르는 1차 아민과 반응하고, maleimides는 sulphhydryls과 반응한다. 만약 시퀀스 안에서 혼합된 타이로신이 chloramine-T (Greenwood *et al.*,1963)와 같은 산화제에 의해 요오드화 되었다면, 결합이 방사화학 분석에 의해 평가될 수 있다.

아민화된 microwell은 0.1 M 인산염 버퍼(NHS 에스테르는 pH 7-9에서 1차 아민과 반응한다.) 안의 SMCC의 6.5 10<sup>-2</sup> mM 용액안에서 1시간 동안 실내온도에서 배양된다. 인산염 버퍼로 3번 세척하고, 물로 3번의 세척 후, 펩티드( 6.5 μ M) 를 포함한 시스테인을 실내온도에 밤새워 0.1M 인산염 버퍼 (maleimide는 SH그룹에 pH 6.5-7.5에서 반응한다.)에 배양함에 의해 결합이 이루어진다. 인산염 버퍼에서의 3번의 세척 후, well은 절단되고, well에 결합된 <sup>125</sup>I 펩티드는 감마광선 카운터에 의해 측정된다. N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) (Carlsson *et al.*, 1978)같은 다른 이중기능 시약도 사용될 수 있다.

#### References

- Carlsson J., Drevin H., Axen R. (1978) *Biochem.J.* **173**, 723-737.
- Greenwood F.C., Hunter W.M., Glover J.S. (1963) *Biochem. J.* **89**, 114-123.
- Hashida S., Imagawa M., Inoue S., Ruan K.H., Ishikawa E. (1984) *J. Appl. Biochem.* **6**, 56-63.
- Labarca C. and Paigen K. (1980) *Anal. Biochem.* **102**, 344-352.
- Yoshitake S., Yamada Y., Ishikawa E., Masseyreff R. (1982) *J. Biochem.* **92**, 1413-1424.
- Zamattoo N., Giradeaux C., Delforge D., Pireaux J-J., Remacle J. (1996) *Anal. Biochem.* **236**, 85-94.

# 바이오맷

## STREPTAVIDIN을 입힌 표면

Streptavidin을 입힌 표면은 비오틴화된 분자결합의 강하고 보편적인 매체이다 (Proteins-Peptides-Polysaccharides-Oligonucleotides-DNA 입자 등.)

Streptavidin은 비오틴에게 매우 높은 친화력을 가진 테트라메릭 단백질이다.(M.W. 60.000) ( $K_a=10^{15}M^{-1}$ ); 그들의 결합은 공유결합에 의해 이루어지지 않은 결합 중 가장 강한 생물학적 상호작용이다.

비오틴은 그 자체의 특성을 잃거나, 변하지 않고도, 많은 단백질들과 결합할 수 있는 작은 분자이고, 각 단백질은 많은 비오틴 분자와 결합할 수 있다. streptavidin의 기본 단위가 1 분자의 비오틴과 결합하기 때문에, 결과적인 영향으로 분석의 민감도가 크게 증대시킨다.

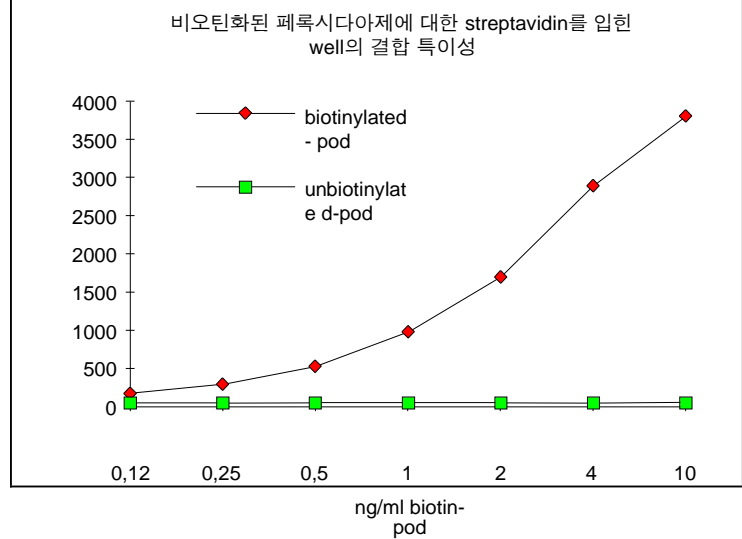
### Streptavidin-biotin 결합의 주요 특성

안정성

특이성

친화성

들이 수동적 흡착에 의한 신뢰할만한 결합을 제공하지 않는 분자의 특별한 적용을 가능하게 한다.



플레이트는 실험되고 보증된다.

- 획일성
- 결합 특이성
- 안정성

**STREPTAVIDIN를 입힌 표면**

**STREPTAVIDIN를 입힌 플레이트의 원리적 특성**

아래의 매개변수들이 분석됨.

1. 비오틴에 대한 결합력
2. 비오틴에 대한 특이성
3. 비오틴화된 IgG에 대한 결합력
4. 획일성
5. 안정성 시험:
  - 5.1 강한 화학적 접촉시의 내구성
  - 5.2 37°C에서의 저장 수명
  - 5.3 온도압력(운송 시뮬레이션)
  - 5.4 장기 보관

**1. 비오틴에 대한 결합력**

Streptavidin을 입힌 well은(그리고 BSA 포화 컨트롤 well은) 측정된 비오틴 용액에서 배양되었다.

결과적으로, 이 용액의 약수가, 비오틴 표준과 공존하는, 비오틴화된 페록시다아제와 섞여 새로운 비어있는 streptavidin을 입힌 well에 옮겨졌다. 샘플에 포함된 비오틴 구성요소는 고체에 결합되어 있는 효소의 양으로부터 계산된다. 이 결과값은 원래부터 첨가된 비오틴의 양과 비교된다; 그 차이로부터 비오틴에 대한 well의 결합력이 계산된다.

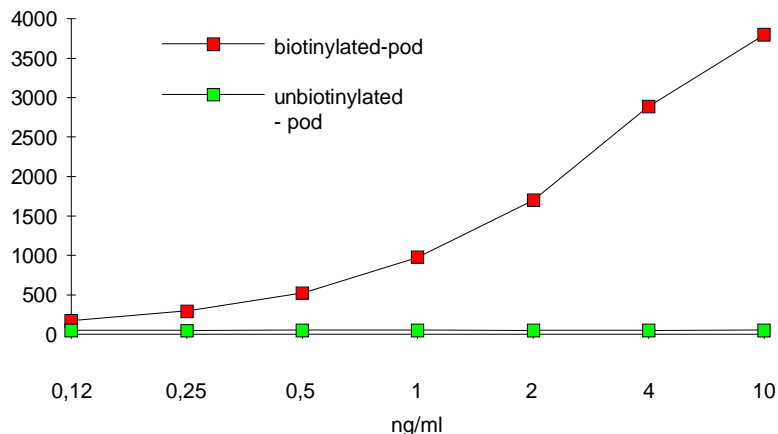
<b>results</b>	<b>12 pmol/ well (200 µl volume)</b>
----------------	--------------------------------------

**2. 비오틴에 대한 특이성**

Streptavidin을 입힌 well은 비오틴화된 페록시다아제 용액(from 10 to 0.12 ng/ml)과 비오틴화되지 않은 페록시다아제를 30' RT에서 배양한 것이다.

세척단계 후, well은 TMB에 의해 배양되고 황산 1N로 활성을 멈춘다. OD값은 450nm에서 측정된다.

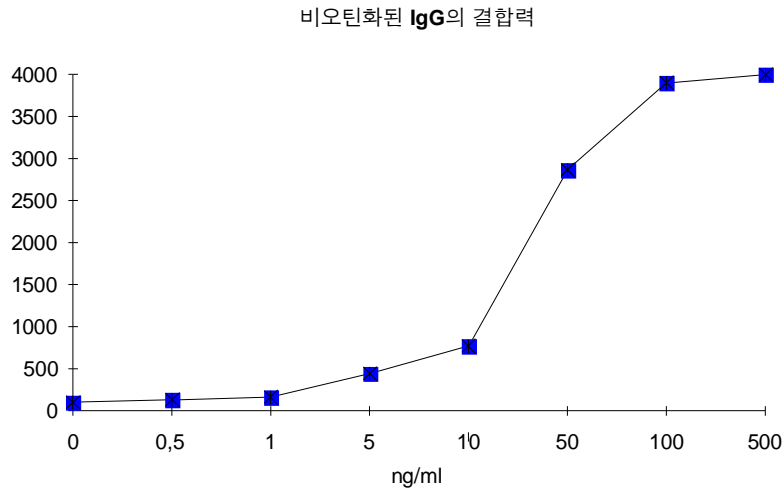
비오틴화 된 페록시다아제에 대한 streptavidin입힌 well의 결합특이성



# 바이오맷

## 3. 비오틴화된 IgG에 대한 결합력

Streptavidin을 입힌 well은 30'RT에서 비오틴화된 IgG (500 ~ 0 ng/ml) 용액에서 배양된다. 세척 단계 후, well은 30'RT에서 AHIgG-Pod에서 배양되고, 다시 세척한 후 TMB에서 배양된 후, 황산 1N으로 활성을 막는다. OD 값은 450 nm에서 측정한다.



## 4. 비오틴 결합의 특이성

시험 조건:

- 96 well 플레이트는 비오틴화된 페록시다아제 용액에서 배양되었다.
- 세척 단계 후, well은 TMB에서 배양된 후, 황산 1N으로 활성을 막는다.
- OD(시각적 밀도)는 450 nm에서 측정되고 CV%를 계산하는데 사용된다.

specificity	CV% < 5
-------------	---------