

# 바이오맷

## 방법 14

방법 14은 제2차 항체의 표면에 묶여있는 비오틴 분자에 대한 Streptavidin의 민감성을 활용하는 것이다. 방법 14는 현재 품질 관리 실험에 쓰인다.

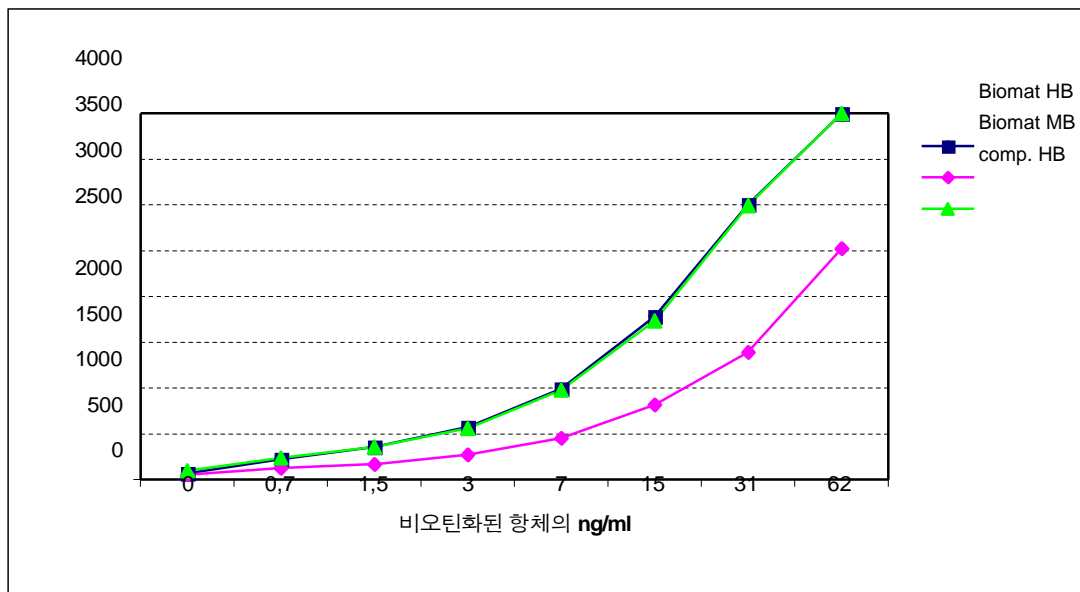
### 코팅

1. 5  $\mu$ g/ml의 토끼 Anti-HIgM 100  $\mu$ l/well 0.1M 탄산염 버퍼 pH 9.6에 투여하고 4°C에서 밤새 배양한다.
2. 0.1 M PBS pH 7.2으로 4번 세척한다.
3. 남아있는 활성 부위를 저해하기 위해 BSA 1% 150  $\mu$ l/well를 0.1M PBS pH 7.2에 투여하고 4°C에 밤새 배양한다.
4. 용액을 따라내고, 플레이트를 사용할 때까지 4°C에 보관한다.

### 실험

5. 비오틴화된 염소 항토끼 IgG (concentration from 62 to 0.7 ng/ml) 100  $\mu$ l/well를 투여하고 실내온도에 1시간 동안 배양한다.
6. PBS pH 7.2 + 0.05% Tween<sup>n</sup> 20으로 4번 세척한다.
7. 160 ng/ml of Streptavidin-POD 100  $\mu$ l/well를 투여하고 실내온도에 1시간동안 배양한다.
8. PBS pH 7.2 + 0.05% Tween<sup>n</sup> 20으로 4번 세척한다.
9. TMB 100  $\mu$ l/well를 투여한다.
- 10 30초 후에 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N를 추가하여 반응을 멈춘다.
11. 450 nm에서 결과를 측정한다.

방법14



# 바이오맷

## CERTIFICATO DI ANALISI - 테스트 인증서

LOTTO/LOT	ARTICOLO/ARTICLE	C.V (limit 5 %)	data/date
<b>H8459</b>	<b>MG01F- HB8</b>	<b>&lt; 5 %</b>	<b>13/06/08</b>

Si certifica che il lotto sopra indicato è stato prodotto secondo le procedure operative in accordo con la norma UNI EN ISO 9001:2000. Questo prodotto è stato analizzato ed è risultato conforme alle specifiche stabilite.

바이오맷은 이 부분이 적용될 수 있는 표준 실행 절차인 현 ISO 9001:2000규제에 따라서 제조되었음을 증명한다. 이 제품은 실험되었고, 모든 확립되어있는 규제를 통과하였다.

### Metodo di analisi

Soluzione di coating: 2.5 µ g/ml di Rabbit IgG in 0.1M Tampone Carbonato pH 9.6.  
Coniugato : Goat Anti-IgG-HRP

### Method of analysis

Coating solution: 2.5 µ g/ml of Rabbit IgG in 0.1 M Carbonate Buffer pH 9.6.  
Conjugate: Goat Anti-IgG-HRP

### **Controllo finale**

Il prodotto finito è stato ispezionato ed approvato per le seguenti caratteristiche fisiche:

#### **Test**

esame visivo  
aspetto generale  
imballaggio

#### **Risultato**

approvato  
approvato  
approvato

### **최종 관리**

이 제품은 실험되었고, 아래에 기술된 물질적 특성에 대해 승인 받았다.

#### **Test**

visual examination  
general appearance  
packaging

#### **Result**

approved  
approved  
approved

**Dr. Maurizia Pettenati**

품질 관리 매니저

## 무 바인딩 표면

단백질이 well에 결합하는 것을 막는 표면.

well표면에 일어날 수 있는 반응에 의한 분자의 활동(예: 효소)의 변화를 피할 필요가 있는 처리를 말한다.

Two types of tests were made for checking the properties of our **No Binding** capacity surface :

### a. No binding capacity against IgG (met. 14)

1. coating: dispense 100 $\mu$  l/well of Rabbit Anti-HIgM (concentration of 25  $\mu$  g/ml in Carbonate Buffer pH 9.6) and incubate 24 h at 4°C.
2. 4 washing with PBS pH 7.2
3. blocking: dispense 150  $\mu$  l/well of BSA 1% in PBS pH 7.2 and incubate overnight at 4°C.
4. wash 4 times with 0.1M PBS pH 7.2 + 0.05%Tween<sup>n</sup> 20
5. dispense 100  $\mu$  l/well of Biotinylated Goat Anti- Rabbit IgG (concentration from 0.062 to 0.0007  $\mu$  g/ml) and incubate 1 hr at room temperature
6. wash 4 times with 0.1M PBS pH 7.2 + 0.05%Tween<sup>n</sup> 20
7. dispense 100  $\mu$  l/well of Streptavidin-POD (concentration 0.16  $\mu$  g/ml) and incubate 1 hr at room temperature
8. wash 4 times with 0.1M PBS pH 7.2 + 0.05%Tween<sup>n</sup> 20
9. dispense 100  $\mu$  l/well of TMB
10. after 30' stop the reaction with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N (100  $\mu$  l/well)
11. reading is made at 450 nm after 5'

results

O.D. values	NO binding	Medium binding	High binding HB 8
<i>RT</i>	62	974	1563
<i>45° C</i>	60	n.a.	1476
<i>- 20°C</i>	61	n.a.	1590

The test was performed after 7 days in the above conditions

### b. No binding capacity against Albumin (met. 25)

1. coating: dispense 100 $\mu$  l/well of a mixture of 20 ng/ml Biotinylated Albumin diluted in 3  $\mu$  g/ml of BSA in 0.1 M PBS pH 7.2 and incubate 24 h at 4°C.
2. wash 4 times with 0.1M PBS pH 7.2 + 0.05%Tween<sup>n</sup> 20
3. dispense 100  $\mu$  l/well of 0.1  $\mu$  g/ml Streptavidin-POD and incubate 30' at room temperature
4. wash 4 times with 0.1M PBS pH 7.2 + 0.05%Tween<sup>n</sup> 20
5. dispense 100  $\mu$  l/well of TMB
6. after 10' stop the reaction with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N (100  $\mu$  l/well)
7. reading is made at 450 nm

results

	NO binding	Medium binding
<b>O.D. values</b>	76	392



# 바이오맷

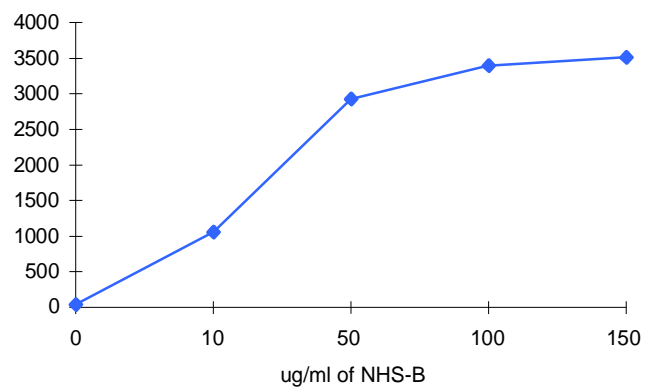
## 아민화된 표면

제 1차 또는 제2차 아미노 그룹 공유결합이 이루어진 표면은 잘 알려진 homo-heterobifunctional 링커(예: N-Hydroxysuccinimide (NHS) 나 Succinimidyl 4-(N-maleidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC))를 매개로 한 아미노, 카르복실, 티올 그룹 같은 반응적인 부분을 포함한 화합물의 공유결합 고정을 만들어내기 위해 기여한다.

이런 종류의 고정은 표면에서의, 분자의 물리적 흡착작용과 연관된 일부의 한계를 극복할 있다:

- 약하게 결합 되어 있는 분자의 고정이나, 물리적 흡착에 의하지 않은, 적은 펩티드(M.W. 1000-5000), 약, 독소나 호르몬.
- 자신의 특정한 부위의 완전성과 접근성을 보장하기 위한 분자의 지향된 고정은 Fab-SH 항체 조각이나 streptavidin, polysaccharides나 핵산 같은 분자의 우연한 물리적 흡착에 의해 일어나는, 이런 부위의 억제의 위험을 피하게 한다.
- 물리적 흡착의 안정성과 비교했을 때, 자연 발생적인 흡수의 위험이 감소되었기 때문에 보관 안정성이 증가하다.

1차 아민 - biotinylated NHS의 공유결합



플레이트들은 실험되고 증명된다.

- 획일성
- 재생성
- 아미노 그룹 활동

## 아민화된 표면

준비의 소개와 면역 감시 분석에의 아민화된 표면 이용.

### 사용 방법

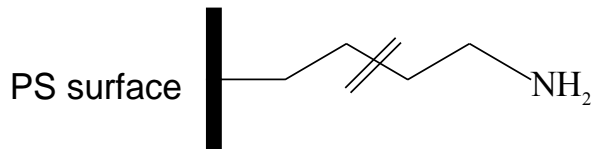
생물학적 분자들을 아미노 그룹과 묶기 위해 다양한 방법이 주기적으로 사용되었다. 사용을 위한 특정한 방법은 의도된 적용에 대한 지식을 요구한다. 일반적인 가이드라인으로, 표면상의 아미노 그룹과 합쳐질 분자의 기능적인 그룹의 상호작용은 homo와 heterofunctional 가교제에 의해 매개된 공유결합에 기초한다.

특별히, N- hydroxysuccinimide을 첨가하든, 하지 않든 Ethyldiethylaminopropylcarbodiimide (EDC)은 카르복실 그룹의 분자와 표면의 아미노그룹 간의 강한 가교제이다.

만약 결합될 생체분자가 리신 아미노 그룹을 포함한다면, 가장 간단한 방법은, Sodium Cyanoborohydride.의 감소로 인한, 안정된 아민결합인 Glutaraldehyde를 매개로하여 결합시키는 것이다.

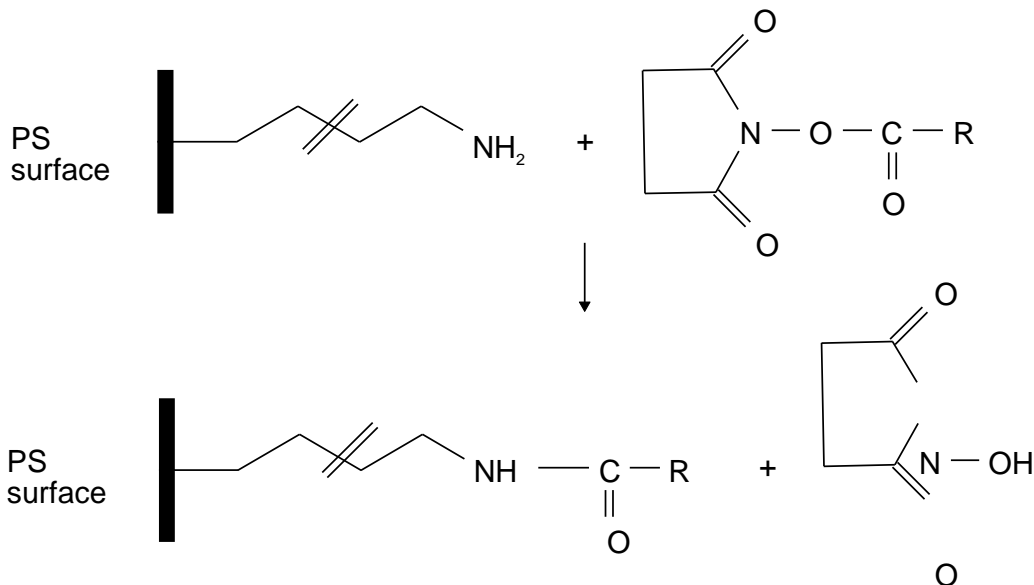
이런 목적을 위한 다른 가교제는 Dimethylpimelidate와 Dissuccinimidyl suberate이다. Fab-SH와 같이 티올 그룹을 포함한 생체분자나 끝부분에 cystein이 있는 펩티드는 아미노 그룹과 반응하기 위해 Succinimidyl 4-(N- maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)같은 가교제를 포함한 많은 수의 maleimido 그룹을 활용할 수 있다.

바이오매트  $NH_2$  표면의 화학적 물리적 분자배열도



반응법의 예:

NHS의 분리를 통해 바이오매트  $NH_2$ 와 공유결합된 임의적 NHS에스테르화 화합물(R)





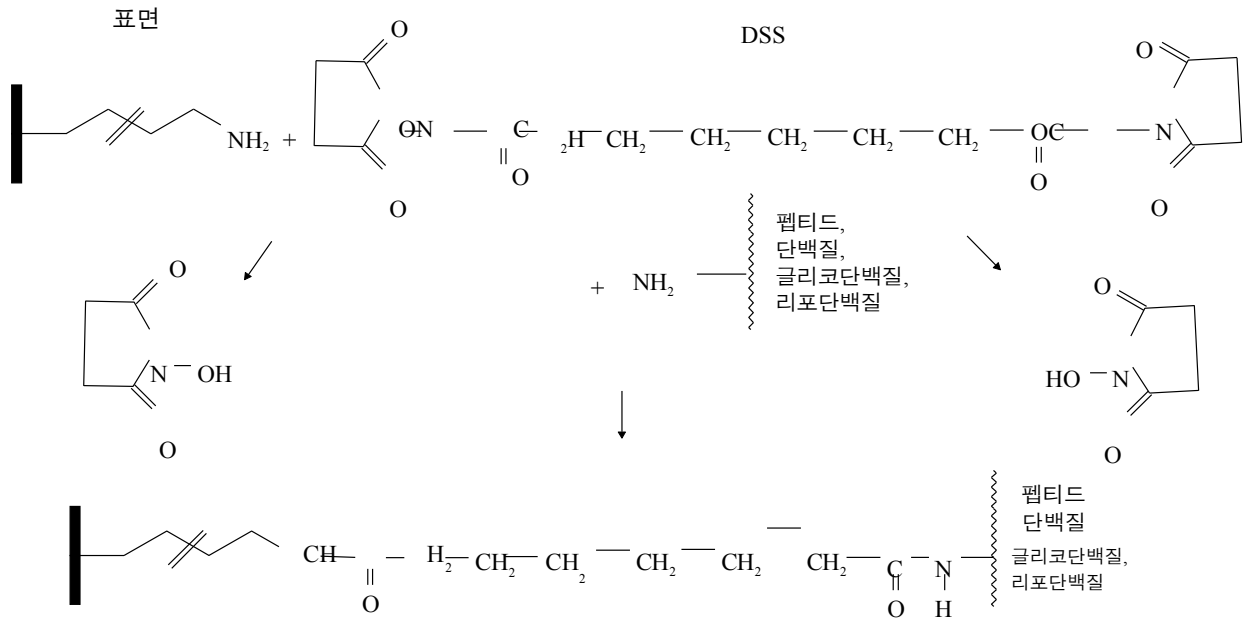
# 바이오맷

아래는 바이오맷 NH<sub>2</sub>표면과 반응 그룹과의 공유결합 코팅에 사용될 가교제의 예이다.

## A. Disuccinimidyl suberate (DSS).

이 대칭의 (동형두기능의)링커는 1차 또는 2차 아미노 그룹을 포함하는 화합물을 연결할 수 있고, 그러므로 펩티드, 단백질, 글리코단백질, 리포단백질의 공유결합 고정에 사용될 수 있다.

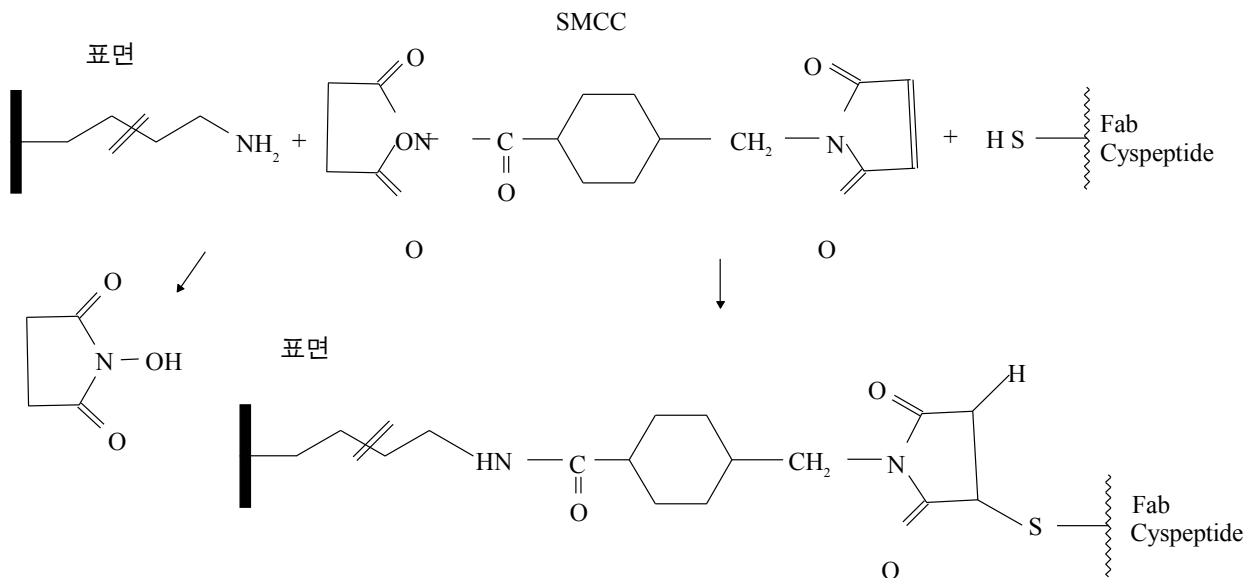
### 반응 A



## B. Sulfosuccinimidyl maleimidomethyl cyclohexane carboxylate (SMCC).

이 이형-두기능 링커는 SH-를 포함한 화합물과 다른 화합물을 연결할 수 있다. 이것은 특별히, Fab-SH 항원 조각이나 영구적으로 시스테인화된 항원 펩티드의 공유결합 고정에 쓰이고, 그 때문에 이 화합물의 활성화된 끝부분을 액체 상태에 노출시킨다.

### 반응 B



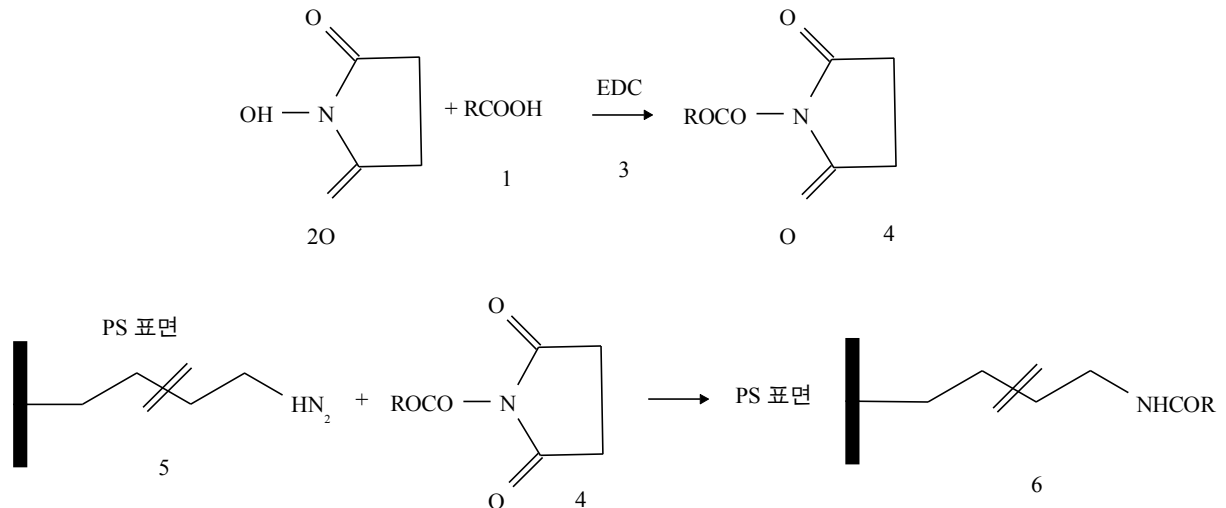




# 바이오맷

- C. N-Hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS) 또는 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride(EDC)와 합쳐진 N-Hydroxysuccinimide (NHS).  
Sulfo-NHS와 합쳐진 EDC링커는 카르복실 그룹을 매개로 해서 작은 펩티드들(M.W. around 1000)을 NH활성화된 스트립 표면에 합칠 수 있다. r c

## 반응 C



1. peptide
2. Sulfo NHS (or NHS)
3. EDC
4. intermediate active compound resulting from the reaction
5. *biomat*  $\text{NH}_2$  surface
6. peptide covalently immobilised on *biomat*  $\text{NH}_2$  surface

## Codes and suppliers of linkers

product	supplier	code
DSS	PIERCE	21555
Sulfo-SMCC	PIERCE	22322
Sulfo-NHS	PIERCE	24510
EDC	PIERCE	22980

## 아민화된 & 카르복실화된 표면

아미노와 카르복실 그룹의 표면 사용을 위한 일반적 방법

바이오맷은 *biomat* NH/ NH<sub>2</sub>와 COOH같은 화학 그룹을 소개하는 변형된 폴리스티렌 표면을 개발했다.

이 그룹은 플라스틱 표면에 화합물의 공유결합을 일으킬 수 있다. 폴리스티렌의 시각적 특성은 바뀌지 않았고, 이 그룹은 변형된 표면을 진단적인 분석을 위한 강력한 수단으로 사용할 수 있게 한다.

이 표면들은 아래의 가능성을 제공한다.

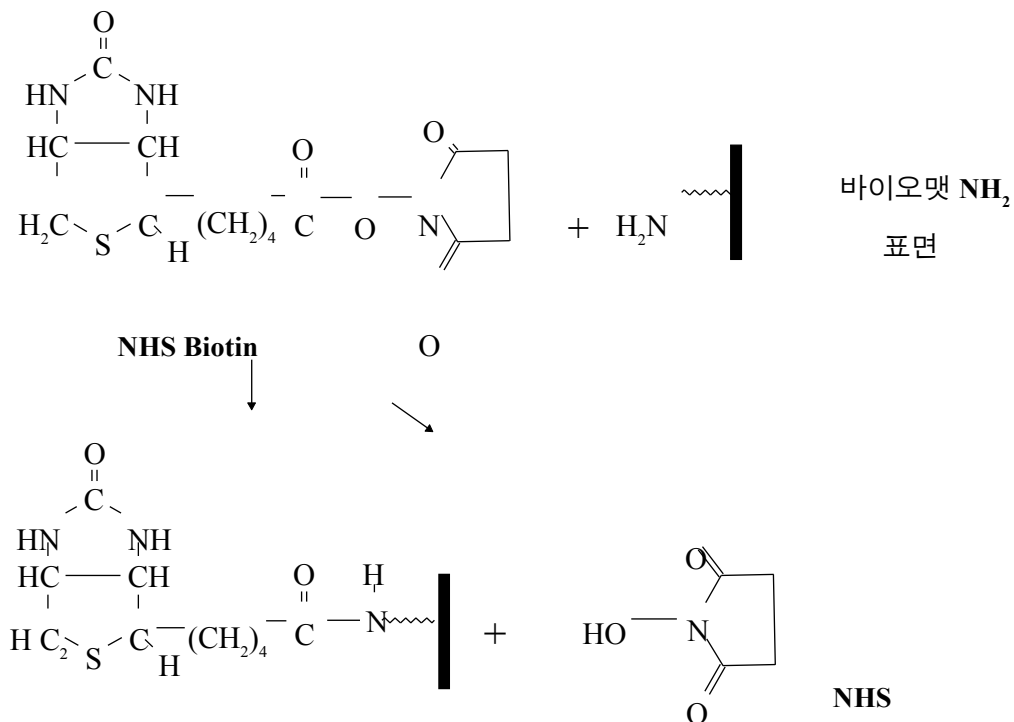
- . 물리적 흡착에 의해 전혀 결합하지 않거나, 약하게 결합하는 작은 분자의 공유결합 고정.
- . 고체상태에서 명확한 방법으로 분자의 고정을 지향.

아래는 사용자가 자신만의 생물적으로 구체적인 분석을 개발할 수 있는 지침이 될만한 적용의 예시들이다.

### 1. NHS-활성화 화합물의 결합

바이오맷 NH/NH<sub>2</sub> 표면의 가장 단순하고 쉬운 적용은 N-hydroxysuccinimide 유도체 (NHS)에 의한 에스테르화에 의해 활성화된 분자 결합이다. 우리의 실험에서는 비오틴의 n-Hydroxysuccinimide 활성 에스테르가 즉각 그 탄소그룹을 매개로 해서 그림1에 보여지는 것처럼 표면에 있는 아미노 그룹과 결합한다.

그림1



Biotin coupled to 바이오맷 NH와 결합된 비오틴, 표면

# 바이오맷

시약과 완충제 준비

## 재료

Solid phase:	Biomat plates	MT02F-AM1 (primary amino groups)
$\epsilon$ -Caproylamido-biotin-N-hydroxysuccinimide ester (NHS- biotin)	BIO-SPA	MT02F-AM2 (secondary amino groups) MT01F-HB (high binding capacity) Cat No. B002-61
Dimetilformamide (DMFO)	Fluka	Cat No. 40250
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

### NHS-Biotin stock solution

NHS-biotin 6mg  
DMFO 2 ml

### NHS-Biotin solution 150 $\mu$ g/ml

NHS Biotin stock solution 500 $\mu$  l  
PBS 0,1M pH 7,2-0,15% Tween<sup>®</sup> 20 ..to 10ml

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

NHS Biotin stock solution 333 $\mu$  l  
PBS 0,1M pH 7,2-0,15% Tween<sup>®</sup> 20 ..to 10ml

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

NHS Biotin stock solution 167 $\mu$  l  
PBS 0,1M pH 7,2-0,15% Tween<sup>®</sup> 20 ..to 10ml

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

NHS Biotin stock solution 33 $\mu$  l  
PBS 0,1M pH 7,2-0,15% Tween<sup>®</sup> 20 ..to 10ml

### Streptavidin-mix

Streptavidin

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

## 실험

- 100 $\mu$  l NHS-비오틴 용액 150-100-50-10  $\mu$  g/ml와 0  $\mu$  g/ml 0,1M PBS-Tween<sup>®</sup> 20 0,15% pH 7,2를 well에 추가하라(1차 아민과 HB와 함께). 증발을 막기 위해 접착테이프로 well을 봉인한다.
- 실내온도에 밤새도록 배양한다.
- well을 비우고 0,1M PBS-Tween<sup>®</sup> 20 0,05%, pH 7,2으로 4번 세척한다.
- streptavidin 믹스 100 $\mu$  l을 각 well에 첨가하고, 실내온도에 30분 동안 배양한다.
- well을 비우고 0,1M PBS-Tween<sup>®</sup> 20 0,05%, pH 7,2으로 4번 세척한다.
- TMB substrate 용액을 100  $\mu$  l/well 첨가하고 실내온도로 10분간 배양한다.

# 바이오맷

7. 황산 1 N을 100 $\mu$  l 추가함으로써, 기질반응을 멈추고, 시각적 농도 값을 450nm에서 측정한다.

## 결과

이 결과는(그림. 2를 보라.) well에 첨가된 NHS-비오틴 농도와 바이오맷의 NH<sub>2</sub> 표면에 결합한 비오틴의 양 사이에 분명한 상관관계가 있음을 보여준다.

반면에, 1차 아미노 그룹이 표면에 융합되어 있지 않으면 어떤 비오틴도 플레이트에 결합되지 않는다. 그것은 비오틴과 효소 결합체 사이에서 수동적 활용이 일어나지 않았음을 보여준다. 그러므로 우리는 NHS-비오틴이 바이오맷 NH<sub>2</sub> 표면에 보여진 아미노 그룹에 공유결합을 했다고 결론내렸다.

그림.2

