

INDEX

회사	1
공학, 표면처리	2
고객품목의 표면처리	3
플라즈마	4

제품

면역측정용 판금	5
기술적 팁	6
특수한 제품과 부품들	7
HTS용 판금	9
조직배양상품	10
컵바닥용 판금	11
단백질 결정화용 판금	12
표면	14
표면 고르는 방법	15

표면성질

고 결합 능력 표면	17
무 결합 능력 표면	23

특수한 표면

생물화	24
카르복실화	28

코팅된 표면

면역단백질 스트렙타아비딘	38
단백질 A	43
단백질 G	48
콘카나발린 A	53
자칼린	55
맥아	57
폴리엘리신	59
폴리엘아르기닌	62
칼로둘린	63
비오틴	65
제품 목록	67
품질	72
환경 정책, 시장	73

회 사

바이오맷은 1992년 설립된 엔지니어링 회사로 생의학 용도로 사용되는 물질표면의 변형을 집중적으로 연구하고 있다

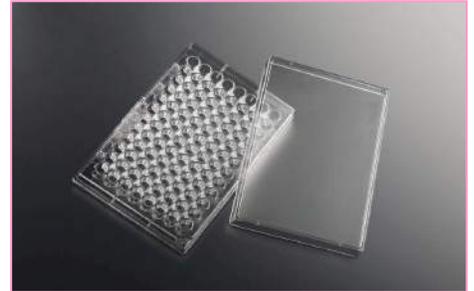
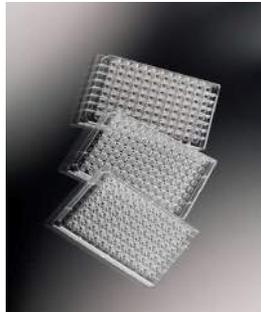
본 회사의 목표는 생명 과학 관련 제조업자들과 연구자들에게:
고객 서비스, 믿을만한 제품, 능력
을 제공하는 것이다.

본 회사는 다양한 기술을 활용한 표면 처리 방법을 연구하여 고객에게 면역학적 검정이나 심사기준에 맞는 최신식 기술의 복합적인 요구를 충족한다.

바이오맷은 현재 생명과학시장에 기여하는 다양한 종류의 **제품**을 제공한다:

- 면역 검정
- 조직 배양
- 초전도
- Glass Bottom (세포조사를 위한)
- 단백질 결정화

상기의 모든 제품은 엄격한 품질 기준을 만족한다.



IgM 코팅 표면의 AFM 이미지

바이오맷의 목표는 생명과학 관련 제조업자들과 연구자들에게 그들의 필요한 용도에 맞는 적절한 표면을 제공하는 것이다.

플라스마 처리법은 특별히 그 독특한 특성 덕분에 생의학 분야에 활용하기에 적절하다.

각각의 특정한 용도에 필요한 표면적 특성을 얻기 위해 모든 유형의 표면 처리법이 연구되고 개발 되었다.

플라스마 처리법은 아래의 용도에 적절하다:

- 생의학과 산업적인 용도에 쓰이는 친수성/소수성 표면의 준비
- 유기적 기질의 응집력을 증가 시킴.
- Microfluidic (미세유체) 장치에의 유동 증가.
- 표면 청소/ 에칭

플라스마 처리법에 의하여 넓은 범위의 제품의 생물학적 활동에 관련한 성능이 개선되었다.

우리는 분석기술의 발전으로 다수의 사용자들이 그들 자신의 장치를 개발 중이라는 것을 잘 알고 있다.

그러므로, 우리는 우리의 마이크로 플레이트를 제공함과 동시에, 고객이 가지고 있는 제품의 모양과 최종목적에 관계 없이 고객의 제품 표면에도 똑 같은 범위의 서비스를 제공한다.

표면 처리 서비스

기술 전이(양도)

적용의 예:



- 바이오칩
- 필터
- 큐벳 Cuvettes
- 특별 장치

고객의 필요에 따라 변형된 표면.

사용자가 기대하는 성능, 부품의 모양, 재료의 특성을 포함한 모든 처리 과정과, 보관법이 고려되고, 사용자가 제품을 가장 효율적으로 사용하도록 하기 위해 단계별로 제품의 개발이 사용자와 협의 된다.

플라스마

플라스마 장치와 과정은 몇 단어로 설명할 수 있다.

이 장치는 진공실내에 하나이상의 가스 흡입구(적절한 주입 시스템을 갖추고 있는)로 구성되어있고, RF(또는 다른 빈도) 발전기에 연결된 두 개의 전극은 그 사이를 흐르는 기체에 플라스마를 발생시키는 분자를 여기 시키는 에너지를 공급하기 위해 이 방안에 설치 되어 있다.

이 과정은 아래의 방법으로 진행된다:

1. 처리를 위한 제품을 방 안에 놓는다.
2. 정해진 진공 수치에 다다른다.
3. 정해진 양의 선별된 기체가 진공실내에 흐르게 되고, 플라스마를 만들어내는 전기의 방전에 의해 여기된다.
4. 반응성 플라스마 종류가 제품의 표면과 반응하여 그 특성이 변화된다.

이 과정은 실질상 아주 짧은 시간 내에 일반 실내온도에서 진행되고, 처리되는 제품의 표면만 변형시킨다.

저온 플라스마 기술이 가장 많이 적용되는 곳은 polymer(화합물)의 습윤성을 변형하는 것이다.

Polymer의 표면은 일반적으로 전혀 습윤성이 없다(접촉 각도 > 90도).

이 특성이 의미하는 것은, 표면과 어떤 물질 사이에 우수한 접착력이 필요할 때마다, 우리가 기대에 못미치는 결과를 얻게 될 것이며, 만족스러운 결과를 얻기 위해 이 표면에 대한 적절한 처리가 필요하다는 것이다.

우수한 습윤성이 중요하게 여겨지는 예:

생물학적 분자의 결합

접착 잉크칠 색칠

모든 종류의 polymer가 각각 다른 특성을 가지고 있다 해도, 처리법은 연구되어야 하고, 미리 고려된 각 특성을 특정한 물질에 적용되어야 한다:

원료 부품의 모양 적용

그러므로 특정 매개변수를 이 과정에 적용 시켜야 한다:



기체의 종류, 시간, 힘

그리고, 처리가 끝나면, 처리된 부분을 시험해야 한다:

- 처리법의 효율성
- 일률성
- 보관도중 효과의 지속성

그리고, 기술적이고 경제적인 면에 있어서의 최고의 처리법을 찾기 위해 사용자와 협력해야 한다.

바이오맷은 자체 시설 내에 설치되어 있는 플라스마 반응장치로 표면 처리법을 연구하고 개발하고 적용한다.

본사 제품

- 면역 검정 플레이트
- 조직 배양 플레이트
- 초전도 플레이트
- Glass Bottom (세포조사를 위한) 플레이트
- 단백질 결정화 플레이트

면역학적 검정 플레이트

바이오맷의 96홀(well) 면역 검정 플레이트는 솔리드 플레이트와 8 x 12의 단일 well holding프레임(분리할 수 있는 스트립)에 조립된 8well 스트립이 있는데, 이것은 사용자가 최대한 원하는 대로 사용할 수 있게 하다.

마이크로 플레이트는 최고의 성능을 제공하기 위해 연구된다:

- 낮은 발광성을 가진 순수 폴리스티렌으로 제조되고, 각각 다른 용도에 따라 투명, 백색, 검은색에서 고를 수 있다.
- 몰드 디자인을 통해 백그라운드 신호를 줄이기 위해 중요한 시각적 품질을 높인다.
- well의 내부 바닥 쪽으로 날이 있는 살은 세척을 용이하게 한다.
- 외부 덮개는 단일 well을 사용할 때 수직 정렬을 보장해준다.
- 테두리는 바닥의 외부 표면을 스크래치로부터 보호한다.
- 플레이트는 SBS 표준을 준수하고, 디자인은 자동처리시설의 우수한 성능을 확증한다.



기술적 조언

마이크로 플레이트의 습성과 성능이 부분적으로 물리적 차원과 직접적인 관계가 있으므로, 즉각적으로 이용 가능한 데이터 자료를 가지고 있는 것이 유용할 것이다.

Well의 표면:

액체로 덮여있는 부분은 화학반응에 관계된 부분이다.

각각의 레벨에서 전체범위는 바닥 표면 범위이고, 그것은 각각의 레벨에서 동일하며, 벽 표면은 달라진다.

광로

광로는 결과에 영향을 미칠 수 있고, 때때로 높고 낮은 반응성에 대한 잘못된 인상을 줄 수 있으므로 또 하나의 중요한 요소이다. 직경이 작은 well은 같은 양의 액체의 표면높이가 더 높을 것을 의미하며, 그렇기 때문에 광선이 더 넓은 확장된 범위의 착색된 액체를 지나갈 것이다. 또한 다른 요소들도:

액체의 메니스커스의 형태

광선의 정확한 조준 - well의 습윤성에 따라 높거나 낮아지는 well의 정중앙을 지나게 함.

습윤성

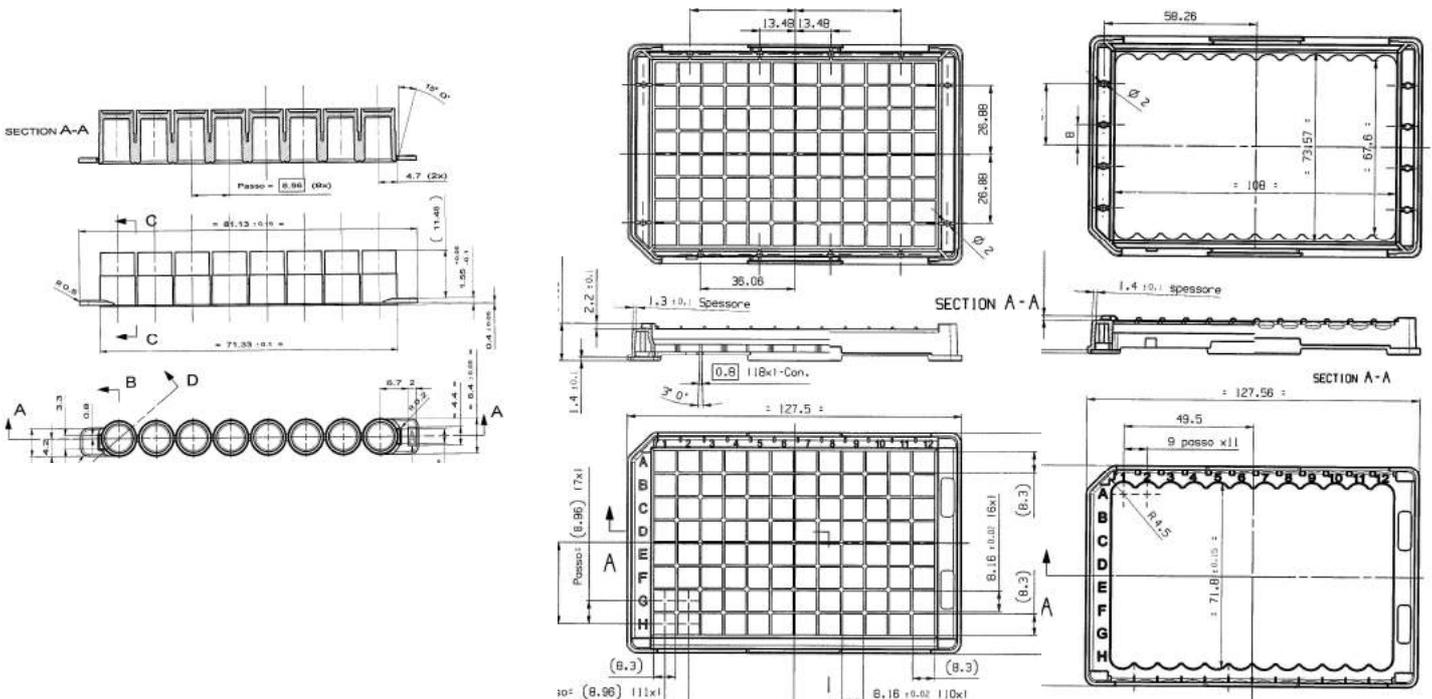
명백하게 결과에 영향을 주기 때문에, 이 요소들은 표현되도록 유도된다.

Level µl	Optical path mm	Bottom surface mm	Wall surface mm	Total surface mm
100	2,98	30,68	61,27	91,95
200	5,98	30,68	117,37	148,05
300	8,97	30,68	176,05	206,73

Formats(형태)

표준 포맷이 모든 고객의 필요를 만족시킴에도, 바이오맷은 다른 용량(400µl)과 직경을 가진 8well 스트립을 필요로 하는 사용자의 요구에도 주의를 기울였다.

두 Well의 일반적인 특성은 동일하고, 둘다 같은 프레임에 들어간다.



특별 제품 과 액세서리

색 코드

색 코드된 스트립은 모든 종류의 표면에서 이용가능 하다.

색깔은 윗 테두리에 표시되어 있고, 그것은 스트립이나 단일 well의 빠르고 신뢰할만한 식별을 가능하게 해준다. 요청에 따라 다양한 색깔이 이용가능 하다.

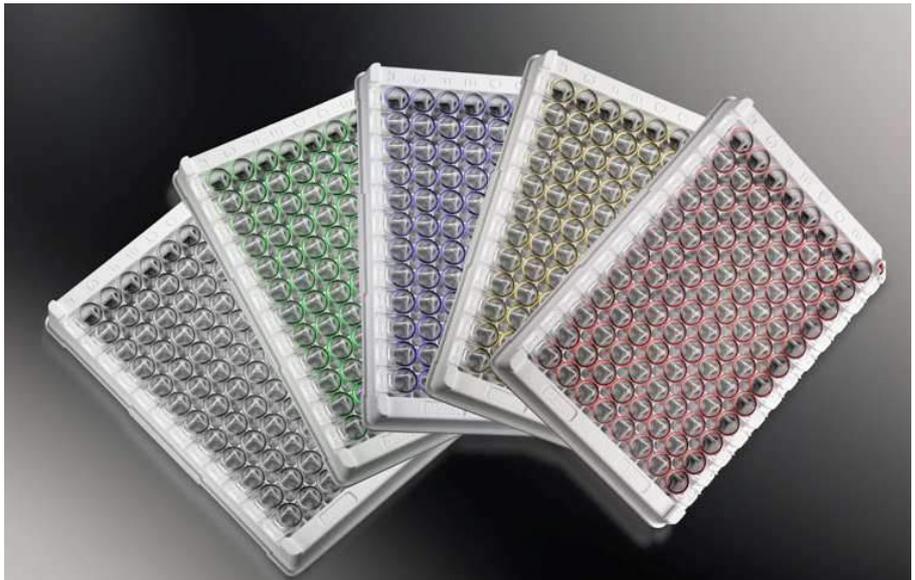
각각의 마이크로 플레이트에는 한가지 색깔만 표시되어 있다.

색깔은 열전도에 의해 표시된다.

플레이트는 그 색깔 처리 공정 동안에 성능의 변화가 일어나지 않았음을 보장하기 위해 착색 전후에 시험된다.

기준 최소량 이상을 주문해야 한다.

예약 가능하다.



커스터마이즈 (주문 후 제작) 플레이트 (OEM)

플레이트에 고객의 브랜드 명을 입력할 수 있다.



biomat

스트립 제거장치



분리 가능한 스트립을 프레임으로부터 분리시키는 간단한 장치

보호 백

바이오맷은 지퍼가 있는/없는 보호 백을 제공한다.

알루미늄 보호 호일 Mil-B-131-H Type-1 Class-1 Qualified

불투명 보호 필름 안쪽 레이어는 식품의약품 규제를 준수한다 (FDA 21 CFR1771520)

구성/ 구조:

- 15마이크론 PET (폴리에스테르) 본딩 레이어
- 12마이크론 알루미늄 호일 본딩 레이어
- 75마이크론 백색/투명 LLDPE 필름



높은 재료처리량 검사 플레이트

바이오맷은 높은 재료처리량 검사를 위해 96well과 384well을 제공한다.
플레이트는 낮은 발광성을 가진 순수 폴리스티렌으로 제조된다.
규격은 SBS표준에 준하고, 디자인은 자동시스템의 정확하고 빠른 처리를 보장한다.



Polymer에 골고루 혼합된 색소는 적은 혼선량을 보장한다.

다른 기술을 위한 백색, 흑색, 투명 플레이트가 이용가능 하다.

표면의 종류

요청에 따라 HTS 플레이트에도 바이오맷의 모든 범위의 가공되거나 활성화된 표면이 적용가능하다.

표면 특성 챕터를 참고하라.



조직 배양 (TC)처리 제품

바이오맷은 플라즈마 표면 처리경험덕분에 TC표면을:

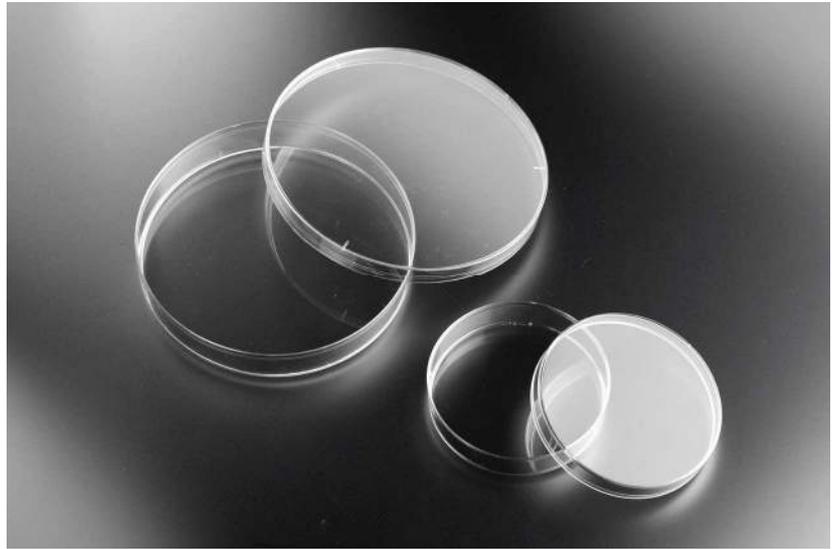
- 24 와 96 well 플레이트
- 페트리 접시
- 고객의 제품

에 적용할 수 있게 되었다.

일반적인 특징

세포 성장에 시간적인 지원을 제공하는 표면은 적절한 진공 플라즈마 처리법에 의해 얻어진다.

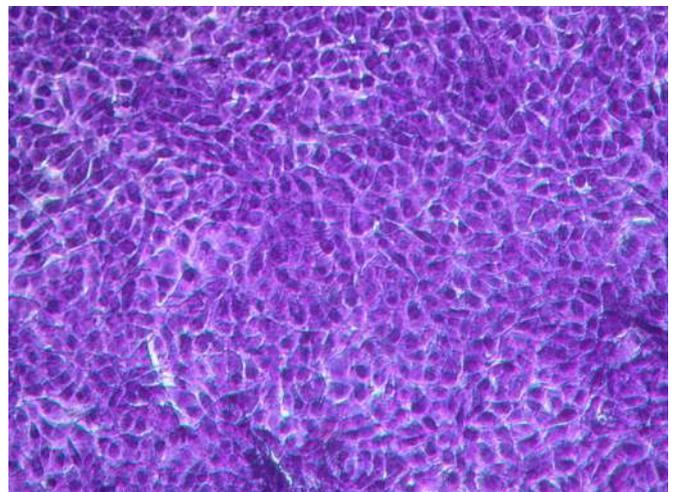
진공 플라즈마 처리법은 엄격하게 관리되는 직경덕분에 그 표면에서 일어나는 반응의 일관성을 보장한다. 표면의 화학반응은 친수성이 있고 음전하의 특성이 있는 획일화된 표면을 제공한다.



고객의 제품상에도 TC처리법을 적용할 수 있다

기술적인 측면

- TC 처리 플레이트는 SBS 표준에 맞는 24와 96well 플레이트 포맷으로 제공되고, 페트리 접시는 다양한 직경으로 제공된다.
- 높은 품질의 폴리 스티렌
- 다양한 종류의 패키지(살균처리 된/살균처리 되지않은)가 이용가능하다.



마이크로 플레이트 표면의 세포 성장 (L929 푸른 얼룩)

GLASS BOTTOM 플레이트

바이오맷의 Glass bottom 플레이트는 아래의 용도에 알맞다 :

- 형광 관계 분광학 (FCS)
- 공초점 이미징
- 형광 분극화 (FP)
- 세포 단위 분석
- 마이크로 어레이
- 레이저 유발 형광 (LIF)
- 세포 배양

제조 과정에서 쓰여진 기술:

- 선진의 로봇
- 선진의 로봇 기술을 사용한 온라인 접착
- 무균실 생산

은 사용자를 위한 최선의 성능을 보장하는 제품의 물리적인 특성과 쉬운 변형을 가능하게 하기 위해 이용된다:

- 월등한 편평함 (평면성) - 마이크로 플레이트의 전반적인 편평함은 스캐닝과 이미징 에러를 줄일 수 있다.
- Well에 접착제 불포함.
- 완벽한 모서리 접착제 침전
- 높은 신호잡음 비율을 발생시키는 자동형광의 감소.(5%미만)

형태

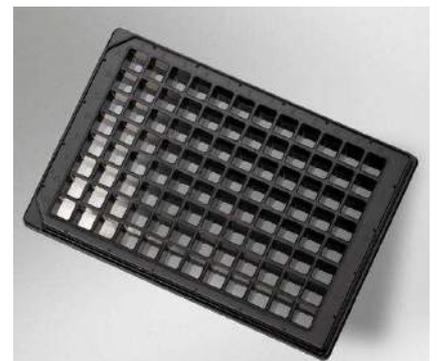
Glass Bottom 플레이트는

96 384 1536 well 형태로 이용가능 하다.

제품 특성

- 이 플레이트는 SBS 표준을 준수하여 디자인되고, 제조 되었다.
- 낮은 자동형광 재질.
- 증가한 작업 량 - 네모난 well은 높은 작업처리량과 최대한의 양을 운반하는데 가장 이상적이다.
- 낮은 베이스 디자인 - 낮은 베이스 디자인은 외부의 well을 포함한 모든 well을 읽기 쉽게 한다.

표면 처리된 플레이트는 요청에 따라 이용가능 하다. 표면 특성 챗터를 참고 하라.



단백질 결정화 플레이트

바이오맷 의 단백질 결정화 플레이트는 3개의 다른 형태를 포함한다.



under oil 96 well 결정화 플레이트

MRC - 192 well 결정화 플레이트

3 Well - 288 well 결정화 플레이트

일반적인 특징

- 쉬운 결정 복구

도드라진 넓은 well이 결정의 마운팅을 특별히 용이하게 한다.

- 안전한 봉인

Well사이의 넓은 분할벽이 테이프로 봉인할 수 있는 충분한 공간을 확보해줌으로써 강한 구조를 이루어 중간부분이 휘지 않는다.

- 추적의 용이함.

마이크로 넘버링이 위치를 추적할 수 있게 해준다.(현미경으로 관찰 가능).

- 우수한 선명도

Well들이 넓은 원뿔형이고 완벽한 조명에 영향을 주는 렌즈를 가지고 있다.

폴리머 Polymers

결정화 플레이트는 아래의 형태로 이용가능 하다.

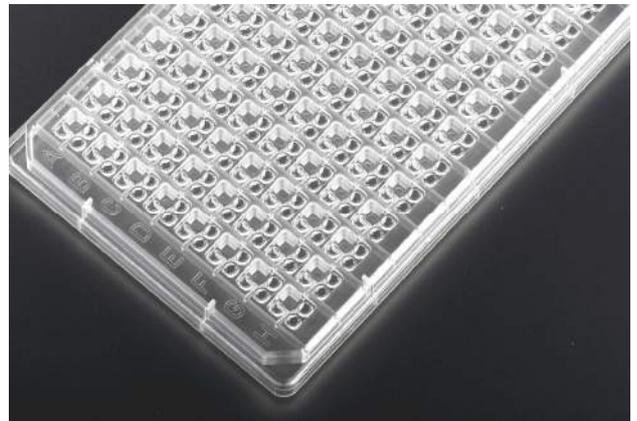
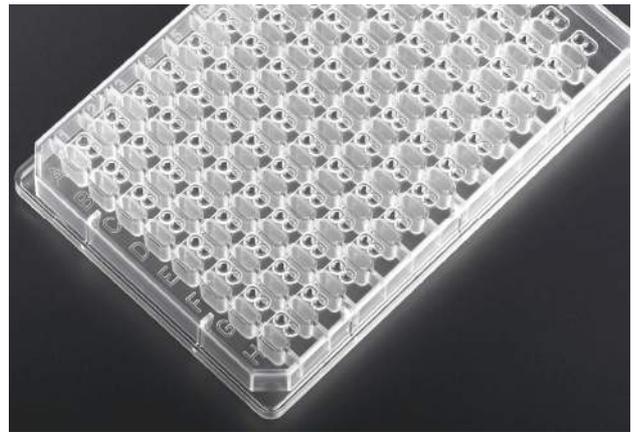
- 시각적으로 우수한 polymer인 UVP는 UV전도가 가능하고 소금과 단백질 결정체를 차별화 하기 위해 사용될 수 있다.

- PS 폴리스티렌

biomat

넓은 범위의 부피

- Under Oil 96 well 결정화 플레이트는 결정의 마운팅을 특별히 용이하게 한다.
전형적인 제안 부피는 100-500나노리터의 샘플 운반을 통한 샷을 포함한 200 μ l의 오일이다: 20마이크로리터 부피의 well은 사용자에게 넓은 범위의 고분자 결정화 가능성을 제공한다.
- MRC의 전형적인 부피는 보관소가 50-100 μ l의 부피이고 한 방울은 10-5 μ l 크기이다. 192개의 시각적 well은 2배의 양의 실험적 구조를 제공한다.
2 well은 일반적으로 각 well당 85 μ l을 완충한다.
- 3 well의 일반적인 부피는 보관소가 50-100 μ l의 부피이고 한 방울은 10 nl-5 ul 크기이다. 288개의 시각적 well이 2배의 양의 실험적 구조를 제공한다.
3 well 일반적으로 각 well당 65 ul을 완충한다.



일반적 특성

이런 결정화 플레이트는 다년간에 걸친 성공적인 로봇의 높은 재료처리량의 결정화 경험의 결과이고, 여러 필요한 특성 등을 통합하는 것은 이전의 결정학자에게는 가능하지 않는 것들이었다.

- 자동화를 위한 표준 SBS 형태
이 플레이트는 일반적인 사용자를 위해 SBS 표준의 96 well에 맞게 디자인되었고, 외부 코너에 매겨진 번호(A-H, 1-12)는 로봇을 이용한 샘플 생산을 용이하게 했다.
- 렌즈가 있는 시각적으로 완벽한 well은 현미경으로 관찰 할 때에 더 잘 보이도록 돕는다.
- well 내부에 있는 미시 식별자는 현미경아래에서의 적응을 단순화 한다.
- 구성 배열에 적절하다.
- 자라난 결정체는 식별하기 쉽고, 고정되지 않은 폴리머 덕분에 제거하기 쉽다.
- 96well구조를 채우기 쉽다.
- Well은 정전기의 영향으로 튀어나오는 미세 물 방울 없이 채워진다.
- Well은 완벽하게 편평한 위 표면으로 개별적으로 봉인된다.- 각 well부분의 완전성을 보장하기 위해 Well마다 넓은 면적을 갖추도록 디자인하였다.

표면

다양한 종류의 표면은 모든 사용자의 필요를 위해 적절한 수단을 제공한다.

- 중간 바인딩 표면
- 높은 바인딩 표면
- 무 바인딩 표면
- Streptavidin 입힌 표면
- 단백질 A 입힌 표면
- 단백질 G 입힌 표면
- Concanavalin A 입힌 표면
- Jacalin 입힌 표면
- 맥아 입힌 표면
- Poly-D 와 L-Lysine 입힌 표면
- Poly-L-Arginine 입힌 표면
- Calmodulin 입힌 표면
- Biotin 입힌 표면
- Aminated (제1차 나 제2차 아민)
- 카르복실화된 표면

위의 표면들 외에도,

- 제품의 성능을 높이기 위해 고객과 협력하여 커스텀이징된 표면이 개발된다.
- 각각의 표면은 품질 보증을 위해 시험된다.

바인딩의

- 안정성
- 획일성
- 재생성

SURFACES SELECTION GUIDE

surface	code	binding capacity	binding interaction	Biomolecule properties	suggested uses
Medium Binding	MB	100-200 ng IgG/cm ²	A polystyrene surface less polar than the HB 8 one and with affinity to molecules of a more hydrophobic nature. The MB surface can better work with lipidic molecules	Large molecules (> 20 kD) with large or abundant hydrophobic regions	Assays where the molecules that have to be coated present large hydrophobic regions or assays that need hydrophobic polipeptides as coated molecule
High Binding	HB8	Up to 400-500 ng IgG/cm ²	A polystyrene surface with high affinity to molecules with mixed hydrophilic/hydrophobic domains such as proteins and antibodies. The surface is optimized for antibodies (IgG)	Improves binding of medium to large molecules (> 10 kD) that are positively charged with or without hydrophobic regions	Assays where the adsorbed molecule must work in excess (up to 400-500 ng/cm ²) - e.g. ELISAs (indirect ELISA test for IgG or ELISA capture test for IgM detection) Very suitable to set up competitive tests (molecule < 50 ng/cm ²) -e.g. steroids/hormones - for the ability to orientate the adsorbed molecule
NO Binding	NB	N.A.	None-Inhibits hydrophobic and ionic interactions	Significantly reduces protein binding	Certain procedures require a surface that is non binding. Many proteins,enzymes in particular may become activated or inactivated upon attachment to a surface. A non-binding surface can be ideal for assays requiring this feature
Streptavidin coated	SA 5/200	12p/mol of biotin The binding will vary depending on the nature of the biotin-bound moieties and the steric hindrance	Non covalent interaction towards biotinylated molecules; streptavidin-biotin interaction is nearly irreversible since the binding affinity (K _a) in solid-phase is around 10 ⁸ -10 ¹⁰	any biotinylated molecules	Streptavidin coated microplate is designed for analysis of biotinylated molecules or for indirect coating with biotinylated ligands. This support binds very effectively any biotinylated molecule, with very rapid kinetic and excellent binding capacity, offering a multipurpose tool for various capture and immunodetection systems
Protein A coated	PA	~ 5 pmol IgG/well	specific for Fc region of IgG	Most immunoglobulins of mammalian species	- Binds strongly to IgG from human, rabbit,guinea pig,pig, dog and cat - Binds strongly to mouse IgG2a,IgG2b and moderately to IgG3 - Binds to Fc region of antibodies for optimal orientation
Protein G coated	PG	~ 5.3 pmol IgG/well	specific for Fc region of IgG	Most immunoglobulins of mammalian species	- Binds strongly to IgG from human, rabbit,mouse ,pig,bovine,dog , goat and horse - Binds only to IgG- no cross-reactivity with other antibody classes - Binds to Fc region of antibodies for optimal orientation
Poly-L or D-lysine coated	Lys-L Lys-D	N.A.	This polymer creates a uniform net positive charge on the plastic surface	Cells and nucleic acids	This surface can enhance cell attachment, growth and differentiation. Moreover this surface can tight bind negatively charged nucleic acids like dsDNA
Poly-L-Arginine	AR		high density of: α -amino/ α -carboxyl/ guanidino groups able to react trough electrostatic and stereospecific bonds		interactions with serino proteases interactions with maturation promoting factors

biomat

surface	code	binding capacity	binding interaction	Biomolecule properties	suggested uses
Calmodulin	Cal		hydrophobic sites		interactions with proteins involved in glycogen metabolism interactions with factors involved in neurotransmission mechanism interactions with enzymes involved in the NAD*/NADP* phosphorylation system
Biotin	Bio		streptavidin/biotin non covalent biological strongest interaction		interactions with avidin interactions with streptavidin
Concanavalin A coated	Con A	N.A	specific for C3-C4-C5 hydroxyl groups	carbohydrates	High affinity for terminal α -D-mannosyl and α -D-glucosyl residues . Used to immobilise glycoproteins or carbohydrates containing these groups
Jacalin coated	Jac	N.A.	high affinity for α -D-galactose residues of the biochemical structure of IgA1 and cell membranes	Human IgA 1	Human IgA1 specific binding, sterically oriented Purification of human immunoglobulins (especially IgA1) Separation of immunocomplexes antigen-antibody Separation of IgA1 from contaminants Stimulation of T-cells
Wheat germ coated	WG	N.A.	specific binding of N-acetyl-D-glucosamine residue	Glicoproteins, enzymes and cell membranes	Studies of surfaces of normal and transformed cells Glycoprotein purification including membrane glycoproteins Studies of cell surface changes during development and the cell cycle
Aminated with primary and secondary amines	AM 1 AM2	N.A	Reactive amino groups allow immobilization of molecules through reductive amination of aldehyde or ketone groups without prior activation of the surface. Alternatively, molecules can be immobilized through amide-bond formation with carbodiimide-activated carboxyl groups. Bifunctional crosslinkers may be used to introduce other functional groups.	Proteins, peptides, carbohydrates, enzymes	Immobilisation of molecules which are bound weakly or not at all by physical adsorption, namely small peptides (M.W. 1000-5000) drugs, toxins or hormones. Oriented immobilisation of molecules in order to secure the integrity and accessibility of their specific sites avoiding the risk of inhibition of these sites by casual physical adsorption for such molecules as Fab-SH-antibody fragments, or nucleic acids (single or double strand)
Carboxylated	COOH	N.A	Carboxyl groups can be performed with a carbodiimide followed by coupling of an amino containing molecule, resulting in a stable amide bond between the surface and the molecule. Alternatively bifunctional crosslinkers may be used to introduce other functional groups.	Molecules containing amino groups	The amino group presents in any molecules, such as peptides or proteins, binds to COOH surface through formation of amide bonds between the amino group presents in the molecule and the surface carboxylic group by the action of carbodiimide .

면역 감시 분석을 위한 높은 바인딩 표면

HB 8

여러 다른 등급의 친수성의 단백질의 수동적 흡착에 적절한 친수성 표면

특징

흡착된 분자의 분석이 관찰되어야 하는 보완 분자들을 초과(400ng/cm2까지)한다. 더욱이 이 표면은 매우 선택적이고, 아주 적은 양(<50 ng/cm2)이 존재할 때에도 실험의 최고의 정확한 결과를 얻을 수 있게 하는, 분자의 흡착에 매우 높은 친화력을 보여준다.

적용

단백질- IgM 포획 분석에 쓰이는 고체의 상에 흡수되는 항체 Anti-IgM
리포 단백질 - IgG 분석에 쓰이는 고체의 상에 흡수되는 Rubella antigen ELISA (길항적) 스테로이드 호르몬과 TSH 실험

성능

경쟁적인 방법을 시뮬레이트하는 실험이 이 표면의 성능을 보여준다.

원리

well표면에 입혀진 제한적 양의 biotinylated albumin을 변함없는 양의 streptavidin peroxidase 와 표준 용액으로 사용된 다양한 양의 분류되지 않은 streptavidin에 반응하게 했다. 자유롭게 된 반응물들은 TMB와 배양시킨 후 씻겨져 나갔고, 황산을 첨가한 후 멈추어졌다. 색깔 농도는 450 nm이었다.

결과의 계산

Well안에서의 효소의 활동은 표준 용액 안에 있는 분류되지 않은 streptavidin의 농도와 반비례한다.

	HB 8	B standard/B Max x 100	Competitor	B standard/B Max x 100
B Max	1327	100	1287	100
B 5 ng/ml	1093	82.4	1129	87.7
B 10 ng/ml	921	69.4	898	69.8
B 25 ng/ml	644	48.5	627	48.7
B 50 ng/ml	424	31.9	421	32.7
B 100 ng/ml	267	20.1	264	20.5
B 200 ng/ml	131	9.9	170	13.2

바인딩 반응 최고치(B Max)는 0ng의 분류되지 않은 streptavidin내의 streptavidin-peroxidase로부터 계산된 흡광도로 표현된다.

표준 용액 안에 있는 streptavidin은 표준용액 (B 표준 농축액)의 상대 흡광도와 0ng의 분류되지 않은 streptavidin안에 있는 streptavidin-peroxidise로부터 계산된 흡광도의 백분율로 표현된다.

면역 감시 분석을 위한 높은 바인딩 표면

다양한 종류의 폴리스티렌 스트립의 비교

다른 종류의 폴리스티렌 스트립의 표면의 성능을 확인하기 위해, 우리는 바이오맷의 높은 바인딩 (HB 8) 스트립 표면과 현재 판매되는 가장 높은 바인딩 유형의 스트립을 비교하였다. 광범위한 연구를 하였다.

결과의 확실성을 보장하기 위해, 우리가 알기에 가장 표준 방법에 가까운 방법인, 분석 장치를 구축하기 위한 고체 상으로 쓰일 폴리스티렌 스트립을 준비할 때 제조업자들이 사용하는 방법을 사용하였다.

(예 torch ELISA kits).

Rubella, Cytomegalovirus와 Toxoplasma, 확인하기 위해 IgM과 IgG 양쪽의 분자 종류가 사용되었다.

재료와 방법

I 플레이트의 준비

Rubella, Cytomegalovirus, 토끼 IgG부터 인간 IgM (DAKO A426)까지를 위한 항원은 탄화중탄산염 버퍼 0,1 M pH 9,6에서 약화되었고, 샘플과 스트립 모두 동시에 코팅되었다. 코팅은 4° C에서 이루어졌다.

세척 단계 후, 플레이트는 1% Bovine Serum Albumin을 포함한 PBS 0,1 M pH 7,2로 포화되고, 밤새도록 4° C에서 배양되었다.

추가 세척 단계 후, 플레이트는 37° C에서 두 시간 동안 건조되었고, 그 후에 진공상태에서 봉인되고, 사용되기 전까지 4° C에 보관된다.

이 실험에 사용된 모든 세럼은 병원 연구실에서 사용되는 것이고, Behring; Biomerieux-Vidas; Sorin Biomedica 등에서 제조한 상업적 제품을 사용함에 긍정적 또는 부정적일 것임이 증명되었다..

II IgG 분석

IgG 분석을 실행하는 방법은 아래와 같다.

1. 100ul의 약화된 샘플과 칼리브레이터는 각각의 종류의 항원을 입힌 Well에서 일반 실내온도에 30분간 배양됨.
2. 0,1M PBS pH 7,2 + 0,05% Tween 20의 세척 단계가 실행됨.
3. 100ul/well의 정제된 goat-anti Human Fc IgG Peroxidase가 첨가되었고, 일반 실내온도에서 30분간 배양되었다.
4. point 2.에서의 추가 세척 단계가 실행됨.
5. 100ul/well 기질(基質) (TMB)이 추가되고, 실내온도에서 15분간 배양됨.
6. 100ul의 황산을 첨가함으로써 반응은 중지됨.
7. 측정결과는 450 nm에서 읽음.

III IgM 포획 분석

IgM 분석을 실행하는 방법은 아래와 같다.

1. 100ul의 약화된 샘플과 칼리브레이터는 일반 anti-IgM을 입힌 Well에서 실내온도에 1시간 동안 배양되었다.
2. 0,1M PBS pH 7,2 + 0,05% Tween 20의 세척 단계가 실행됨.
3. 100ul/well의 적절한 비오틴화된 정제된 항원의 복합체와 streptavidin-peroxidase가 첨가되어 실내온도에서 1시간 동안 배양되었다.
4. point 2.에서의 추가 세척 단계가 실행됨.
5. 100ul/well 기질(基質) (TMB)이 추가되고, 실내온도에서 30분간 배양됨.
6. 100 ul의 황산을 첨가함으로써 반응은 중지됨.
7. 측정결과는 450 nm에서 읽음.

ANALYSIS OF DATA

The data obtained from the two types of samples of microplates were processed in the following way:

NEGATIVE SAMPLES	POSITIVE SAMPLES
a. min. O.D. observed for each type of strip	a. coefficient of correlation
b. Max. O.D. observed for each type of strip	b. linear regression calculated as $y = a + bx \quad (1)$
c. mean of Standard Deviations	with a confidence level of 95% X values were those obtained with competitor's samples Y values were those obtained with <i>biomat's</i> HB8 samples

결과는 다음의 표에 나타난다.

biomat

TABLE A IgG 분석

IgG assay to Cytomegalovirus				IgG assay to Rubella			
TOTAL SERA TESTED	51			TOTAL SERA TESTED	81		
NEGATIVE SERA	32			NEGATIVE SERA	46		
POSITIVE SERA	19			POSITIVE SERA	35		
	calibrators	O.D. comp.	O.D. biomat		calibrators	O.D. comp.	O.D. biomat
	A.U. /ml				I.U. /ml		
	120	2,393	2,272		250	3,367	2,971
	50	1,375	1,463		75	1,833	1,624
	20	0,748	0,891		25	0,718	0,609
	10	0,322	0,38		8	0,251	0,246
	0	0,015	0,012		0	0,015	0,016
A.U.=Arbitrary Unit				I.U.=International Unit			
O.D. of negative sera	comp.	biomat		O.D. of negative sera	comp.	biomat	
minumum	0,031	0,043		minumum	0,035	0,027	
Maximum	0,183	0,173		Maximum	0,192	0,119	
mean of Standard Deviation	0,111+-0,035	0,109+-0,030		mean of Standard Deviation	0,076 +- 0,032	0,061 +- 0,023	
results of positive sera				results of positive sera			
R=	0,994			R=	0,961		
y=	2,644+0,996x			y=	4,567 + 0,948 x		

TABLE B IgM assays

IgM assay to Cytomegalovirus				IgM assay to Toxoplasma Gondii			
TOTAL SERA TESTED	32			TOTAL SERA TESTED	58		
NEGATIVE SERA	23			NEGATIVE SERA	27		
POSITIVE SERA	9			POSITIVE SERA	31		
	calibrators	O.D. comp.	O.D. biomat		calibrators	O.D. comp.	O.D. biomat
HIGH POSITIVE	2,092			HIGH POSITIVE	2,673		
LOW POSITIVE	0,65			LOW POSITIVE	0,931		
NEGATIVE	0,146			NEGATIVE	0,225		
O.D. of negative sera	comp.	biomat		O.D. of negative sera	comp.	biomat	
minumum	0,153	0,142		minumum	0,228	0,174	
Maximum	0,431	0,36		Maximum	0,847	0,594	
mean of Standard Deviation	0,189+-0,06	0,181+-0,04		mean of Standard Deviation	0,484+-0,186	0,38+-0,131	
results of positive sera				results of positive sera			
R=	0,975			R=	0,978		
y=	0,24+0,84 x			y=	0,047+0,88 x		

위의 결과는 병원 연구소에서 얻어진 임상 자료와의 일치하여 입증되었다

결과의 토론

표 A와 B에 나타난 분석 자료는:

- 바이오맷의 HB8과 경쟁자의 스트립의 단백질의 바인딩 능력이 비슷함
- 코팅된 단백질과 드러나는 단백질 사이의 특정한 바인딩을 입증하기 위한 두 종류의 샘플의 능력: 모든 실험된 세럼에 대해 두 종류의 샘플의 민감성과 특이성을 말해주는 우리 실험 결과의 100% (세럼에 232번, 94번 긍정적 결과, 128 부정적 결과)가 증명되었다.

- 수용 가능한 결과 값이

$$R \geq 0.95 \text{인}$$

회귀분석 결과가 온전히 존중되었다.

- 등식(1)에서 얻어진 정도와 값의 범위:

a 0과 많이 달라서는 안된다.

그리고

b 값의 범위는 $0,8 \leq b \leq 1,2$ 이다.

결과의 엄밀한 일치를 증명한다.

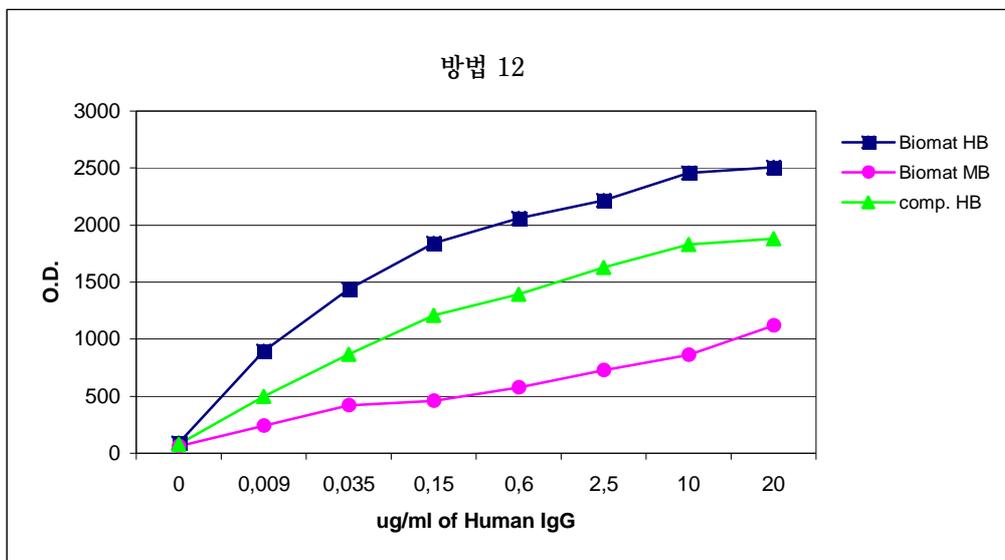
면역 감시 분석을 위한 높은 바인딩 능력 표현

중간 바인딩(MB)과 높은 바인딩(HB)과 상업적 비교(Comp HB) 스트립을 비교한 2개의 다른 분석 방법을 통해 높은 바인딩(HB)의 바인딩 능력의 증가를 확인했다..

방법 12

방법 12는 토끼 AHlgG(제1차 항체) - HIgG(제2차 항체) - AHlgG/POD 결합의 샌드위치 방법이다.

1. 0.15 ug/ml 토끼 Anti-HlgG 100 ul/well을 pH 9.6의 0.1M탄산염 버퍼에 투여하고, 37° C에서 3시간 배양한 후, 4° C에서 밤새 배양한다.
2. 0.1M PBS pH 7.2 + 0.05%Tween® 20으로 2번 세척한다.
3. 0.1M PBS pH 7.2에서 BSA 1% 150 ul/well을 투여하고, 남아있는 활성 부위를 저해하기 위해 37° C에서 30초간 배양한다.
4. 0.1M PBS pH 7.2+ 0.05% Tween® 20으로 3번 세척한다.
5. HIgG (20~0.009 ug/ml 농축액) 100 ul/well를 투여하고 37° C에서 45초간 배양한다.
6. 0.1M PBS pH 7.2 + 0.05% Tween® 20으로 3번 세척한다.
7. 염소 Anti-HlgG-POD 결합 100 ul/well를 투여하고 37° C에서 45초간 배양한다.
희석 요인 1/10,000
8. 0.1M PBS pH 7.2 + 0.05% Tween® 20으로 3번 세척한다.
9. TMB 100 ul/well를 투여한다.
10. 30초 후, H2SO4 1 N으로 반응을 멈춘다.
11. 450 nm에서 결과를 읽는다.



biomat

방법 14

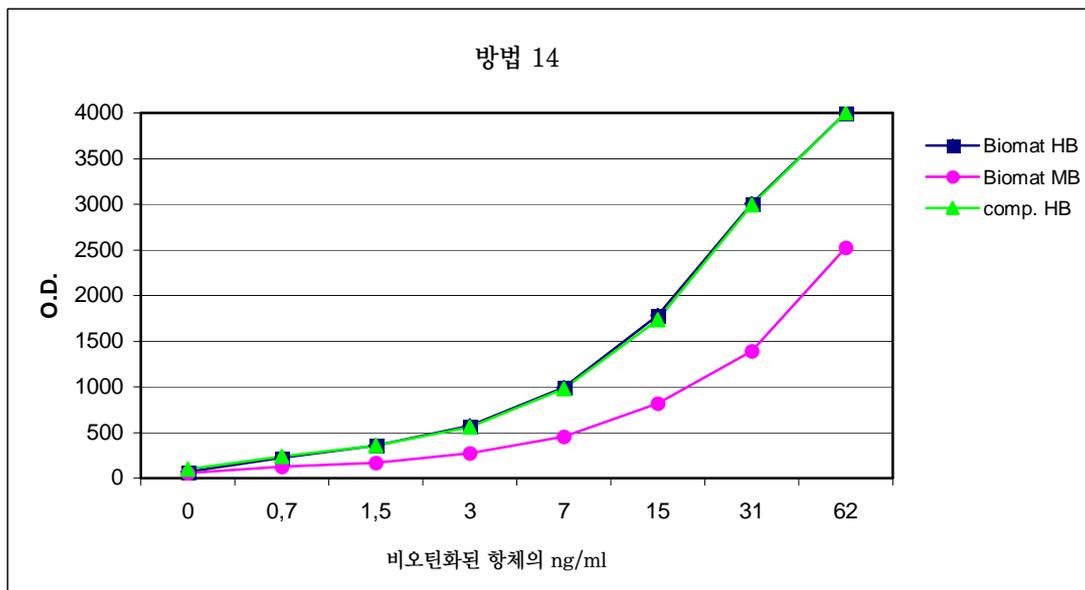
방법 14은 제2차 항체의 표면에 묶여있는 비오티ن 분자에 대한 Streptavidin의 민감성을 활용하는 것이다. 방법 14는 현재 품질 관리 실험에 쓰인다.

코팅

1. 5 ug/ml의 토끼 Anti-HIgM 100ul/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 ul/well를 0.1M PBS pH 7.2에 투여하고4° C에 밤새 배양한다.
4. 용액을 따라내고, 플레이트를 사용할 때까지 4° C에 보관한다.

실험

5. 비오티ن화된 염소 항토끼 IgG (concentration from 62 to 0.7 ng/ml) 100 ul/well를 투여하고 실내온도에 1시간 동안 배양한다.
6. PBS pH 7.2 + 0.05% Tween® 20으로 4번 세척한다.
7. 160ng/ml of Streptavidin-POD 100 ul/well를 투여하고 실내온도에 1시간동안 배양한다.
8. PBS pH 7.2 + 0.05% Tween® 20으로 4번 세척한다.
9. TMB 100 ul/well를 투여한다.
- 10 30초 후에 H2SO4 1 N를 추가하여 반응을 멈춘다.
11. 450 nm에서 결과를 측정한다.



CERTIFICATO DI ANALISI - 테스트 인증서

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

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 µg/ml di Rabbit IgG in 0.1M Tampone Carbonato pH 9.6.
Coniugato : Goat Anti-IgG-HRP

Method of analysis

Coating solution: 2.5 µg/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:

최종 관리

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

Test

esame visivo
aspetto generale
imballaggio

Risultato

approvato
approvato
approvato

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 100µl/well of Rabbit Anti-HIgM (concentration of 25 µg/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 µl/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® 20
5. dispense 100 µl/well of Biotinylated Goat Anti- Rabbit IgG (concentration from 0.062 to 0.0007 µg/ml) and incubate 1 hr at room temperature
6. wash 4 times with 0.1M PBS pH 7.2 + 0.05% Tween® 20
7. dispense 100 µl/well of Streptavidin-POD (concentration 0.16 µg/ml) and incubate 1 hr at room temperature
8. wash 4 times with 0.1M PBS pH 7.2 + 0.05% Tween® 20
9. dispense 100 µl/well of TMB
10. after 30' stop the reaction with H₂SO₄ 1 N (100 µl/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 100µl/well of a mixture of 20 ng/ml Biotinylated Albumin diluted in 3 µg/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☒ 20
3. dispense 100 µl/well of 0.1 µg/ml Streptavidin-POD and incubate 30' at room temperature
4. wash 4 times with 0.1M PBS pH 7.2 + 0.05% Tween☒ 20
5. dispense 100 µl/well of TMB
6. after 10' stop the reaction with H₂SO₄ 1 N (100 µl/well)
7. reading is made at 450 nm

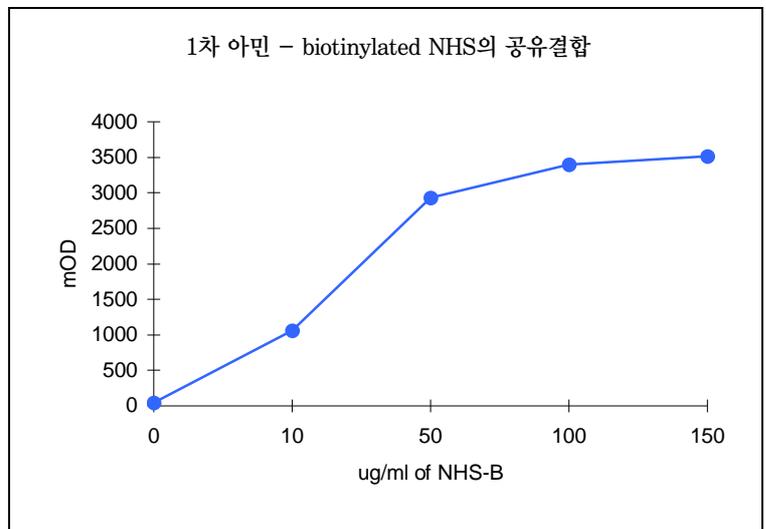
results

	NO binding	Medium binding
O.D. values	76	392

아민화된 표면

제1차 또는 제2차 아미노 그룹 공유결합이 이루어진 표면은 잘알려진 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 억제 위험을 피하게 한다.
- 물리적 흡착의 안정성과 비교했을 때, 자연 발생적인 흡수의 위험이 감소되었기 때문에 보관 안정성이 증가하다



플레이트들은 실험되고 증명된다.

- 획일성
- 재생성
- 아미노 그룹 활동

아민화된 표면

준비의 소개와 면역 감시 분석에의 아민화된 표면 이용.

사용 방법

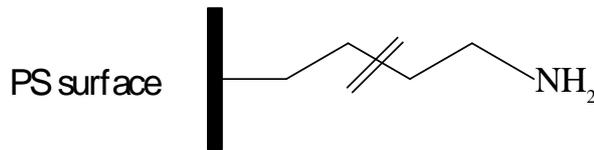
생물학적 분자들을 아미노 그룹과 묶기 위해 다양한 방법이 주기적으로 사용되었다. 사용을 위한 특정한 방법은 의도된 적용에 대한 지식을 요구한다. 일반적인 가이드라인으로, 표면상의 아미노 그룹과 합쳐질 분자의 기능적인 그룹의 상호작용은 homo와 heterofunctional 가교제에 의해 매개된 공유결합에 기초한다.

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.

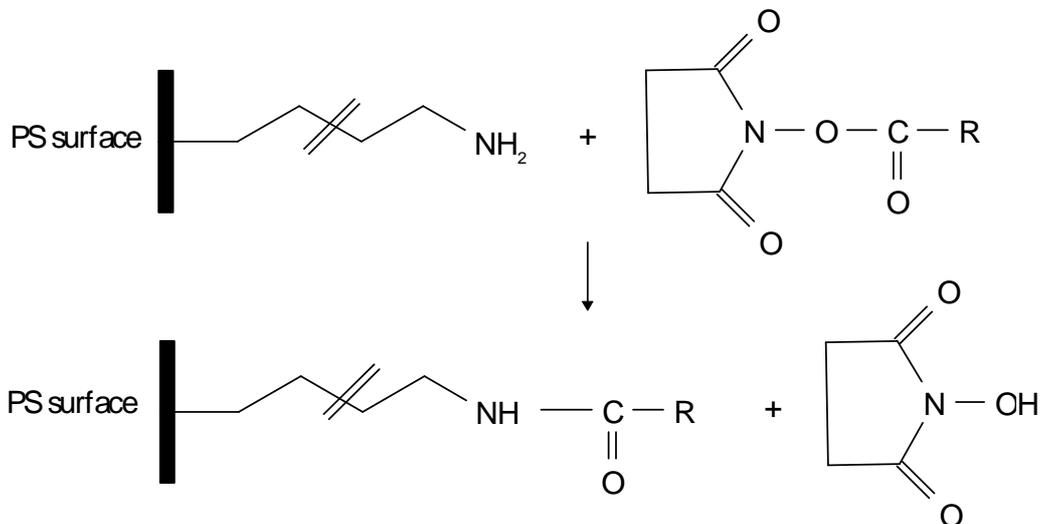
이런 목적을 위한 다른 가교제는 Dimethylpimelidate와 Dissuccinimidyl suberate이다. Fab-SH와 같이 티올 그룹을 포함한 생체분자나 끝부분에 cystein이 있는 펩티드는 아미노 그룹과 반응하기 위해 Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)같은 가교제를 포함한 많은 수의 maleimido 그룹을 활용할 수 있다.

바이오매트 NH₂ 표면의 화학적 물리적 분자배열도



반응법의 예:

NHS의 분리를 통해 바이오매트 NH₂와 공유결합된 임의적 NHS에스테르화 화합물(R)

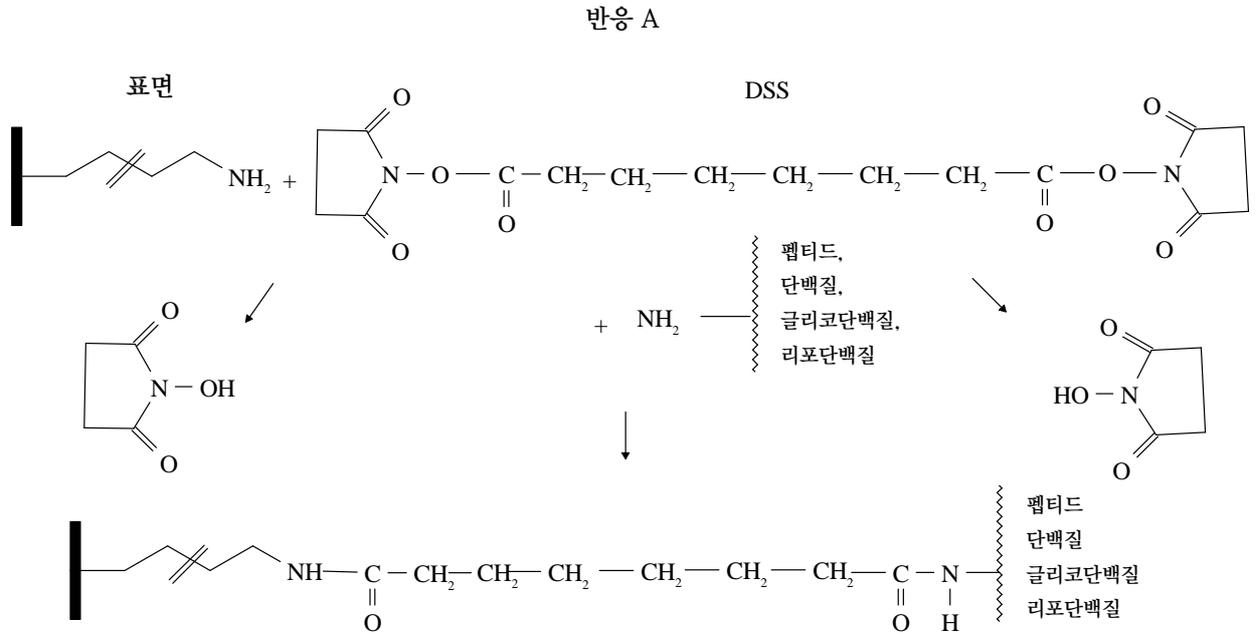


biomat

아래는 바이오매트 NH₂표면과 반응 그룹과의 공유결합 코팅에 사용될 가교제의 예이다.

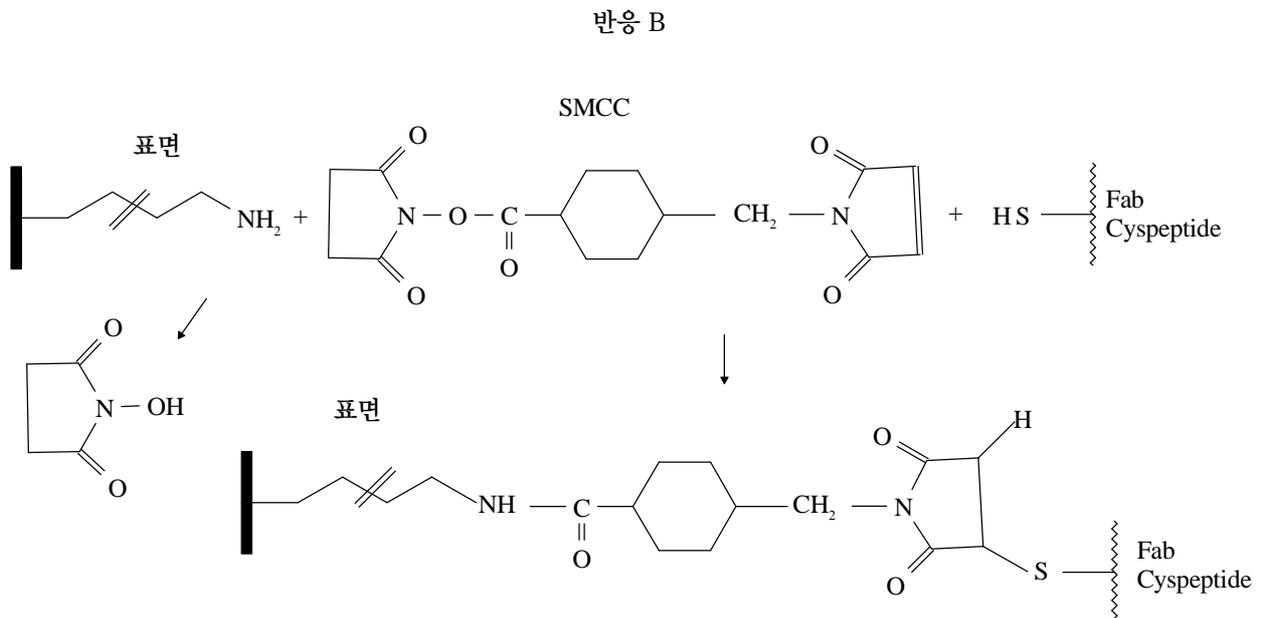
A. Disuccinimidyl suberate (DSS),

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



B. Sulfosuccinimidyl maleimidomethyl cyclohexane carboxylate (SMCC),

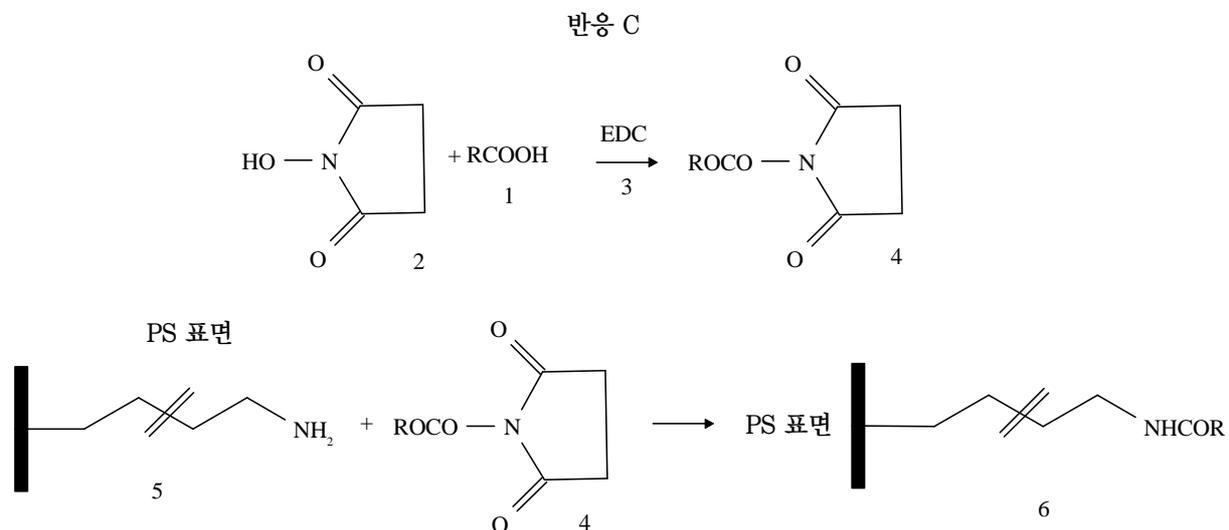
이 이형-두기능 링커는 SH-를 포함한 화합물과 다른 화합물을 연결할 수 있다. 이것은 특별히, Fab-SH 항원 조각이나 영구적으로 시스테인화된 항원 펩티드의 공유결합 고정에 쓰이고, 그 때문에 이 화합물의 활성화된 끝부분을 액체 상태에 노출시킨다.



biomat

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 매개로해서 작은 펩티드들(M.W. around 1000)을 NH활성화된 스트립 표면에 합칠 수 있다



1. peptide
2. Sulfo NHS (or NHS)
3. EDC
4. intermediate active compound resulting from the reaction
5. *biomat* NH₂ surface
6. peptide covalently immobilised on *biomat* NH₂ 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

바이오맷은biomat NH/ NH₂와 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.

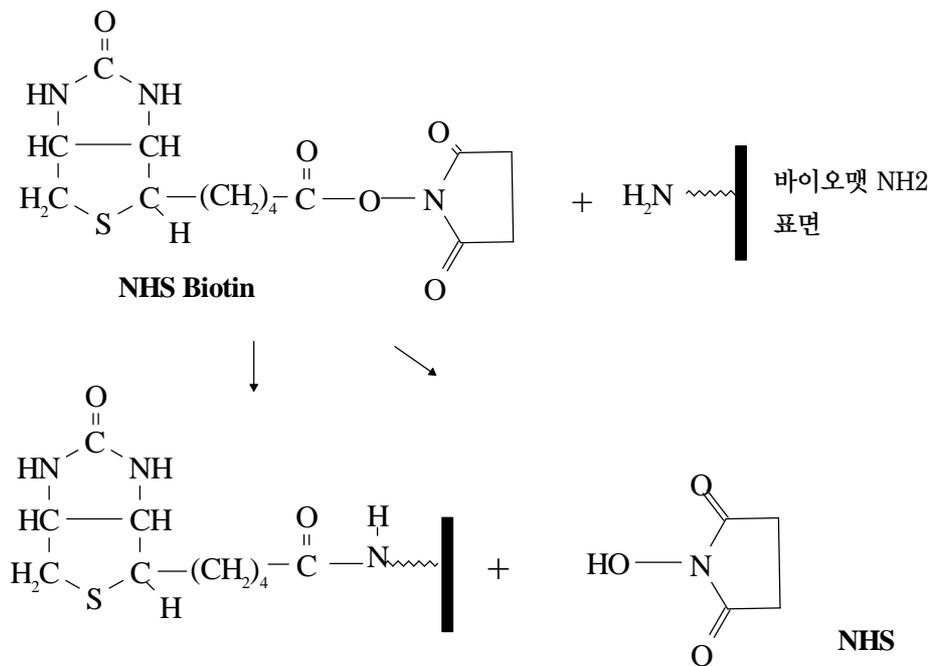
- 물리적 흡착에 의해 전혀 결합하지 않거나, 약하게 결합하는 작은 분자의 공유결합고정.
- 고체상태에서 명확한 방법으로 분자의 고정을 지향.

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

1. NHS-활성화 화합물의 결합

바이오맷 NH/NH₂ 표면의 가장 단순하고 쉬운 적용은 N-hydroxysuccinimide 유도체 (NHS)에 의한 에스테르화에 의해 활성화된 분자 결합이다. 우리의 실험에서는 비오틴의 n-Hydroxysuccinimide 활성화 에스테르가 즉각 그 탄소그룹을 매개로 해서 그림1에 보여지는 것처럼 표면에 있는 아미노 그룹과 결합한다.

그림1



biomat

시약과 완충제 준비

재료

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

NHS Biotin stock solution 500 μ l
PBS 0,1M pH 7,2-0,15% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 ..to 10ml

NHS-Biotin solution 100 μ g/ml

NHS Biotin stock solution 333 μ l
PBS 0,1M pH 7,2-0,15% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 ..to 10ml

NHS-Biotin solution 50 μ g/ml

NHS Biotin stock solution 167 μ l
PBS 0,1M pH 7,2-0,15% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 ..to 10ml

NHS-Biotin solution 10 μ g/ml

NHS Biotin stock solution 33 μ l
PBS 0,1M pH 7,2-0,15% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 ..to 10ml

Streptavidin-mix

Streptavidin 50 μ g
Streptavidin-peroxidase 1 μ g
PBS-BSA 1% 10ml

실험

- 100 μ l NHS-비오틴 용액 150-100-50-10 μ g/ml와 0 μ g/ml 0,1M PBS-Tween $\text{\textcircled{R}}$ 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 $\text{\textcircled{R}}$ 20 0,05%, pH 7,2으로 4번 세척한다.
- streptavidin 믹스 100 μ l을 각 well에 첨가하고, 실내온도에 30분 동안 배양한다.
- well을 비우고 0,1M PBS-Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 0,05%, pH 7,2으로 4번 세척한다.
- TMB substrate 용액을 100 μ l /well 첨가하고 실내온도로 10분간 배양한다.

biomat

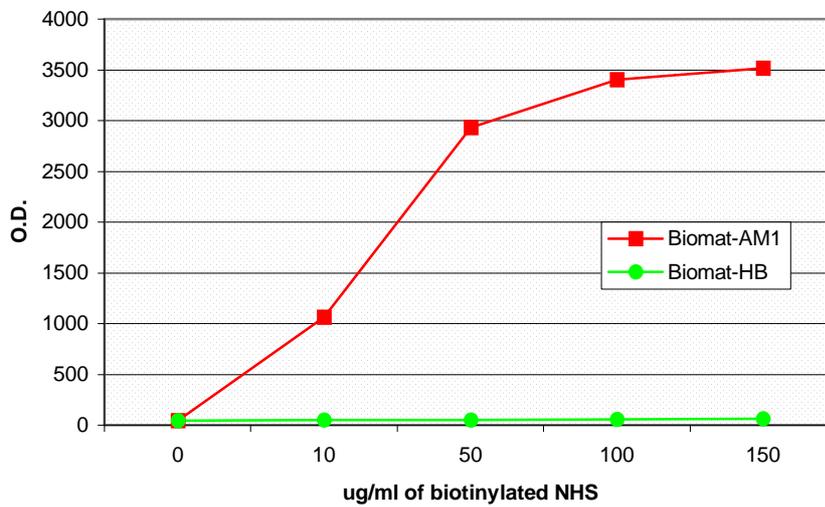
7. 황산 1 N을 100ul 추가함으로써, 기질반응을 멈추고, 시각적 농도 값을 450nm에서 측정한다.

결과

이 결과는(그림. 2를 보라.) well에 첨가된 NHS-비오틴 농도와 바이오맷의 NH₂ 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 NH₂ 표면에 보여진 아미노 그룹에 공유결합을 했다고 결론내렸다.

그림.2



biomat

2. 카르복실 그룹에 있는 합텐이나 펩티드를 바이오맷 NH/NH2 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/NH2 표면과 결합한다.

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

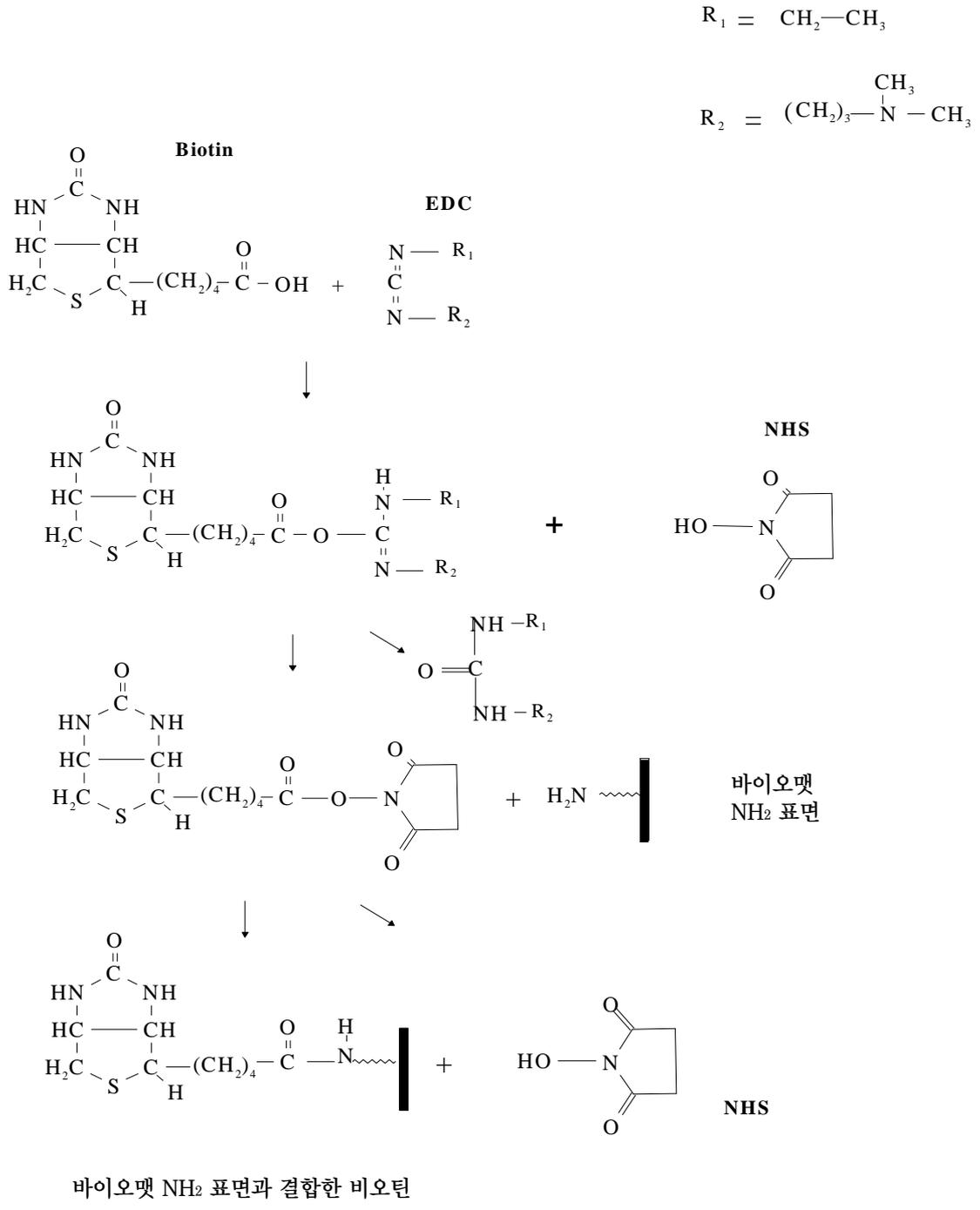


그림3

biomat

시약과 완충제의 준비

재 료

Solid phase:	Biomat plates	MT02F-AM1 (primary amino groups) MT01F-HB (high binding capacity)
d-Biotin	Sigma	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® 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	500µl
Sulfo-NHS	3,45 mg.
Distilled water - 0,30% Tween® 20	to 10 ml

EDC solution

EDC	5,8 mg
Distilled water	to 10 ml

Streptavidin-mix

Streptavidin	50µg
Streptavidin-peroxidase	1µg
PBS-BSA 1%	10ml

실 험

1. 칼럼(표의 세로 란) 2에 있는 well 이외에도, 각 well에 증류수 50 ul을 추가한다.
그런 후, 칼럼 2에 있는 모든 well 에 비오틴-NHS 용액 100ul를 추가한다.
2. 칼럼 2에 있는 well에서 50 ul를 칼럼 3으로 옮겨 희석하고, 칼럼 3의 50ul을 칼럼 4로 옮기고,
이렇게 섞고, 옮기는 방법으로 칼럼 12까지 진행한다.
3. 반응을 시작시키기 위해: 각 칼럼에 50 ul의 EDC 용액을 첨가한다. 공란인 실험(칼럼 1)에는 EDC대신
증류수를 50ul 첨가한다.
4. 실내온도로 2시간 동안 배양한다.
5. Well을 비우고, 0,1M PBS-0,05%Tween® 20 pH 7,2로 4번 세척한다.
6. 각각의 well에 streptavidin믹스를 100ul 추가하고, 실내온도에서 30분간 배양한다.

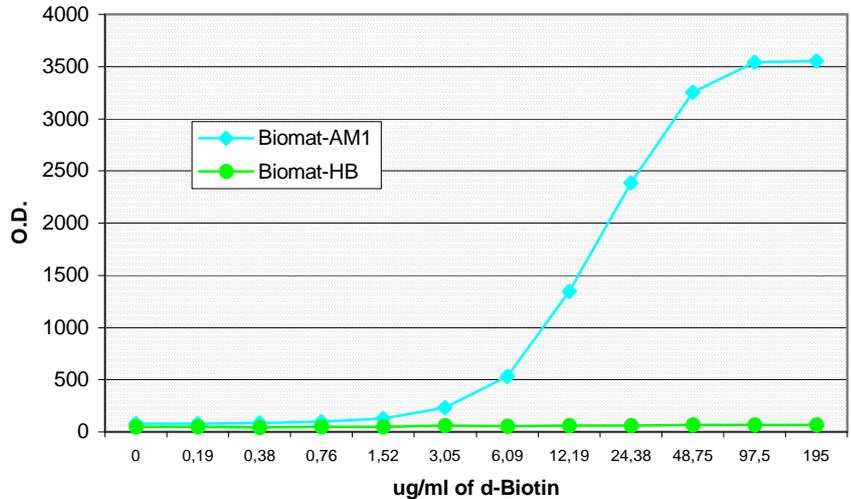
biomat

7. well을 비우고, 0,1M PBS-0.05%Tween® 20 pH 7,2로 4번 세척한다.
8. TMB 기질 용액 100ul을 각 well에 추가하고, 실내온도에서 10분간 배양한다.
9. 황산 1 N 100ul를 첨가하여 기질 반응을 멈춘다. 시각적 밀도 값은 450nm에서 측정한다.

결 과

이 실험의 결과는 (그림 4.) 바이오맷 HB에서는 인식되지 않는 반면, 바이오맷 NH2 (cod. AM1)는 감지될 수 있는 방법으로 분자(비오틴)가 결합함을 명백하게 보여준다. 이 결과는 비오틴 내의 카르복실 그룹과 바이오맷 NH2에 결합된 1차 아미노 그룹 사이에서 공유 결합이 일어났음을 보여준다. 결과(나타나지 않은 자료)는 carbodiimide를 추가 하지 않고는 비오틴의 공유결합이 일어나지 않음을 지적한다.

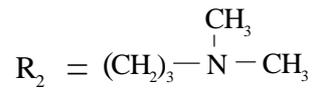
그림4



3. 아미노 그룹이 있는 분자의 바이오맷 COOH 표면과의 결합

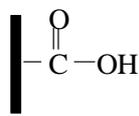
펩티드나 단백질 같은 분자 안에 있는 아미노 그룹이, carbodiimide의 활동에 의해 분자에 있는 아미노 그룹과 표면 카르복실 그룹 사이의 아미드 결합의 형성을 통해 바이오맷 COOH와 결합한다.

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

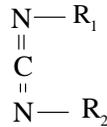


바이오맷COOH 표면

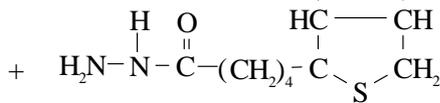
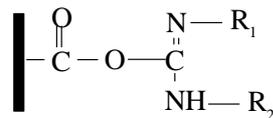
EDC



+

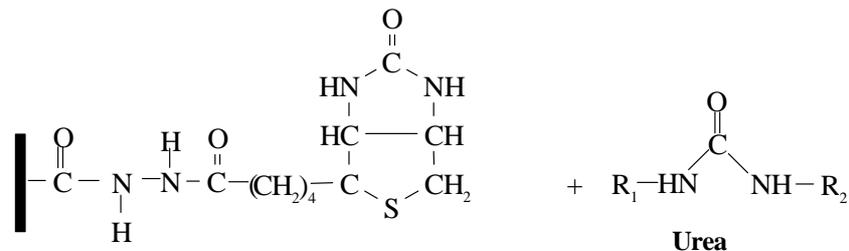


↓



비오틴-하이드라지드

↓



Urea

바이오맷 COOH 표면에 결합한 비오틴-하이드라지드

biomat

시약과 완충제의 준비

재료

Solid phase:	Biomat plates	MT04F-COOH MT01F-HB (high binding capacity)
Biotin-Hydrazide	Sigma	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 \square 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 μ g/ml

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

Biotin-hydrazide solution 50 μ g/ml

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

Biotin-hydrazide solution 10 μ g/ml

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

Biotin-hydrazide solution 1,0 μ g/ml

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

Biotin-hydrazide solution 0,5 μ g/ml

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

Biotin-hydrazide solution 0,25 μ g/ml

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

Biotin-hydrazide solution 0,1 μ g/ml

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

Streptavidin-mix

Streptavidin 50 μ g
Streptavidin-peroxidase 0,5 μ g
PBS-BSA 1% 10 ml

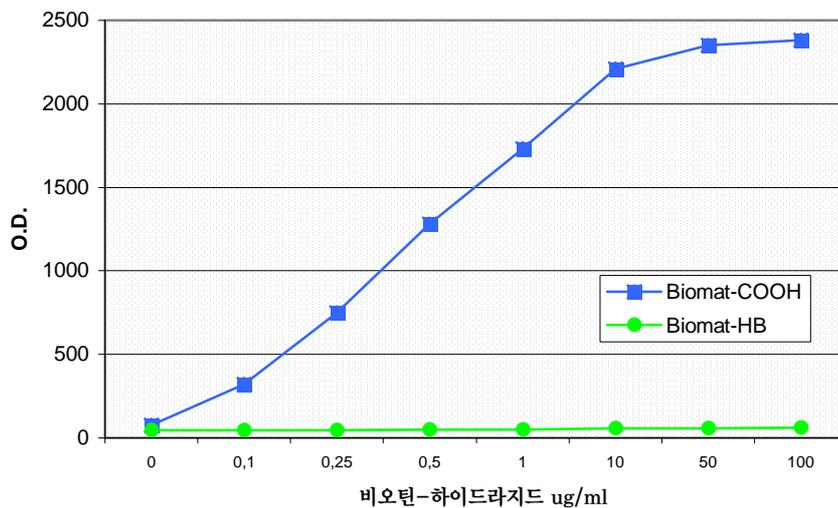
실험

1. 100 ul의 비오틴-하이드라지드 용액 100-50-10-1-0,5-0,25-0,1 ug/ml와 100 ul 0,1 MES pH 6,0를 0 ug/ml로 well에 추가하고, (카르복실화 되고, HB는 활성화되지 않았다.) 증발을 막기위해 접착 테이프로 well을 밀봉한다.
3. well을 비우고 0.1 M PBS-0.05%Tween® 20 pH 7,2로 4번 세척한다.
4. streptavidin- mix 100 ul를 각 well에 추가하고, 실내온도에서 30분간 배양한다.
5. well을 비우고 0.1 M PBS-0.05%Tween® 20 pH 7,2로 4번 세척한다.
6. TMB 기질 용액 100 ul을 각 well에 추가하고, 실내온도에서 10분간 배양한다.
7. 황산 1 N 100 ul을 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.

그림5



1. 2차 아민 상의 DNA 결합

인산화와 캡처 프로브의 표시

carbodiimide중재 결합에 사용되는 DNA는 T4 폴리뉴클레오티드 키나아제로 5' 엔드에서 인산화되었고, 약수는 Sephacryl 200 spin column(1 ml) (Pharmacia, Uppsala, Sweden)의 색층분석에 의해 [γ -32P]-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. (Zamatteo 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 얻기 위해 추가되었다. 변성된 DNA 용액은 얼음 위에 놓인 microwell에(75 ul/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. (25ul/well, 50°C에서 5시간 동안 배양되었다.)

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

50°C) 200ul/well로, 세척 버퍼로 5분간 배양되고, 마지막으로 다시 3번 세척된다. Microwell은 4°C에서 건조되어 보관된다. 결합 후, well은 절단되고, well에 결합된 32P-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 압과 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 10⁻² mM 용액안에서 1시간 동안 실내온도에서 배양된다. 인산염 버퍼로 3번 세척하고, 물로 3번의 세척 후, 펩티드(6.5 uM) 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 125I 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.
 Zamatteo N., Giradeaux C., Delforge D., Pireaux J.-J., Remacle J. (1996) *Anal. Biochem.* **236**, 85-94.

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.

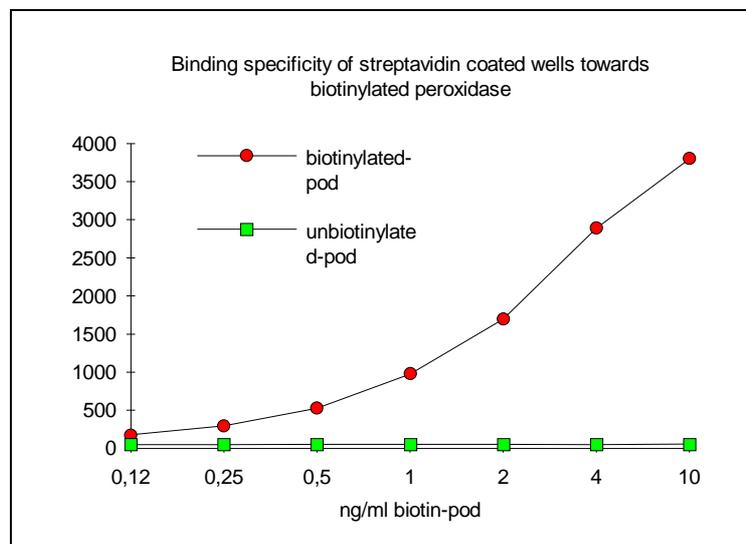
Streptavidin-biotin 결합의 주요 특성

- 안정성
- 특이성
- 친화성

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

플레이트는 실험되고 보증된다.

- 획일성
- 결합 특이성
- 안정성



STREPTAVIDIN을 입힌 표면

TREPTAVIDIN를 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

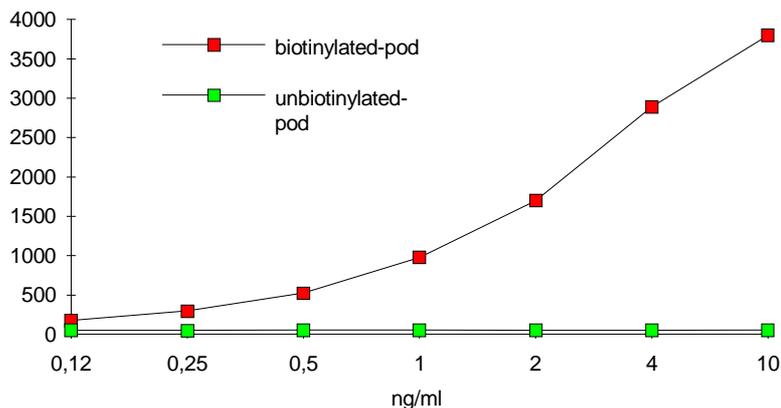
Streptavidin을 입힌 well은(그리고 BSA 포화 컨트롤 well은) 측정된 비오틴 용액에서 배양되었다. 결과적으로, 이 용액의 약수가, 비오틴 표준과 공존하는, 비오틴화된 페록시다아제와 섞여 새로운 비어있는 streptavidin을 입힌 well에 옮겨졌다. 샘플에 포함된 비오틴 구성요소는 고체에 결합 되어있는 효소의 양으로부터 계산된다. 이 결과값은 원래부터 첨가된 비오틴의 양과 비교된다; 그 차이로부터 비오틴에 대한 well의 결합력이 계산된다.

results	12 pmol/ well (200 µl volume)
----------------	--------------------------------------

2. 비오틴에 대한 특이성

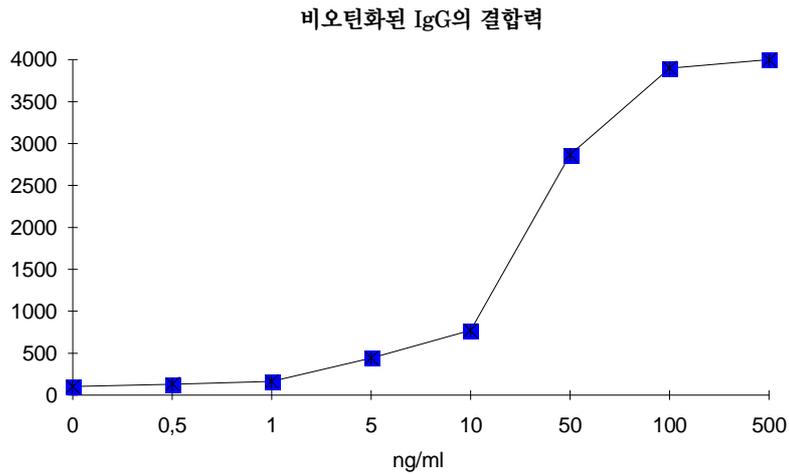
Streptavidin을 입힌 well은 비오틴화된 페록시다아제 용액(from 10 to 0.12 ng/ml)과 비오틴화되지 않은 페록시다아제를 30' RT에서 배양한 것이다. 세척단계 후, well은 TMB에 의해 배양되고 황산 1N로 활성을 멈춘다. OD값은 450nm에서 측정된다.

비오틴화 된 페록시다아제에 대한 streptavidin입힌 well의 결합특이성



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
--------------------	-------------------

biomat

5. 안전성 시험:

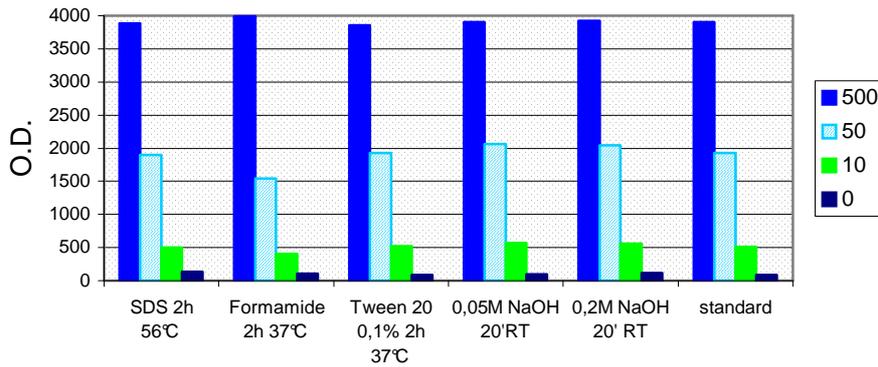
5.1. 강한 화학 접촉 하의 내구성

강한 화학 접촉 하의 내구성은 다음 방법 1 (500에서 0ng/ml의 Biotinylated IgG) 을 사용하여 시험하였다. 첫 행균 단계는 다음의 배양으로 대체되었다.

chemical compound	conditions
SDS 0.1% 0.6M NaCl	56°C 2h
30% Formamide in 0.6M NaCl	37°C 2h
0.1% Tween 20 in 0.1M PBS	37°C 2h
0.05M NaOH	RT 20'
0.2M NaOH	RT 20'
standard -0.1% Tween 20 in 0.1M PBS	4 x
Urea 8M	60'-30'-15'-5'

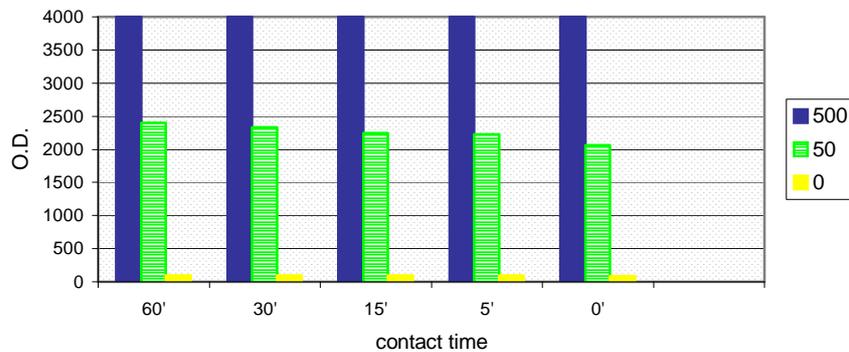
Results

stability test: binding capacity towards Biotinylated IgG



Urea 8M

stability test: binding capacity towards Biotinylated IgG



biomat

5.2. 37° C 에서의 저장 수명

Streptavidin 으로 코팅된 well은 7도에서 15일간 유지, 일반 저장은 4도에서 유지, 이들은 방법 1로 비교 분석되었다 (biotinylated IgG = 100ng/ml)

결과

temperature	4 ° C	37° C
OD	2568	2667
CV%	3.3	3.6

5.3. 장기 저장

Streptavidin 코팅된 well은 냉방이 되지 않는 창고에서 30개월간 유지 (온도는 10도~40도 사이), 이는 4도 (표준 조건)에서 저장된 샘플과 방법2로 비교 분석되었다.

결과는 코팅의 뛰어난 안정성을 보여준다.

결과

temperature	4 ° C	RT
OD	1890	1950
CV%	1.8	2.3

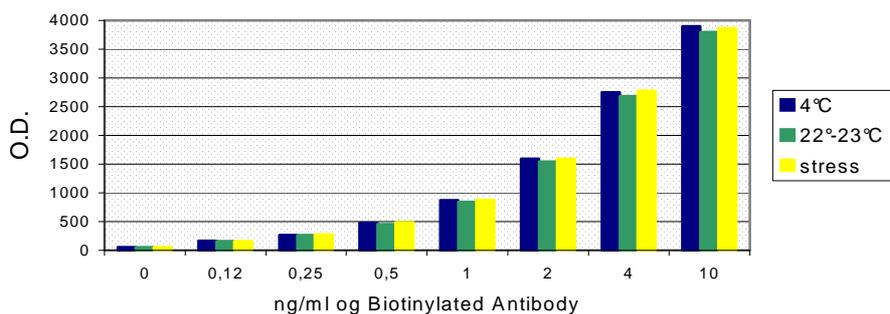
5.4. 온도 실험 (운반 시뮬레이션)

운반 중 일어날 수 있는 각기 다른 하에서의 안정성 실험이 진행되었다. 다음의 조건에 노출된 Streptavidin과 다른 plate를 비교하기 위해 방법2를 사용하였다.

plate n.	conditions	time
1	4° C	10 days
2	22°-23° C	10 days
3	37° C	3 days
	22°-23° C	12 h.
	- 20° C	10 h.
	37° C	3 days
	22°-23° C	3 days

stability test: temperature stress

결과



단백질 A로 코팅된 표면

Biomat 제품은 단백질 A와 비특정적으로 접합된 곳을 막아주어 안정적인 활동성을 유지하도록 하는 96개의 잘 코팅된 microplate이다. 단백질 A는 많은 포유류 동물에서 면역 글로블린 항체의 Fc지역을 접합시킨다 (표1 참조) 로써 에피토프의 효율적인 접합을 위해 F(ab)₂ 접합지역을 자유롭게 하는 구조를 가지고 있다. Microplate에 코팅되어 있을 경우 단백질 A는 직접적으로 적용된 또는 항원/항체 복합물로써 적용된 IgG를 안전하게 확보할 수 있다.

적용 사례:

- 위생적이고 구체적으로 형성된 IgG 결합
- 다른 글로블린 항체에서 IgG의 분리
- 항원-항체 복합물로부터 분리
- 오염물로부터 IgG의 분리
- 융합 단백질로부터의 고립과 분석

제품 소개

구성

개별 포장된 96개 microplates와 12개의 탈부착 가능한 8-well 조각

코팅

재조합형 단백질A(mol, 무게 38,9 kDa), Staphylococcus aureus subsp. Aureus로부터, E.coli로 표기되어, 이는 100 u l/well을 사용하여 코팅되었다. 조각들은 구체적 접합과 장기적 안정성을 위해 사후 코팅 (봉쇄)되었다.

접합 용량

Microplate는 ELISA 형식을 사용하여 반-인간 IgG-HRP를 검출기로 사용하고 TMB를 기질 (基質) 로 사용하여(자료와 실험세부사항을 위해서 표1 참조) 7,5 ug/ml (750 ng/well)의 농도로 인간 IgG를 사용하여 인간 IgG와 함께 농축되었다.

Biomat 단백질 A microplate는 5 pmol IgG/well의 근소한 접합 용량을 보인다.

민감성

Biotinylated 인간 IgG가 TMB를 기질 (基質) 로 사용하고 streptavidin-HRP 을 검출기로 사용한 ELISA 형식에서 표준을 훨씬 웃도는 농도 발견되었다 (자료와 실험세부사항은 표2 참조)

Biomat 단백질 A microplate는 0,113 ng/well의 인간IgG의 민감도를 보인다

biomat

일관성

Biotinylated 인간 IgG를 잡는 용도로 TMB를 기질 (基質) 로 사용하고 streptavidin-HRP 을 검출기로 사용한 ELISA 형식에서 사용한 Microplates 는 5보다 적은 CV%를 나타내었다.

저장과 안정성

Microplate들은 개봉되지 않으면 냉장 상태에서 안정적이고 이는 라벨에 적힌 유통기한이 지나기 전까지 지속된다. 개봉된다면 습기제거제와 함께 밀봉된 봉투에 넣고 유통기한 전까지 사용할 것.

표 1. 항글로불린 접합 도메인에 대한 재조합형 단백질 A와 G 접합 성질

(아래 표는 단백질 A 와 G가 다른 종과 하위 분류와의 접합 강도를 나타낸다. S : 강한 접합; M : 중간 접합; W: 약한 접합; N : 접합 안됨)

Species	Ig Subclass	Protein A	Protein G
Human	Total Ig	S	S
	IgG1,IgG2,IgG4	S	S
	IgG3	W	S
	IgD	W	N
	IgA	W	N
	IgE	W	N
	IgM	W	N
Mouse	Total Ig	S	S
	IgG1	W	M
	IgG2a, IgG2b,IgG3	S	S
	IgM	N	N
Rabbit	IgG	S	S
Rat	IgG	N	W-S
Goat	IgG	W-M	M-S
Sheep	IgG	W-M	M-S
Chicken	IgG	N	W
Guinea Pig	IgG	S	W-M
Hamster	IgG	W	M
Horse	IgG	W	S
Pig	IgG	S	W-M
Bovine	IgG	M	S
Dog	IgG	S	W-M
Cat	IgG	S	W

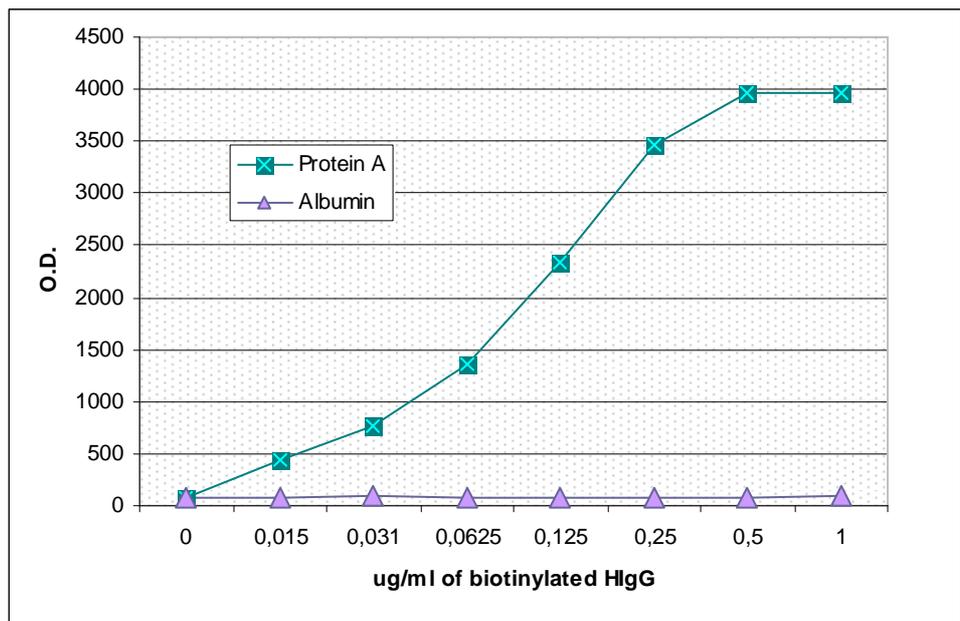
단백질 A로 코팅된 표면

단백질 A 코팅된 표면에 항 글로불린을 접합시키는 표준적 방법

1. 항 글로불린 (샘플)을 중성 pH의 완충제 혹은 약간 중성적 (8-8.5)으로 용해시켜 농도 0,1- 5 ug/ml로 조절
2. 배양 실행: 조건은 생체 분자와 순수도에 따라 달라짐
3. 결합되지 않은 물질을 씻어내기 위해 네 번 행구기
4. 구체적인 실험 진행:
 - 결합된 항 글로불린 구별
 - 결합된 항 글로부린을 사용하여 구체적인 항원을 구별하거나 결합시킨다

실험의 예: Biotinylated HIgG를 위한 결합 세부사항

1. 다양한 농도 (1 에서 0,015 ug/ml까지)의 Biotinylate된 HIgG 100ul을 단백질 A로 코팅된 plate well들에 더하고 실온에서 30분 배양한다. 같은 용액을 알부민으로 코팅된 plate에 더하여 결합의 세부사항을 알기 위해 비교분석한다. 빈 well들은 대조 표준으로 둔다.
2. Well들을 비우고 0,1M PBS pH 7,2 + 0,05% Tween® 20로 4번 행군다.
3. Streptavidin-Pod(160ng/ml)를 더하고 실온에서 30분 배양
4. Well들을 비우고 0,1M PBS pH 7,2 + 0,05% Tween® 20로 4번 행군다
5. 100 ul /well 의 TMB 기질 용액을 더하고 실온에서 10분 배양
6. 기질 반응을 멈추기 위해 100 ul의 황산1N을 더하고 시각적 밀도를 450nm으로 읽는다.



단백질 A로 코팅된 표면 - 결합 용량 측정

1. 100 ul 의 각기 다른 인간 IgG (0.1 에서 20 ug/ml) 를 단백질 A로 코팅된 plate well 에 더하고 실온에서 30분간 배양시킨다
2. Well을 비우고 0.1 M PBS pH 7.2, 0.05% Tween® 20 로 네 번 행균
3. 농도 100 ul /well 의 F(ab)2 염소 비인간 IgG-HRP (Sigma 상품번호 A 2290, 1:8000 비율로 희석) 를 더하고 실온에서 30분 배양.
4. Well을 비우고 0.1 M PBS pH 7.2, 0.05% Tween® 20 로 네 번 행균
5. 100 ul /well 의 TMB 기질 용액을 더하고 실온에서 15분 배양
6. 기질 반응을 멈추기 위해 100 ul의 황산1N을 더하고 시각적 밀도를 450nm으로 읽는다.

데이터는 IgG 용액 농도 7.5ug/ml로 인해 평탄한 모양의 그래프가 형성되었음을 보여준다.

이 용액은 다음과 같이 표현되는 well결합 용량을 의미한다:

- ug/well = 0.75 (750 ng/well)
- pmol/well= 5 (이 결과는 다음을 고려하여 계산됨 IgG M.W. = 150,000)

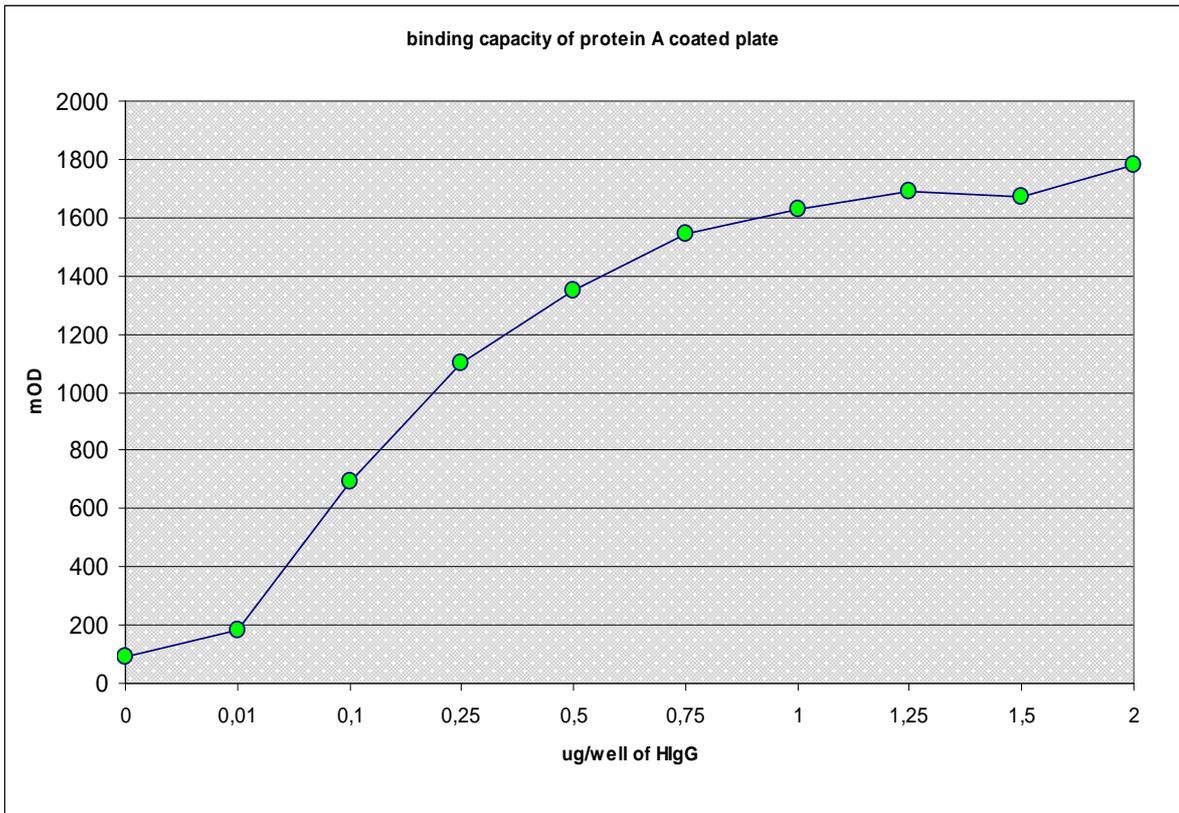


Figure 1

단백질 A로 코팅된 표면 - 민감도 시험

1. 100 ul 의 각기 다른 인간 IgG (1.56 에서 100 ug/ml) 를 단백질 A로 코팅된 plate well 에 더하고 실온에서 30분간 배양시킨다
 2. Well을 비우고 0,1 M PBS pH 7,2,0,05% Tween® 20 로 네 번 행균
 3. 농도 100 ul /well의 Streptavidin-HRP를 더하고 (BioSpa 상품번호 SB01-61 , 1:20,000로 희석된) 30분간 실온에서 배양.
 4. Well을 비우고 0,1 M PBS pH 7,2,0,05% Tween® 20 로 네 번 행균
 5. 100 ul /well 의 TMB 기질 용액을 더하고 실온에서 15분 배양
 6. 기질 반응을 멈추기 위해 100 ul의 황산1N을 더하고 시각적 밀도를 450nm으로 읽는다.
- Microplate 민감도는 가장 낮은 biotinylated IgG 용액 평균 optical 밀도 더하기 0 ng/ml 농도의 biotinylated IgG 용액의 5S,D.

이 실험으로 다음 결과가 나타났다 :

- 0 ng/ml biotinylated IgG optical 밀도 평균 (8개의 동일 결과) = 0,141
- 표준편차= 0,019
- 평균+ 5 S,D. = 0,236
- 민감도= human IgG 의 0,113 ng/well

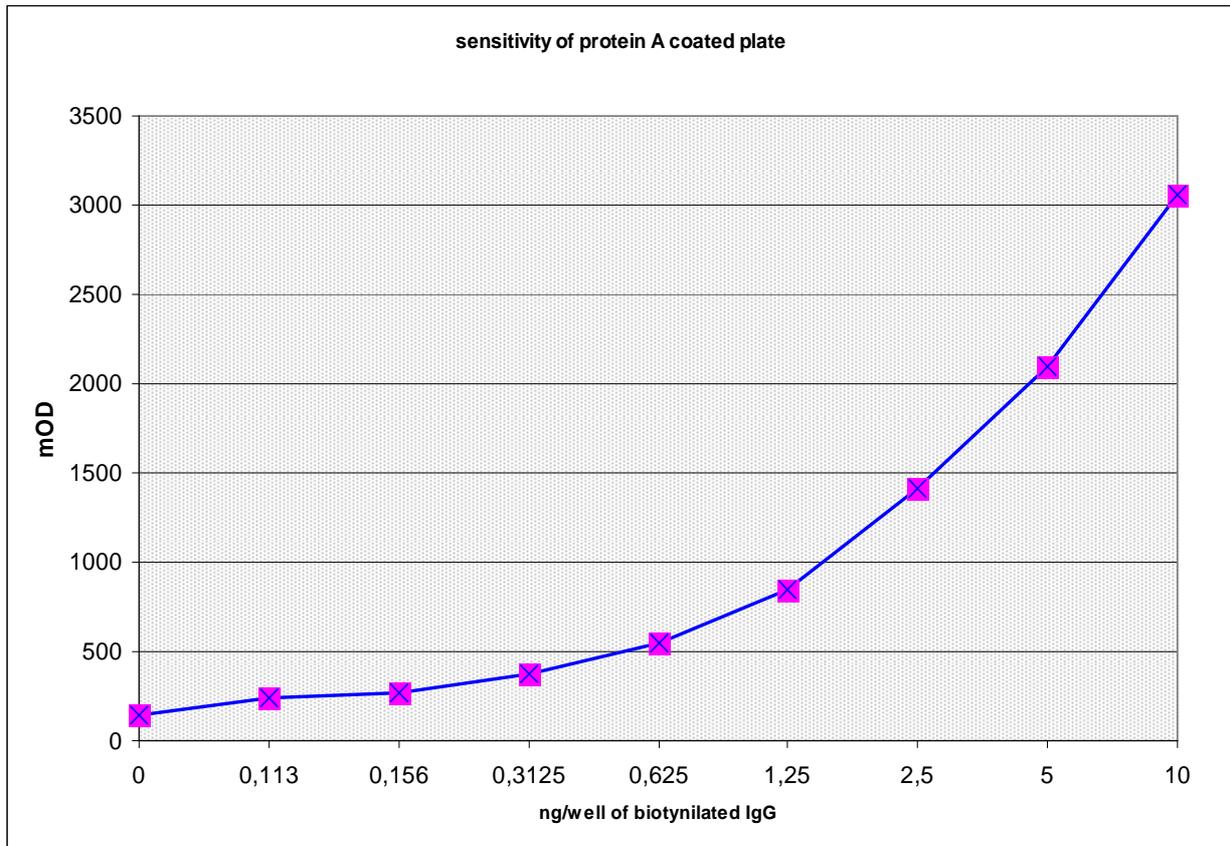


Figure 2

단백질 G 코팅된 표면

Biomat 제품은 단백질 G와 비특정적으로 접합된 곳을 막아주어 안정적인 활동성을 유지하도록 하는 96개의 잘 코팅된 microplate이다. 단백질 G는 많은 포유류 동물에서 면역 글로블린 항체의 Fc지역을 접합시킨다 (표1 참조) 로써 에피토프의 효율적인 접합을 위해 F(ab)2 접합지역을 자유롭게 하는 구조를 가지고 있다. Microplate에 코팅되어 있을 경우 단백질 G는 직접적으로 적용된 또는 항원/항체 복합물로서 적용된 IgG를 안전하게 확보할 수 있다.

적용 사례:

- 위생적이고 구체적으로 형성된 IgG 결합
- 다른 글로블린 항체에서 IgG의 분리
- 항원-항체 복합물로부터 분리
- 용합 단백질로부터의 고립과 분석

제품 소개

구성

개별 포장된 96개 microplates와 12개의 탈부착 가능한 8-well 조각

코팅

재조합형 단백질G(mol. 무게 26.1kDa), Streptococcus sp., E.coli로 표기되어, 이는 100 μ l/well을 사용하여 코팅되었다. 조각들은 구체적 접합과 장기적 안정성을 위해 사후 코팅 (봉쇄)되었다.

접합 용량

Microplate는 ELISA 형식을 사용하여 반-인간 IgG-HRP를 검출기로 사용하고 TMB를 기질 (基質) 로 사용하여(자료와 실험세부사항을 위해서 표1 참조) 8.0 μ g/ml (800 ng/well)의 농도로 인간 IgG를 사용하여 인간 IgG와 함께 농축되었다.

Biomat 단백질 G microplate는5.3 pmol IgG/well의 근소한 접합 용량을 보인다.

민감성

Biotinylated된 인간 IgG가 TMB를 기질 (基質) 로 사용하고 streptavidin-HRP 을 검출기로 사용한 ELISA형식에서 표준을 훨씬 웃도는 농도 발견되었다 (자료와 실험세부사항은 표2 참조)

Biomat 단백질 G microplate는0.056 ng/well의 인간IgG의 민감도를 보인다

일관성

Biotinylated 인간 IgG를 잡는 용도로 TMB를 기질 (基質) 로 사용하고 streptavidin-HRP 을 검출기로 사용한 ELISA 형식에서 사용한 Microplates 는 5보다 적은 CV%를 나타내었다.

저장과 안정성

Microplate들은 개봉되지 않으면 냉장 상태에서 안정적이고 이는 라벨에 적힌 유통기한이 지나기 전까지 지속된다. 개봉된다면 습기제거제와 함께 밀봉된 봉투에 넣고 유통기한 전까지 사용할 것.

표 1. 항글로불린 접합 도메인에 대한 재조합형 단백질 A와 G 접합 성질

(아래 표는 단백질 A 와 G가 다른 종과 하위 분류와의 접합 강도를 나타낸다. S : 강한 접합; M : 중간 접합; W: 약한 접합; N : 접합 안됨)

Species	Ig Subclass	Protein A	Protein G
Human	Total Ig	S	S
	IgG1,IgG2,IgG4	S	S
	IgG3	W	S
	IgD	W	N
	IgA	W	N
	IgE	W	N
	IgM	W	N
Mouse	Total Ig	S	S
	IgG1	W	M
	IgG2a, IgG2b,IgG3	S	S
	IgM	N	N
Rabbit	IgG	S	S
Rat	IgG	N	W-S
Goat	IgG	W-M	M-S
Sheep	IgG	W-M	M-S
Chicken	IgG	N	W
Guinea Pig	IgG	S	W-M
Hamster	IgG	W	M
Horse	IgG	W	S
Pig	IgG	S	W-M
Bovine	IgG	M	S
Dog	IgG	S	W-M
Cat	IgG	S	W

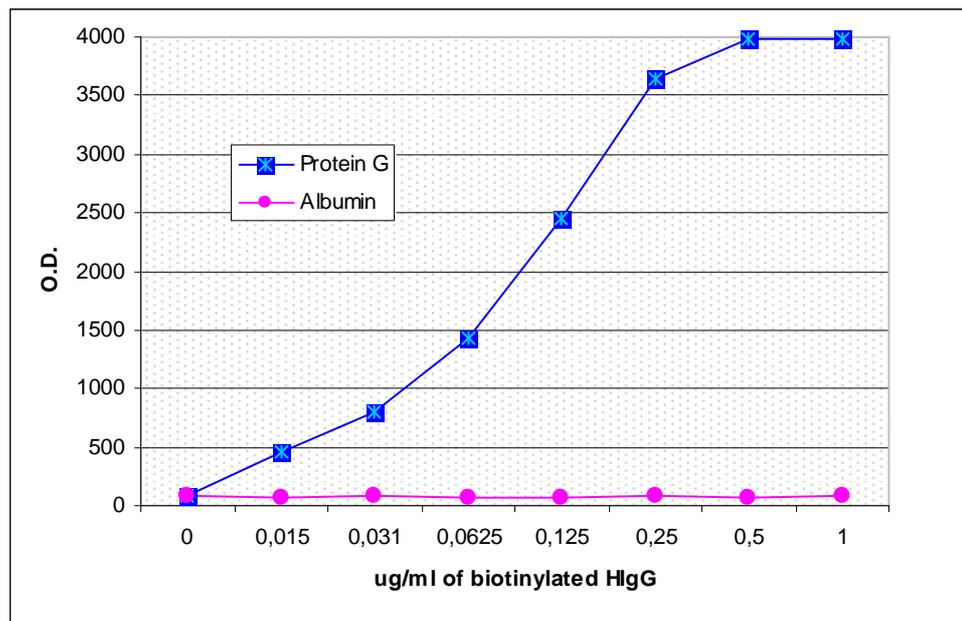
단백질 G로 코팅된 표면

단백질 A 코팅된 표면에 항 글로불린을 접합시키는 표준적 방법

1. 항 글로불린 (샘플)을 중성 pH의 완충제 혹은 약간 중성적 (8-8.5)으로 용해시켜 농도 0,1- 5 ug/ml로 조절
2. 배양 실행: 조건은 생체 분자와 순수도에 따라 달라짐
3. 결합되지 않은 물질을 씻어내기 위해 네 번 행구기
4. 구체적인 실험 진행:
 - 결합된 항 글로불린 구별
 - 결합된 항 글로부린을 사용하여 구체적인 항원을 구별하거나 결합시킨다

실험의 예: Biotinylated HIgG를 위한 결합 세부사항

1. 다양한 농도 (1 에서 0,015 ug/ml까지)의 Biotinylate된 HIgG 100ul을 단백질 G로 코팅된 plate well들에 더하고 실온에서 30분 배양한다. 같은 용액을 알부민으로 코팅된 plate에 더하여 결합의 세부사항을 알기 위해 비교분석한다. 빈 well들은 대조 표준으로 둔다.
2. Well들을 비우고 0,1M PBS pH 7,2 + 0,05% Tween® 20로 4번 행군다.
3. Streptavidin-Pod(160ng/ml)를 더하고 실온에서 30분 배양
4. Well들을 비우고 0,1M PBS pH 7,2 + 0,05% Tween® 20로 4번 행군다
5. 100 ul /well 의 TMB 기질 용액을 더하고 실온에서 10분 배양
6. 기질 반응을 멈추기 위해 100 ul의 황산1N을 더하고 시각적 밀도를 450nm으로 읽는다



단백질 G 로 코팅된 표면들 - 결합 수용력 테스트

1. 100 ul 의 다양한 농도의 인간 IgG (0.5 에서 10 ug/ml) 과 일정한 양의 인간 (biotinylated) IgG 을 섞어서 단백질 G 로 코팅된 판 우물들에 첨가해서 30분 동안 실내온도에 배양하라.
2. 우물들을 비우고 0.1 M PBS pH 7.2, 0.05% 트윈 (Tween) 으로 24번 세척하라.
3. 100 ul /well of Streptavidin-HRP (바이오스파 제품 코드 SB01-61, diluted 1:20,000) 을 첨가하고 30분 동안 실내온도에 배양하라.
4. 우물들을 비우고 0.1 M PBS pH 7.2, 0.05% 트윈 (Tween) 으로 24번 세척하라.
5. 100 ul /well of TMB 기질 용액을 첨가하고 15분 동안 실내온도에 배양하라.
6. 100 ul /well 유허 산 1 N 첨가 함으로 기질 반응을 중단시키라. 시각 밀도 치수가 450 nm까지.

데이터는 IgG 농도가 8.0ug/ml 일 때 그래프의 평탄역이 시작된다는 것을 가리킨다.

이 농도는 우물 결합 수용력을 이렇게 표현해도 된다는 것을 의미한다:

- ug/well = 0.800 (800 ng/well)

- pmol/well= 5.3 (이 결과는 the IgG M.W. = 150,000이라고 고려하고 계산된 것이다.

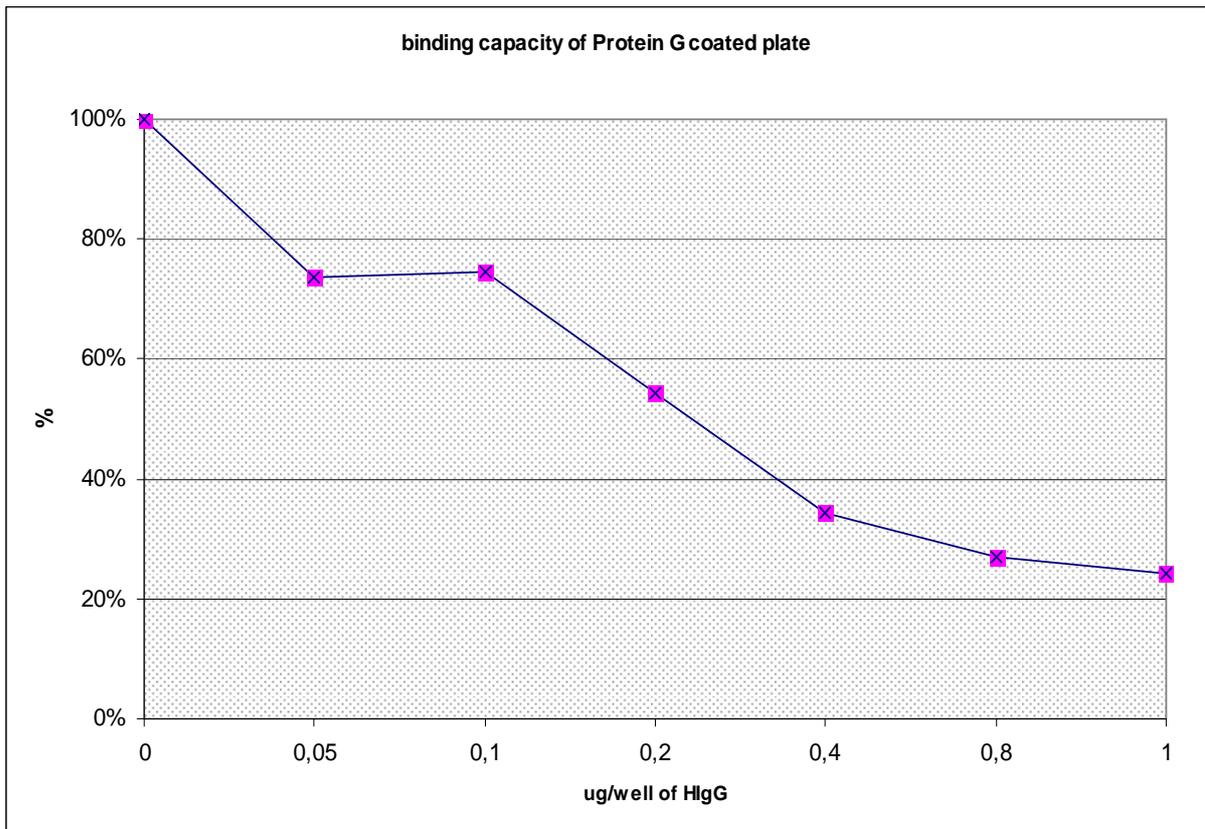


Figure 1

단백질 G 로 코팅된 표면들 - 민감도 테스트

1. 100 μ l 의 다양한 농도의 인간 IgG biotinylated (1,56 에서 100ng/ml 까지) 을 단백질 G 로 코팅된 판 우물들에 첨가하고 30분 동안 실내온도에 배양하라.
2. 우물들을 비우고 0,1 M PBS pH 7,2,0,05% 트윈 (Tween) 으로 24번 세척하라.
3. 100 μ l /well of Streptavidin-HRP (바이오스파 제품 코드 SB01-61, diluted 1:20,000) 을 첨가하고 30분 동안 실내온도에 배양하라.
4. 우물들을 비우고 0,1 M PBS pH 7,2,0,05% 트윈 (Tween) 으로 24번 세척하라.
5. 100 μ l /well of TMB 기질 용액을 첨가하고 15분 동안 실내온도에 배양하라.
6. 100 μ l /well of sulphuric acid 1 N 첨가 함으로 기질 반응을 중단시키라. 시각 밀도 치수가 450 nm까지.

마이크로 판 민감도는 평균 시각 밀도보다 높은 가장 낮은 biotinylated IgG 농도에, 0 ng/ml biotinylated IgG 의 5 S,D 를 더해서 계산 되었다.

우리의 실험은 다음과 같은 결과를 주었다:

- 0 ng/ml biotinylated IgG 평균 시각 밀도 (8개의 복제에서 나온) = 0,133
- 표준 편차 = 0,012
- 평균 + 5 S,D. = 0,193
- 민감도 = 0,056 ng/well of human IgG

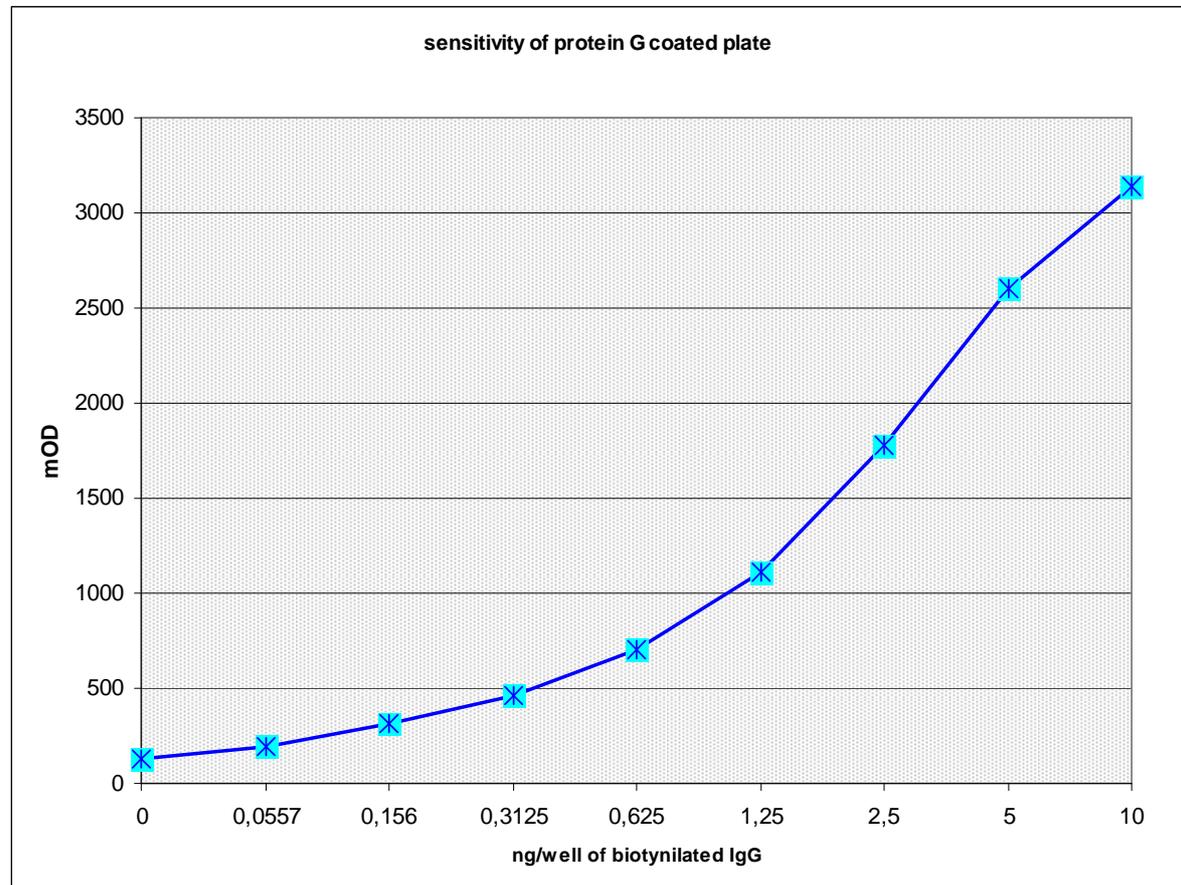


Figure 2

콘카나발린 A 로 코팅된 표면들

렉틴에 소속인 콘카나발린 A는 일반 콩인 카나발리아 엔시포미스에서 나오는 항체이다. 렉틴은 glyco-conjugates과 당단백질을 특정한 탄수화물 구조로 분리시키는데 있어서 광범위하게 사용되는 것으로 잘 알려져 있다.

콘카나발린 A는 α -D-mannopyranosyl, α -D-glucopyrannosyl 그리고 그들과 비슷한 물질이 함유된 분자에 뚜렷한 친근감을 보인다.

콘카나발린 A로 코팅된 표면들은 당단백질의 탄수화물, 효소, 그리고 세포막의 특정한 결합을 위한 강력하고 민감한 도구를 제공한다.

폴리스티렌의 시각적 속성들은 변화하지 않은 상태로 남고, 그것은 변경된 표면을 진단 테스트의 강력한 도구로 사용되게 한다.

실용성:

- 당단백질, 글리코펩타이드, 항체 접합과의 상호 작용
- 다당류와 당지질
- 세포막과 호르몬과 호르몬 수용체와의 상호 작용

판 (Plate) 들은 이것들을 위해 검사를 하고 보증된다:

- 균일성
- 결합 특수성
- 안정성

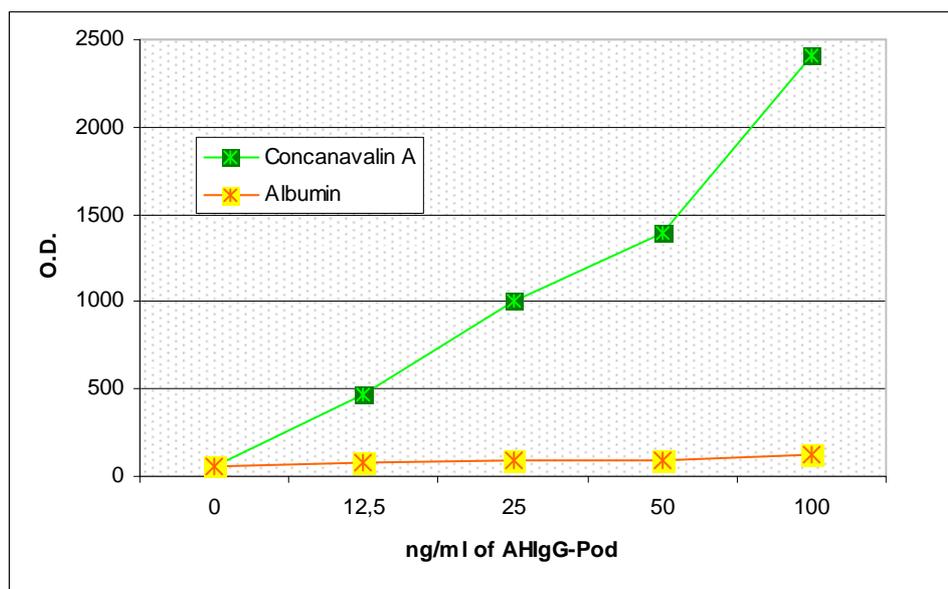
콘카나발린 A 로 코팅된 표면들

생체분자를 콘카나발린 A 로 코팅된 표면과 결합하는 일반 절차

1. 생체분자 (샘플) 을 적절한 중립 완충제의 pH 0,5- 5 ug/ml 으로 강도를 약하게 하라. 완충제는 1mM Ca⁺⁺ 와 1mM Mn⁺⁺ 가 함유되어 있어서 한다; 사실상 이런 이온들이 당류와 콘카나발린 A로 코팅된 표면의 상호작용을 활성화시킨다.
2. 배양을 진행하라: 생체분자 구조에 따라 컨디션은 좌우된다.
3. 결합이 안된 물질을 제거하기 위해 네 번 씻어라.
4. 특정한 테스트를 진행하라:
 - 생체분자의 결합을 지적하기 위해
 - 결합된 생체분자를 특정한 반대의 분자를 지적하는데 사용되기 위해

테스트의 예: 콘카나발린 A로 코팅된 판들의 특수성 결합

1. AHIgG-Pod 를 100 ng/ml 에서 12,5 ng/ml 로 1 mM CaCl₂·2 H₂O + 1 mM MnCl₂·4 H₂O 가 함유된 순수 증류된 물에서 강도를 약하게 하라.
2. 각 용액의 100ul을 콘카나발린 A로 코팅된 판 우물들에게 첨가하고 30' RT를 배양하라. 같은 용액을 알부민으로 코팅된 판에 첨가하라. 특수성 결합의 평가를 비교하기 위해.
3. 빈 우물들을 대조 표준으로 남겨라.
4. 우물들을 비우고 0,1M PBS pH 7,2 + 0,05% 트윈 (Tween) 으로 스무 번 씻어라.
5. 100 ul /well of TMB 기질 용액을 첨가하고 10분 동안 실내온도에 배양하라.
6. 기질 반응을 100 ul 유허 산 1 N 을 첨가함으로 중단시키라. 시각 밀도 치수가 450 nm까지.



하칼린으로 코팅된 표면

렉틴에 소속인 하칼린은 *Artrocarpus integrifolia* 과일 씨앗에서 나오는 항체이다. 렉틴은 glyco-conjugates과 당단백질을 특정한 탄수화물 구조로 분리시키는데 있어서 광범위하게 사용되는 것으로 잘 알려져 있다.

하칼린은 환원하지 않는 α -D-galactosyl 이 함유된 분자에 뚜렷한 친근감을 보인다. 이 물질은 주로 IgA1의 생화학적 구조와 세포막에 존재한다.

폴리스티렌의 시각적 속성들은 변화하지 않은 상태로 남고, 그것은 변경된 표면을 진단 테스트의 강력한 도구로 사용되게 한다.

실용성:

- 인간 IgA1 특정 결합, 원자의 공간 지향적
- 인간 면역 글로블린 항체의 정화 (특히 IgA1)
- 면역 복합체 항체의 분리
- IgA1 를 오염균에서 분리
- T - 세포들의 자극

판 (Plate) 들은 이것들을 위해 검사를 하고 보증된다:

- 균일성
- 결합 특수성
- 안정성

하칼린으로 코팅된 표면

하칼린 표면의 특수성 결합

하칼린으로 코팅된 판 특수성을 평가하기 위해 인간 IgA 을 생포하는 검사가 진행 되었다.

IgA 검사

1. 보통 인간 혈청 함유: mg/dl IgG, 280 mg/dl IgA, 90 mg/dl IgM의 강도를 PBS 0,05M pH 7,2에서 1:200으로 약하게 했다.
2. 100 ul의 강도가 약하게 된 인간 혈청 그리고 100 ul PBS 0,05M pH 7,2 as 0 mg/dl 의 반응이 하칼린으로 코팅된 우물들과 솟과의 혈청 알부민 (BSA) 으로 코팅된 우물들에서 30분 동안 실내온도에서 배양되었다. 테스트의 특수성을 증명하는데 사용되기 위해.
3. 0,1M PBS pH 7,2 + 0,05% 트윈 (Tween) 으로 세척하는 작업이 진행되었다.
4. 100 ul/ 정화된 염소 anti-human Fc IgA Peroxidase의 우물이 각 우물에 첨가되었고 30분 동안 실내온도에 배양되었다.
5. 추가적인 세척작업이 진행되었다.
6. 100 ul/TMB 우물이 각 우물에 첨가되었고 15분 동안 실내온도에 배양되었다.
7. 100 ul/유황 산 우물 1N 을 첨가함으로 반응은 중단되었다.
8. 450 nm 치수에서 진행되었다.

다음과 같은 결과가 나왔다. 시각적 밀도 (O.D) 로 표현했다.

Sample	Jacalin coated well O.D.	BSA coated well O.D.
100 ul PBS 0,05M pH 7,2	0,126	0,076
100 ul 1:200 diluted serum	1,189	0,134

맥아로 코팅된 표면들

렉틴에 소속인 맥아 렉틴은 *Triticum Vulgaris* 인 일반 밀 세균에서 나오는 항체이다. 렉틴은 glyco-conjugates과 당단백질을 특정한 탄수화물 구조로 분리시키는데 있어서 광범위하게 사용되는 것으로 잘 알려져 있다.

맥아 렉틴은 N-acetyl-D-글루코사민 잔재가 함유된 분자에 뚜렷한 친근감을 보인다.

맥아 렉틴으로 코팅된 표면들은 당단백질의 탄수화물, 효소, 그리고 세포막의 특정한 결합을 위한 강력하고 민감한 도구를 제공한다.

폴리스티렌의 시각적 속성들은 변화하지 않은 상태로 남고, 그것은 변경된 표면을 진단 테스트의 강력한 도구로 사용되게 한다.

실용성:

- 정상적인 그리고 변형된 세포 표면 연구
- 세포막 당단백질을 포함한 당단백질 정화
- 세포 순환과 성장과장에서 세포 표면 변화 연구

판 (Plate) 들은 이것들을 위해 검사를 하고 보증된다:

- 균일성
- 결합 특수성
- 안정성

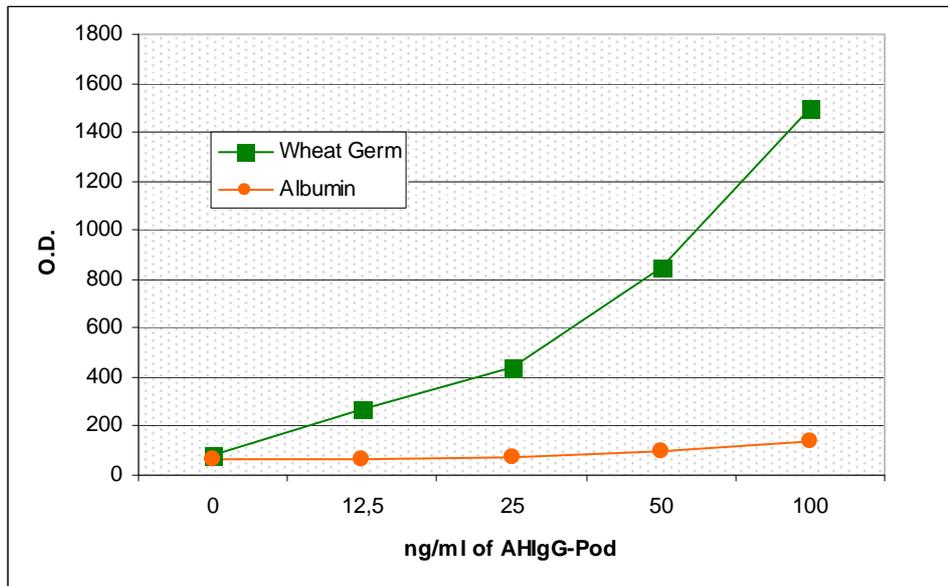
맥아 코팅된 표면들

생체분자를 맥아로 코팅된 표면과 결합하는 일반 절차

1. 생체분자 (샘플) 을 적절한 중립 완충제의 pH 0,5- 5 ug/ml 으로 강도를 약하게 하라. 완충제는 1mM Ca⁺⁺ 와 1mM Mn⁺⁺ 가 함유되어 있어서 한다; 사실상 이런 이온들이 당류와 맥아로 코팅된 표면의 상호작용을 활성화시킨다.
2. 배양을 진행하라: 생체분자 구조에 따라 컨디션은 좌우된다.
3. 결합이 안된 물질을 제거하기 위해 네 번 씻어라.
4. 특정한 테스트를 진행하라:
5. 생체분자의 결합을 지적하기 위해 그리고 결합된 생체분자를 특정한 반대의 분자를 지적하는데 사용되기 위해

테스트의 예: 맥아로 코팅된 판들의 특수성 결합

1. AHIgG-Pod 를 100 ng/ml 에서 12,5 ng/ml 로 1 mM CaCl₂·2 H₂O + 1 mM MnCl₂·4 H₂O 가 함유된 순수 증류된 물에서 강도를 약하게 하라.
2. 각 용액의 100ul을 맥아로 코팅된 판 우물들에게 첨가하고 30' RT를 배양하라. 같은 용액을 알부민으로 코팅된 판에 첨가하라. 특수성 결합의 평가를 비교하기 위해.
3. 빈 우물들을 대조 표준으로 남겨라.
4. 우물들을 비우고 0,1M PBS pH 7,2 + 0,05% 트윈 (Tween) 으로 스무 번 씻어라.
5. 100 ul /TMB 기질 용액 우물을 첨가하고 10분 동안 실내온도에 배양하라.
6. 기질 반응을 100 ul 유허 산 1 N 을 첨가함으로써 중단시키라. 시각 밀도 치수가 450 nm까지.



폴리-L-리신으로 코팅된 표면들

바이오맷 (biomat) 은 물질적으로 폴리-L-리신이 흡수된 폴리스티렌 표면을 발달시켰다. 단량체 L-리신 체인은 높은 밀도의 집단을 나타낸다:

- α -amino (아민이 함유된)
- α -carboxyl (카르복시기)
- ϵ -amino (아민이 함유된)

이 집단들은 정전과 입체 특이성의 본드를 통해 반응할 수 있다.

폴리스티렌 시각 특성들은 변화하지 않고, 그럼으로 변질된 표면들이 생물학적인 실험들을 할 수 있는 유용한 도구로 사용될 수 있게 한다.

이 표면은 다음과 같은 중요한 실용성을 나타낸다:

- 플라스미노젠과 플라스미노젠 활성화제와의 상호 작용
- 리보솜 RNA와 상호 작용
- 쌍으로 끈 DNA 와 상호 작용

판 (Plate) 들은 이것들을 위해 검사를 하고 보증된다:

- 균일성
- 결합 특수성
- 안정성

폴리-L-리신으로 코팅된 표면들 - 입체 특이성의 결합 활동

NHS-b 를 폴리-L-리신으로 코팅된 표면과 결합하는 일반적 절차
 이 실험은 리신에 소용이 되는 ϵ - amino (아민이 함유된)를 측정하는데 적당하다.

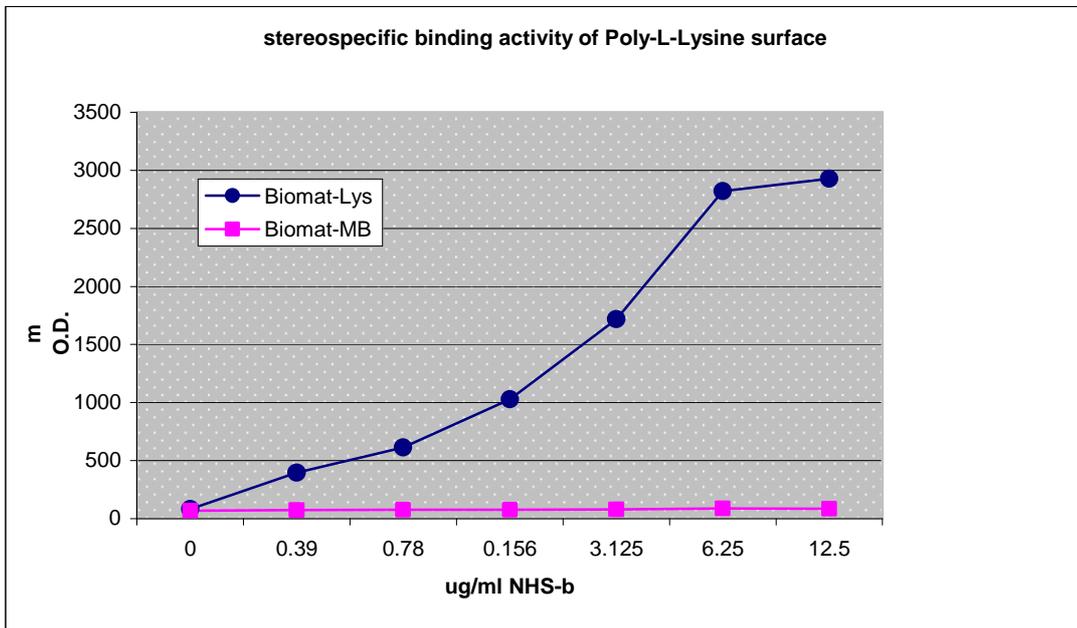
시약들과 완충제들의 준비

재료

Solid phase:	Biomat plates	MT12F-LYS-L (poly-L-Lysine coated plate) MT0F-MB (medium binding capacity)
ϵ -Caproylamido-biotin-N-hydroxysuccinimide ester (NHS- biotin)	BIO-SPA	Cat No. B002-61
Dimetilformamide (DMFO)	Fluka	Cat No. 40250
Tween 20	Merck	Cat No. 822184
Streptavidin-peroxidase conjugate	BIO-SPA	Cat. No. SB01-61
TMB peroxidase substrate	Kirkegard & Perry	Cat. No. 50-76-05

실험

1. 0,1M PBS-트윈 (Tween)으로 강도가 약화된 100ul NHS-비오틴 용액 12.5 - 6.25 - 3.125 - 1.56 - 0.78 - 0 ug/ml을 우물들에 투여하라. 우물들을 증발을 방지하기 위해 봉하라.
2. 4도 섭씨에 밤새 배양하라.
3. 우물들을 비우고 0,1 M PBS-트윈 (Tween) 20 0,05%, pH 7.2 로 4번 세척하라.
- 4 각 우물에 100ul 의 50 ng/ml streptavidin-HRP 를 첨가하고 30분 동안 실내온도에 배양하라.
5. 우물들을 비우고 0,1M PBS-트윈 (Tween) 20 0,05%, pH 7.2 로 4번 세척하라.
6. 100 ul /TMB 기질 용액의 우물을 첨가하고 10분동안 실내온도에 배양하라.
7. 기질 반응을 100 ul 유황 산 1 N 을 첨가함으로 중단시키라. 시각 밀도 치수가 450 nm까지.



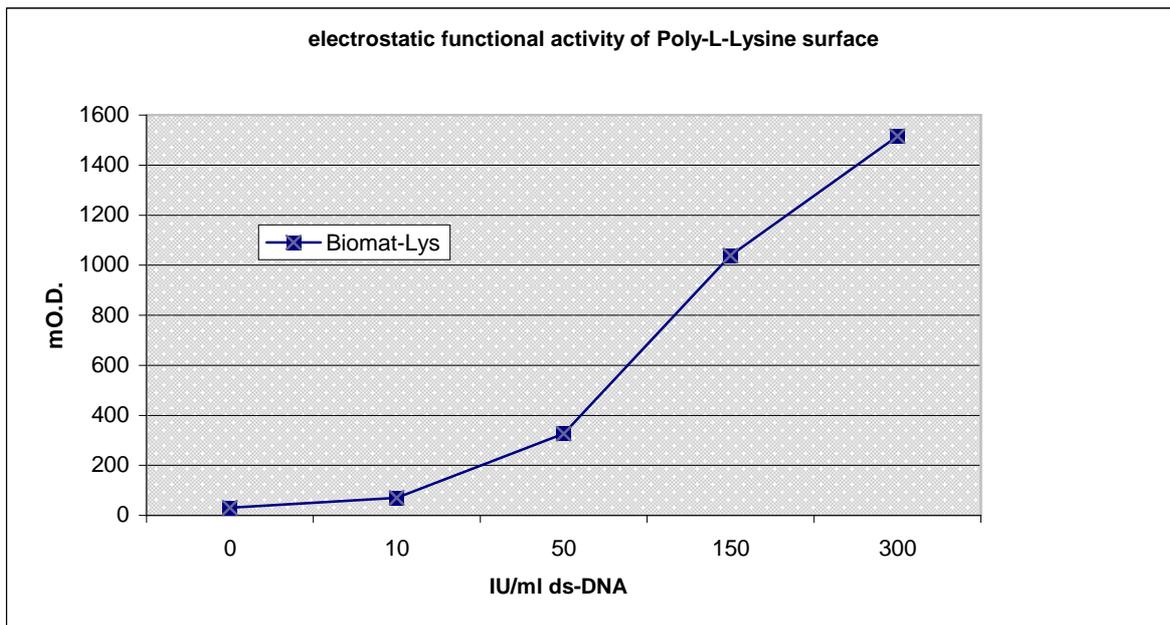
폴리-L-리신으로 코팅된 표면들 - 정전 기능성 활동

dsDNA 를 폴리-L-리신으로 코팅된 표면과 결합하는 일반적 절차

1. dsDNA분자를 1-10 ug/ml in 20 mM TRIS-HCl pH 8 ,0.1 mM EDTA로 강도를 약하게 하라.
2. 배양을 진행하라: dsDNA 분자의 무게와 청결이 컨디션을 좌우한다.
3. 결합이 안된 물질을 제거하기 위해 세 번 씻어라.
4. 특정한 테스트/실용성을 진행하라

테스트의 예: dsDNA에 대한 인간 (면역 자기 항체) IgG 측정

1. dsDNA 를 종아리 티무스 (시그마 코드 D4522) 에서 5 ug/ml in 20 mM TRIS-HCl pH 8 0.1mM EDTA로 강도를 약하게 하라.
2. 100 ul/강도 약화된 dsDNA우물을 각 우물에 첨가하고 + 4 ° C에 배양하라.
3. 우물들을 비우고 0.1 M PBS pH 7.2, 0.05 % 트윈 (Tween) 20에 세 번 세척하라.
4. 각 0.1 M PBS pH 7.2, 0.5 % BSA의 우물들에 200 ul 를 첨가하고 두 시간 동안 실내온도에 배양하라.
5. 우물들을 비우고 0.1 M PBS pH 7.2, 0.05 % 트윈 (Tween) 20에 세 번 세척하라.
6. 100 ul의 다음과 같은 IgG 농도를 갖고 있는 강도 약화된 인간 혈청을 dsDNA에 첨가하라: 0-10-50-150-300 IU/ml
7. 30' 을 실내온도에 배양하라.
8. 우물들을 비우고 0.1 M PBS pH 7.2, 0.05 % 트윈 (Tween) 20에 세 번 세척하라.
9. 100 ul의 강도가 약화된 염소 인간반대인 IgG-peroxidase 를 첨가하라.
10. 30' 을 실내온도에 배양하라.
11. 우물들을 비우고 0.1 M PBS pH 7.2, 0.05 % 트윈 (Tween) 20에 세 번 세척하라.
12. 100 ul/TMB 기질의 우물을 첨가하고 15분 동안 실내온도에 배양하라.
13. 기질 반응을 100 ul 유허 산 1 N 을 첨가함으로 중단시키라. 시각 밀도 치수가 450 nm까지.



폴리-L-아르기닌으로 코팅된 표면들

바이오맷 (biomat) 은 물질적으로 폴리-L-아르기닌으로 흡수된 폴리스티렌 표면을 발달시켰다. 단량체 L-아르기닌 체인은 높은 밀도의 집단을 나타낸다:

- α -amino (아민이 함유된)
- α -carboxyl (카르복시기)
- 구와니디노

이 집단들은 정전과 입체 특이성의 본드를 통해 반응할 수 있다.

폴리스티렌 시각 특성들은 변화하지 않고, 그럼으로 변질된 표면들이 생물학적인 실험들을 할 수 있는 유용한 도구로 사용될 수 있게 한다.

이 표면은 다음과 같은 중요한 실용성을 나타낸다:

- 세린 프로테아제 상호 작용
- 성숙 분열을 증진시키는 요소들과 상호 작용

판 (Plate) 들은 이것들을 위해 검사를 하고 보증된다:

- 균일성
- 결합 특수성
- 안정성

칼모듈린으로 코팅된 표면들

바이오맷 (biomat) 은 물질적으로 칼모듈린으로 흡수된 폴리스티렌 표면을 발달시켰다. 칼모듈린 Ca ++ 결합 단백질은 단백질의 표면에서 단백질과 주로 공유병적인 장소를 결합할 수 있다. 폴리스티렌 시각 특성들은 변화하지 않고, 그럼으로 변질된 표면들이 생물학적인 실험들을 할 수 있는 유용한 도구로 사용될 수 있게 한다.

이 표면은 다음과 같은 중요한 실용성을 나타낸다.

- 글리코겐 작용에 관련된 단백질과 상호 작용
- 신경 전달 메커니즘과 관련된 요소들과 상호 작용
- NAD^{*}/NADP^{*} 인광체 시스템에 관련된 효소들과 상호 작용

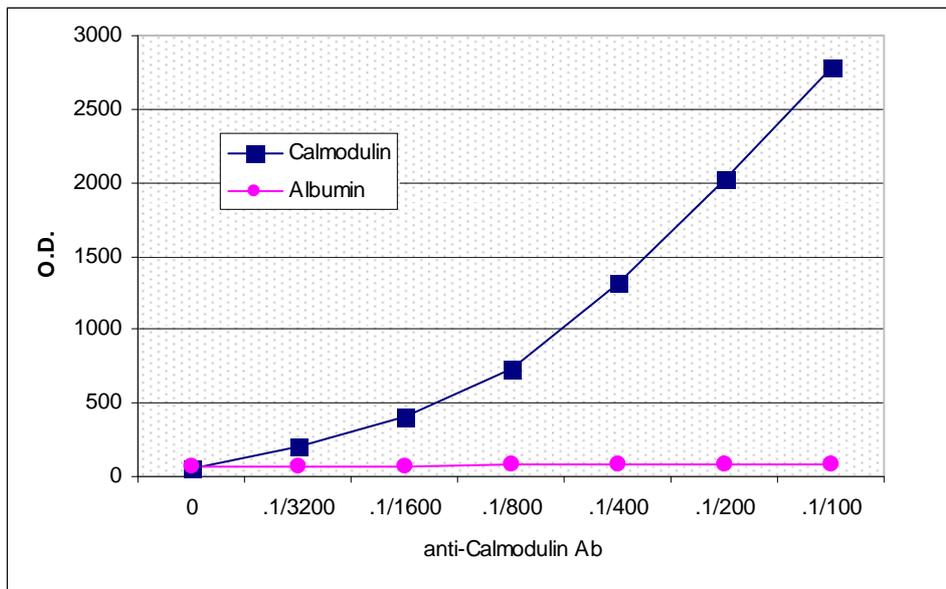
판 (Plate) 들은 이것들을 위해 검사를 하고 보증된다.

- 균일성
- 결합 특수성
- 안정성

칼모듈린으로 코팅된 표면들

안티-칼모듈린 단일클론에 대한 특수성 결합의 평가

1. 안티-칼모듈린 단일클론 항체를 1: 100 에서 1: 3200 로 0,2 % BSA 가 첨가된 0,1 M PBS pH 를 사용하여 강도를 약하게 하라.
2. 각 강도가 약화된 100 ul 을 칼모듈린으로 코팅된 판의 우물들에 첨가하고 60' RT를 배양하라. 같은 용액을 알부민으로 코팅된 판에 첨가하라. 특수성 결합의 평가를 비교하기 위해.
3. 빈 우물들을 대조 표준으로 남겨라.
4. 우물들을 비우고 0,1M PBS pH 7,2 + 0,05% 트윈 (Tween) 으로 네 번 씻어라.
5. 100 ul /접합 염소 안티-쥐-POD의 우물을 첨가하고 30' RT 를 배양하라.
6. 100 ul /TMB 기질 용액의 우물을 첨가하고 10분동안 실내온도에 배양하라
7. 기질 반응을 100 ul 유허 산 1 N 을 첨가함으로써 중단시키라. 시각 밀도 치수가 450 nm까지.



비오틴으로 코팅된 표면들

비오틴, 혹은 비타민 H (MW 244,31)는 작고 자연스럽게 발생하는 공동 인자이고 모든 살아있는 세포에 아주 작은 양 (보통 0,0001%보다 적음)으로 포함되어 있다. 비오틴 분자는 쥐오줌폴산 카르복시기를 통해 단백질과 결합된 상태 (예를 들어 피르부 카르복실라아제) 로 존재한다. 이것은 아마이드 본드와 리신 옆-체인 아민을 통해서 이다.

비오틴으로 코팅된 표면들은 비오틴과 아비딘 혹은 스트렙타비딘과의 특수성 결합과 관련된 면역 화학에서 가장 실용적인 상호 적용에 필요한 강력한 도구를 제공한다. 이 결합은 위대하고 일정한 친근감을 나타낸다 (10 - 15 M).

폴리스티렌 시각 특성들은 변화하지 않고, 그럼으로 변질된 표면들이 생물학적인 실험들을 할 수 있는 유용한 도구로 사용될 수 있게 한다.

이 표면은 다음과 같은 중요한 실용성을 나타낸다.

- 아비딘과 상호 작용
- 스트렙타비딘과 상호 작용

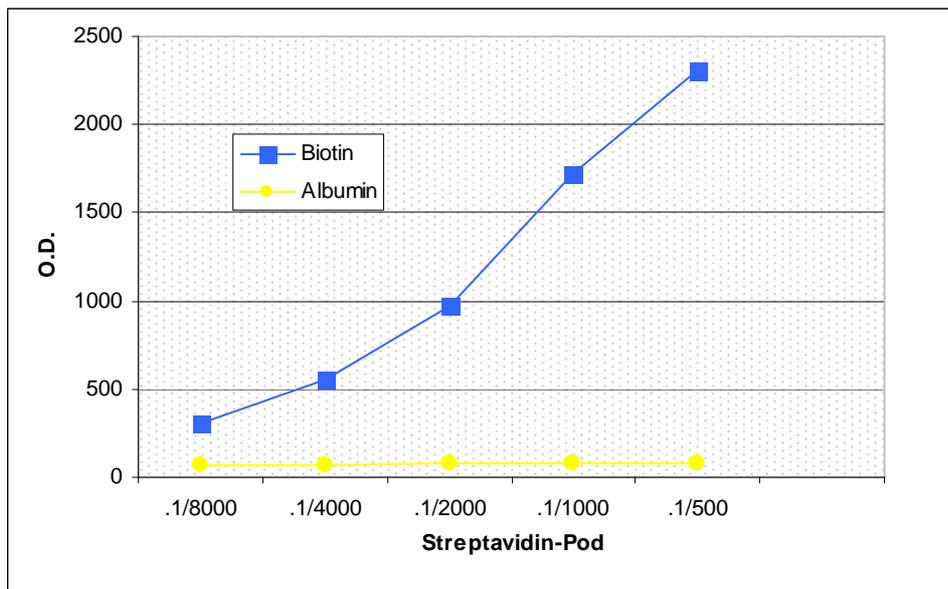
판 (Plate) 들은 이것들을 위해 검사를 하고 보증된다.

- 균일성
- 결합 특수성
- 안정성

비오틴으로 코팅된 표면들

스트렙타비딘 페록시다아제 결합에 대한 특수성 결합의 평가

1. 스트렙타비딘 페록시다아제 결합을 1: 500에서 1: 8000로 0,2 % BSA가 첨가되어 있는 0,1 M PBS pH 7,2로 강도를 약하게 하라.
2. 100 ul의 강도가 약화된 것을 각 비오틴으로 코팅된 판 우물에 첨가하고 60' RT을 배양하라. 같은 용액을 알부민으로 코팅된 판에 첨가하라. 특수성 결합의 평가를 비교하기 위해.
3. 빈 우물들을 대조 표준으로 남겨라.
4. 우물들을 비우고 0,1M PBS pH 7,2 + 0,05% 트윈 (Tween) 으로 스무 번 씻어라.
5. 100 ul /TMB 기질 용액 우물을 첨가하고 10분 동안 실내온도에 배양하라.
6. 기질 반응을 100 ul 유황 산 1 N 을 첨가함으로 중단시키라. 시각 밀도 치수가 450 nm까지.



PRODUCT CATALOGUE

General information above codes	code
96 WELL PLATE 12 X 8 FRAME	MT
96 WELL PLATE SINGLE WELL HOLDING FRAME	MG
96 WELL SOLID PLATE	MC
TUBES	TS

MATERIAL **TRANSPARENT POLYSTYRENE Unless otherwise indicated**
 Strips and plates in black or white polystyrene are available upon request

pack **case**
 sleeve carton

TISSUE CULTURE PRODUCTS

Code	Description	quantity per pack	quantity per case
MC024FL-TC/S	24 well plate Tissue Culture treated- sterile with lid	1	80
MC024F-TC	24 well plate Tissue Culture treated	20	160
MC0FL-TC/S	96 well plate Tissue Culture treated- sterile with lid	1	160
MC0F-TC	96 well plate Tissue Culture treated	25	200
PD 60-TC	Ø 60 mm Petri dish Tissue Culture treated	10	500
PD 90-TC	Ø 90 mm Petri dish Tissue Culture treated	20	500
PD 120-TC	Ø 120 Petri dish Tissue Culture treated	20	360
PD 150-TC	Ø 150 Petri dish Tissue Culture treated	20	160

CRYSTALLIZATION PLATES

Code	Description	quantity per pack	quantity per case
MC0-CR O	96 well protein crystallization plate Under Oil	10	100
MC0-CR 96-2	96 well protein crystallization plate 192 wells	10	100
MC0-CR 96-3	96 well protein crystallization plate 288 wells	10	100

TRANSPARENT BOTTOM PLATES

Code	Description	quantity per pack	quantity per case
MCB-GB-96	96 well plate Black PS - Glass Bottom	5	40
MCB-GB-384	384 well plate Black PS - Glass Bottom	5	40
MCB-GB-1536	1536 well plate Black PS - Glass Bottom	5	40

HTS PLATES

Code	Description	quantity per pack	quantity per case
MCW0F-96	96 well plate White PS	25	200
MCW0F-384	384 well plate White PS	25	200

IMMUNOASSAY PRODUCTS**MEDIUM BINDING CAPACITY**

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT0F2-MB	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	25	200
MG0F-MB	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	25	200
MC0F-MB	96 wells plate - flat bottom	25	200

HIGH BINDING CAPACITY HB8

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT01F2-HB8	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	25	200
MG01F-HB8	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	25	200
MC01F-HB8	96 wells plate - flat bottom	25	200

SPECIAL SURFACES PRODUCTS**NO BINDING CAPACITY**

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT03F2-NB	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	25	200
MG03F-NB	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	25	200
MC03F-NB	96 wells plate - flat bottom	25	200
TS 127503-NB	12 x 75 mm tubes	100	1000-2000

biomat

PRIMARY AMINO GROUPS

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT02F2-AM1	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	10or25	100 or 200
MG02F-AM1	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	10or25	100 or 200
MC02F-AM1	96 wells plate - flat bottom	10or25	100 or 200
TS 127502-AM1	12 x 75 mm tubes	100	1000-2000

SECONDARY AMINO GROUPS

MT02F2-AM2	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	10or25	100 or 200
MG02F-AM2	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	10or25	100 or 200
MC02F-AM2	96 wells plate - flat bottom	10or25	100 or 200
TS 127502-AM2	12 x 75 mm tubes	100	1000-2000

CARBOXYLATED

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT04F2-COOH	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	10or25	100 or 200
MG04F-COOH	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	10or25	100 or 200
MC04F-COOH	96 wells plate – flat bottom	10or25	100 or 200
TS 127504-COOH	12 x 75 mm tubes	100	1000-2000

BIOTIN COATED

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT15F2-BIO	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MG15F-BIO	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MC15F-BIO	96 wells plate - flat bottom	1(sealed barrier bag)	100 or 200
TS 127515-BIO	12 x 75 mm tubes	20	500 or 1000

CALMODULIN COATED

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT14F2-CAL	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MG14F-CAL	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MC14F-CAL	96 wells plate - flat bottom	1(sealed barrier bag)	100 or 200
TS 127514-CAL	12 x 75 mm tubes	20	500 or 1000

biomat

CONCANAVALIN A COATED

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT07F2-CON A	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MG07F-CON A	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MC07F-CON A	96 wells plate - flat bottom	1(sealed barrier bag)	100 or 200
TS 127507-CON A	12 x 75 mm tubes	20	500 or 1000

JACALIN COATED

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT10F2-JAC	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MG10F-JAC	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MC10F-JAC	96 wells plate – flat bottom	1(sealed barrier bag)	100 or 200
TS 127510-JAC	12 x 75 mm tubes	20	500 or 1000

POLY-L-ARGININE COATED

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT13F2-AR	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MG13F-AR	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MC13F-AR	96 wells plate - flat bottom	1(sealed barrier bag)	100 or 200
TS 127513-AR	12 x 75 mm tubes	20	500 or 1000

POLY-D-LYSINE COATED (MW 70.000-150.000)

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT17F2-LY-D	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MG17F-LY-D	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MC17F-LY-D	96 wells plate – flat bottom	1(sealed barrier bag)	100 or 200
TS 127517-LY-D	12 x 75 mm tubes	20	500 or 1000

POLY-L-LYSINE COATED (MW 70.000-150.000)

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT12F2-LY-L	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MG12F-LY-L	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MC12F-LY-L	96 wells plate - flat bottom	1(sealed barrier bag)	100 or 200
TS 127512-LY-L	12 x 75 mm tubes	20	500 or 1000

biomat

PROTEIN A COATED

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT06F2-PA	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MG06F-PA	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MC06F-PA	96 wells plate – flat bottom	1(sealed barrier bag)	100 or 200
TS 127506-PA	12 x 75 mm tubes	20	500 or 1000

PROTEIN G COATED

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT09F2-PG	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MG09F-PG	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MC09F-PG	96 wells plate - flat bottom	1(sealed barrier bag)	100 or 200
TS 127509-PG	12 x 75 mm tubes	20	500 or 1000

STREPTAVIDIN COATED

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT0STF2-SA5/200	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame-coating level 200 ul*	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MG0STF-SA5/200	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame- coating level 200 ul*	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MC0STF-SA5/200	96 wells plate - flat bottom- coating level 200 ul*	1(sealed barrier bag)	50 or 100
TS 12750STF-SA5	12 x 75 mm tubes -Streptavidin coated-coating level 500 ul*	20	500 or 1000

* different coating levels are available upon request

WHEAT GERM COATED

code	description	quantity per pack	quantity per case
MT11F2-WG	1x8 flat bottom wells strips on 12 x 8 frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MG11F-WG	1x8 flat bottom wells strips on single well holding frame	1(sealed barrier bag)	50 or 100
MC11F-WG	96 wells plate - flat bottom	1(sealed barrier bag)	100 or 200
TS 127511-WG	12 x 75 mm tubes	20	500 or 1000

FRAMES FOR MICROPLATES

code	Description	quantity per case
FR1	frame 12 x 8	200
FRG	single well holding frame	200

품질

품질은 각 회사 경영에 있어서 가장 중요하다. 이것은 바이오맷 (biomat) 모든 관점에서 위대한 기준을 성취하게 하였다.

- 바이오맷은 2002년부터 ISO 9001에서 보증되었다.
- 현재는 ISO 9001:2008 보증되어 있다.
- 모든 것은 균일성-안정성-반복성을 위해 검사한다.
- CQ 증명서는 모든 패키지에 포함되어 있다.



CERTIFICATO ◆ CERTIFICADO ◆ CERTIFICAT ◆ 証明書 ◆ CERTIFICATE ◆ ZERTIFIKAT



CERTIFICATO

Nr 50 100 1842 - Rev. 02

Si attesta che / This is to certify that
**IL SISTEMA QUALITÀ DI
 THE QUALITY SYSTEM OF**

BIOMAT S.n.c.
 VIA ZENI 8
 I-38068 ROVERETO (TN)

È CONFORME AI REQUISITI DELLA NORMA
 HAS BEEN FOUND TO COMPLY WITH THE REQUIREMENTS OF
UNI EN ISO 9001:2000

Questo certificato è valido per il seguente campo di applicazione
 This certificate is valid for the following product or service range

**Progettazione e fabbricazione di micropiastre per uso
 diagnostico; progettazione e applicazione di trattamenti
 superficiali per prodotti di uso diagnostico e medicale (EA 14)**
**Design and manufacture of microplates for diagnostic use;
 design and application of surface treatments for diagnostic
 and medical use products (EA 14)**

Data di emissione / Issue date
2008 -05- 28

Per l'Organismo di Certificazione
 For the Certification Body
TUV Italia S.r.l.

Alessio Galazzo
 Technical Responsible



SINCERT
INTERNATIONAL CERTIFICATION

ISO 9001:2000
 ISA Nº 0180
 ISO 9001:2008
 ISO 9001:2004
 ISO 9001:2015

Membro degli Accordi di Mutuo Riconoscimento EA e IAF
 Signatory of EA and IAF Mutual Recognition Agreements

Rinnovo del certificato emesso per la prima volta in data 2002-06-12

"La validità del presente certificato è subordinata a sorveglianza periodica a 12 mesi e al riesame completo del sistema di gestione aziendale con periodicità triennale"

"The validity of the present certificate depends on the annual surveillance every 12 months and on the complete review of company's management system after three-years."

TUV Italia • Gruppo TÜV SÜD • Via Carducci 125, Pal. 23 • 20098 Sesto San Giovanni (MI) • Italia • www.tuv.it TÜV®

Biomat s.n.c. via zeni 8 I-38068 rovereto ITALY
 phone +39-0464-443320/ fax 443159
 e-mail biomat@tin.it <http://www.immunosurface.com>

 Sistema di Qualità ISO 9001-2000
 Certificato n° 50 100 1842

CERTIFICATO DI ANALISI - TEST CERTIFICATE

LOTTO/LOT	ARTICOLO/ARTICLE	C.V (limit 5 %)	data/date
H8187	MG01F- HB8	< 5 %	14/10/04

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.

Biomat certifies that this lot has been manufactured according to applicable standard operating procedures, current ISO 9001:2000 regulation.
 This product has been tested and has passed all established specifications

Metodo di analisi

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

Method of analysis

Coating solution: 2.5 µg/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:

Final control

This product has been tested and approved for the following physical characteristics:

Test	Risultato	Test	Result
esame visivo	approvato	visual examination	approved
aspetto generale	approvato	general appearance	approved
imballaggio	approvato	packaging	approved

Dr. Maurizia Pettenati
 Quality Control manager

Copia conforme al certificato originale firmato e conservato presso i nostri archivi
 Original signed certificate is filed in our offices

환경 정책

환경에 관한 바이오맷의 정책은 바이오맷의 활동으로 인한 환경의 영향에 대한 해답을 다음과 같이 활용한다.

- 포장을 감소시킨다
- 재활용한다
- 간편한 운용

바이오맷은 몇 년 동안 포장에 대한 해답을 연구해왔다. 제품에 같은 보호를 유지하면서 무게를 감소하고 운용시간을 감소하며 고객을 위한 낭비를 감소했다. 현재 포장은 운용 간편한 상자와 완전히 재활용 할 수 있는 열로 인해 수축되는 폴리올레핀 피막을 제품 최후의 상자로 예견하고 있다.

제품에 있는 라벨과 코드는 제품 종류를 간편히 구별하게 한다. 2004년부터 바이오맷은 제조업자들이 원료의 상자 낭비를 감소하는 재활용 정책을 채용했다.



시장들

몇 년 만에 바이오맷은 세계적으로 면역학과 연구 시장에서 경영을 발전시켰다. 그의 70% 이상의 제품과 서비스는 유럽, 미대륙, 아시아와 중동으로 수출되고 있다.

