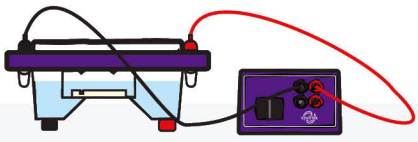
실험 가이드북

2024

ELISA를 이용한 알츠하이머병 연구

RESEARCHING ALZHEIMER'S DISEASE VY ELISA

ED1116



KOREA SCIENTIFICS (주)한국과학

02-929-1110 info@koreasci.com

www.koreasci.com

※ 이 문서는 교육적 목적으로만 사용되어야 하며 그 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

실험 목표

이 실험을 통해 학생들은 대조군과 알츠하이머병 모집단의 시뮬레이션된 샘플을 분석하여 알츠하이머병에 대한 잠재적인 바이오마커를 검사합니다.

제품 구성품

A	10X ELISA Wash Buffer	10X ELISA 세척버퍼
B	ELISA Dilution Buffer	희석 버퍼
C	Antigen (lyophilized)	동결건조된 유청 항원
D	Primary Antibody (lyophilized)	동결건조된 항-유청 항체
E	Secondary Antibody (lyophilized)	동결건조된 2차 항체
F	TMB Substrate	TMB 기질
G	Stop Solution	정지용액

Small transfer pipets

Strip tubes (12-well)

15 mL conical tubes

1.5mL Snap-top microcentrifuge tubes

필요 장비 및 준비물

마이크로 피펫 (5-50uL), 피펫팁

비커 또는 플라스크

증류수, 비커, 일회용 장갑, 고글, 실험용 티슈

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

배경지식

1906 년, 독일의 정신과 의사 알로이스 알츠하이머는 50 세 여성에게서 처음으로 알츠하이머병(Alzheimer's Disease, AD) 사례를 보고했습니다. 그 이후로, 알츠하이머병은 가장 비극적인 신경퇴행성 질환 중 하나로 인식되고 있습니다. AD 는 기억 상실과 신경 기능 장애를 특징으로 하며, 주로 65 세 이상의 인구에서 진단되며, 나이가 들수록 AD 발병 위험이 증가합니다.

AD 는 기억 상실과 인지 능력 저하로 특징지어집니다. 실제로, AD 의 초기 징후와 증상은 보통 스트레스나 피로에 기인하는 경미한 인지 장애일 뿐입니다. 그러나 이러한 증상은 건강한 사람들에게도 매우 흔할 수 있습니다. AD 진단은 지속적인 단기 기억 상실, 가족력, 그리고 시간에 따른 행동 관찰에 기반해야 합니다. 불행히도, PET 및 MRI 스캔을 포함한 뇌 영상 기법은 아직 뇌 스캔만으로 AD 를 확실히 진단할 수 있는 수준에 이르지 못했습니다. AD 의 확정적인 진단은 사후에 뇌 조직을 검사하고 AD 의 분자 마커를 찾는 것으로만 가능합니다.

AD 의 병리 생리학

뇌는 위치와 기능에 따라 여러 엽(Lobe)과 영역(Area)으로 나뉩니다. 뇌의 주요 엽은 뇌간, 두정엽, 소뇌, 전두엽, 측두엽입니다(Figure 1). 뇌간은 심장 박동, 혈압, 호흡 조절 등 생명 유지에 필요한 주요 기능을 담당합니다. 두정엽은 감각 정보를 처리하며, 소뇌는 운동 기능과 움직임을 조절합니다. 전두엽은 실행 결정 및 고차원적 처리에 관여하고, 측두엽은 기억을 담당합니다. 측두엽 안에는 해마라는 영역이 있으며, 이곳에서 모든 새로운 기억이 형성됩니다.

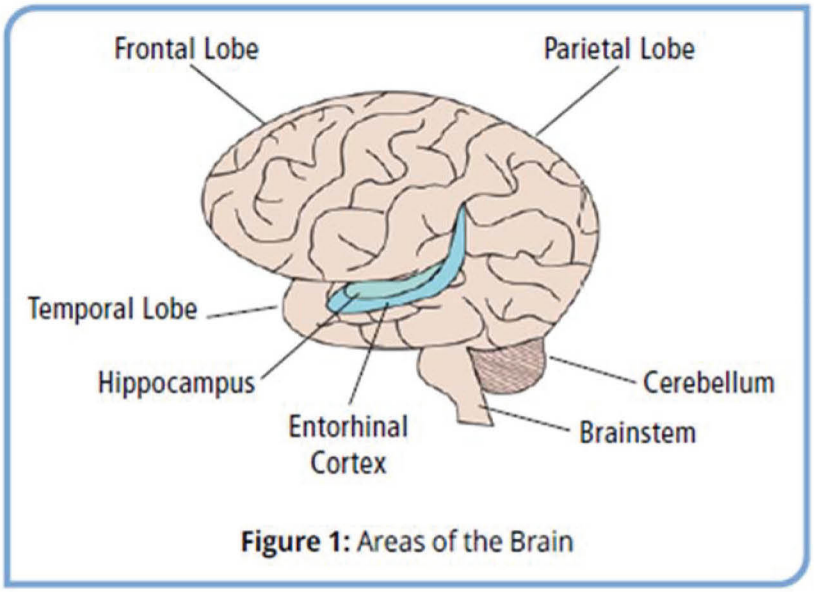


Figure 1: Areas of the Brain

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

1953 년, 환자 HM 에게 측두엽 절제술(측두엽 제거 수술)이 시행되었습니다. 환자 HM 은 약물로 더 이상 치료할 수 없는 난치성 간질을 앓고 있었고, 발작은 측두엽의 과도하게 활동적인 뉴런 때문에 발생했습니다. 의사는 그의 뇌에서 그 부위를 제거하기로 결정했습니다. 수술은 성공적이어서 발작은 멈췄지만, 그는 새로운 기억을 형성할 수 없게 되었습니다. 수술 이전의 모든 기억은 온전했지만, 새로운 정보를 저장할 수 없었습니다. 이 불행한 수술 덕분에 우리는 새로운 기억이 측두엽, 특히 해마에서 형성된다는 것을 알게 되었습니다.

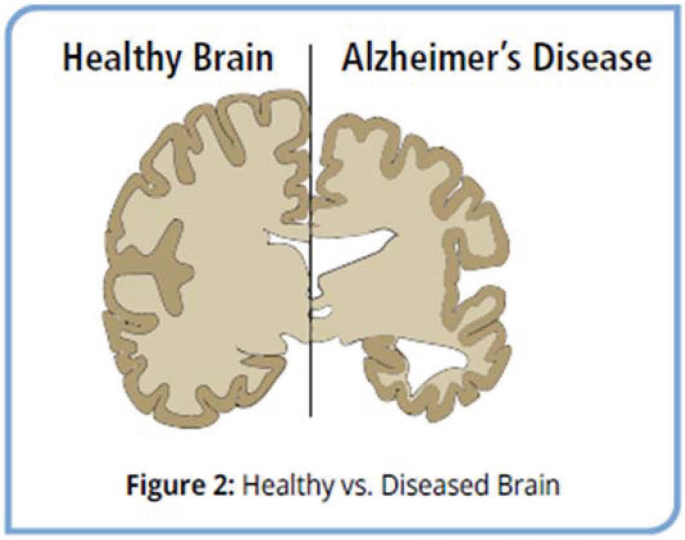


Figure 2: Healthy vs. Diseased Brain

기억이 뇌에서 정확히 어떻게 형성되고 저장되는지는 아직 잘 알려지지 않았습니다. 하지만 해마가 뇌의 다른 영역과 어떻게 소통하는지는 알고 있습니다. 해마는 정보를 전두엽으로 보내며, 전두엽은 정보를 처리하고 실행 결정을 내릴 수 있습니다. 해마와 전두엽을 연결하는 뇌의 영역은 내후각 피질(entorhinal cortex)이라고 합니다. 내후각 피질은 해마와 전두엽 사이에서 정보를 주고받을 수 있어 기억을 통합하는 데 중요한 영역일 수 있습니다. 현재 AD 는 내후각 피질에서 시작하여 점진적으로 뇌 전체로 퍼진다는 것이 잘 알려져 있습니다.

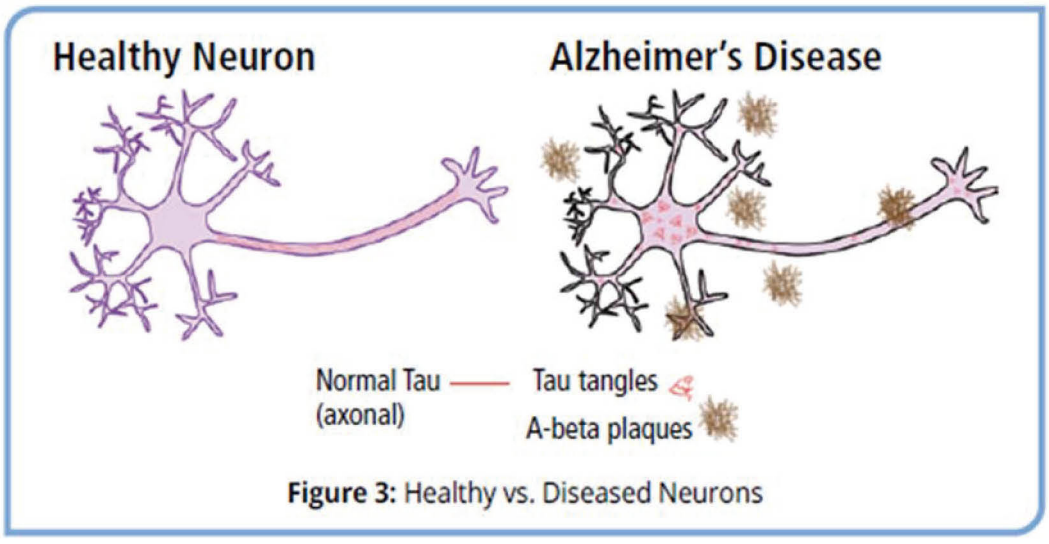


Figure 3: Healthy vs. Diseased Neurons

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

알츠하이머병(AD)에서 내후각 피질에서는 주요 증상으로 광범위한 신경세포 사멸이 일어나며, 이는 변형되고 잘못 접힌 단백질의 축적에 의해 발생합니다. 질병 진행에 중요한 역할을 하는 두 가지 주요 단백질이 있습니다: 아밀로이드 베타(Ab)와 타우(tau)입니다. Ab 는 아밀로이드 전구 단백질(APP- Amyloid Precursor Protein)이라는 더 큰 단백질에서 절단된 작은 펩타이드(단백질)입니다. APP 가 특정 프로테아제에 의해 절단되면 Ab 펩타이드가 형성됩니다. Ab 펩타이드는 서로 응집하여 플라크(Ab 축적의 밀집 영역)를 형성할 수 있습니다. 이러한 플라크는 단백질 수송, 미토콘드리아 활동, 그리고 세포에 중요한 많은 다른 과정들을 방해할 수 있습니다. 반면, 타우는 미세소관 단백질입니다. 미세소관은 세포의 "철도 선로" 역할을 하며, 타우는 미세소관에 결합하여 축삭에서 이를 안정화시킵니다. 정상적으로 타우는 축삭 외부에서 발견되지 않습니다. 그러나 AD 에서는 타우가 세포체와 수상돌기에 잘못 위치하게 됩니다. 이 잘못 위치한 타우는 또한 부적절하게 조절되어 신경섬유 엉킴을 형성합니다. 이러한 엉킴은 세포에 매우 해롭습니다. AD 를 사후 조직에서 감지할 때, 과학자들은 플라크와 엉킴을 염색하여 확인합니다. 이들이 존재하면 환자가 AD 를 앓고 있었음을 의미합니다. Ab 플라크와 타우 엉킴 사이에서, AD 신경세포는 압도되어 죽게 됩니다. 신경세포가 죽으면 재생할 수 없기 때문에, 이는 신체의 대부분 다른 세포와 달리 뇌 손상과 신경퇴행성 질환을 치료하기 어렵게 만듭니다. 또한, 몇몇 신경세포가 죽어도 다른 신경세포들이 보상할 수 있기 때문에 진단이 어려워집니다. 따라서 증상은 많은 신경세포가 죽고 기능을 회복할 수 없을 때까지 나타나지 않을 수 있습니다. 대부분의 알츠하이머병 치료 약물의 임상 시험은 진단이 이루어진 후 시작됩니다. 그러나 진단 시점에는 이미 질병이 뇌를 되돌릴 수 없을 정도로 손상시킨 경우가 많습니다. 따라서 많은 과학자들과 연구 그룹은 뇌에서 대량의 신경세포 손상 이전에 AD 를 조기에 발견하고 진단할 수 있는 검사를 개발하고 있습니다.

알츠하이머병 연구

뇌는 뇌척수액(CSF)이라는 투명하고 무색의 액체에 의해 둘러싸여 있습니다. CSF 는 뇌를 둘러싸고 뇌실(비어 있는 공간)과 척수의 중앙을 채웁니다. CSF 는 뇌실을 둘러싼 특수 세포들에 의해 생성되며, 혈장과 유사합니다. CSF 는 전해질 농도가 높아 뇌의 항상성을 유지하는 데 도움을 줍니다.

알츠하이머병에서 Ab 가 플라크로 축적되면, 플라크는 뇌의 세포외 공간을 차지하고 신경세포에 손상을 줍니다. 이러한 플라크는 증상이 시작되기 최대 20 년 전에 나타나기 시작합니다. 그러나 새로운 약물의 임상 시험은 환자가 이미 진단을 받은 후에만 시작할 수 있습니다. 이 시점에는 너무 많은 신경세포가 죽어 완전한 기억 복원이 불가능합니다. 따라서 과학자들은 알츠하이머병의 조기 경고 신호를 찾아 너무 많은 신경세포가 죽기 전에 질병을 막으려고 합니다. 하나의 질문은 뇌척수액에서 Ab 수준을 측정할 수 있는지 여부와, 그렇다면 질병

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

상태에서 Ab 수준이 어떻게 변화하는지입니다. Ab 수준이 일정하게 유지되는지, 증가하는지, 감소하는지, 그리고 이것이 조기 발견의 마커가 될 수 있는지를 연구하는 것입니다.

이번 실험에서는 알츠하이머병 환자와 나이가 일치하는 건강한 대조군의 모의 뇌척수액(CSF) 샘플을 테스트할 것입니다. 나이가 들면서 CSF 의 Ab 수준이 변할 수 있으므로, 나이가 일치하는 대조군을 사용하는 것이 중요합니다. 샘플을 테스트하기 위해 효소결합 면역흡착 측정법(ELISA)을 사용할 것입니다.

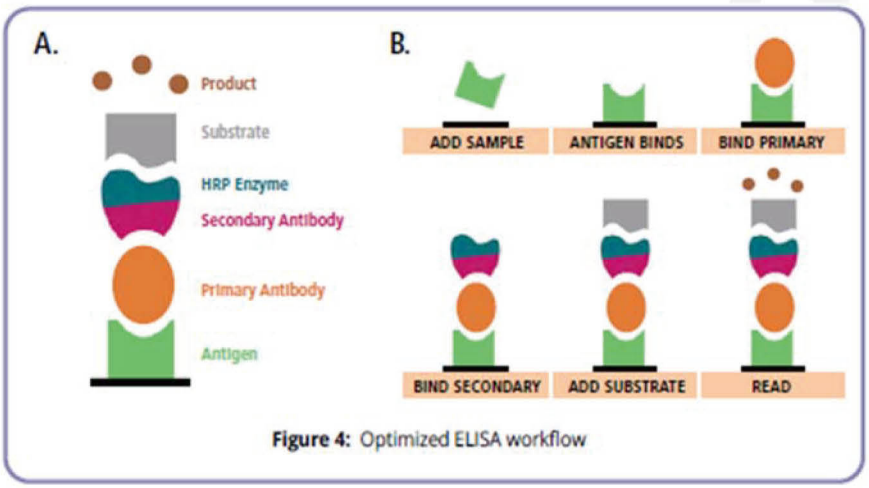


Figure 4: Optimized ELISA workflow

효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA)은 원래 혈액에서 항체를 측정하기 위해 개발되었습니다.

이러한 면역분석법은 뇌척수액(CSF)에 있는 단백질을 포함한 샘플을 성공적으로 검출하도록 개조되었습니다. 이 ELISA 시뮬레이션 실험은 모의 환자의 CSF 에 순환하는 Ab 의 양을 검출하도록 설계되었습니다. ELISA 는 일반적으로 폴리스티렌이나 폴리염화비닐로 만들어진 마이크로타이터 플레이트에서 수행됩니다. 이 플레이트는 약간 투명하며 액체 샘플이 담기는 많은 작은 웰을 포함하고 있습니다.

먼저, 샘플을 웰에 추가하면 단백질이 소수성 결합에 의해 웰의 벽면에 흡착됩니다. 그 후 과잉의 결합되지 않은 단백질은 씻겨 나갑니다. 흡착되지 않은 물질을 씻어낸 후, 웰의 비점유 부위는 일반적으로 소 혈청 알부민과 같은 단백질로 차단되어 플레이트가 단백질로 포화되도록 합니다.

ELISA 분석법은 관심 단백질을 시각화하기 위해 항체를 필요로 합니다. 항체(면역글로불린 또는 Ig 라고도 함)는 면역 체계가 "자기" 단백질이나 다당류와 "비자기" 단백질이나 다당류를 구별할 수 있게 해주는 특수한 단백질입니다. 과학 연구에 사용되는 항체는 동물(예: 토끼, 쥐, 기니피그)에 항원을 주입했을 때 면역 반응으로 생성됩니다. 면역 반응은 항원에 특이적인 항체를 생성하며, 이는 혈청에서 정제됩니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

전통적인 ELISA 는 두 가지 항체를 필요로 합니다. 일차 항체라고 불리는 한 항체는 관심 단백질을 인식합니다. 예를 들어, Ab 단백질을 검출하는 ELISA 는 Ab 에 특이적으로 결합하는 항체를 사용할 것입니다. 이차 항체는 일차 항체를 인식합니다 - 만약 토끼가 우리의 일차 항체를 생산했다면, 우리는 토끼 항체를 인식하는 이차 항체를 사용할 것입니다. 이차 항체는 항체-항원 복합체의 존재를 감지할 수 있게 해주는 호스래디시 퍼옥시다제(HRP)라는 효소와 공유 결합되어 있습니다(Figure 4). HRP 는 높은 촉매 활성을 가지고 있어 - 기질 전환율이 초당 100 을 초과합니다 - 아주 적은 양의 항원도 빠르게 검출할 수 있습니다.

이 실험에서는 ELISA 를 사용하여 알츠하이머병 환자와 연령이 일치하는 대조군에서 채취한 모의 CSF 샘플을 테스트할 것입니다. 이 신속한 검사는 1 시간 이내에 완료할 수 있으며 CSF 에서 Ab 단백질의 존재를 검출할 수 있습니다. 환자 및 대조군 샘플과 비교하기 위해 표준 곡선을 만들 것입니다.

실험 전 준비 개요

현재 연구에 따르면 알츠하이머병에 대한 높은 특이적 마커는 감소된 Aβ42 와 CSF(cerebrospinal fluid-뇌척수액)내에서 증가된 tau 수치의 조합입니다. (Aβ에는 다양한 중합체 oligomer 가 이들 중 Aβ42 는 가장 독성이 있음). 그렇기에 학생들에게 Aβ수치가 낮은 AD(Alzheimer Disease)환자 샘플 5 개와 Aβ수치가 높은 대조군 환자 샘플 5 개를 준비해 각 조마다 나눠줍니다. 실험 전 샘플, 항체 및 완충액을 준비해야 합니다. 모든 구성 요소는 실험 전 필요시까지 4℃ 온도의 어두운 곳에서 보관해야 합니다.

실험 준비	준비할 것	준비 시간	소요 시간
모듈 I: ELISA 수행	1X 세척 완충액 준비	언제든지	5 분
	항원 준비	최대 실험 1 주일 전	5 분
	1 차 항체 준비	최대 실험 1 주일 전	5 분
	2 차 항체 준비	**실험 하루 전**	**5 분**
	ABTS 준비	최대 실험 1 주일 전	5 분
	시약 분주	최대 실험 1 주일 전	30 분

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

실험 전 준비

1X ELISA 세척 완충액(Wash Buffer) 준비

1. 10X ELISA 세척 완충액(A)를 모두 증류수 525mL 와 섞은 후 "1X wash buffer"로 표기합니다.
2. 각 조마다 작은 비커를 나눠주고 여기에 55mL 씩 넣은 후 "Wash Buffer"로 표기합니다.

희석 완충액(Dilution Buffer) 준비

10 개의 원심분리기 튜브에 ELISA Dilution Buffer(B) 1mL 씩 담고 "Dilution Buffer"라고 적습니다.

대조군과 AD(알츠하이머 질병) 환자 샘플 준비

1. ELISA Dilution Buffer(튜브 B) 7mL 를 15mL 코니칼튜브에 옮겨 담습니다. "Antigen"이라고 표기합니다.
2. 1 번에서 만든 희석 완충액에서 0.5mL 를 Antigen(C) 바이알병에 넣습니다. 피펫팅 또는 볼텍스를 이용해 잘 섞도록 합니다.
3. 잘 섞은 antigen 모두를 다시 15mL 코니칼튜브에 넣습니다.
4. 10 개의 원심분리기 튜브에 Antigen 120μL 씩 담고 "Antigen"으로 표기합니다.
5. 또 다른 10 개의 원심분리기 튜브에 Antigen 175μL 씩 담고 "Positive Control"로 표기합니다.
6. 또 다른 10 개의 원심분리기 튜브에 Dilution Buffer(튜브 B)를 175μL 씩 담고 "Negative Control"로 표기합니다.

위 과정에서 남은 항원은 100μg/mL 농도이며 환자 샘플을 만들기위해 희석해야 합니다. 원심분리기 튜브에 환자 번호를 표시하고 Dilution Buffer(B)와 항원을 사용해 표시된 샘플을 준비합니다. 이 환자들의 신원은 실험 시작시에 공개할 수 있습니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

7. 양성 A 환자 샘플(환자 1, 환자 2, 환자 3, 환자 4)을 준비하기 위해 원심분리기 튜브에 Table2 를 참조해 희석합니다. 각 튜브에는 최대 3 조에 대한 충분한 샘플이 들어있습니다. 튜브를 살짝 볼텍싱하거나 가볍게 두드려 섞습니다.
8. 각각의 양성 환자에 대해 3 개의 원심분리기 튜브에 표기합니다. 각 샘플의 175µL 씩 튜브에 넣습니다.
9. 모의 음성 AD 환자 샘플(환자 5, 6, 7, 8, 9)을 준비하기 위해 2 개의 원심분리기 튜브에 각 음성 환자를 적고 Dilution Buffer(B) 175µL 씩 넣습니다.

각 조마다 1 개의 양성(positive), 1 개의 음성(negative) 환자 샘플, 그리고 최소 2 개의 환자 샘플을 무작위로 나눠줘야 합니다.

주의: 환자 샘플에 가상의 이름을 지정하거나 환자 번호를 혼합하여 양성 및 음성 샘플이 더 균등하게 분배되도록 할 수 있습니다.

Table 2: Dilutions of Patient Samples

	Patient #	Vol. of Dilution Buffer (B)	Vol. of Antigen (C)	Final Concentration	Number of Aliquots (175 µL/tube)
Positive	Patient 1	300 µL	300 µL	50 µg/mL	3
	Patient 2	525 µL	75 µL	12.5 µg/mL	3
	Patient 3	580 µL	20 µL	3.33 µg/mL	3
	Patient 4	590 µL	10 µL	1.66 µg/mL	3
Negative	Patient 5	400 µL	---	---	2
	Patient 6	400 µL	---	---	2
	Patient 7	400 µL	---	---	2
	Patient 8	400 µL	---	---	2
	Patient 9	400 µL	---	---	2

1 차 항체(Primary Antibody) 준비

1. ELISA 희석 완충액(B) 14mL 를 15mL 코니컬튜브에 넣고 "1°AB"라고 표기합니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

2. Primary Antibody(D) 뚜껑을 조심스럽게 제거합니다. "1°AB" 코니컬튜브에서 0.5mL 를 덜어내어 Primary Antibody 에 넣고 뚜껑을 닫은 후 잘 흔들어 섞습니다.
3. 재구성된 Primary Antibody 모두를 1 번 과정의 15mL 코니컬튜브에 모두 옮긴 후 잘 섞습니다.
4. 10 개의 원심분리기 튜브에 "1°AB"로 표기한 후 각 튜브에 1.3mL 씩 담습니다.

2 차 항체(Secondary Antibody) 희석

1. ELISA Dilution Buffer(B) 14mL 를 15mL 코니컬 튜브에 넣습니다. "2°AB"라고 표기합니다.
2. Secondary Antibody(E) 뚜껑을 조심스럽게 제거합니다. "2°AB" 코니컬 튜브에서 0.5mL 를 덜어내어 Secondary Antibody 에 넣고 뚜껑을 닫은 후 잘 흔들어 섞습니다.
3. 재구성된 Secondary Antibody 모두를 1 번 과정의 15mL 코니컬튜브에 모두 옮긴 후 잘 섞습니다.
4. 10 개의 원심분리기 튜브에 "2°AB"로 표기한 후 각 튜브에 1.3mL 씩 담습니다.

TMB 기질(TMB Substrate) 준비

- 1.3mL TMB Substrate(F)를 10 개의 원심분리기 튜브에 담고 "Substrate"로 표기합니다.

정지액(Stop Solution) 준비

- 1.3mL Stop Solution(G)를 10 개의 원심분리기 튜브에 담고 "Stop"으로 표기합니다.

각 조당 받아야할 시약들

2 12-well strip tubes

1 Wash Buffer 비커 (55 mL)

1 Tube Dilution Buffer (1 mL)

1 Tube Antigen (120 µL)

1 Tube Positive Control (175 µL)

1 Tube Negative Control (175 µL)

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

1 Tube first patient sample (175 µL)

1 Tube second patient sample (175 µL)

1 Tube Primary Antibody (1.3 mL)

1 Tube Secondary antibody (1.3 mL)

1 Tube Substrate (1.3 mL)

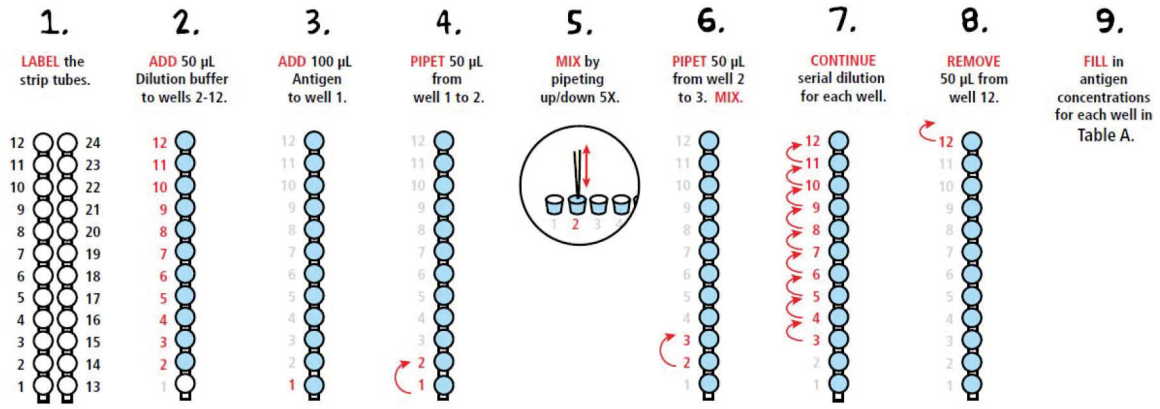
1 Tube Stop Solution (1.3 mL)

1 피펫

1 폐용액 수집용 비커

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

실험 - 모듈 I: ELISA 수행



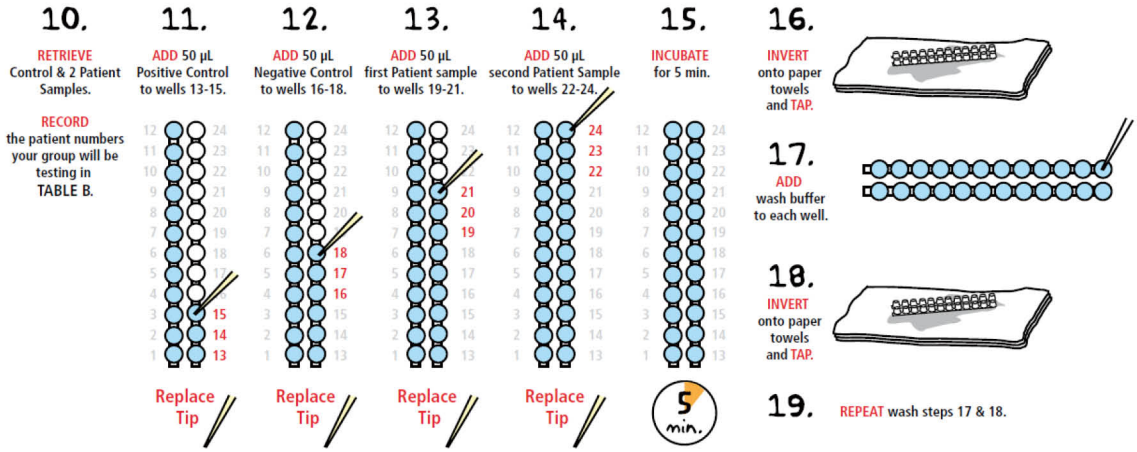
표준 곡선(Standard Curve) 준비

1. 12-well 스트립 튜브 2 개를 받습니다. 끝이 뾰족한 네임펜으로 한 스트립에는 1-12, 다른 스트립에는 13-24 숫자를 적습니다. 1-12 웰은 "Standard Curve Strip" 13-24 웰은 "Patient Sample Strip"이 될 예정입니다. 지금은 13-24 번 스트립의 웰을 한 쪽에 놓아 둡니다.
2. Dilution Buffer 50µL 씩 2-12 번 웰에 넣어줍니다.
3. 100µL 항원을 #1 번 웰에 넣습니다. 이 항원은 100µg/mL 의 농도로 제공됩니다.
4. #1 번 웰에서 50µL 를 #2 번 웰로 옮깁니다.
5. 피펫팅으로 샘플이 잘 섞이도록 합니다.
6. 같은 피펫팁을 사용해 #2 번 웰에서 50µL 를 #3 번 웰로 옮긴 후 피펫팅으로 잘 섞습니다.
7. 각 웰마다 위와 같은 방법으로 희석과정을 #12 번 웰까지 진행합니다.
8. #12 번 웰에서 희석된 항원 50µL 를 빼내 버립니다.
9. 방해받지 않는 안전한 장소로 스트립을 놔둡니다. 아래 Table A 에 희석(1:2, 1:4.....)과 항원 농도(µL/mL)를 기록합니다.

Table A: Dilutions and Concentrations

Well #	1	2	3	4	5	6
Dilution	---					
Concentration	100 µg/mL					
Well #	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Dilution						
Concentration						

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.



대조군(Control)과 환자 샘플 로딩

10. 양성대조군, 음성대조군, 2 개의 환자 샘플을 가지고 Table B 표에 환자 번호를 적습니다.

11. 마이크로피펫으로 양성 대조군(Positive Sample) 50µL 씩 13-15 번 웰에 넣습니다.

12. 음성 대조군(Negative Sample) 50µL 씩 16-18 번 웰에 넣습니다.

13. 첫 번째 환자 샘플을 50µL 씩 19-21 번 웰에 넣습니다.

14. 두 번째 환자 샘플을 50µL 씩 22-24 번 웰에 넣습니다.

15. 9 번 과정에서 표준 곡선 스트립을 실온에서 5 분간 배양합니다.

이 과정동안 샘플 안의 단백질은 웰의 플라스틱 표면에 붙게 됩니다.

샘플 제거와 웰 세척

16. 스트립을 페이퍼타월 위에 뒤집고 가볍게 두드려 샘플을 제거합니다.

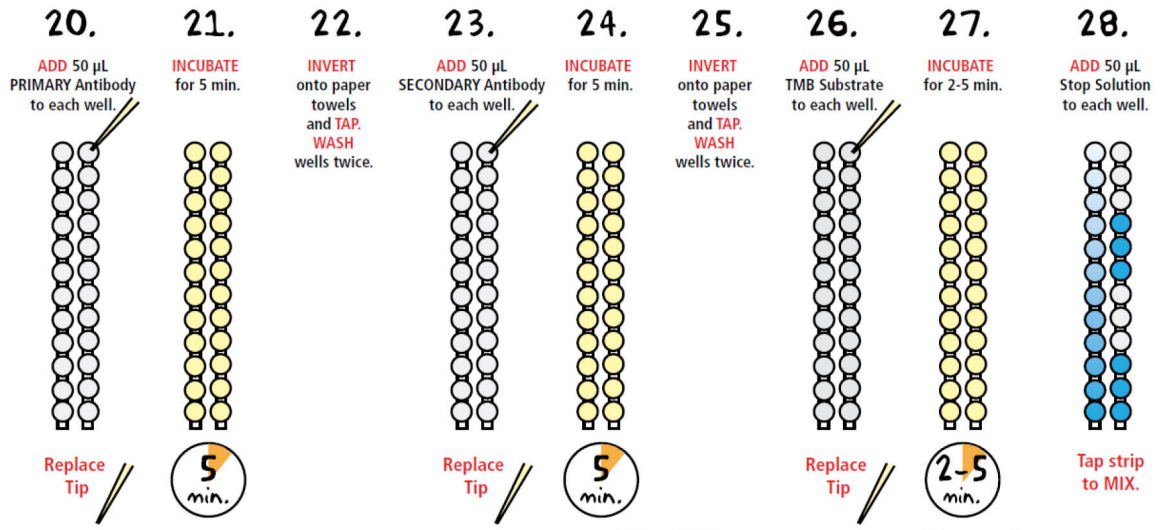
17. 세척 완충액(Wash Buffer)를 각 웰마다 200µL 씩 채웁니다. (넘치지 않게 주의합니다.)

18. 16 번 과정부터 다시 반복합니다.

19. 세척 과정을 다시 진행하고 페이퍼 타월에 스트립을 뒤집습니다.

세척완충액은 플라스틱을 포화시키기 위한 차단 화합물(blocking compound)을 가지고 있기에 평상시 필요한 차단 단계를 건너뛸 수 있습니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.



1 차 항체와 2 차 항체 첨가

20. 새로운 피펫팁을 사용해 1 차 항체 1°AB 50µL 씩 각 웰에 넣습니다.
21. 5 분간 상온에서 배양합니다. 이 때 1 차 항체는 웰에 고정된 모든 항원과 결합합니다.
22. 페이퍼 타월에 뒤집어 샘플을 제거합니다. 16-19 번 과정을 반복해 웰을 세척합니다.
23. 새로운 피펫팁을 사용해 2 차 항체 2°AB 50µL 씩 각 웰에 넣습니다.
24. 5 분간 상온에서 배양합니다. 이 때 2 차 항체는 웰에 1 차 항체와 결합합니다.
25. 페이퍼 타월에 뒤집어 샘플을 제거합니다. 16-19 번 과정을 반복해 웰을 세척합니다.

기질(Substrate) 추가

26. 새로운 피펫팁을 사용해 기질을 50µL 씩 각 웰에 넣습니다.
27. 상온에서 2-5 분 배양합니다. 농도가 가장 높은 웰에서 색 변화가 더 이상 일어나지 않을 때까지 배양합니다.

※ **기질의 최고 농도에서는 효소 반응이 포화될 수 있기에 최대 10 분을 넘기지 않도록 주의합니다.**

28. 새로운 피펫팁을 사용해 정지액(Stop solution) 50µL 씩 각 웰에 넣고 잘 섞습니다.
29. 바로 다음 **모듈 II: ELISA 분석**으로 넘어갑니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

모듈 II: 정량적 ELISA 결과 분석

1. ELISA 가 성공적으로 이뤄졌는지 양성, 음성 샘플의 반응 색을 확인합니다.

참고: 스트립 튜브를 흰색 종이나 라이트 박스에 올려놓으면 색구별이 수월합니다.

2. 표준곡선(Standard Curve) 스트립을 참조해 대조군 환자와 AD 환자 샘플의 농도를 계산합니다. 결과를 Table B 에 기록합니다.

3. 다른 그룹과 결과를 공유하고 각 환자의 농도를 Table C 에 기록합니다.

Table B: Identification of Patient Samples

Well #	13	14	15	16	17	18
Sample	Positive Control			Negative Control		
Concentration						
Well #	19	20	21	22	23	24
Patient Sample #						
Concentration						
Diagnosis						

Table C: Concentration of Patient Samples

Group #	Patient Sample #	Concentration	Group #	Patient Sample #	Concentration

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

탐구 활동

실험 분석

1. 어떤 환자가 CSF 에 더 많은 항원을 가지고 있습니까? 이 환자들은 알츠하이머병에 대해 음성인가요 양성인가요?

2. 위 질문의 답을 설명하기 위한 가설을 세웁니다.

3. 알츠하이머병 바이오마커를 연구하고 있다면 다음에 할 실험은 무엇입니까?

연구 질문

1. 알츠하이머병이란?

2. 주요 위험인자는 무엇인가요?

3. 치료제를 찾기 어려운 이유는 무엇인가요?

4. 같은 연령의 대조군을 비교하는 이유는 무엇인가요?

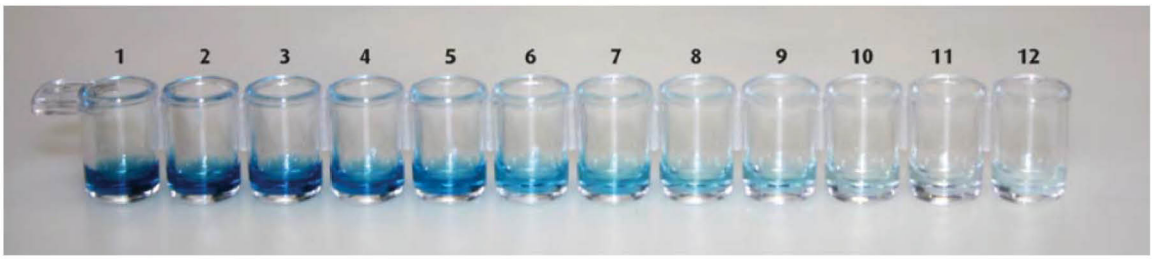
5. 생명공학이 어떻게 알츠하이머병을 치료하는데 도움이 되나요?

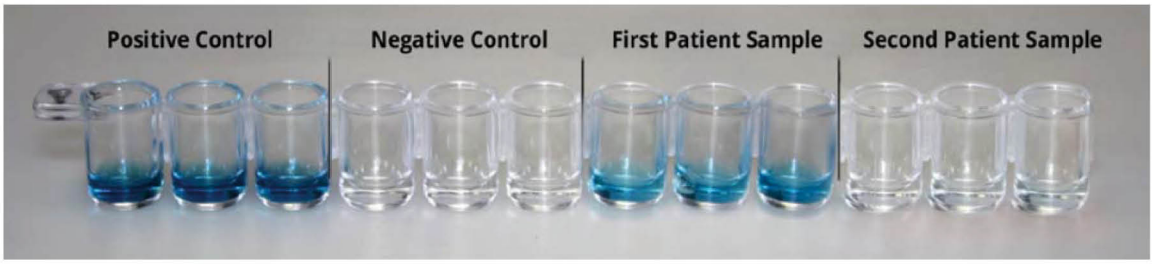
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

결과 분석

항원의 유무 및 각 환자의 수준은 양성 및 음성 대조군 샘플에서 확인되어야 합니다. 파란색이 나타난 웰은 양성반응 결과이며 박테리아 감염을 나타냅니다. 음성 환자의 샘플에서는 색변화가 없습니다. 환자 샘플을 표준 곡선과 비교하여 각 반응에서 항원의 농도를 결정합니다.

일반적인 실험 결과는 다음 사진과 같습니다.





★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.