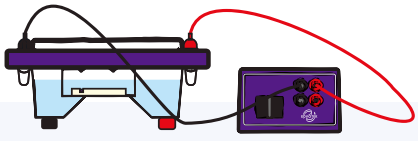
ELISA를 이용한 알츠하이머병 연구

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	정지액

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.

실험 전 준비 개요

현재 연구에 따르면 알츠하이머병에 대한 높은 특이적 마커 하나는 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

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.

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

2. 1 번에서 만든 희석 완충액에서 0.5mL 를 Antigen(C) 바이알병에 넣습니다. 피펫팅 또는 볼텍스를 이용해 잘 섞도록 합니다.
3. 재구성한 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.

재수화(rehydration) 후에 항원 스톡(stock)은 100µg/mL 용액이 되며 환자 샘플생성시 희석해야 합니다. 원심분리기 튜브에 환자 번호를 표시하고 Dilution Buffer(B)와 항원 stock 을 사용해 표시된 샘플을 준비합니다. 이 환자들의 신원은 실험 시작시에 공개할 수 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.

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

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

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.

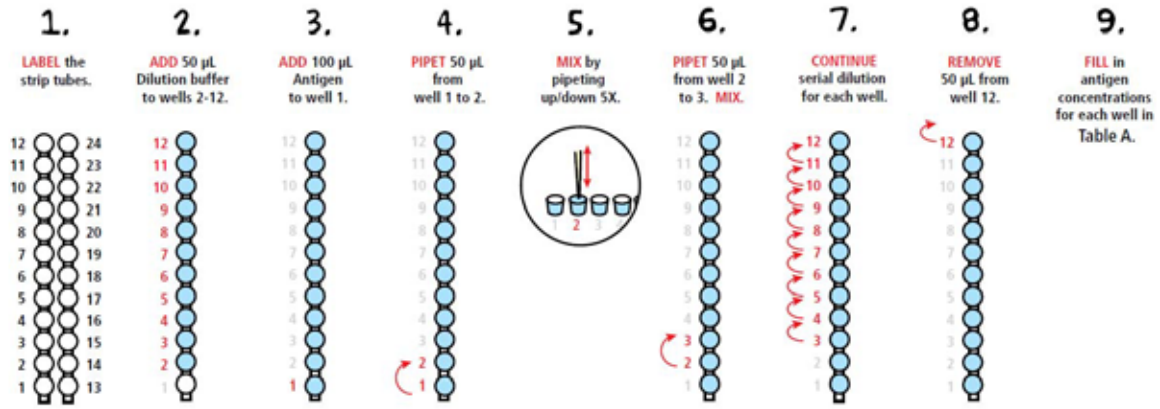
각 조당 받아야할 시약들

Each Lab Group Should Receive:

2	12-well strip tubes
1	Beaker of Wash Buffer (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)
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	Transfer pipet
1	Empty beaker for waste

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

실험 - 모듈 I: ELISA 수행



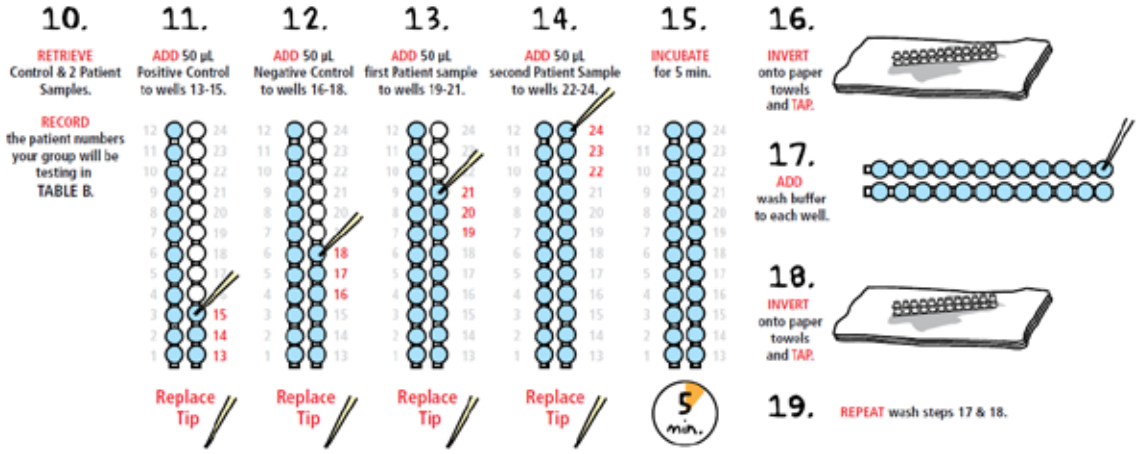
표준 곡선(Standard Curve) 준비

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.

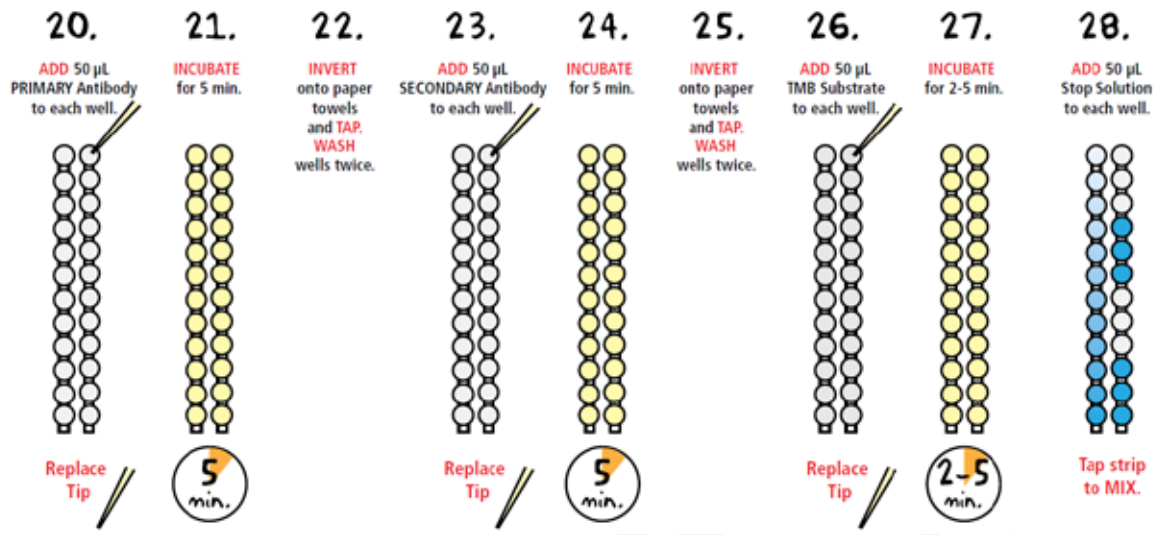
17. 세척 완충액(Wash Buffer)를 각 웰마다 200µL 씩 채웁니다. (넘치지 않게 주의합니다.)

18. 16 번 과정부터 다시 반복합니다.

19. 세척 과정을 다시 진행하고 페이퍼 타월에 스트립을 뒤집습니다.

세척완충액은 플라스틱을 포화상태로 만드는 차단 컴파운드를 가지고 있기에 평상시 필요한 블록킹 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. 표준 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?

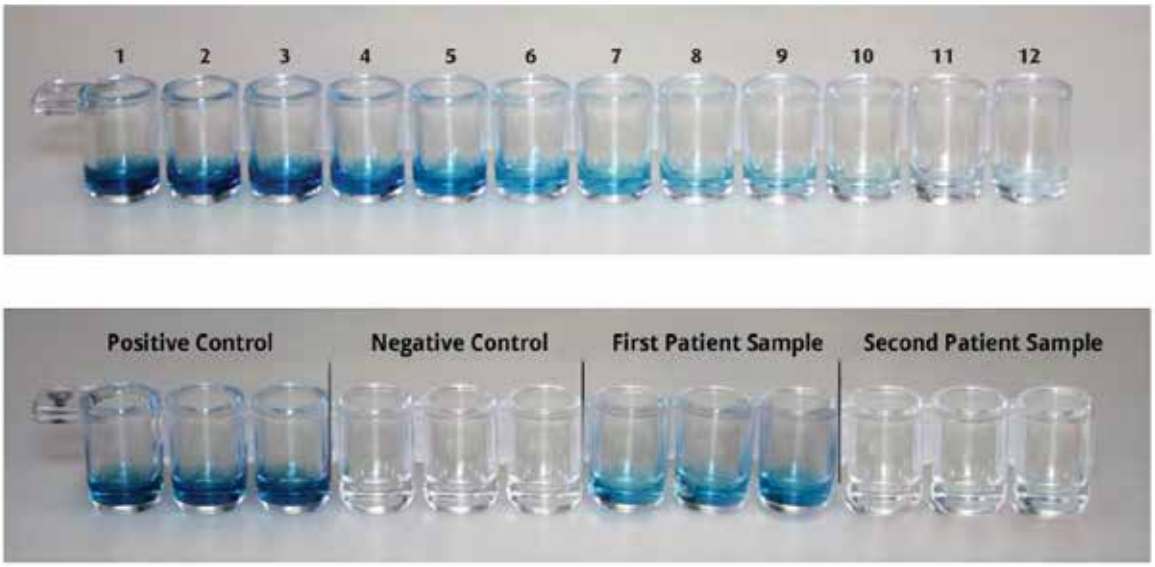
5. 생명공학이 어떻게 알츠하이머병을 치료하는데 도움이 되나요?

★ 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.