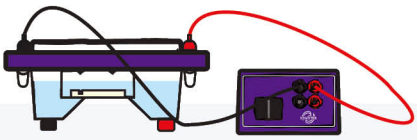
실험 가이드북

2024

ELISA를 이용한 정량적 음식 알레르기 검사

What's In My Lunch? Quantitative Milk Allergy ELISA

ED266



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 ELISA의 이면에 있는 개념과 방법을 학습합니다. 다양한 식품에서 유청 단백질의 존재를 ELISA를 통해 검출합니다. 각 샘플의 유청 농도를 정량화하기 위해 표준곡선(Standard Curve)를 작성합니다.

제품 구성품

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

Strip tubes (8-well)

Snap-top microcentrifuge tubes

Homogenization pestles with tubes

15 mL conical tubes

Transfer pipets

필요 장비 및 준비물

실험용 다양한 음식 샘플

증류수, 비커, 일회용 장갑, 고글, 실험용 티슈

마이크로 피펫 (5-50ul, 100-1000ul), 피펫팁

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

실험전 준비 개요

샘플 준비

다양한 유제품 또는 비유제품을 테스트할 수 있습니다. 학생에게 자신의 샘플을 가져오도록 합니다. 실험결과는 제품 브랜드에 다르지만 보통은 Table 5 의 표와 같은 결과가 나옵니다.

Table 5: 유제품에서 예상되는 결과

실험 제품	ELISA 색상 변화
우유	어두움
두유	없음
단백질 음료	밝음
커피용 크리머	밝음
신선한 크림	밝거나 어두움
치즈	밝음
요거트	밝거나 어두움
아이스크림	밝거나 어두움
비유청 요거트	없음
비유청 아이스크림	밝음
쿠키 / 케이크	없거나 밝음
샐러드 드레싱	밝음
버터	없음
캔디바	밝음
에너지/프로틴 바	어두움

스트립 튜브 준비

이 키트에는 15 개의 스트립 튜브가 제공됩니다. 실험을 위해 각 학생마다 하나의 스트립(8 개의 웰)이 표준곡선(standard curve)에 필요하며 식품 샘플에 대해 절반의 스트립(4 개의 웰)이 필요합니다.

모듈 III-B 를 위한 컴퓨팅

정량적 분석을 수행하기 위해서 학생들은 최적의 곡선을 찾을 수 있는 그래프 프로그램과 컴퓨터가 필요합니다. 12 개의 웰을 비교하기 위해 여러 프로그램을 사용할 수 있습니다.

ImageJ(버전 1.49 이상 0 을 권장합니다. 이 프로그램은 미국 국립보건원(National Institute of Health)이 개발한 이미지 처리 프로그램입니다. 공개 버전이므로 자유롭게 다운로드 가능합니다.

자세한 정보는 다음 링크에서 찾을 수 있습니다.

http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html

ImageJ 프로그램 실행시 컴퓨터에 Java 가 실행되어야 합니다.

샘플 제거와 well 세척

학생들은 모듈 II 에서 샘플 제거를 위해 스트립을 뒤집는 대신에 피펫을 사용해 샘플과 버퍼를 세척할 수 있습니다. 각각의 웰 세척시에는 새로운 피펫 또는 피펫팁으로 교체하는 것이 중요합니다.

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

세척 버퍼 준비

1. 10x ELISA 세척 완충액(A)를 모두 180mL 증류수에 넣고 잘 섞습니다.
2. 10 그룹마다 18mL 작은 비커를 나눠줍니다. 비커에 "Wash Buffer"로 레이블을 적습니다.

샘플용 버퍼 준비

1. 250mL 비커/플라스크에서 150mL 증류수에 7mL ELISA 희석 완충액(B)을 희석합니다.
2. 1 단계의 희석액 13mL 를 작은 비커 10 개에 넣습니다. "food Dilution Buffer"로 표기합니다.
3. 1 단계의 희석액 1mL 를 원심분리기 튜브 10 개에 넣고 "Standard Curve Buffer"
4. 다음 단계를 위해 나머지 ELISA 희석 완충액(B)를 보관합니다.

표준 곡선을 위한 Whey Antigen 준비

1. ELISA 희석 완충액(튜브 B) 7mL 를 15mL 코니칼튜브로 옮깁니다. "Antigen"이라고 표기합니다.
2. 동결건조된 항원(튜브 C) 뚜껑을 조심스럽게 열어 위 1 번과정의 튜브에서 0.5mL ELISA 희석 완충액을 옮깁니다. 뚜껑을 닫고 바이알병을 부드럽게 흔들어 섞습니다.
3. 재수화된 항원 0.25mL(250uL)를 1 번 과정의 코니칼튜브에 다시 옮겨 담고 잘 섞습니다.
4. 원심분리기 튜브 10 개에 "Whey Antigen"이라고 표기하고 위에서 준비한 용액을 200uL 씩 넣습니다.

1 차 항체 준비

1. ELISA 희석 버퍼(튜브 B) 7mL 를 15mL 코니칼튜브에 넣고 "Primary Antibody"라고 표기합니다.
2. 동결건조된 1 차 항체(튜브 D)의 바이알에서 뚜껑을 조심스럽게 제거하고 1 번 과정의 튜브에서 약 0.5mL 의 ELISA 희석 완충액을 옮겨 담습니다. 뚜껑을 닫고 바이알을 부드럽게 흔들어 섞습니다.
3. 재수화된 1 차 항체 모두를 코니칼튜브에 다시 옮긴 후 잘 섞습니다.
4. 원심분리기 튜브 10 개에 "Primary Antibody"로 표기하고 700uL 씩 나눠 담습니다.

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

2 차 항체 준비

(주의: 실험 당일에 준비합니다.)

1. ELISA 희석 버퍼(튜브 B) 7mL 를 15mL 코니칼튜브에 넣고 "Secondary Antibody"라고 표기합니다.
2. 동결건조된 2 차 항체(튜브 E)의 바이알에서 뚜껑을 조심스럽게 제거하고 1 번 과정의 튜브에서 약 0.5mL 의 ELISA 희석 완충액을 옮겨 담습니다. 뚜껑을 닫고 바이알을 부드럽게 흔들어 섞습니다.
3. 재수화된 2 차 항체 모두를 코니칼튜브에 다시 옮긴 후 잘 섞습니다.
4. 원심분리기 튜브 10 개에 "Secondary Antibody"로 표기하고 700uL 씩 나눠 담습니다.

TMB 기질과 정지액 준비

1. TMB Substrate (튜브 F) 700uL 씩 10 개의 원심분리기 튜브 나눠 넣고 "Substrate"라고 표기합니다.
2. 정지액(Stop Solution) (튜브 G) 700uL 씩 10 개의 원심분리기 튜브 나눠 넣고 "Stop"라고 표기합니다.

각 그룹당 받아야하는 준비물

모듈 I:

- 13 mL Food Dilution Buffer
- Food Sample for analysis
- 15 mL conical tube
- 3 microcentrifuge tubes
- 1 tube with pestle (for solid foods)

모듈 II:

- One 8-well strip and one 4-well strip

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

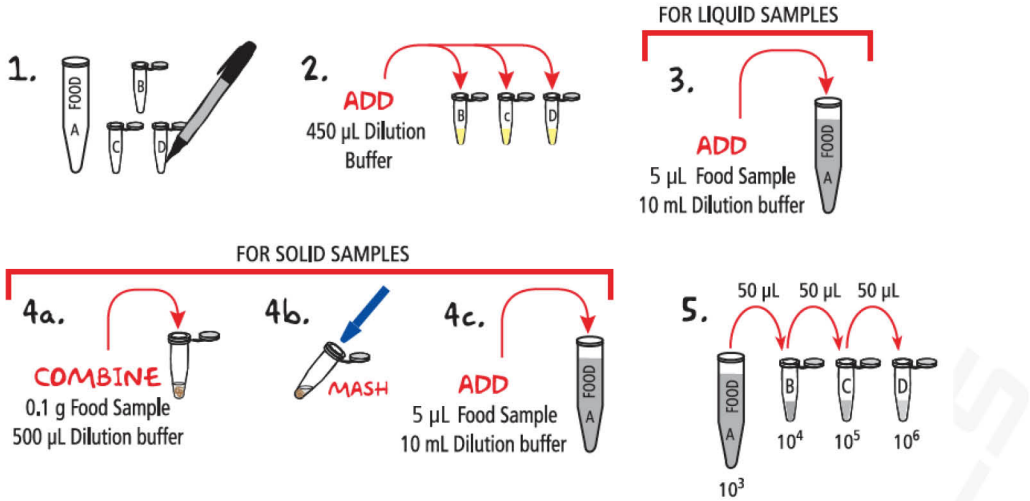
- 18 mL Wash Buffer
- 1 mL Standard Curve Buffer
- 200 µL Whey Antigen
- 700 µL Primary Antibody
- 700 µL Secondary Antibody
- 700 µL Substrate
- 700 µL Stop Solution
- 마이크로 피펫, 피펫팁
- 피펫
- 빈 비커
- 페이퍼 타월

모듈 III:

- 컴퓨터와 그래프 프로그램

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

모듈I : 음식 샘플의 준비



1. 15mL 튜브에 가져온 식품의 이름을 적고 3개의 원심분리기 튜브에는 각각 "A", "B", "C"로 표기합니다.
2. 샘플용 희석버퍼 450uL를 각각의 원심분리기 튜브에 넣습니다.
3. 샘플이 액체라면:
   A. 15mL 샘플 튜브에 샘플 5uL와 10mL 샘플용 희석버퍼를 섞어 $1x10^3$ 희석액을 만들고 잘 섞습니다. 다음 바로 5번째 과정으로 넘어갑니다.
4. 샘플이 고체라면:
   A. 원심분리기 튜브에 0.1g 식품샘플을 넣고 샘플용 희석버퍼 500uL를 넣습니다.
   B. 플라스틱 막대(pestle)을 이용해 완전히 으깹니다.
   C. 으깨진 샘플 용액 5uL와 샘플용 희석버퍼 10mL를 15mL 튜브에 넣어 $1x10^3$ 희석액을 만들고 잘 섞습니다.
5. 식품 샘플의 단계별 농도의 희석액을 준비합니다. $1x10^3$ 음식샘플 "A"로 표기한 튜브에서 50uL를 "B"튜브에 넣습니다. $1x10^4$ 음식샘플 "B"튜브에서 50uL를 "C"튜브에 넣습니다. 다시 튜브"C"에서 50uL를 튜브"D"에 넣고 잘 섞습니다.
6. 모듈 II를 수행합니다.

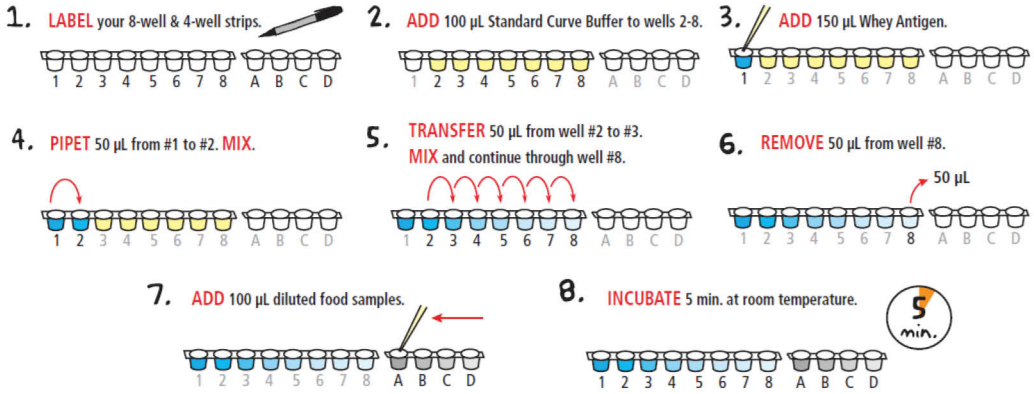
Table 2: Food Product Dilutions and Concentrations

Well	A	B	C	D
Concentration	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$
Dilution	Food sample dilution prepared in step 3 or 4	50 µL of $1:10^3$ (A) sample + 450 µL food dilution buffer	50 µL of $1:10^4$ (B) sample + 450 µL food dilution buffer	50 µL of $1:10^5$ (C) sample + 450 µL food dilution buffer

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

모듈II : ELISA에 의한 알레르기 항원 검출

이 모듈에서는 whey protein을 버퍼와 1:3 비유로 희석하여 8개의 항원 농도를 만들게 됩니다. 그리고나서 희석된 식품 샘플과 표준 곡선 샘플을 가지고 ELISA를 수행합니다.



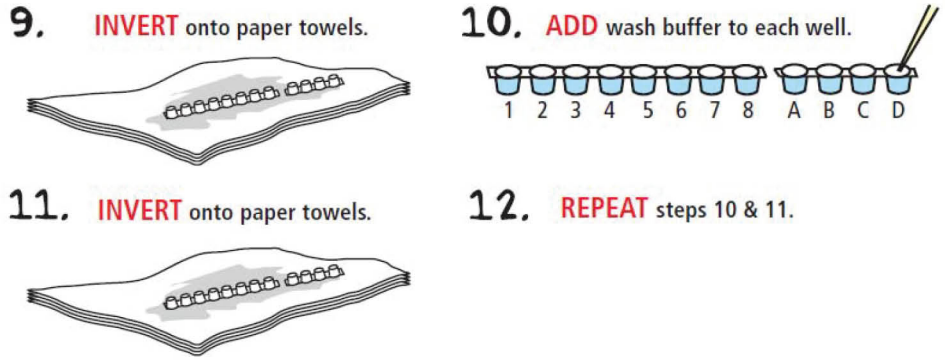
표준 곡선(Standard Curve)와 희석된 식품 샘플 준비:

1. 끝이 얇은 마커펜을 사용해 8개 well을 가진 스트립에는 1~8 숫자를 적고 4개 well 을 가진 스트립에는 A~D 를 표기합니다.
2. 표준 곡선 완충액(Standard Curve Buffer) 100uL를 2~8 웰에 넣습니다.
3. 유청항원 용액(Whey antigen solution) 150uL를 1번 웰에 넣습니다. 이 항원의 농도는 10ug/ml로 제공됩니다.
4. 1번에서 2번 웰로 50uL만큼 피펫으로 옮긴후 위아래로 5회 정도 피펫팅을 하여 섞습니다.
5. 사용한 피펫팁으로 위 과정을 각 웰마다 차례로 수행합니다. 8번 웰까지 단계적으로 희석합니다. 아래 Table 3 표와 같이 희석 농도로 남게 됩니다.
6. 8번 웰에서 50uL를 제거합니다.
7. 가장 많이 희석된 식품 샘플(A~D) 순서로 D로 표기한 웰부터 A웰까지 각각 100uL씩 넣습니다. (가장 농도가 높은 샘플은 A웰) 각각 피펫팁을 교체하며 샘플을 넣습니다.
8. 5분간 실온에서 배양합니다. 기다리는 동안 1~8번 항원농도를 계산하여 Table 3에 기록합니다.

Table 3: Standard Dilutions and Concentrations

Well	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilution	---	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243	1:729	1:2187
Dilution Procedure	150 µL of whey antigen	50 µL of well 1 into 100 µL standard curve buffer	50 µL of well 2 into 100 µL standard curve buffer	50 µL of well 3 into 100 µL standard curve buffer	50 µL of well 4 into 100 µL standard curve buffer	50 µL of well 5 into 100 µL standard curve buffer	50 µL of well 6 into 100 µL standard curve buffer	50 µL of well 7 into 100 µL standard curve buffer
Concentration	10 µg/mL							

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



샘플 제거와 웰 세척

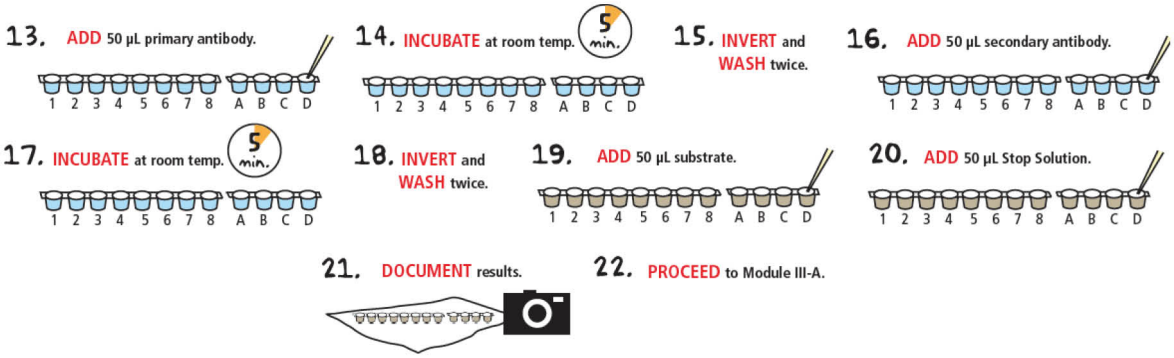
9. 샘플 제거를 위해 스트립을 페이퍼타월 위에 뒤집어 놓습니다. 4-5 회 스트립을 부드럽게 두드립니다. 젖은 페이퍼타월은 버립니다.

10. 피펫을 사용해 세척 완충액(Wash Buffer)를 각 웰이 거의 가득찰 정도(대략~200uL)로 넣습니다. 넘쳐흘러서 주변 웰에 들어가지 않도록 주의합니다.

11. 싱크대나 페이퍼타월 위에 다시 뒤집고 살살 용액을 털어냅니다.

12. 10~11 번 과정을 한 번 더 진행합니다.

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



13. 새로운 피펫팁을 사용해 1 차 항체 용액(Primary Antibody Solution)을 50uL 씩 각 웰에 넣습니다.

14. 실온에서 5 분간 배양합니다.

15. 페이퍼타월에 뒤집고 살살 용액을 털어냅니다. 10~12 번 과정을 반복하여 2 회 세척합니다.

16. 새로운 피펫팁으로 2 차 항체 용액(Secondary Antibody Solution)을 50uL 씩 각 웰에 넣습니다.

17. 실온에서 5 분간 배양합니다.

18. 페이퍼타월에 뒤집고 살살 용액을 털어냅니다. 10~12 번 과정을 반복하여 2 회 세척합니다.

기질(Substrate) 추가하기

19. 마이크로 피펫을 사용해 TMB Substrate을 50uL씩 모든 웰에 넣습니다. 첫 번째 웰에서 진한 파란색이 나오면(2-5분), 다음 20번 단계로 넘어갑니다.

주의: 효소반응은 항원 농도가 높은 웰에서 빠르게 포화됩니다. TMB substrate를 추가할 때에는 빠르지만 흔들리지 않게 넣도록 합니다.

20. 새로운 피펫팁을 사용하여 각 웰마다 50uL의 정지액(Stop Solution)을 넣고 가볍게 튜브를 쳐서 섞습니다.

21. 카메라, 휴대폰 등으로 결과물을 사진 찍습니다.

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

모듈III-A : 알레르기 항원 검사의 정성적 분석

각 웰의 색상 진하기는 유청의 초기 농도를 반영합니다. 색상은 육안으로 확인 가능하며 0(투명)에서 10(파란색)까지의 척도로 순위를 매깁니다. ELISA 용액은 빠르게 증발되기에 실험 당일에 다음 아래의 질문에 대한 답을 적도록 합니다. 시간여유가 없다면 사진촬영 후 사진을 보면서 적도록 합니다.

1. 어떤 표준 곡선 샘플(Standard Curve Sample)이 가장 진한가요? 가장 밝은 것은? 이것이 의미하는 것은 무엇일까요? Table 3에서 계산한 농도와 관련이 있나요?

2. 식품 샘플 희석(Food sample dilution) 관찰 후 어떤 것이 색 변화를 일으켰나요? 그것들 중 하나라도 색이 변했나요?

3. 식품 샘플 희석 웰(A~D) 중 표준 곡선 웰(1~8)과 매우 유사한 것이 있나요?

4. 이 유사성을 기반으로 테스트한 식품 샘플의 원래 유청 농도를 추정할 수 있나요? A~D웰은 희석된 식품을 보여줍니다.

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

모듈III-B : 알레르기 항원 검사의 정량적 분석

각 웰의 색상 진하기는 흡광도를 정량적으로 측정하는 농도계를 사용하여 측정할 수 있습니다. 이 ELISA에서 유청의 초기 농도는 얼마나 많은 TMB 분자가 산화되는지를 결정합니다. 산화된 TMB는 파란색 용액으로 되어 더 많은 빛을 흡수하게 됩니다. 따라서 알려진 농도의 8개 웰에 있는 샘플의 색도(color intensity)를 측정하여 유청 농도와 흡광 사이의 관계를 알 수 있습니다. 이 관계는 표준 곡선 방정식으로 설명됩니다. 그리고나서 표준 곡선 방정식을 사용하여 식품의 원래의 유청 농도를 추정할 수 있습니다.

1. 8개의 표준 곡선 웰(well)에 대한 평균 회색 값과 유청 단백질 농도를 계산합니다.

   A. 실험결과 사진을 컴퓨터에 JPEG으로 저장합니다.

   B. 컴퓨터에서 ImageJ 프로그램을 엽니다.

   C. File -> Open 으로 이동하여 이미지를 엽니다.

   D. Image -> Type -> 32 bit 로 이동합니다.

   E. Edit -> Invert 로 이동합니다.

   F. Analyze -> Set Measurements 이동 후 "mean gray value"을 선택합니다.

주의: 디지털 이미지에서 각 픽셀에는 검정색(세기 0)에서 흰색(최대 세기) 범위의 휘도 또는 빛의 세기 값이 있습니다. Image J에서 이 값은 회색값(Grey value)라고 합니다. 평균 회색 값은 선택영역의 모든 회색 값을 더하고 총 픽셀 수로 나누어 계산됩니다.

자세한 설명서 다운로는 다음 링크에서 확인 가능합니다.

http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html

   G. 원형 선택 도구를 선택하고 범위에 맞는 원을 그립니다.

참고: 이 원은 모든 웰을 측정하는데 사용됩니다. 일부 카메라는 웰의 가장자리 모양을 왜곡할 수 있기에 이 원은 실제 웰보다는 약간 작게 그리는 것이 좋습니다.

   H. Analyze -> Measure로 이동하고 결과창(results)이 나타납니다. "mean gray value"에 대한 결과를 아래 표에 기록합니다.

   I. 결과 이미지로 다시 돌아가고 마우스나 키보드로 다음 웰로 이동합니다. 모든 웰에 대해 반복합니다.

   J. 다음 표에 평균 회색값(Mean Gray Value)와 유청 단백질 농도(Whey Protein Concentration)을 기록합니다.

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

Table 4: Calculations for the Standard Curve and Diluted Food Samples			
Well	Dilution	Mean Gray Value	Whey Protein Concentration (µg/mL)
1	1:1		10
2	1:3		
3	1:9		
4	1:27		
5	1:81		
6	1:243		
7	1:729		
8	1:2187		
A	$1:10^3$		
B	$1:10^4$		
C	$1:10^5$		
D	$1:10^6$		

2. 표준 곡선을 만듭니다.

   A. 각 표준 농도에 대한 평균 회색 값(y축)과 유청단백질 농도(x축)으로 그래프를 그립니다.

   B. 그래프의 점을 통해 최적의 곡선을 그립니다 .

   C. 곡선의 방정식을 계산하여 적습니다.

참조: 로그식을 추천합니다. 이 식의 그래프는 결과 값의 점들을 모두 통과하지 않을 수 있습니다.

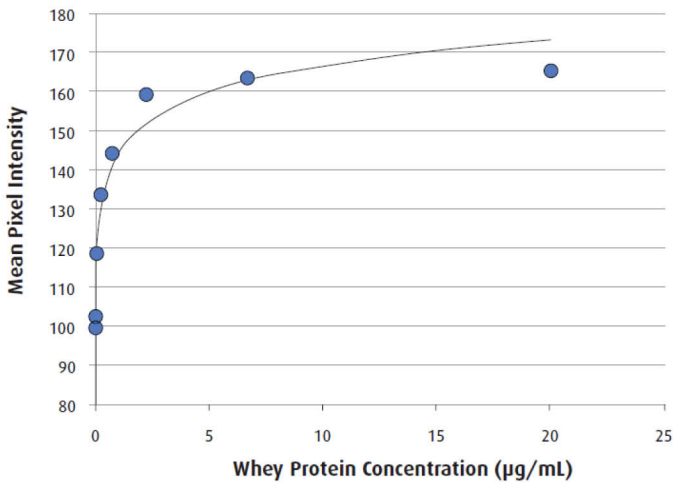


Figure 4: Plotting a Standard Curve.

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

3. 식품 샘플의 웰에서 표적 단백질의 농도를 계산합니다.

   A. 1단계에서와 같이 A~D 웰 까지의 평균 회색 값을 구합니다.

   B. 최대 표준 곡선값과 최소 표준 곡선값 사이에 있는 세기 값을 가진 샘플을 선택합니다.

   C. 주어진 y 값에서 x를 풀기 위한 최적의 방정식을 사용합니다. 대안적으로 수평선을 샘플(y축)의 흡광도에서부터 표준곡선까지 확장하고 해당 농도(x축) 값을 읽습니다. Figure 5 참조.

4. 원래의 식품 샘플에서 유청의 농도를 계산합니다.

   A. 왼쪽의 숫자를 오른쪽 숫자로 나누어 웰의 희석 비율을 십진수로 변환합니다. 예를 들어 1:104 희석은 0.0001로 다시 쓸 수 있습니다.

   B. 유청 단백질 농도(위의 3.C 과정)를 이 숫자로 나눕니다.

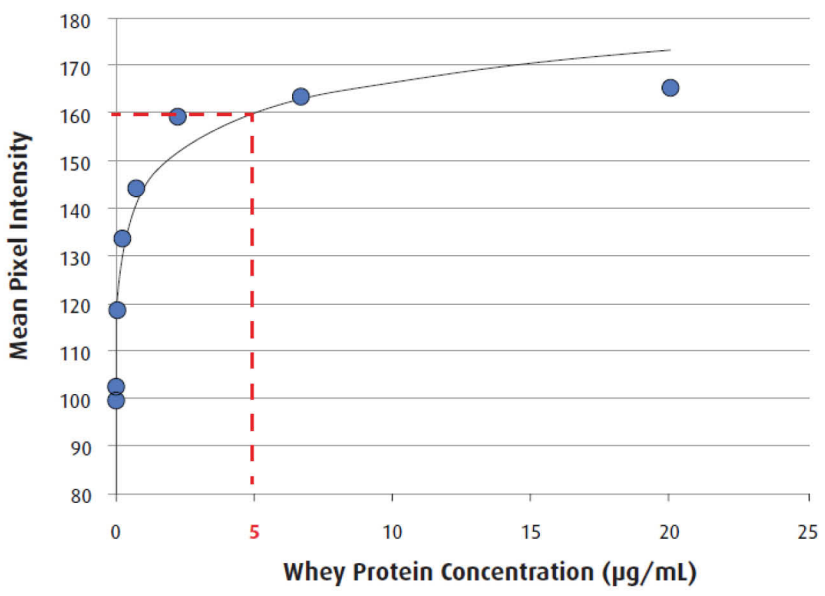
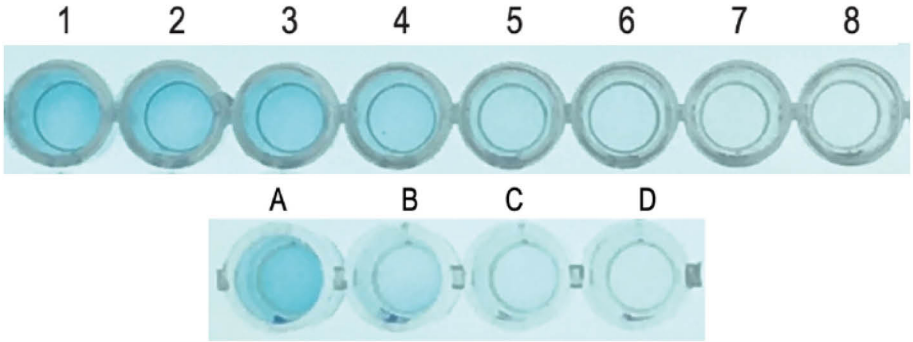


Figure 5: Determining a Protein Concentration.

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

실험결과: 모듈 II



실험결과: 모듈 III-B

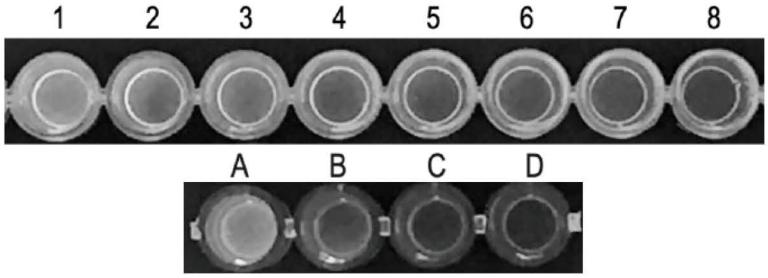
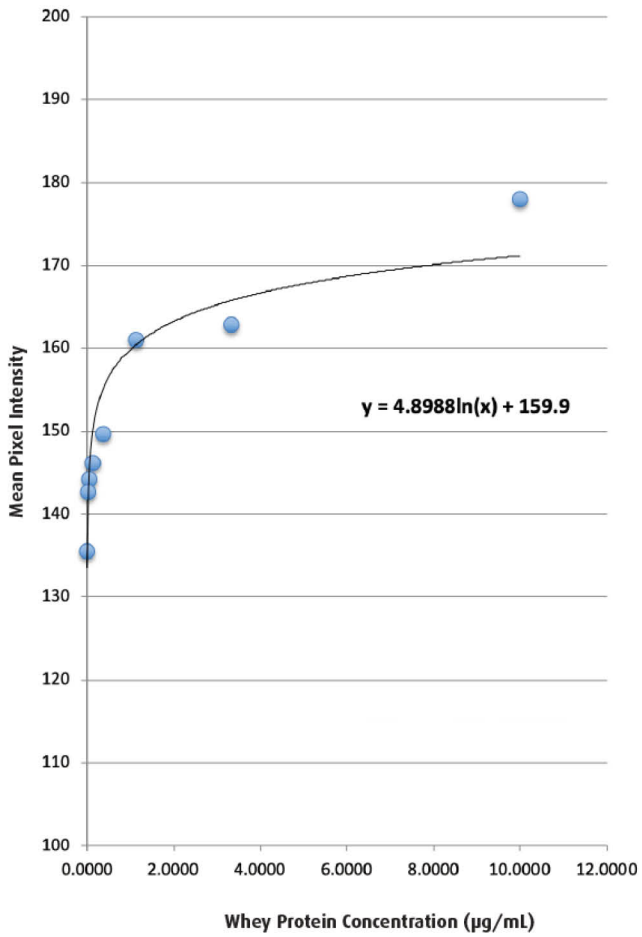


Table 4: Calculations for the Standard Curve and Diluted Food Samples

Well	Dilution	Mean Gray Value	Whey Protein Conc. (µg/mL)
1	1:1	177.84	10.0000
2	1:3	162.645	3.3333
3	1:9	160.823	1.1111
4	1:27	149.56	0.3704
5	1:81	145.953	0.1235
6	1:243	144.029	0.0412
7	1:729	142.504	0.0137
8	1:2187	135.357	0.0046
A	1:103	199.33	Unknown
B	1:104	164.01	Unknown
C	1:105	134.667	Unknown
D	1:106	129.667	Unknown

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

Below is the scatter plot graph and logarithmic best-fit line created in step 2.



For step 3 only the food dilution in well B (mean grey value of 164.01) fell within the range of the standard curve. This was used to calculate the whey concentration using the best-fit line equation.

Equation of the line: $y = 4.8988 \ln(x) + 159.9$
y represents the mean gray scale value
x represents the whey concentration

Solving for x:

$164.01 = 4.8988 \ln(x) + 159.9$
$4.11 = 4.8988 \ln(x)$
$0.8389 = \ln(x)$
$e^{(0.8389)} = e^{\ln(x)}$
$2.3138 = x$

Finally, in step 4, the original dilution factor ($1:10^4$) is converted into a decimal (0.0001). The x value from above (2.314) is then divided by this number to calculate the original concentration of whey in the food sample: 2.3138/0.0001 = 23,138 µg/mL.

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