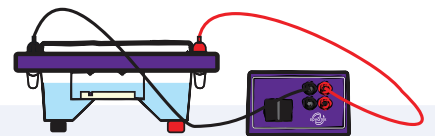

ELISA 반응 소개

Introduction to ELISA Reactions

ED269



실험 목표

이 실험을 통해 ELISA의 각 단계별 필요성을 학습합니다. 항원이나 1차 항체가 없는 웰은 2차 항체가 결합할 수 없어 음성 결과가 나타납니다. 또한 학생들은 두 개의 과산화효소 기질 간의 색 차이를 판별합니다. 기질1은 과산화수소와 아미노살리실산을 포함하는 반면에 기질2는 과산화수소와 ABTS를 가집니다. 마지막 단계동안 수소 공여체로써 기질을 사용해 과산화효소는 과산화수소를 물과 산소로 변환합니다. 산화된 살리실레이트는 갈색이지만 산화된 ABTS는 녹색으로 변환합니다.

제품 구성품

A	Antigen reconstitution buffer	항원 복원 버퍼
B	Whey antigen (lyophilized)	동결건조된 유청 항원
C	10X PBST (wash buffer)	세척 버퍼 10X PBST
D	Primary Antibody (lyophilized)	동결건조된 1차 항체
E	Secondary Antibody (lyophilized)	동결건조된 2차 항체
F	ABTS substrate	ABTS 기질
G	Aminosalicic Acid (peroxide co-substrate)	아미노살리실산 (과산화물 보조기질)
H	Hydrogen peroxide, stabilized	과산화수소

Microtiter plates

Transfer pipets

Snap-top microcentrifuge tubes

15mL conical tubes

필요 장비 및 준비물

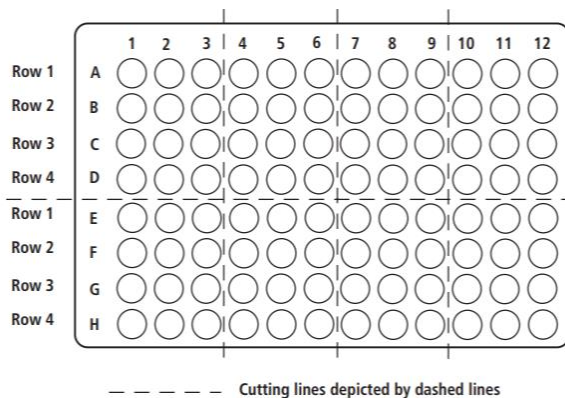
증류수, 비커, 일회용 장갑, 고글

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

실험전 준비 개요

해야할 일	언제	시간
Microtiter plate 분리	실험시작 전	5분
시약 준비	실험 최대 1주일 전	30분
기질 1 준비	실험 동안(15-20분)	10분
2차 항체 준비	실험 당일	10분

Microtiter Plate 분리하기



1-12까지 숫자와 A-H까지 알파벳이 있습니다. 그림처럼 점선을 따라 자릅니다. 각 그룹당 1개씩 나눠줍니다.

Whey Antigen 준비

1. 7mL Antigen reconstitution buffer (A)를 15mL 코니칼튜브에 넣고 "Antigen"이라고 표기합니다.
2. 조심스럽게 Whey antigen (B)의 마개를 제거하고 1단계의 antigen reconstitution buffer를 0.5mL 넣습니다. 마개를 닫고 흔들어 섞습니다.
3. 잘 섞어진 버퍼 전부를 1단계 15mL 튜브에 다시 넣고 잘 섞습니다.
4. "Ag"라고 10개의 원심분리기 튜브에 표기하고 위의 용액을 0.6mL씩 옮겨 담습니다.

1X PBST Wash Buffer 준비

1. 10X PBST (C)를 180mL 증류수에 넣고 잘 섞습니다. "1xPBST"로 표기합니다.
2. 16mL 씩 작은 비커에 옮겨담고 각 그룹에 나눠줍니다.

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

3. 남은 1xPBST 는 1 차항체, 2 차항체, 기질 1 을 위해 보관합니다.

1 차 항체 준비

1. 1xPBT 7mL 를 15mL 코니칼튜브에 넣고 "1°AB"를 표기합니다.
2. Primary Antibody (D) 뚜껑을 조심히 제거하고 1 단계 튜브에서 대략 0.5mL 의 PBST 를 넣고 뚜껑을 닫아 잘 흔들어 섞습니다.
3. 잘 섞인 용액 모두를 다시 15mL 코니칼튜브에 넣고 흔들어 섞습니다.
4. 10 개의 원심분리기 튜브에 "1°AB"로 표기하고 용액을 0.6mL 씩 담습니다.

2 차 항체 준비

(주의: 실험을 위해 당일 준비합니다.)

1. 1xPBST 6.5mL 를 15mL 코니칼튜브에 넣고 "2°AB"로 표기합니다.
2. Secondary Antibody (E) 뚜껑을 조심히 제거하고 1 단계 튜브에서 대략 0.5mL 의 PBST 를 넣고 뚜껑을 닫아 잘 흔들어 섞습니다.
3. 잘 섞인 용액 모두를 다시 15mL 코니칼튜브에 넣고 흔들어 섞습니다.
4. 10 개의 원심분리기 튜브에 "2°AB"로 표기하고 용액을 0.6mL 씩 담습니다.

ABTS 기질 준비

1. 10 개의 원심분리기 튜브에 "S2"로 표기합니다.
2. ABTS substrate (F) 0.5mL 씩 각 튜브에 넣습니다.

Aminosalicylic Acid substrate 준비

(주의: 실험시간에 사용 15-20 분 전에 준비합니다.)

1. 1xPBST 9mL 를 15mL 코니칼튜브에 넣고 Aminosalicylic acid (G)를 첨가한 후 뚜껑을 닫고 잘 흔들어 섞어 완전용해시킵니다. (볼텍스 사용추천)
2. 뚜껑을 열고 Hydrogen peroxide (H) 1mL 를 넣어 잘 섞고 원심분리기 튜브에 0.5mL 씩 넣습니다. 그리고 "S1"으로 표기합니다.

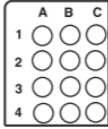
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

각 그룹당 받아야하는 준비물

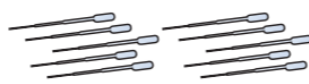
- 1 microtiter plate (3x4 well)
- 1 0.6mL "Ag" (Antigen 원심분리기 튜브)
- 1 0.6mL "1°AB" (1 차 항체 원심분리기 튜브)
- 1 0.6mL "2°AB" (2 차 항체 원심분리기 튜브)
- 1 0.5mL "S1" (기질 1, Aminosalicylic Acid)
- 1 0.5mL "S2" (기질 2, ABTS)
- 10 피펫
- 1 16mL 1X PBST 비커
- 1 빈 비커 (사용 후 버리는 용액 담는용)

실험 과정

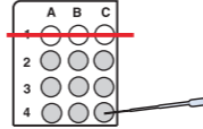
1. LABEL the microtiter plate.



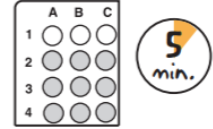
2. LABEL the transfer pipets.



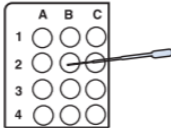
3. ADD 3 drops Ag to rows 2, 3, and 4.



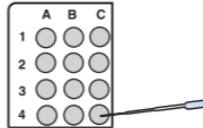
4. INCUBATE microtiter plate at room temp.



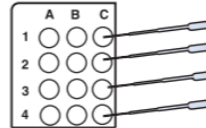
5. REMOVE liquid from wells.



6. WASH each well with 1X PBST buffer.



7. REMOVE all PBST using pipet for each row.



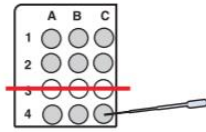
8. REPEAT Steps 6 and 7.

1. 그림처럼 microtiter plate에 A-C, 1-4 표기합니다.
2. 기본제공되는 피펫을 아래와 같이 표기하여 각 용액별로 사용할 수 있게 합니다.

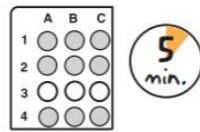
(PBS)	Phosphate Buffered Saline	(S2)	Substrate 2
(Ag)	Antigen	(Row1)	Used to remove samples from row 1
(1°AB)	Primary antibody	(Row2)	Used to remove samples from row 2
(2°AB)	Secondary antibody	(Row3)	Used to remove samples from row 3
(S1)	Substrate 1	(Row4)	Used to remove samples from row 4

3. "Ag" 피펫을 사용해 2, 3, 4 열에 Antigen(Ag) 3방울씩을 넣습니다. 1번 열에는 넣지않도록 합니다.
4. 5분간 실온에서 배양합니다.
5. "Ag" 피펫을 사용해 웰에서 모든 용액을 빼내 제거합니다.
6. "PBS" 피펫을 사용해 1xPBST 버퍼를 첨가하여 모든 웰을 세척합니다. 넘치지 않을 정도로 가득 채웁니다. (~200 μ L)
7. 다시 피펫을 사용해 모든 웰에서 빼내 제거합니다.
8. 6-7번 과정을 한 번더 반복합니다.

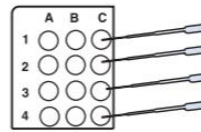
9. ADD 3 drops 1°AB to rows 1, 2, and 4.



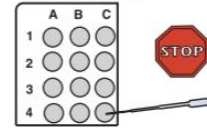
10. INCUBATE microtiter plate at room temp.



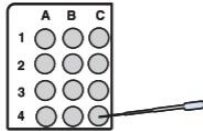
11. REMOVE all 1°AB using pipet for each row.



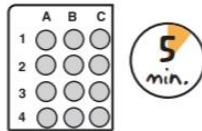
12. WASH each well with 1X PBST buffer. Remove. Repeat.



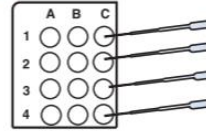
13. ADD 3 drops 2°AB to each well.



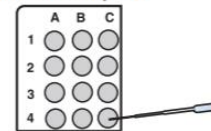
14. INCUBATE microtiter plate at room temp.



15. REMOVE all 2°AB using pipet for each row.



16. WASH each well with 1X PBST buffer. Remove. Repeat.



9. "1°AB" 피펫을 사용해 1차 항체 3방울씩 1, 2, 4 열에 넣습니다. 3열에는 넣지 않습니다.

10. 5분간 실온에서 배양합니다.

11. 다시 피펫을 사용해 모든 웰에서 1차 항체를 빼내 제거합니다.

12. 1X PBST 버퍼를 넣어 세척하고 피펫으로 다시 빼내 제거합니다. 이 과정을 한 번 더 합니다.

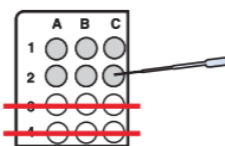
13. "2°AB" 피펫을 사용해 2차 항체를 모든 웰에 각각 3방울씩 넣습니다.

14. 5분간 실온에서 배양합니다.

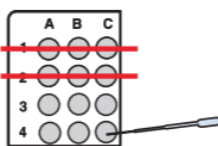
15. 피펫으로 각 웰의 2차항체를 모두 빼내 제거합니다.

16. 1X PBST 버퍼를 넣어 세척하고 피펫으로 다시 빼내 제거합니다. 한 번 더 반복합니다.

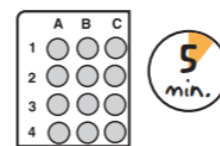
17. ADD 3 drops S1 to rows 1 and 2.



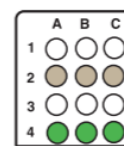
18. ADD 3 drops S2 to rows 3 and 4.



19. INCUBATE microtiter plate at room temp.



20. ANALYZE plate for color changes.



17. "S1" 피펫으로 기질 1 을 1, 2 열에 3 방울씩 떨어뜨립니다.

18. "S2" 피펫으로 기질 2 를 3, 4 열에 3 방울씩 떨어뜨립니다.

19. 5 분간 실온에서 배양합니다.

20. 색 변화를 관찰하고 분석합니다. 만약 색이 뚜렷하지않다면 좀 더 시간을 갖고 기다립니다.

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

Experiment Results and Analysis

Color should appear only in Rows 2 and 4. Rows 1 and 3 are each missing a critical component for the ELISA procedure. Row 2 will be a brown color and row 4 will be green in color.

Row	Antigen	1°AB	2°AB	S1	S2
1		√	√	√	
2	√	√	√	√	
3	√		√		√
4	√	√	√		√

