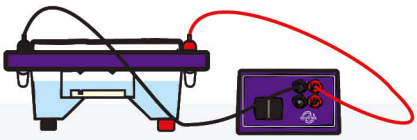
실험 가이드북

2024

ELISA 반응 소개

Introduction to ELISA Reactions

ED269



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 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 변합니다.

제품 구성품

A	Antigen reconstitution buffer	항원 복원 버퍼
B	Whey antigen (lyophilized)	동견건조된 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	Aminosalicylic 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.

배경지식

효소 결합 면역흡착법(ELISA)의 원리

항체(면역글로불린 또는 Ig 라고도 함)는 면역계가 "자기(self)"와 "비자기(non-self)" 단백질 또는 다당류를 구별할 수 있도록 하는 전문화된 단백질입니다. 이 Y 자 모양의 분자는 네 개의 연결된 폴리펩타이드 사슬로 구성되어 있습니다: 두 개의 동일한 "무거운 사슬"과 두 개의 동일한 "가벼운 사슬"입니다(그림 1). 항원 결합 부위는 Y 의 짧은 팔 끝에 위치해 있습니다. 아미노산 서열 영역은 가변적이어서 각 항체가 고유한 에피토프(항원 내의 특정 위치)를 인식할 수 있도록 합니다.

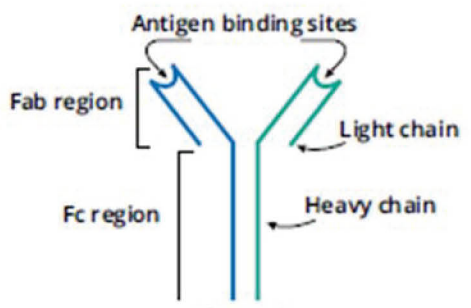


Figure 1: General Structure of an antibody.

과학 연구에 사용되는 항체는 동물(예: 토끼, 쥐, 기니피그)이 항원으로 주사될 때 면역 반응으로 생성됩니다. 면역 반응은 항원에 특이적인 항체를 생성하며, 이 항체는 혈청에서 정제됩니다. 이 용액에는 다양한 면역 세포가 항원의 다양한 에피토프를 인식하는 항체를 생성하기 때문에 혼합된 항체가 포함됩니다. 이러한 이질적인 항체 혼합체를 다클론 항체(polyclonal antibody)라고 합니다. 만약 이러한 동물에서 개별 면역 세포를 분리하고 배양한다면, 우리는 단클론 항체(monoclonal antibodies)를 생성할 수 있습니다. 이러한 항체는 단일 에피토프를 겨냥하기 때문에 매우 특이적입니다.

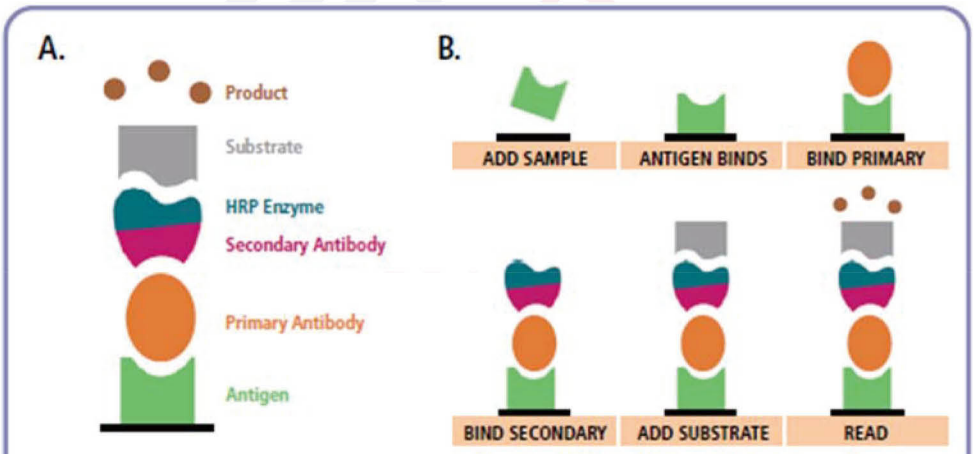


Figure 2: Optimized ELISA workflow.

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

항체의 특이성 덕분에, 항체는 샘플 내에서 특정 생체 분자(즉, 펩타이드, 단백질, 항원 및 호르몬)의 존재를 감지하는 데 사용될 수 있습니다. 이러한 방식으로 항체를 사용하는 일반적인 기술 중 하나가 효소 결합 면역흡착법(ELISA)입니다. ELISA 는 혈액, 소변, 척수액 및 기타 생물학적 샘플에서 항원을 식별하는 데 사용될 수 있기 때문에 의료 진단에서 일반적으로 사용됩니다. ELISA 는 정성적 또는 정량적 결과를 제공하도록 설계될 수 있습니다. 정성적 ELISA 에서는 샘플이 항원에 대해 양성인지 음성인지를 나타냅니다. 이러한 유형의 분석은 수행하기 간단하며, 임신 검사나 약물 검사와 같이 분자의 정확한 농도가 필요하지 않은 상황에서 유용합니다. 반대로, 정량적 ELISA 는 표준 곡선을 사용하여 샘플 내의 물질의 정확한 농도를 결정합니다.

전통적인 ELISA 는 두 가지 항체가 필요합니다. 하나의 항체는 1 차 항체라고 하며, 관심 있는 항원을 인식합니다. 예를 들어, HIV 바이러스를 감지하는 ELISA 는 바이러스의 외피 단백질 중 하나를 인식하는 항체를 사용할 것입니다. 2 차 항체는 1 차 항체를 인식합니다. 만약 토끼가 우리의 1 차 항체를 생산했다면, 우리는 토끼 항체를 인식하는 2 차 항체를 사용할 것입니다. 2 차 항체는 Horseradish Peroxidase (HRP)라는 효소에 공유 결합되어 있어 항원-항체 복합체의 존재를 감지할 수 있게 합니다(Figure 2A). HRP 는 높은 촉매 활성을 가지고 있어 아주 작은 양의 항원도 빠르게 감지할 수 있습니다.

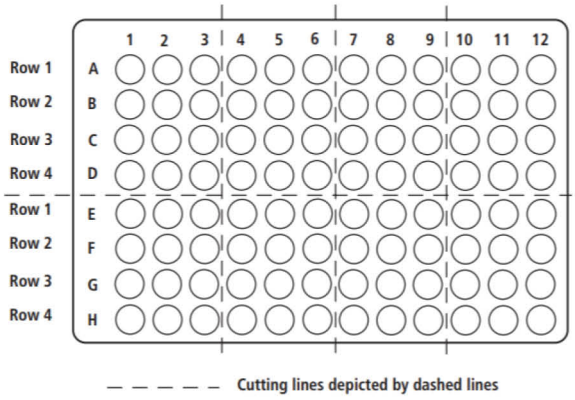
ELISA 를 수행하기 위해 실험 샘플이 웰에 추가되고, 항원이 웰에 흡착될 수 있도록 짧은 시간 동안 인큐베이션을 시행합니다(Figure 2B). ELISA 는 결과를 쉽게 시각화할 수 있도록 투명한 플라스틱 마이크로타이터 플레이트에서 수행됩니다. 인큐베이션 후 웰은 짧게 세척하여 결합되지 않은 샘플을 제거하고, 각 웰에 1 차 항체를 추가합니다. 항원이 존재하면 1 차 항체가 항원에 결합하고 세척 후에도 부착된 상태로 남아 있습니다. 다음으로 2 차 항체가 추가되며, 이는 이미 1 차 항체가 결합한 곳에만 부착됩니다. 마지막으로 각 웰에 기질이 추가됩니다. 2 차 항체가 존재하면 HRP 효소가 색반응을 촉매합니다. 이 실험은 ELISA 의 각 구성 요소의 필요성을 보여줍니다. 예를 들어, 항원이나 1 차 항체가 없는 웰은 2 차 항체를 결합할 수 없으므로 음성 결과를 나타냅니다. 또한 학생들은 두 가지 과산화물 효소 기질 사이의 색의 차이를 조사하게 됩니다. 기질 1(S1)은 과산화수소와 아미노살리실산을 포함하고, 기질 2(S2)는 과산화수소와 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산)(ABTS)를 포함합니다. ELISA 의 마지막 단계 동안, 과산화효소 효소는 기질을 수소 공급체로 사용하여 과산화수소를 H2O 와 O2 로 변환합니다. 산화된 살리실산염은 갈색이며, 산화된 ABTS 는 녹색으로 변합니다. 반응한 두 기질은 부정적인 웰에서 색이 없는 반응하지 않은 기질과 쉽게 구별될 수 있습니다.

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

실험전 준비

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. 1xPBST 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 Aminosaliccylic 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.

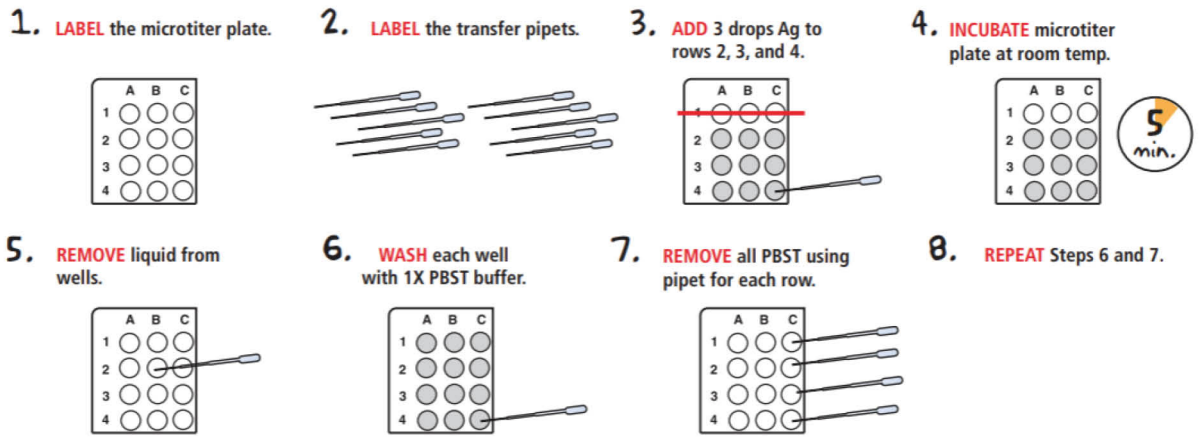
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

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)

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

실험 과정

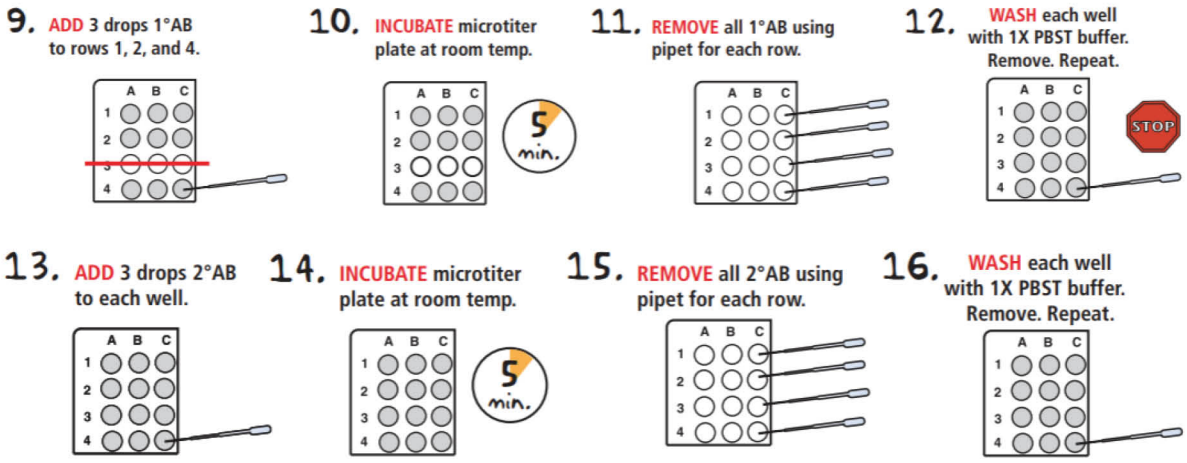


1. 그림처럼 microtiter plate에 A-C, 1-4 표기합니다.
2. 기본제공되는 피펫을 아래와 같이 표기하여 각 용액별로 사용할 수 있게 합니다.

(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. (~200μL)
7. 다시 피펫을 사용해 모든 웰에서 빼내 제거합니다.
8. 6-7번 과정을 한 번더 반복합니다.

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



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.

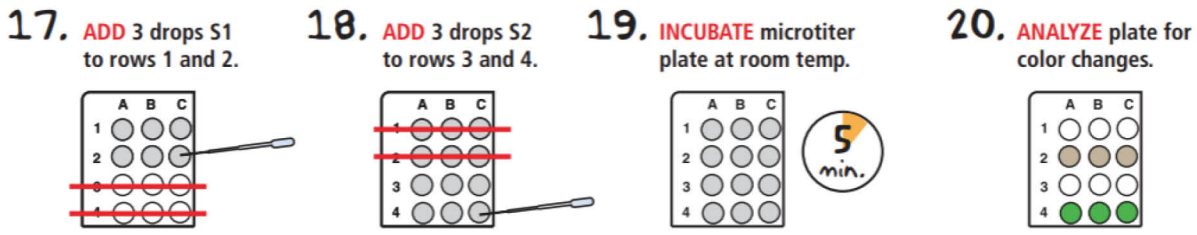
12. 1X PBST 버퍼를 넣어 세척하고 피펫으로 다시 빼내 제거합니다. 이 과정을 한 번 더 합니다.

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. "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.

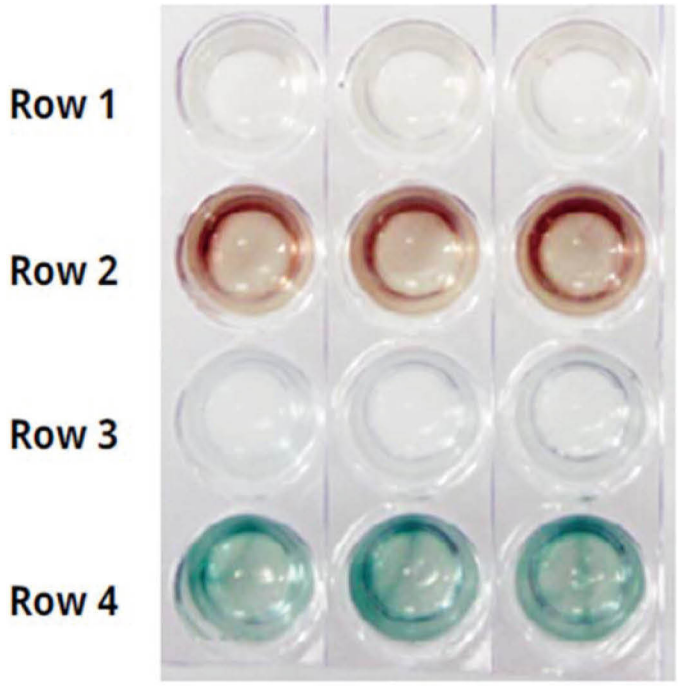
실험 결과

색상은 2 번째와 4 번째에만 나타나야 합니다.

1, 3 번째는 ELISA 에 필요한 중요한 구성 요소가 각각 빠져 있습니다.

2 번째는 갈색 색상을 띠고, 4 번째는 녹색 색상을 띠게 됩니다.

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



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