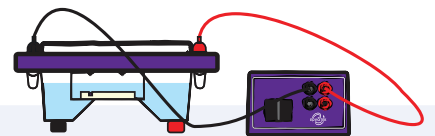

ELISA에 의한 HIV 진단

AIDS Kit I: Simulation of HIV Detection by ELISA

ED271



☎ 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 후천성 면역 결핍 증후군 바이러스(HIV)를 이해합니다.

ELISA 분석 방법과 실험 개념을 HIV 바이러스 항체의 혈청 샘플을 걸러내게(screening) 됩니다.

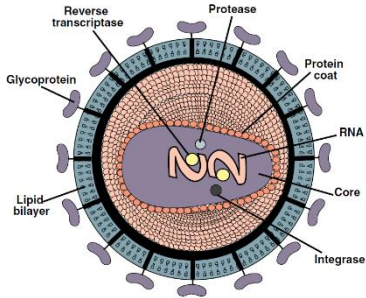


Figure 1: The HIV Virus

HIV Protein Name	Category	Protein Description
gp41	Envelope Antigens	Transmembrane protein
gp120	Envelope Antigens	CD4 binding protein
p17	Core Antigens	Matrix protein
p24	Core Antigens	Capsid protein
p31	Enzymes	Integrase
p51	Enzymes	Reverse transcriptase

제품 구성품

- | | | |
|---|----------------------------------|-------------|
| A | 10X ELISA Wash Buffer | 10X 세척 버퍼 |
| B | ELISA Dilution Buffer | ELISA 희석버퍼 |
| C | Antigen (lyophilized) | 동결건조된 항원 |
| D | Primary Antibody (lyophilized) | 동결건조된 1차 항체 |
| E | Secondary Antibody (lyophilized) | 동결건조된 2차 항체 |
| F | ABTS substrate | ABTS 기질 |
| G | ABTS Reaction Buffer | ABTS 반응 버퍼 |

Microtiter plates

Transfer pipets (피펫 3방울은 대략 50 µL)

Snap-top microcentrifuge tubes

15mL conical tubes

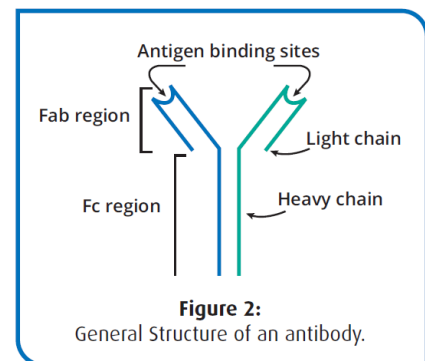


Figure 2: General Structure of an antibody.

필요 장비 및 준비물

증류수, 비커, 일회용 장갑, 고글,

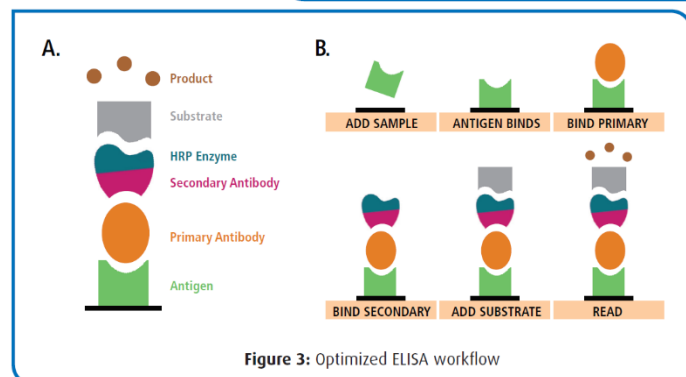
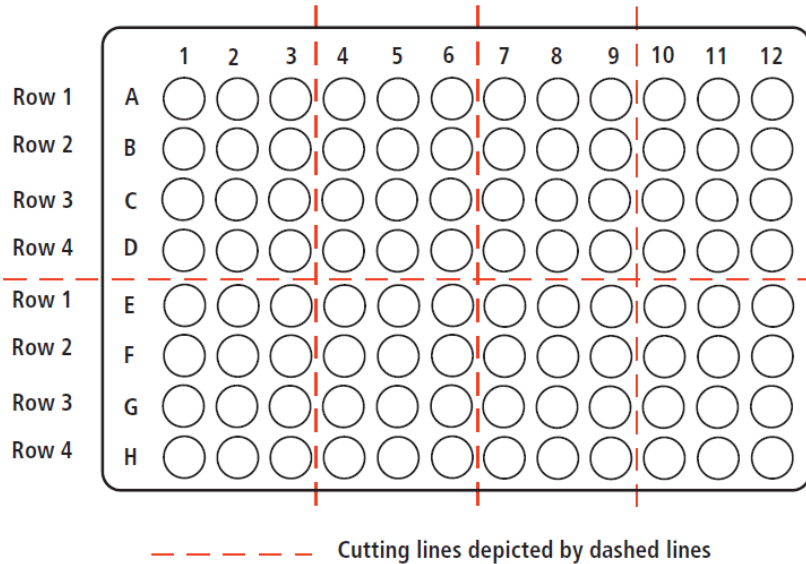


Figure 3: Optimized ELISA workflow

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

실험전 준비 개요

Microtiter Plate 분리하기



1-12까지 숫자와 A-H까지 알파벳이 있습니다. 그림처럼 (3x4) 점선을 따라 자릅니다. 각 그룹당 1개씩 나눠줍니다.

세척 버퍼 준비

1. 비커에 180mL 증류수와 10X ELISA Wash Buffer (A) 모두를 넣어 섞습니다. "Wash Buffer"라고 표기합니다.
2. 18mL 씩 작은 비커에 담아 학생들에게 나눠줍니다.

항원 준비

1. 15mL 코니칼튜브에 7mL ELISA Dilution Buffer (B)를 넣고 "Antigen"이라고 표기합니다.
2. 동결건조된 항원이 들어있는 Antigen (C)의 마개를 조심스럽게 제거하고 1번의 ELISA Dilution Buffer 0.5mL를 넣습니다. 마개를 닫고 흔들어 잘 섞습니다.
3. 1번의 15mL 코니칼튜브에 잘 섞인 Antigen 전부를 다시 돌려 넣습니다.
4. 10개의 원심분리기 튜브에 "Ag"라고 표기하고 위의 용액을 650 μ L 씩 옮겨 담습니다.

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

컨트롤 샘플과 환자 샘플 준비

1. 원심분리기 튜브 10 개는 "-CTRL"(음성), 다른 10 개는 "P1"(환자 1)으로 표기합니다. 200 μ L ELISA Dilution Buffer (B)를 각 튜브마다 넣습니다.
2. 7mL 의 ELISA Dilution Buffer (B)를 15mL 코니칼 튜브에 넣고 "1°AB"로 표기합니다.
3. 동결건조된 Primary Antibody (D) 병의 뚜껑을 제거하고 2 번의 ELISA Dilution Buffer 에서 0.5mL 를 빼내 병으로 넣습니다. 뚜껑을 닫고 흔들어 줍니다.
4. 잘 섞인 Primary Antibody 를 2 번의 15mL 튜브에 다시 돌려 넣고 잘 섞습니다.
5. 원심분리기 튜브 10 개는 "+CTRL"(양성), 다른 10 개는 "P2"(환자 2)로 표기합니다. Primary antibody 를 200 μ 씩 각 튜브에 넣습니다.

2차 항체 준비

(주의: 실험을 위해 당일 준비합니다.)

1. 7mL ELISA Dilution Buffer (B)를 15mL 코니칼 튜브에 넣고 "2°AB"로 표기합니다.
2. Secondary Antibody (E) 뚜껑을 조심히 제거하고 1 단계 튜브에서 대략 0.5mL 의 ELISA Dilution Buffer 를 빼내 병에 넣고 뚜껑을 닫아 잘 흔들어 섞습니다.
3. 잘 섞인 용액 모두를 다시 15mL 코니칼 튜브에 넣고 흔들어 섞습니다.
4. 10 개의 원심분리기 튜브에 "2°AB"로 표기하고 용액을 650 μ L 씩 담습니다.

ABTS 기질 준비

1. 10ml ABTS Reaction Buffer (G) 10ml 를 15mL 코니칼 튜브에 옮깁니다. "ABTS"로 표기합니다.
2. ABTS (F) 병의 뚜껑을 제거하고 1 단계의 ABTS 0.5mL 를 넣고 뚜껑을 닫아 흔들어서 섞습니다.
3. ABTS 모두를 15mL 코니칼 튜브에 옮깁니다.
4. 10 개의 원심분리기 튜브에 "ABTS"로 표기하고 각 튜브마다 650 μ L 넣습니다.

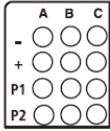
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

각 그룹당 받아야하는 준비물

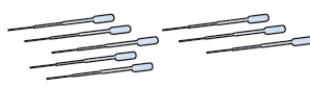
- 1 microtiter plate (3x4 well)
- 1 650 μ L "Ag" (Antigen 원심분리기 튜브)
- 1 650 μ L "2°AB" (2 차 항체 원심분리기 튜브)
- 1 650 μ L "ABTS" (ABTS 튜브)
- 1 200 μ L "-Control" (음성 컨트롤 튜브)
- 1 200 μ L "+Control" (양성 컨트롤 튜브)
- 1 200 μ L "P1" (1 번 환자 샘플 튜브)
- 1 200 μ L "P2" (2 번 환자 샘플 튜브)
- 8 피펫
- 1 세척버퍼(Wash Buffer) 18mL 가 들어있는 비커
- 1 빈 비커 (사용 후 버리는 용액 담는용)

실험 과정

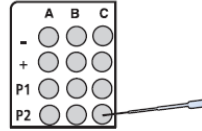
1. LABEL the microtiter plate.



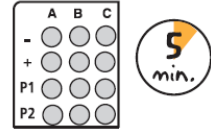
2. LABEL the transfer pipets.



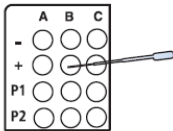
3. ADD 3 drops Ag to all 12 wells.



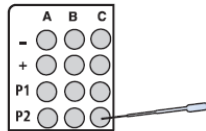
4. INCUBATE microtiter plate at room temp.



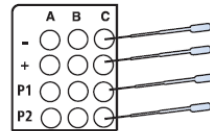
5. REMOVE liquid from wells.



6. WASH each well with wash buffer.



7. REMOVE all wash buffer using the pipet for each row.



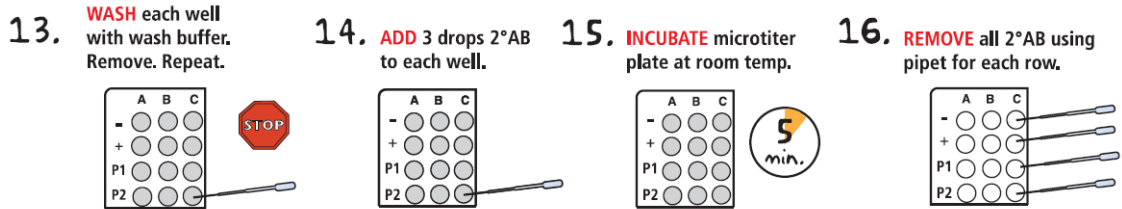
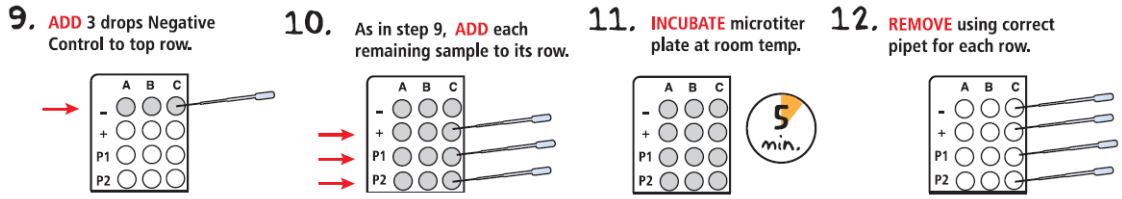
8. REPEAT Steps 6 and 7.

1. 그림처럼 microtiter plate에 A-C, 1-4 표기합니다.
2. 기본제공되는 피펫을 아래와 같이 표기하여 사용별로 구별합니다. (예) *(Wash), (Ag), (-)등.

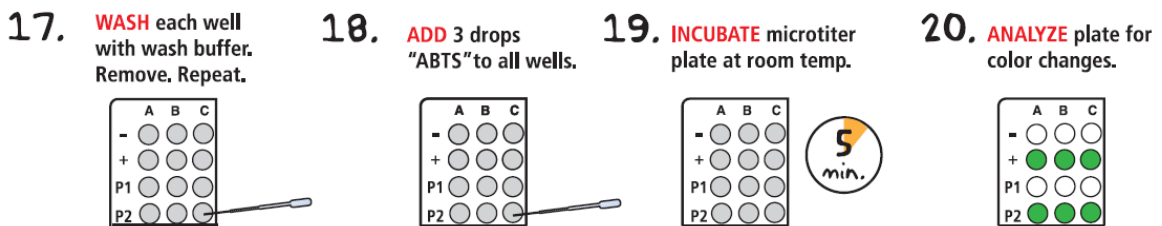
(Wash) 1x PBST Wash Buffer
 (Ag) HIV Antigen
 (-) Negative Control
 (+) Positive Control

(P1) Patient 1 Sample
 (P2) Patient 2 Sample
 (2°AB) Secondary Antibody
 (ABTS) ABTS Substrate

3. "Ag" 피펫을 사용해 12개의 모든 well에 Antigen (Ag) 3방울씩을 넣습니다
4. 5분간 실온에 놔둡니다.
5. "Ag" 피펫을 사용해 웰에서 모든 용액을 빼내 제거합니다.
6. "Wash" 피펫을 사용해 세척버퍼(Wash)를 대략 200 μ L 내외로 첨가하여 모든 웰을 가득 채웁니다. 넘치지 않을 정도로 가득 채웁니다.
7. 다시 "Wash" 피펫을 사용해 모든 웰에서 세척버퍼를 빼내 제거합니다.
8. 6-7번 과정을 한 번더 반복합니다.



9. "-" 피펫을 사용해 -CTRL(음성) 3방울씩 제일 위 3개의 well에 넣습니다.
10. 9번에서와 같이 "+(양성)", "P1(환자1)", "P2(환자2)" 3가지 샘플들을 피펫을 사용해 각 줄의 well에 넣습니다.
11. 5분간 실온에 놔둡니다.
12. 다시 피펫을 사용해 모든 웰에서 용액을 제거합니다.
13. 세척버퍼를 넣은 후 피펫으로 다시 빼내 세척합니다. 이 과정을 한 번 더 합니다.
14. "2°AB" 피펫을 사용해 2차 항체를 모든 웰에 각각 3방울씩 넣습니다.
15. 5분간 실온에 놔둡니다.
16. 피펫으로 각 웰의 2차항체를 모두 빼내 제거합니다.



17. 세척버퍼를 넣은 후 피펫으로 다시 빼내 세척합니다. 이 과정을 한 번 더 합니다.
18. "ABTS" 피펫으로 ABTS 기질을 모든 well에 3방울씩 떨어뜨립니다.
19. 5분간 실온에 놔둡니다.
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 결과와 분석

ABTS 기질은 ELISA 에 양성결과가 있는 웰을 짙은 녹색으로 변화시킵니다.

학생들은 첫 번째 열에서 음성결과인 색변화가 없어야하며 두 번째 열에서는 양성변화인 색변화가 나타나야합니다.

환자 샘플 중 2 번 환자는 색변화가 일어난 양성반응이므로 HIV 양성으로 판단해야하며 한 줄에 있는 3 개의 웰에 모두 동일한 결과가 나타나야합니다.

