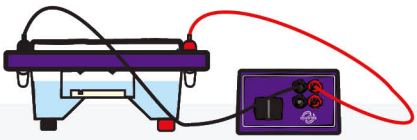
실험 가이드북

2024

ELISA에 의한 HIV 진단

AIDS Kit I: Simulation of HIV Detection by ELISA

ED271



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 후천성 면역 결핍 증후군 바이러스(HIV)를 이해합니다.

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

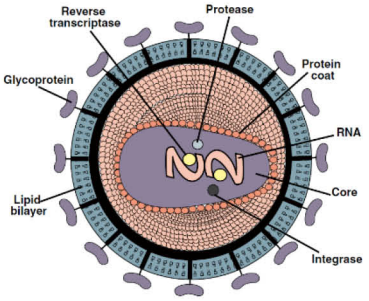


Figure 1: The HIV Virus

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

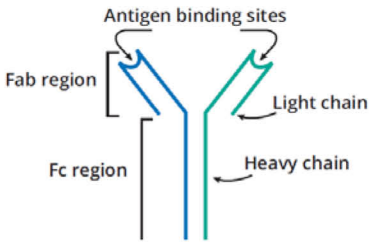


Figure 2:
General Structure of an antibody.

필요 장비 및 준비물

증류수, 비커, 일회용 장갑, 고글,

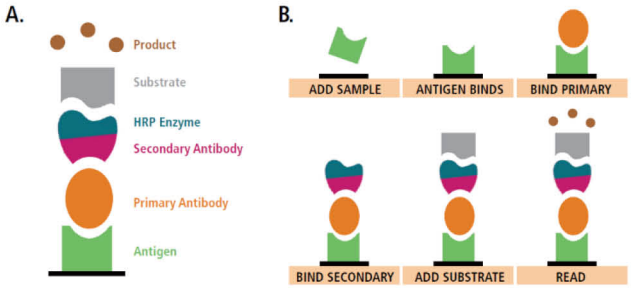


Figure 3: Optimized ELISA workflow

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

배경 지식

후천성 면역 결핍 증후군(AIDS)은 개인의 면역 체계가 점진적으로 악화되는 질병입니다. 면역 장애는 바이러스, 박테리아, 곰팡이 및 기생충과 같은 감염성 인자가 몸에 침투하고 통제되지 않고 번식할 수 있도록 허용합니다. 또한, 이러한 환자들은 면역 체계가 손상되어 특정 종류의 암 발생률이 급격히 증가합니다. AIDS 는 인류 건강에 심각한 위협을 가하며, 전 세계적인 문제입니다. 검출, 임상 치료 및 예방 방법을 발전시키기 위한 집중적인 연구가 진행되고 있습니다.

HIV-1 에 대하여

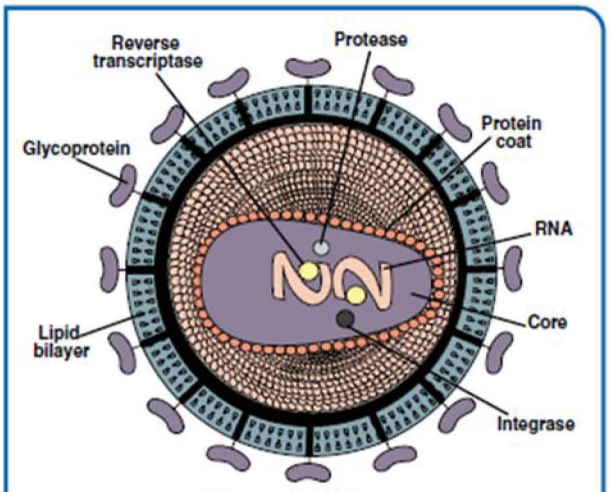


Figure 1: The HIV Virus

AIDS 의 병원체(원인 물질)인 HIV-1 은 인체 면역 결핍 바이러스 타입 1 으로, 레트로바이러스입니다. HIV-1 은 RNA 게놈을 포함하고 있으며, RNA 의존적인 DNA 중합효소인 역전사 효소를 포함하고 있습니다. HIV 의 구조와 복제 메커니즘은 다른 레트로바이러스와 매우 유사합니다. 레트로바이러스 계통의 바이러스는 인간과 동물의 특정 유형의 백혈병 및 기타 육종의 병인에 관여하고 있습니다. HIV 는 면역계를 특정적으로 겨냥하고, 매우 면역 회피 능력이 뛰어나며, 질병의 후반 단계에서 체내에서 상당한 양의 자손 바이러스를 형성하고, 성적 활동 중에 전염될 수 있는 몇 가지 특성을 가지고 있어 독특합니다.

Table 1: Examples of HIV Proteins

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

HIV 바이러스 입자는 호스트 세포막에서 향상된 지질 이중층으로 둘러싸여 있으며, 단백질 이고리(캡시드)를 포함하고 있습니다. 코어 내에는 길이가 9000 뉴클레오타이드인 동일한 두 개의 RNA 분자가 있습니다. 각 바이러스 RNA 에 수소 결합된 것은 세포의 tRNA 분자입니다. 코어에는 역전사 효소가 약 50 개 들어 있습니다. 바이러스 단백질은 "gp"(당단백질) 또는 "p"(단백질)라는 접두사 뒤에 킬로달톤 단위로 대략적인 분자량을 나타내는 숫자가 붙어 식별됩니다. 전체적으로 HIV 게놈은 바이러스의 구조, 통합, 복제 및 숙주 세포의 파괴에 필요한 19 개의 단백질을 암호화합니다.

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

환자 샘플에서 HIV 감염 탐지

개인은 보호되지 않은 성관계, 혈액 수혈 또는 오염된 주사를 통해 HIV 에 감염될 수 있습니다. 바이러스 또는 바이러스에 감염된 세포는 정액 및 혈액과 같은 체액에서 발견됩니다. 면역력이 있는 개인의 감염 초기 단계에서 HIV 바이러스는 면역 반응을 유도합니다. 그러나 바이러스의 역전사 효소는 높은 오류율을 가지고 있어 매우 높은 변이 속도를 초래합니다. 이는 일부 바이러스 변종이 생존하고 면역 감시를 피하는 유사한 능력을 갖춘 자손을 생성할 수 있도록 합니다.

HIV 의 전염성이 매우 높기 때문에 감염 후 최대한 빨리 환자를 검사하는 것이 필수적입니다. 이를 통해 환자는 자신의 잠재적 위험을 이해하고 바이러스 전파를 최소화하며 필요할 경우 즉시 치료를 시작할 수 있습니다. 거의 모든 현대의 HIV 탐지 검사는 환자의 혈청 또는 타액 샘플을 수집하여 HIV 단백질에 대한 항체의 존재를 확인합니다. 이러한 항체는 HIV 감염 후 몇 주 이내에 생성되며 매우 특정적이어서 HIV 검사에 이상적입니다.

항체

항체(면역글로블린 또는 Ig 라고도 함)는 면역 시스템이 "자기"와 "비자기" 단백질 또는 다당류를 구분할 수 있도록 해주는 전문화된 단백질입니다. 이 Y 자 형태의 분자는 서로 연결된 네 개의 폴리펩타이드 사슬(두 개의 동일한 "무거운 사슬"과 두 개의 동일한 "가벼운 사슬")로 구성되어 있습니다. 항원 결합 부위는 Y 형태의 짧은 팔 끝에 위치하고 있습니다. 이 지역의 아미노산 서열은 변동성이 있어 각 항체가 고유한 에피토프(항원의 특정 위치)를 인식할 수 있도록 합니다.

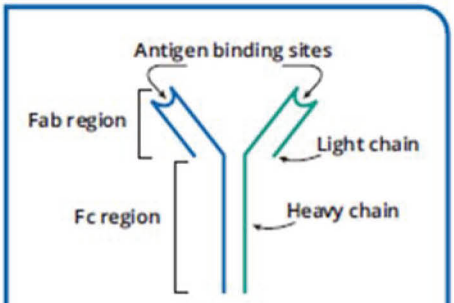


Figure 2:
General Structure of an antibody.

이들의 특이성 덕분에 연구자들은 항체를 사용하여 복잡한 샘플에서 특정 생체 분자(예: 펩타이드, 단백질, 항원 및 호르몬)의 존재를 식별할 수 있습니다. 웨스턴 블로팅이라는 한 가지 기술은 혼합 샘플에서 특정 단백질을 식별합니다. 면역조직화학(Immunohistochemistry)은 항체를 사용하여 세포나 조직 내에서 특정 항원을 표지합니다. 샘플 내에서 항원의 양을 정량적으로 측정하기 위해서는 효소 연결 면역 흡착 분석(ELISA)을 사용합니다. 이 분석법은 세포 용해물과 같은 복잡한 혼합물에서도 탐지하고 정량화하기 쉬운 신호를 생성합니다.

ELISA

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

ELISA 는 원래 용액 내 항체의 양을 측정하기 위해 개발되었지만, 이후 여러 종류의 항원을 탐지하기 위해 적응되었습니다. 전통적인 ELISA 는 두 개의 항체가 필요합니다. 첫 번째 항체인 "1 차 항체"는 관심 항원을 인식합니다. 예를 들어, HIV 바이러스를 탐지하는 ELISA 는 바이러스의 외피 단백질 중 하나를 인식하는 항체를 사용하도록 설계될 수 있습니다. 임상 HIV ELISA 에서는 환자 샘플 내에 HIV 항체가 존재하는지를 결정합니다.

"2 차 항체"는 1 차 항체를 인식합니다. 1 차 항체는 인체 면역 세포에 의해 생성되기 때문에, 우리는 인체 항체를 선택적으로 인식하는 2 차 항체를 사용합니다. 2 차 항체는 효소인 과산화물 효소(HRP)와 공유 결합되어 있어 항원-항체 복합체의 존재를 감지할 수 있게 합니다. HRP 는 높은 촉매 활성을 가지며, 기질 전환율이 초당 10^6 을 초과하여 가장 적은 양의 항원도 신속하게 감지할 수 있습니다.

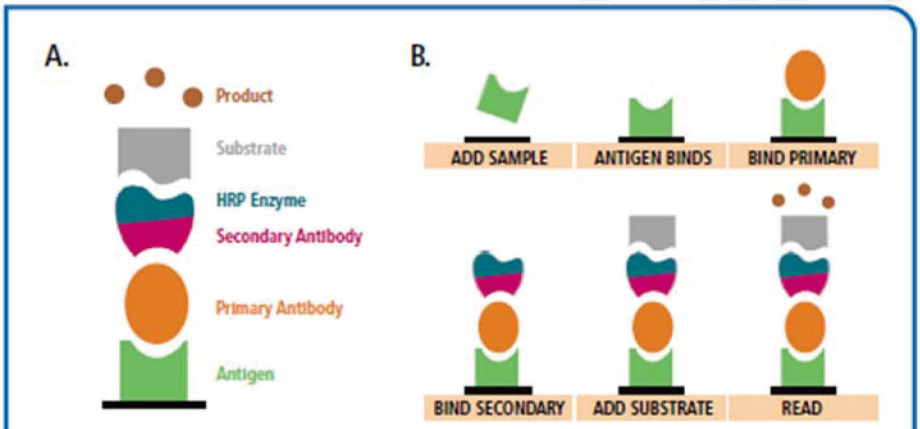


Figure 3: Optimized ELISA workflow

ELISA 를 수행하기 위해 샘플을 웰에 추가하고 항원이 수소 친화적 상호작용을 통해 표면에 흡착하도록 합니다. HIV ELISA 에서는 미리 준비된 바이러스 단백질이 항원이 됩니다. ELISA 는 종종 투명한 폴리스티렌이나 폴리염화비닐 플라스틱으로 만들어진 마이크로타이틀 플레이트에서 수행됩니다. 과학자들은 항원을 웰에 추가하고 비특이적으로 플라스틱에 붙도록 허용합니다. 잉여 액체를 씻어내고, 웰은 비특이적 상호작용을 방지하기 위해 단백질이 포함된 완충액으로 "차단"됩니다.

그 후, 환자 샘플 또는 대조 샘플이 웰에 추가되고 혼합물이 짧은 시간 동안 인큐베이션됩니다. 환자 샘플에 항-HIV 항체가 존재하면, 이들은 HIV 항원에 결합하게 됩니다. 인큐베이션 후에는 항원과 결합하지 않은 1 차 항체를 제거하기 위해 웰을 씻습니다.

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

씻은 후, 효소 결합된 2 차 항체가 1 차 항체를 인식하고 결합하기 위해 웰에 추가됩니다. 중요한 점은, 환자 샘플에 1 차 항체가 없는 경우 2 차 항체가 결합할 수 있는 것이 없다는 것입니다. 이전과 마찬가지로, 잉여 항체는 완충액으로 씻어내고, 2 차 항체가 1 차 항체에 결합했다면, 2 차 항체는 웰에 남아 있게 됩니다.

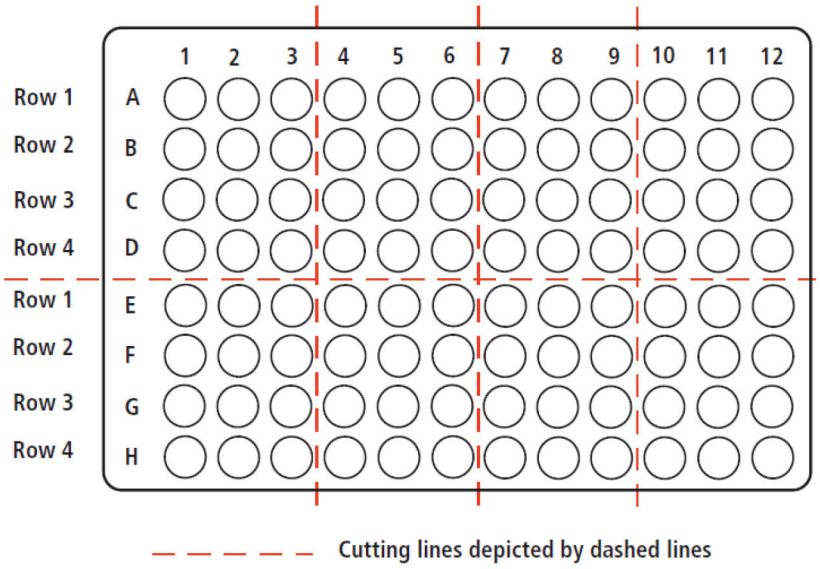
마지막으로, 각 웰에 ABTS (2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-황산)에 대한 색이 없는 투명한 용액과 과산화수소가 추가됩니다. 2 차 항체에 부착된 HRP 효소가 항원-항체 복합체가 존재하는 웰의 ABTS 를 산화시키면서 투명한 기질 용액이 청록색으로 변합니다. 각 효소가 많은 기질 분자를 분해하기 때문에, ELISA 는 아주 적은 양의 항원도 검출할 수 있습니다. 변색이 눈으로 확인될 수 있지만, 405nm 에서 샘플의 흡광도를 측정하면 정량적인 결과를 얻을 수 있습니다.

이 실험은 시뮬레이션된 환자 혈액 샘플에서 HIV 항체를 탐지하기 위한 임상 스크리닝을 재현합니다. 학생들은 준비된 항원을 마이크로타이틀 플레이트에 인큐베이션하고, 흡착되지 않은 단백질을 씻어낸 후, 대조 및 환자 샘플과 함께 인큐베이션합니다. 환자가 HIV 양성인 경우, 그들의 혈액에는 웰에서 단백질에 결합할 수 있는 항-HIV 항체가 포함되어 있을 것입니다. 그러고 나서 HRP 연결 2 차 항체가 추가되어 1 차 항체를 감지하게 됩니다. 마지막으로, 각 웰에 기질이 추가되고 분석 상태를 확인합니다. 실험 종료 시 학생들은 각 환자에 대한 HIV 진단을 제공합니다.

★ 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 잘섞인 Antigen 전부를 다시 돌려 넣습니다.
4. 10개의 원심분리기 튜브에 "Ag"라고 표기하고 위의 용액을 650 μL 씩 옮겨 담습니다.

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

콘트롤 샘플과 환자 샘플 준비

1. 원심분리기 튜브 10 개는 "-CTRL"(음성), 다른 10 개는 "P1"(환자 1)으로 표기합니다. 200 μL 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.

2 차 항체 준비

(주의: 실험을 위해 당일 준비합니다.)

1. 7mL ELISA Dilution Buffer (B)를 15mL 코니칼튜브에 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 코니칼튜브에 넣고 흔들어 섞습니다.
4. 10 개의 원심분리기 튜브에 "2°AB"로 표기하고 용액을 650 μL 씩 담습니다.

ABTS 기질 준비

1. 10ml ABTS Reaction Buffer (G) 10ml 를 15mL 코니칼튜브에 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 코니칼튜브에 옮깁니다.
4. 10 개의 원심분리기 튜브에 "ABTS"로 표기하고 각 튜브마다 650 μL 넣습니다.

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

각 그룹당 받아야하는 준비물

1 microtiter plate (3x4 well)

1 650 µL "Ag" (Antigen 원심분리기 튜브)

1 650 µL "2ºAB" (2 차 항체 원심분리기 튜브)

1 650 µL "ABTS" (ABTS 튜브)

1 200 µL "-Control" (음성 컨트롤 튜브)

1 200 µL "+Control" (양성 컨트롤 튜브)

1 200 µL "P1" (1 번 환자 샘플 튜브)

1 200 µL "P2" (2 번 환자 샘플 튜브)

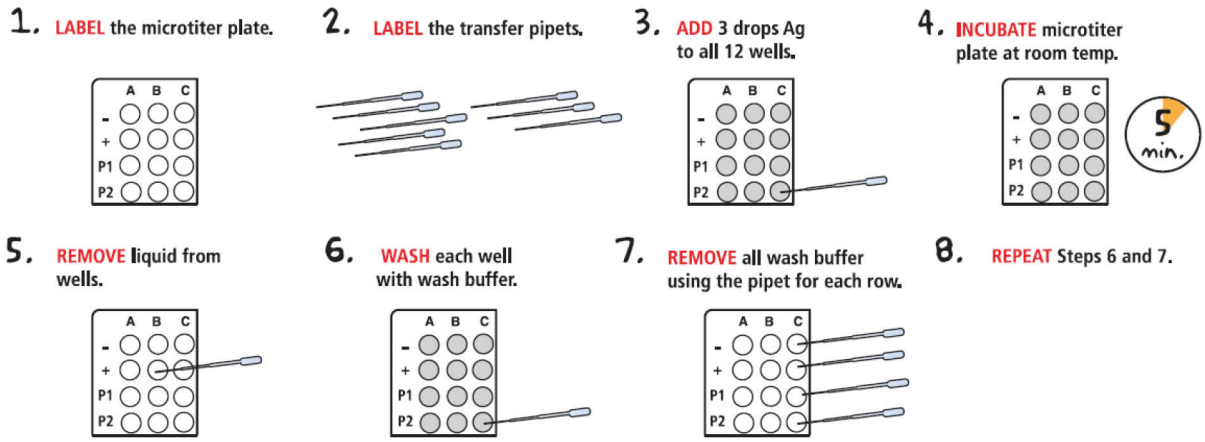
8 피펫

1 세척버퍼(Wash Buffer) 18mL 가 들어있는 비커

1 빈 비커 (사용 후 버리는 용액 담는용)

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

실험 과정

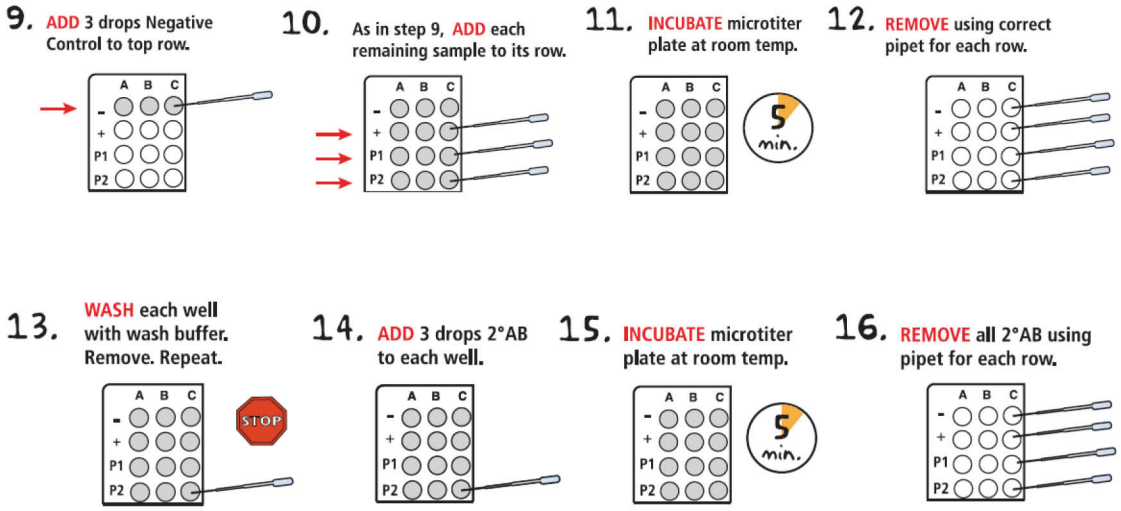


1. 그림처럼 microtiter plate에 A-C, 1-4 표기합니다.
2. 기본제공되는 피펫을 아래와 같이 표기하여 사용별로 구별합니다. (예) *(Wash), (Ag), (-)등.

(Wash)	1x PBST Wash Buffer	(P1)	Patient 1 Sample
(Ag)	HIV Antigen	(P2)	Patient 2 Sample
(-)	Negative Control	(2°AB)	Secondary Antibody
(+)	Positive Control	(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 200μL 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.

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



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.

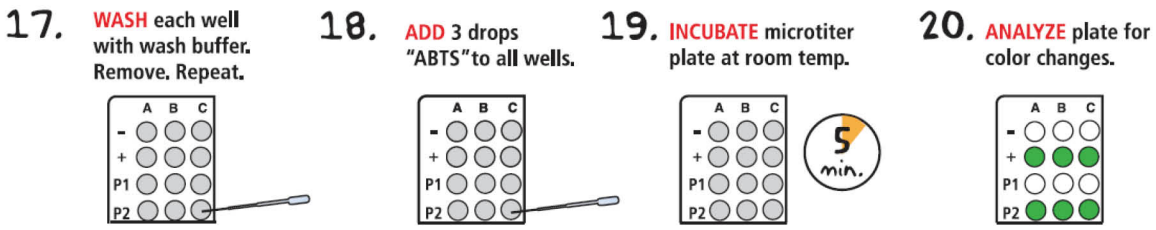
12. 다시 피펫을 사용해 모든 웰에서 용액을 제거합니다.

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 well 에 3 방울씩 떨어뜨립니다.

19. 5 분간 실온에 놔둡니다.

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

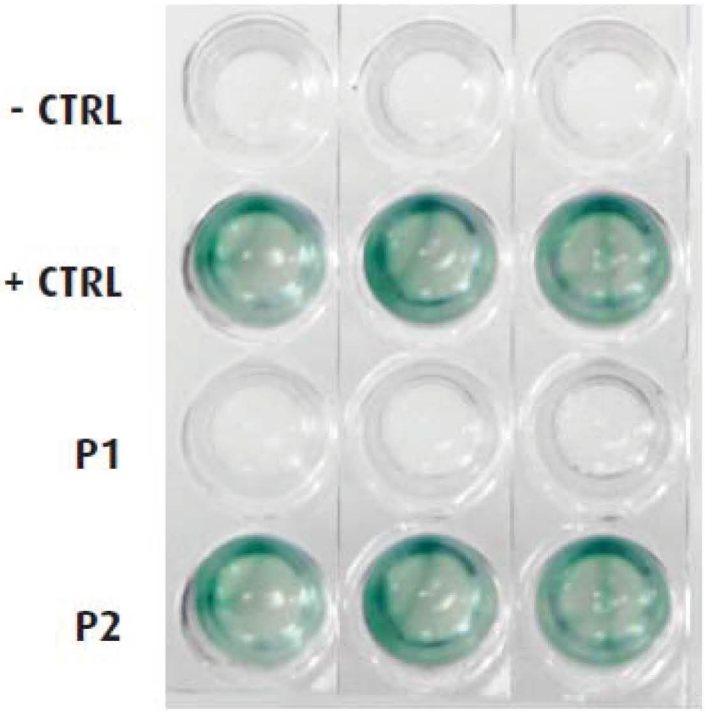
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

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.



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