

참고자료

1. IEF (등전점 전기영동, 등전점 포커싱)

2. ELISA (효소결합면역흡착측정법)

- 2024 년 61 회 번시 1 차 생물기출 관련 -

2024 김 민

<< 참고 자료 1 : 등전점 전기영동 >>

<< 핵심지문 >>

1. 단백질의 전기적 특성에 가장 큰 영향을 미치는 아미노산은 이온화가 가능한 아미노산 4 가지이다.

ASP(아스파르트산), GLU(글루탐산), LYS(라이신), ARG(아르지닌)이 그것이다.

ASP, GLU 는 카르복시기를 갖기 때문에 이온화되어 음성(-) 전하를 가질 수 있다.

LYS, ARG 은 아민기를 갖기 때문에 이온화되어 양성(+) 전하를 가질 수 있다.

2. 단백질들은 다양한 아미노산 조성 and 서열을 가지며 조성에 따라 전기적 특성이 다르다.

3. 단백질에 포함된 아민기/카르복시기의 중성화/이온화는 단백질이 존재하는 수용액의 pH 에 따라 달라진다.

4. 낮은 pH 에서는, H⁺(수소 이온)의 농도가 높기 때문에, 단백질에 양성(+) 전하가 많아진다.

단백질의 아민기는 이온화된 형태(-NH₃⁺)로 존재하는 숫자가 많아지며, 단백질의 카르복시기는 중성의 형태(-COOH)로 존재하는 숫자가 많아진다.

5. 높은 pH 에서는, OH⁻(수산화 이온)의 농도가 높기 때문에, 단백질에 음성(-) 전하가 많아진다.

단백질의 아민기는 중성의 형태(-NH₂)로 존재하는 숫자가 많아지며, 카르복시기는 이온화된 형태(-COO⁻)로 존재하는 숫자가 많아진다.

6. 단백질은 특정 pH 의 수용액에 존재하는 경우, 이온화되어 (-)1 의 음성전하를 갖는 카르복시기의 숫자와 이온화되어 (+)1 의 양성전하를 갖는 아민기의 숫자가 같아지면서, 이 단백질의 알짜 전하(Net Charge)가 0(zero)된다.

이러한 pH 의 값을 이 단백질의 등전점(pI)이라고 한다.

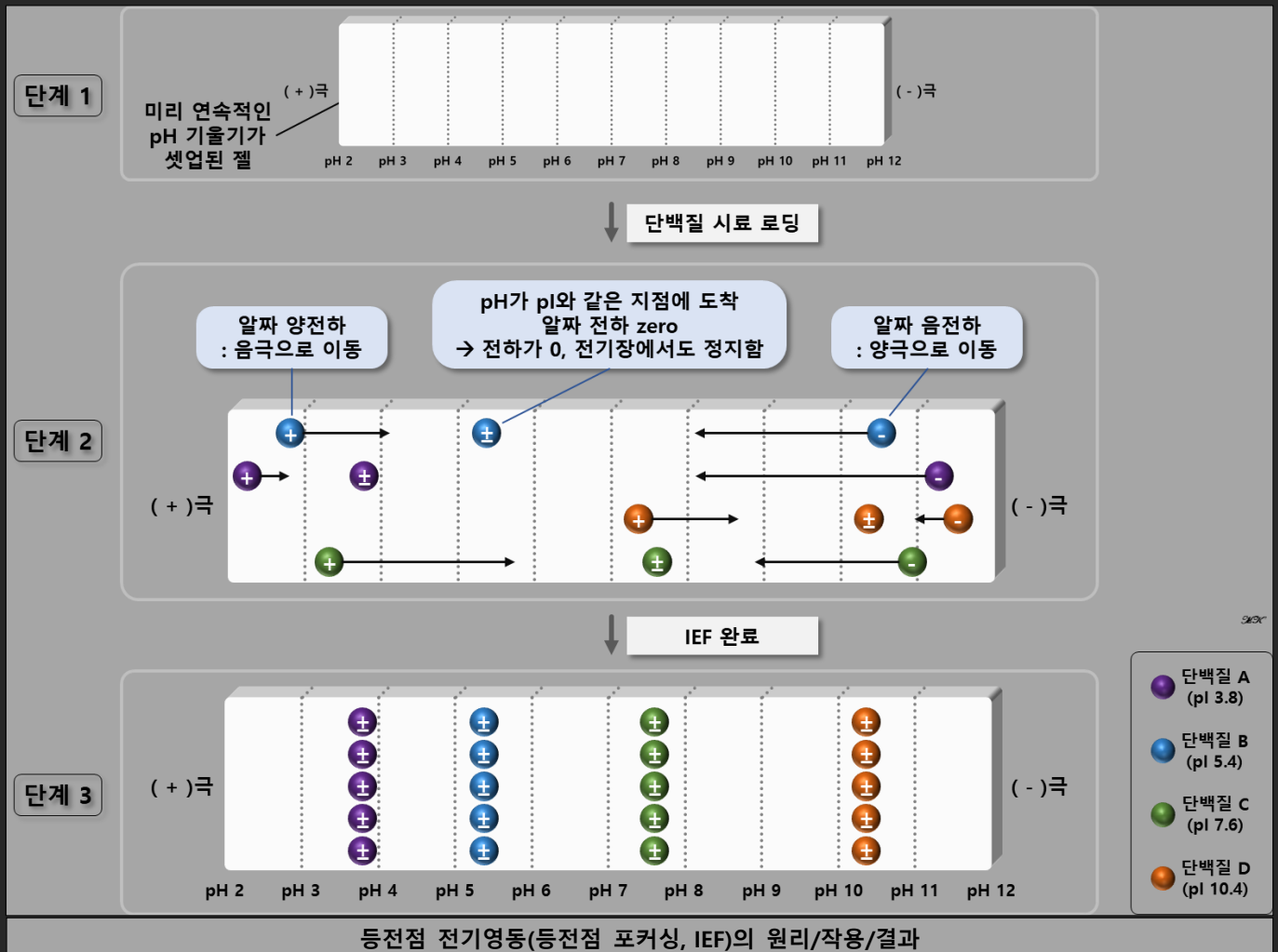
등전점은 각 단백질 고유의 값이다.

7. 주의할 점은, 등전점에서 단백질의 알짜 전하가 0 이 되는 이유는, '모든 카르복시기와 모든 아민기가 중성 상태로 존재하여 단백질의 알짜 전하가 0 이 된다'가 아니다.

8. 등전점 전기영동 (IsoElectric Focusing, **IEF**)

단백질들의 등전점이 다 다르기 때문에 이를 이용하여, 단백질 혼합물로부터 단백질들을 등전점에 따라 분리하는 생명공학 기법이 '등전점 전기영동'이다.

9. 등전점 전기영동(IsoElectric Focusing, IEF)의 원리



- (1) 단백질은 pI(자신의 등전점)보다 낮은 pH에서는 양성(+)의 알짜 전하를 가지며, 전기장에서 음극(-) 방향으로 이동하게 된다.
- (2) 단백질은 pI 보다 높은 pH에서는 음성(-)의 알짜 전하를 가지며, 전기장에서 양극(+) 방향으로 이동하게 된다.
- (3) 단백질은 pI 와 같은 pH 환경에 존재하는 경우, 중성의 알짜 전하를 가지며, 전기장하에서도 전하가 없기 때문에 이동하지 않는다.

10. 'IEF(등전점 전기영동)'에서는 단백질들이 등전점(pI)에 따라 분리되며, '젤 전기영동(Gel Electrophoresis)'에서는 단백질들이 크기에 따라 분리된다.

11. '2 차원 전기영동'(2D Electrophoresis)'에서는 1 차 전개에서 IEF를 하고, 2 차 전개에서 젤 전기영동을 진행하는 경우가 많다.

이러한 방식의 '2 차원 전기영동'은 1 차 전개에서는 단백질 간의 등전점의 차이를 이용하고, 2 차 전개에서는 단백질 간의 크기의 차이를 이용하기 때문에 단백질의 분리능이 높은 분석 기법이다.

<< 참고 자료 1 : 등전점 전기영동 (IsoElectric Focusing, IEF) >>

1. 단백질의 전기적 특성에 가장 큰 영향을 미치는 아미노산은 4 가지이다

단백질을 구성하는 약 20 종의 아미노산은 곁가지(Side Chain)의 특성에 따라 일반적으로 4 가지 그룹으로 분류한다.

(1) 이온화가 가능한 **극성 아미노산들** (2) 이온화가 되지 않고 **부분전하를 갖는 아미노산들** (3) **소수성 아미노산들** (4) **특수 아미노산들** 의 4 가지가 그것이다.

이 중 전하가 가장 강한 아미노산들이 첫번째 그룹인 (1) 극성 아미노산들 이다.

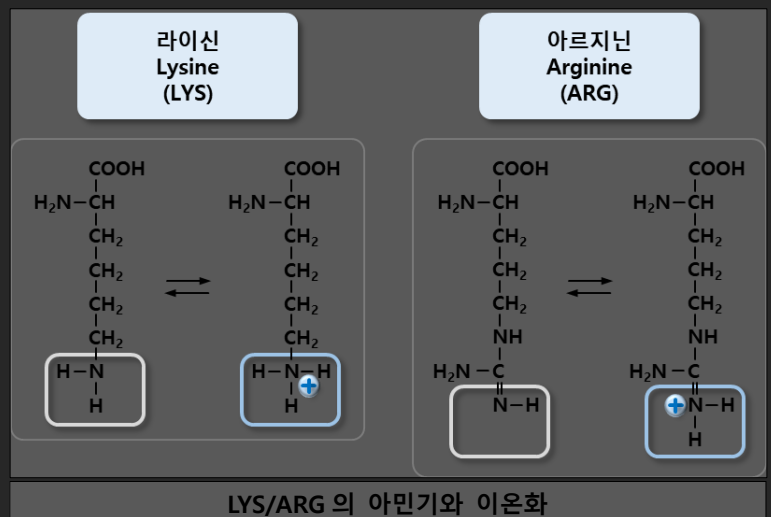
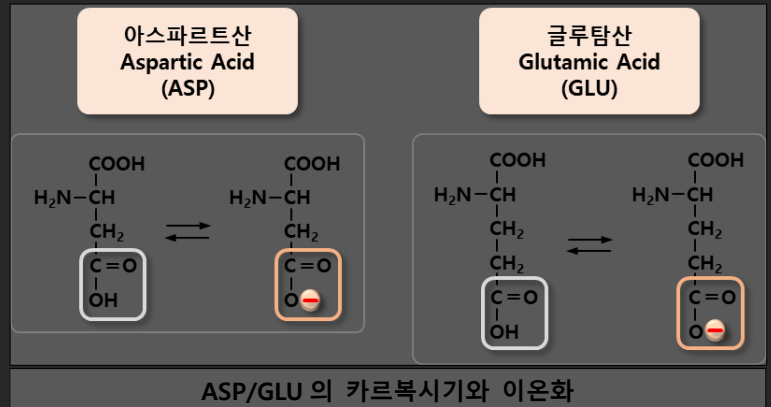
약 20 종의 아미노산 중 단백질의 구성요소가 되었을 때 **단백질의 전기적 특성에 가장 큰 영향을 미치는 아미노산은 이온화가 가능한 극성 아미노산 4 가지**이다.

전하가 강한 아미노산들이기 때문이다.

ASP(아스파르트산), GLU(글루탐산), LYS(라이신), ARG(아르지닌)이 그것이다.

ASP 와 GLU 은 곁가지(Side Chain)에 **카르복시기(-COOH)**를 포함하고 있으며, 수용액에서 **이온화되면 -COO⁻** 가 되어 **음성(-) 전하**를 갖는다.

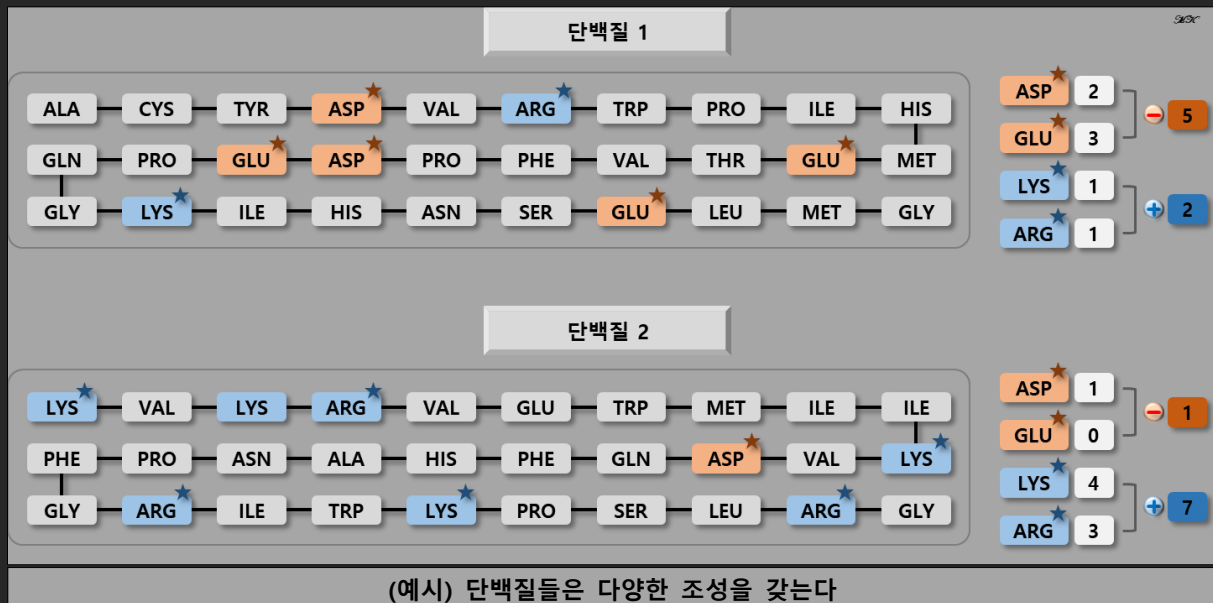
LYS 과 ARG 은 곁가지에 **아민기(-NH₂)** 등의 질소 작용기를 포함하고 있으며, 수용액에서 **이온화되면 -NH₃⁺** 등의 형태가 되어 **양성(+)** 전하를 갖는다.



IEF : IsoElectric Focusing, 등전점 전기영동, 등전점 포커싱

IsoElectric Focusing : Iso(동일한) + Electric(전기, 전하) + Focusing(시료가 시료의 등전점과 pH 가 일치하는 지역에 집중적으로 모이는 현상)

2. 단백질들은 다양한 아미노산 조성을 가지며 조성에 따라 전기적 특성이 다르다



위의 그림은, 2 가지 단백질의 아미노산 서열과 조성의 예시이다.

단백질들은 다양한 아미노산 서열과 조성을 갖는다.

이에 따라 단백질들마다 다른 여러가지 특성을 나타내게 된다.

특히 이온화될 수 있는 극성 아미노산의 비율은 단백질의 전기적 특성에 가장 중요한 영향을 미친다.

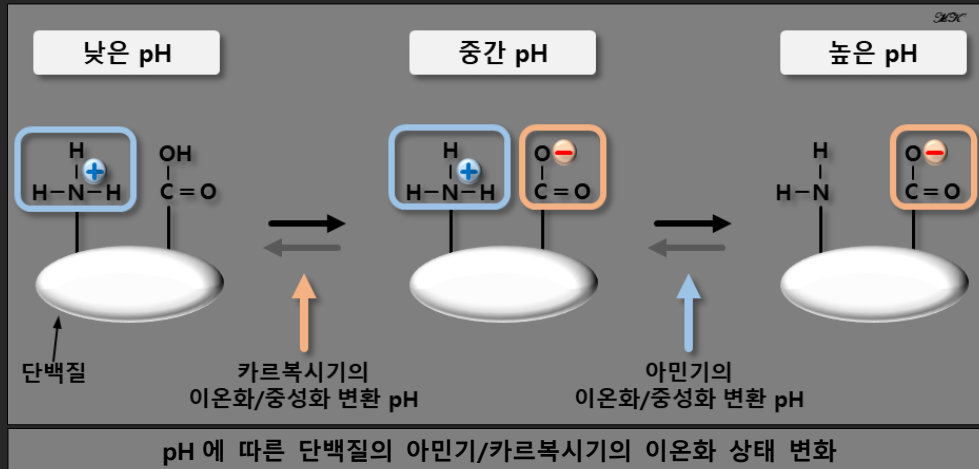
그림에서 예시로서, '단백질 1'은 30 개의 아미노산 중 곁가지에 음성 전하를 갖는 아미노산(ASP+GLU)이 5 개이며, 곁가지에 양성 전하를 갖는 아미노산(LYS+ARG)이 2 개이다.

반면에 '단백질 2'는 30 개의 아미노산 중 음성 전하를 갖는 아미노산이 1 개이며, 양성 전하를 갖는 아미노산이 7 개이다.

'단백질 1'과 '단백질 2'는 극성 아미노산의 비율이 서로 다르기 때문에 전기적 특성이 서로 많이 다르다.

ASP : Aspartic Acid (아스파르트산), GLU : Glutamic Acid (글루탐산)
 LYS : Lysine (라이신), ARG : Arginine (아르지닌)

3. 단백질에 포함된 아민기/카르복시기의 전하는 pH 에 따라 달라진다



그러나 단백질의 극성 아미노산 4 가지에 존재하는 아민기와 카르복시기가 수용액 속에서 항상 이온화되어 있지는 않다.

아민기와 카르복시기의 이온화/중성화의 여부는 단백질이 포함되어 있는 수용액의 pH 에 따라 변화한다.

위의 그림은, 단백질에 결합되어 있는 아민기와 카르복시기의 상태를 나타낸다.

단백질이 포함되어 있는 수용액의 pH 에 따라 2 가지 작용기의 상태가 달라짐을 알 수 있다.

상대적으로 낮은 pH에서는 단백질의 아민기는 이온화($-\text{NH}_3^+$)되어 양성전하를 갖고, 단백질의 카르복시기($-\text{COOH}$)는 중성이 된다.

중간 pH의 구간에서는 아민기는 그대로 이온화($-\text{NH}_3^+$)되어 양성전하를 갖고, 카르복시기도 이온화($-\text{COO}^-$)되어 음성전하를 갖는다.

높은 pH에서는 아민기($-\text{NH}_2$)는 중성이 되며, 카르복시기는 그대로 이온화($-\text{COO}^-$)되어 있어 음성전하를 갖는다.

4. '등전점'(IsoElectric Point)의 의미

단백질은 특정 pH 의 수용액에 존재하는 경우, 이온화되어 (-)1 의 음성전하를 갖는 카르복시기의 숫자와 이온화되어 (+)1 의 양성전하를 갖는 아민기의 숫자가 같아지면서, 이 단백질의 알짜 전하(Net Charge)가 0(zero)된다.

이러한 pH 의 값을 이 단백질의 등전점(pI)이라고 한다.

예시로서, 특정 단백질이 pH 3.0 에서는 +7 의 알짜 전하를 갖고, pH 10.0 에서는 -9 의 알짜 전하를 가지며, pH 7.8 에서는 0(zero)의 알짜 전하를 갖는다면, 이 단백질의 pI 는 7.8 이다.

등전점(等電點): 등(等, 같을 등) + 전기 전

등(等, 같을 등): ex. 동등하다, 등호, 등식

등전점에서 등(等)의 '같다'의 의미는 이온화된 카르복시기의 숫자와 이온화된 아민기의 숫자가 같다고 생각하면 된다.

IsoElectric Point (pI): 등전점, 단백질의 알짜 전하(Net Charge)가 0(zero)가 되는 pH를 그 단백질의 등전점이라고 한다.

5. 단백질의 아민기/카르복시기의 전하가 pH 에 따라 달라지는 이유

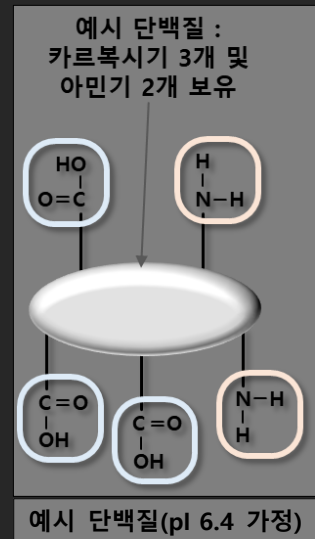
우측의 그림은 예시 단백질이다.

이 단백질은 3 개의 카르복시기와 2 개의 아민기를 포함하고 있다고 가정한다.

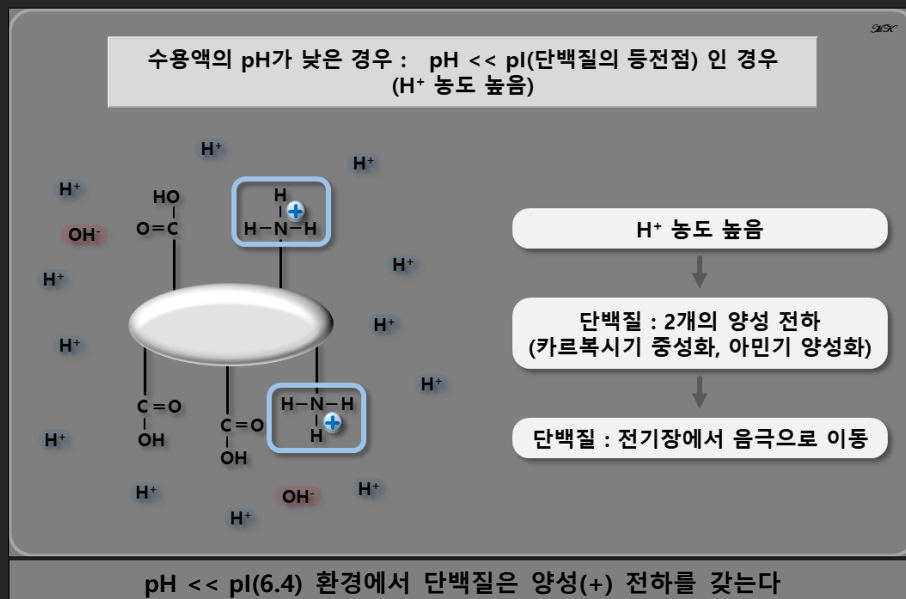
이 단백질은 카르복시기가 3 개이므로, GLU 과 ASP 의 개수가 합해서 3 개이다.

아민기는 2 개이므로, LYS 과 ARG 의 개수가 합해서 2 개이다.

또 예시로서 이 단백질의 pI 를 6.4 로 가정한다.



5-1. 수용액의 pH 가 낮은 경우



위의 그림은, 이 예시 단백질이 낮은 pH 의 수용액에 존재하는 경우에 알짜 전하가 양성(+)이 됨을 나타낸다.

낮은 pH 는 이 단백질의 pI 값인 6.4 보다 수용액의 pH 가 낮음을 의미한다.

낮은 pH 의 수용액에는 H^+ (수소이온)의 농도가 높다.

높은 농도의 H^+ 는 단백질의 Carboxylate($-COO^-$)에 결합하여 Carboxylate 를 중성의 카르복시산($COOH$)으로 전환시킨다.

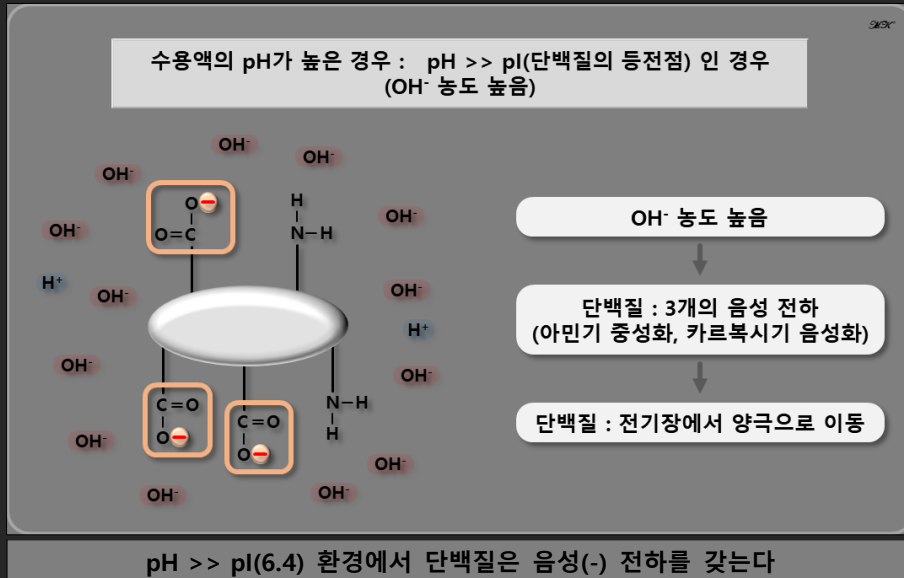
또한 높은 농도의 H^+ 는 단백질의 아민기($-NH_2$)에 결합하여 양성(+)전하를 갖는 $-NH_3^+$ 로 전환시킨다.

이러한 이유로 이 단백질은 자신의 pI 보다 낮은 pH 의 수용액에서는 알짜 전하가 양성(+)이 된다.

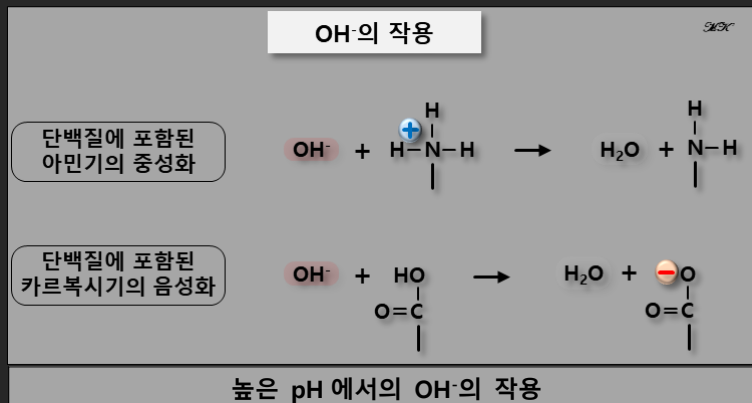
주의할 점은 여기서 'pH'는 단백질 자체의 고유의 값을 말하는 것이 아니라, 단백질이 용해되어 있는 수용액의 pH를 의미한다.

이에 반해 'pI'는 단백질 자체의 전기적 특성에 의한 단백질 고유의 특성값이다.

5-2. 수용액의 pH가 높은 경우



위의 그림은, 이 예시 단백질이 높은 pH의 수용액에 존재하는 경우에 알짜 전하가 음성(-)이 될을 나타낸다. 높은 pH는 이 단백질의 pI 값인 6.4 보다 수용액의 pH가 높음을 의미한다.



높은 pH의 수용액에는 OH⁻(수산화기)의 농도가 높다.

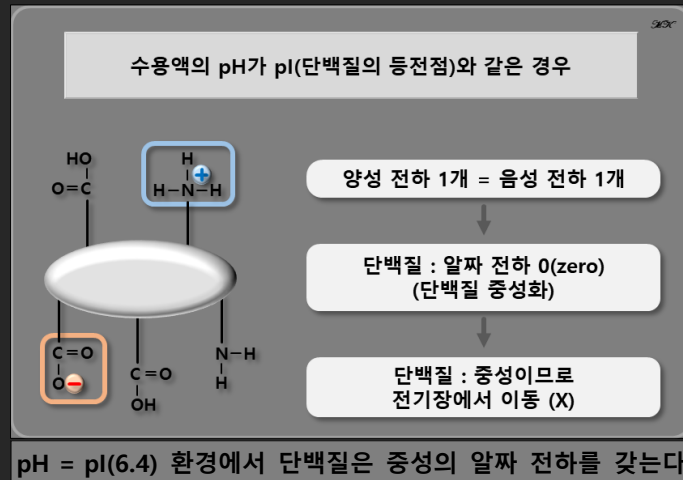
높은 농도의 OH⁻는 단백질의 -NH₃⁺로부터 H⁺를 제거하여 중성의 아민기(-NH₂)로 변환시킨다.

또한 높은 농도의 OH⁻는 단백질의 카르복시산(COOH)으로부터 H⁺를 제거하여 음성(-)전하를 갖는 Carboxylate(-COO⁻)로 변환시킨다.

이 변환들에 사용된 OH⁻는 H⁺과 결합하여 H₂O(물)이 된다.

이러한 이유로 이 단백질은 높은 pH에서는 알짜 전하가 음성(-)이 된다.

5-3. 수용액의 pH가 pI와 같은 경우



위의 그림은, 이 예시 단백질이 pI 값 6.4 과 동일한 pH 6.4 의 수용액에 존재하는 경우에 알짜 전하가 0(zero)으로 중성이 됨을 나타낸다.

단백질은, 이 단백질의 pI(등전점) 값과 동일한 pH 의 수용액에 존재하는 경우, 이온화되어 (-)1 의 음성전하를 갖는 카르복시기의 개수와 이온화되어 (+)1 의 양성전하를 갖는 아민기의 갯수가 같아진다.

위의 그림에서는, 예시로서, 이온화된 카르복시기와 이온화된 아민기가 각각 한 개로서 그 숫자가 같다.

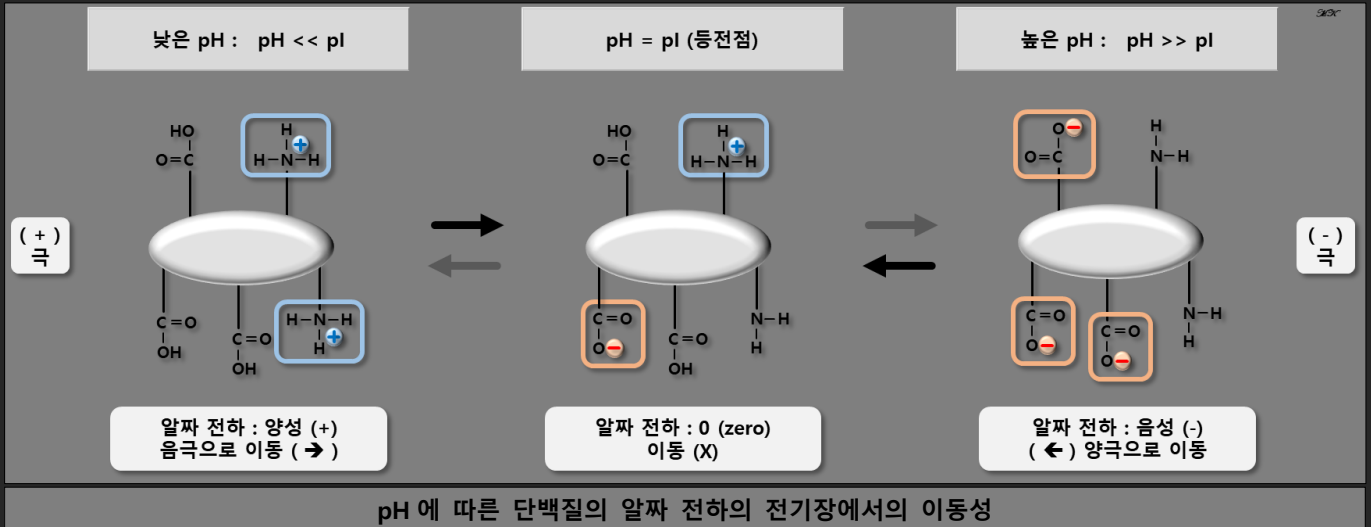
다른 예시로서, 실제 단백질에서는 이온화된 카르복시기와 이온화된 아민기가 각각 26 개인 경우로 숫자가 같아도 알짜 전하가 0 이 되며, 각각 42 개인 경우로 숫자가 같아도 알짜 전하가 0 이 된다.

이런 이유로 이 단백질은 pH 가 pI 와 동일한 환경에서는 알짜 전하가 0 으로 중성이 된다.

주의할 점은 pH=pI 인 수용액에서 단백질의 알짜 전하가 0 이 되는 이유는, “모든 카르복시기와 모든 아민기가 중성 상태로 존재하여 단백질의 알짜 전하가 0 이 된다”가 아니다.

“이온화되어 음성(-)전하를 갖는 카르복시기의 숫자와 이온화되어 양성(+)전하를 갖는 아민기의 숫자가 같기 때문에 단백질의 알짜 전하가 0 이 된다”가 정확한 이유라는 것을 기억해야 한다.

6. pH 에 따른 단백질의 전하와 전기장에서의 이동



소결론으로서,

(0) 단백질들은 아미노산의 서열과 조성에 따라 **다른 전기적 특성**을 나타낸다.

(1) 단백질은 **낮은 pH**에서는 **양성(+)**의 알짜 전하를 가지며, **전기장에서 음극(-) 방향으로 이동**하게 된다.

(2) 단백질은 **높은 pH**에서는 **음성(-)**의 알짜 전하를 가지며, **전기장에서 양극(+) 방향으로 이동**하게 된다.

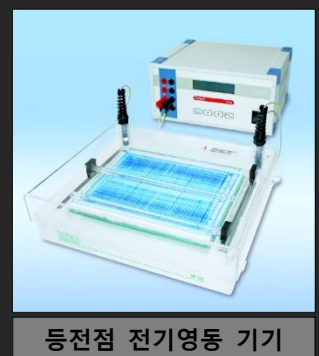
(3) 단백질은 자신의 **등전점(pI)**과 **같은 pH 환경에 존재**하는 경우, **중성**의 알짜 전하를 가지며, **전기장에서도 전하가 없기 때문에 이동하지 않는다**.

7. 등전점 전기영동 (IsoElectric Focusing, IEF)

단백질들은 고유의 아미노산 서열과 조성이 다르기 때문에 각각 다른 **고유의 등전점(pI, IsoElectric Point)** 값을 갖는다.

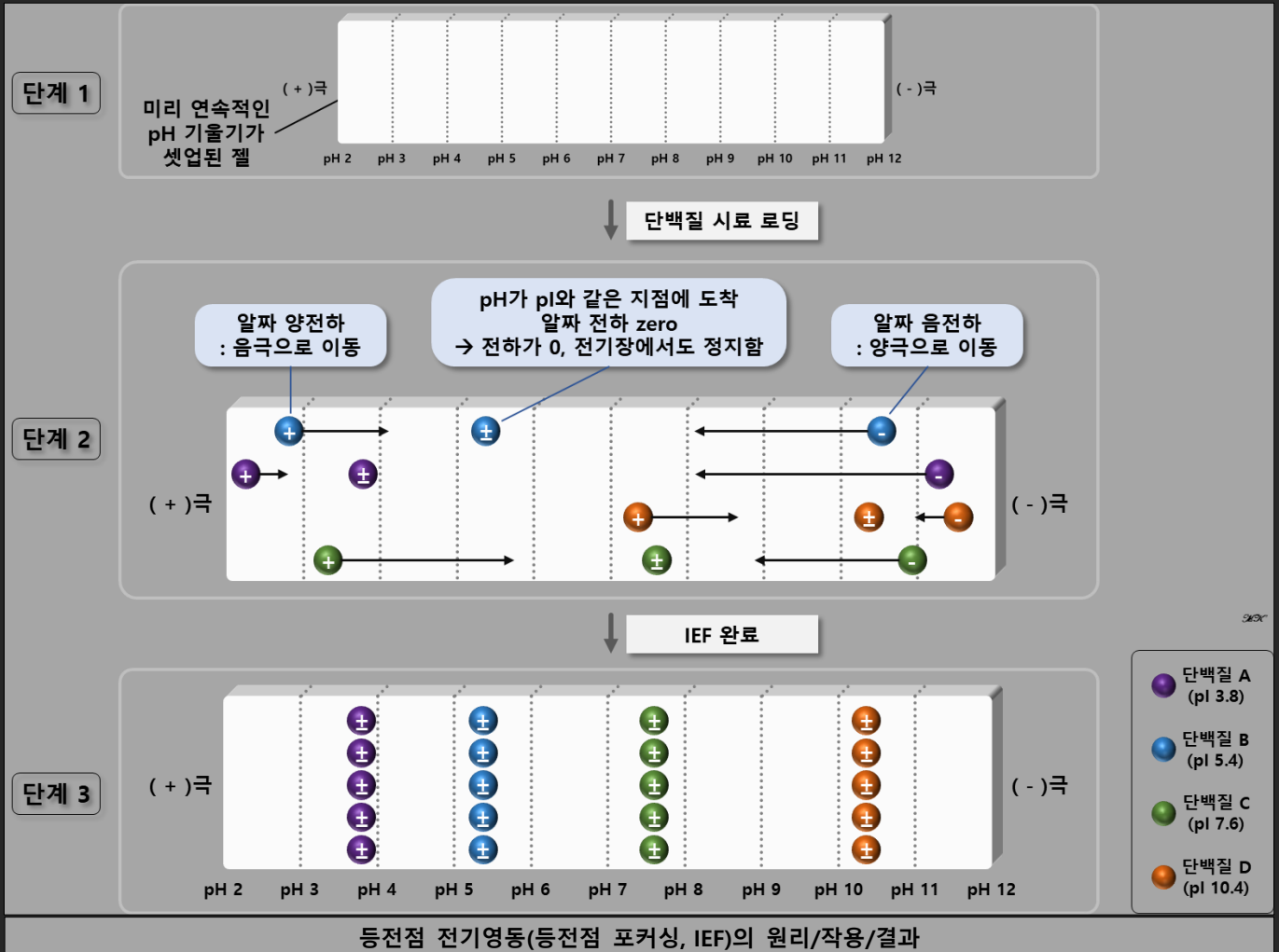
단백질들의 등전점이 다 다르기 때문에 이를 이용하여, 단백질 혼합물로부터 단백질들을 등전점에 따라 분리하는 생명공학 기법이 '**등전점 전기영동**'이다.

IEF : **I**so**E**lectric **F**ocusing (등전점 전기영동, 등전점 포커싱, 등전점 쫓점맞추기)



등전점 전기영동 기기

8. IEF(등전점 전기영동)의 원리/작용/결과



위의 그림은 IEF(등전점 전기영동)의 원리 및 작용 그리고 결과에 대한 그림이다.

IEF의 작용에 대한 설명이다.

(단계 1) IEF 젤을 준비한다. IEF 젤은 위치에 따라 pH가 점진적으로 변화하도록 미리 처리를 한다. 전원장치를 이용하여 IEF 젤에 전기장을 걸어준다. pH가 낮은 쪽이 (+)극이 된다.

(단계 2) 단백질 혼합물질을 IEF 젤에 로딩한다. 단백질들은 자신의 pI 값을 같은 pH 지역으로 전기장에 의해 이동하게 된다.

(단계 3) IEF 전기영동(Focusing)이 완료된 젤이다. 동일한 단백질 분자들은 동일한 pI 값을 갖기 때문에 동일한 지역에 위치하게 된다. 결과적으로 단백질별로 분리가 완료된다. 이 단백질들의 분리 결과는 분석에 사용되거나, 특정 단백질을 추출하여 순도가 높은 단백질 샘플을 얻을 수 있다.

IEF의 원리에 대한 설명이다.

위 그림의 (단계 2)의 최상단에 포함되어 있는 단백질 B(파란색)의 pI는 (예시로서) 5.4이다.

단백질 B 는 자신의 pI 값인 5.4 보다 낮은 pH 지역에 존재할 때(그림에서 pH 5.4 지역보다 좌측에 존재할 때)는, H^+ 의 농도가 높기 때문에, 단백질 B 에 포함된 카르복시기 는 중성화되고, 아민기는 양성(+) 전하를 갖는 $-NH_3^+$ 형태로 전환된다.

이에 따라 단백질 B 의 알짜 전하는 양성(+)이 되고, 단백질 B 분자는 (-)극이 있는 우측으로 이동하게 된다.

또 단백질 B 는 자신의 pI 값인 5.4 보다 높은 pH 지역에 존재할 때(그림에서 pH 5.4 지역보다 우측에 존재할 때)는, OH^- 의 농도가 높기 때문에, 단백질 B 에 포함된 아민기는 중성화되고, 카르복시기는 음성(-) 전하를 갖는 $-COO^-$ 형태로 전환된다.

이에 따라 단백질 B 의 알짜 전하는 음성(-)이 되고, 단백질 B 분자는 (+)극이 있는 좌측으로 이동하게 된다.

또 자신의 pI 값과 동일한 pH 5.4 지역에 있는 단백질 B 는 알짜 전하가 0(zero)이기 때문에 전기장하에서도 이동하지 않는다.

이러한 이동 경향에 따라 모든 단백질 B 들은 자신의 pI 값과 같은 pH 5.4 지역에 모이게 된다.

그림에 예시로서 포함되어 있는 단백질 A, B, C, D 들은 모두 이런 원리에 따라 자신의 pI 값과 같은 pH 지역에 모이게 된다.

결국 IEF 과정을 통해 단백질 혼합물은 동일한 단백질들끼리는 같은 지역에 모이게 되며, 다른 단백질들과는 서로 분리된다.

IEF 의 F 는 '**Focusing**'을 의미하는데, IEF 에서 동일한 단백질들은 특정 지역에 집중해서 모여서 위치하기 때문에 붙여진 명칭이다.

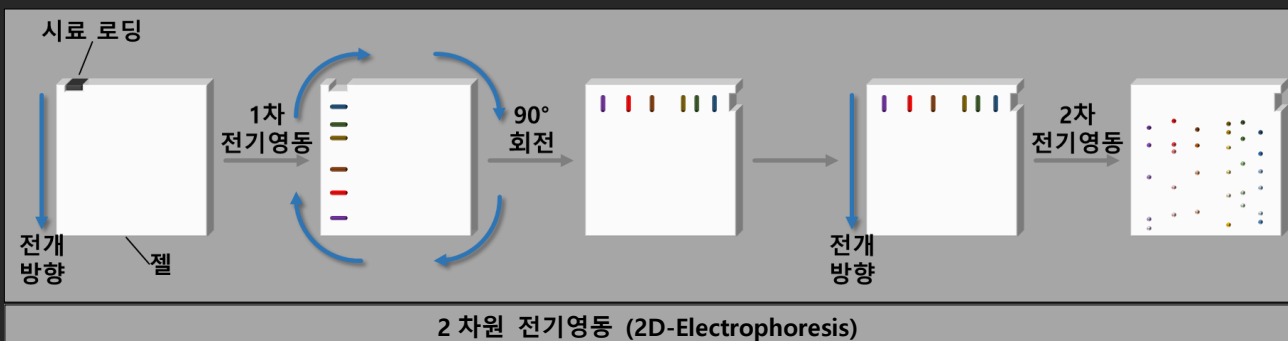
9. 단백질 분리 기법 : IEF(등전점 전기영동) vs 젤 전기영동(Gel Electrophoresis)

젤을 이용하여 단백질을 분리하는 기법에는 대표적으로 IEF 와 젤 전기영동이 있다.

"IEF 는 단백질들이 등전점(pI)에 따라 분리되며, 젤 전기영동은 단백질들이 크기에 따라 분리된다"는 것이 시험에서는 가장 중요한 포인트이다 !!!

'2 차원 전기영동'(2D Electrophoresis)에서는 1 차 전개에서 IEF 를 하고, 2 차 전개에서 젤 전기영동을 진행하는 경우가 많다.

이러한 방식의 '2차원 전기영동'은 1차 전개에서는 단백질 간의 등전점의 차이를 이용하고, 2차 전개에서는 단백질 간의 크기의 차이를 이용하기 때문에 단백질의 분리능이 높은 분석 기법이다.



추가내용 : 단백질의 젤 전기영동

젤 전기영동은 단백질 외에도 DNA, RNA 를 분리하는데 많이 사용된다.

단백질의 젤 전기영동 방식 중 가장 대표적인 방식은 'SDS-PAGE'이다.

'SDS-PAGE'는 SDS 라는 계면활성제를 사용하여 단백질을 변성 상태로 만들고, 폴리아크릴아마이드 성분의 젤에서 전기영동을 통해 단백질을 분리시키는 기법이다.

SDS 에 의해 변성된 단백질은 젤에서 정확히 크기에 따라 분리된다.

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate, 탄화수소 체인에 황산기(Sulfate)와 나트륨(Sodium)이 결합되어 있는 물질, 계면활성제로서 단백질을 변성시키는데 많이 사용한다.

SDS 의 탄화수소 체인은 12 개의 탄소(C) 원자를 포함하는데, SDS 의 D(Dodecyl)는 숫자 12 를 의미한다.

PAGE : PolyAcrylAmide Gel Electrophoresis, 폴리아크릴아마이드를 젤의 주성분으로 사용하는 젤(Gel) 전기영동법(Electrophoresis)

젤 전기영동의 젤을 만드는 물질로는 '아가로스'와 '폴리아크릴아마이드'가 대표적이다. '폴리아크릴아마이드'가 '아가로스'보다 더 조밀한 젤 구조를 형성할 수 있어 일반적으로 더 크기가 작은 분자를 분리하는데 사용된다.

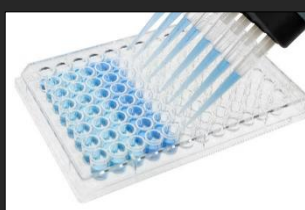
<< 참고 자료 2 : ELISA >>

<< 핵심지문 >>

1. **ELISA**(엘라이자)는 **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay** 의 약자이다.

Enzyme(효소)-Linked(결합) Immuno(면역)Sorbent(흡착) Assay(측정법)이므로 '효소결합면역흡착측정법'으로 번역될 수 있다.

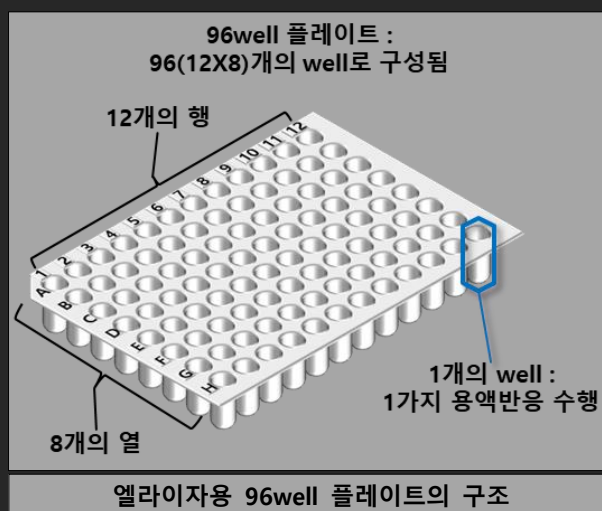
2. 이 기법에서는 '효소가 결합되어 있는 항체'가 필수적으로 사용되기 때문에 이러한 명칭을 갖고 있다.



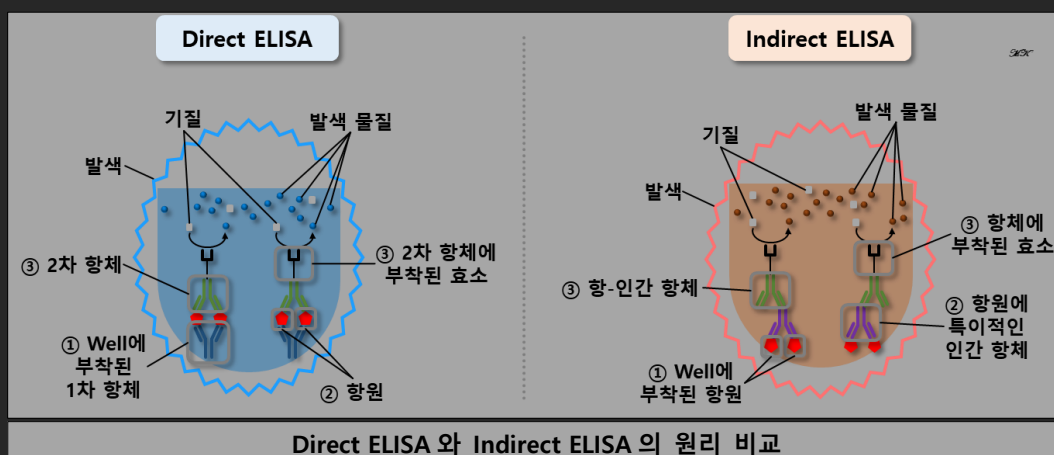
96well 엘라이자 플레이트



엘라이자 분석기기



3. ELISA 에 많이 사용되는 96-Well 플레이트와 ELISA 분석기기의 사진과 구조이다.



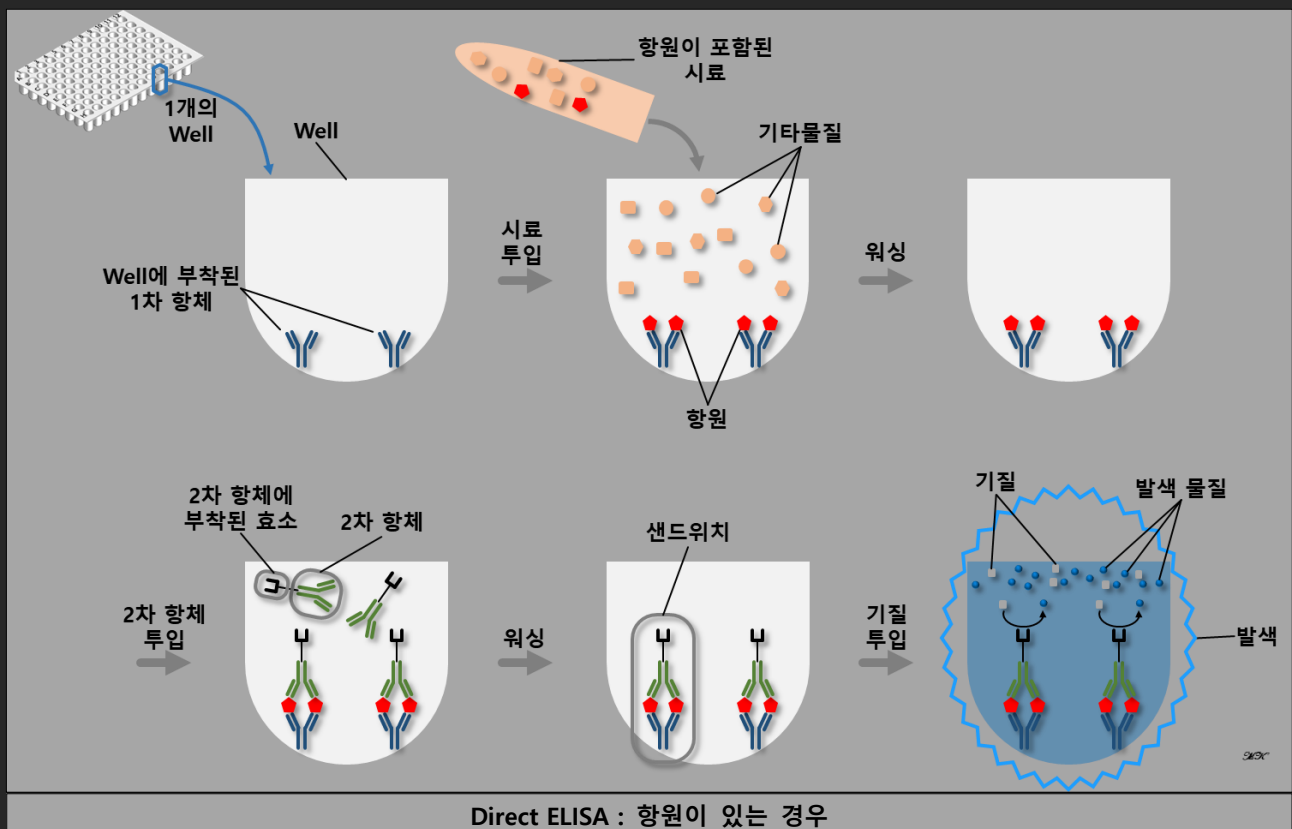
4. ELISA 에는 대표적으로 2 가지 방식이 존재한다. **Direct ELISA** 와 **Indirect ELISA** 가 그것이다.

5. **Direct ELISA** 는 항원의 양을 정량할 수 있으며, **Indirect ELISA** 는 항체의 양을 정량할 수 있다.

6. 96-Well 플레이트의 각 well 에서 일어난 반응은 최종적으로 발색반응이 이루어지며, 엘라이자 분석기기에서 이 발색량들을 정량적으로 측정하게 된다.

<< Direct ELISA 와 Indirect ELISA 의 비교 >>

	Direct ELISA	Indirect ELISA
① Well 부착 물질	1 차 항체	항원
② 분석 대상 물질	<u>항원</u>	항원에 특이적인 인간 <u>항체</u>
③ 추가 투입 항체	효소가 부착된 2 차 항체이며, 항원에 결합하는 2 차 항체	효소가 부착된 '항-인간 항체'이며, 인간 항체의 불변부위에 결합하는 항체
응용	다양한 응용 방식이 가능함 <u>단백질의 정량</u> 이 가능함	Ex) AIDS 등 <u>전염병의 감염여부 판단</u>

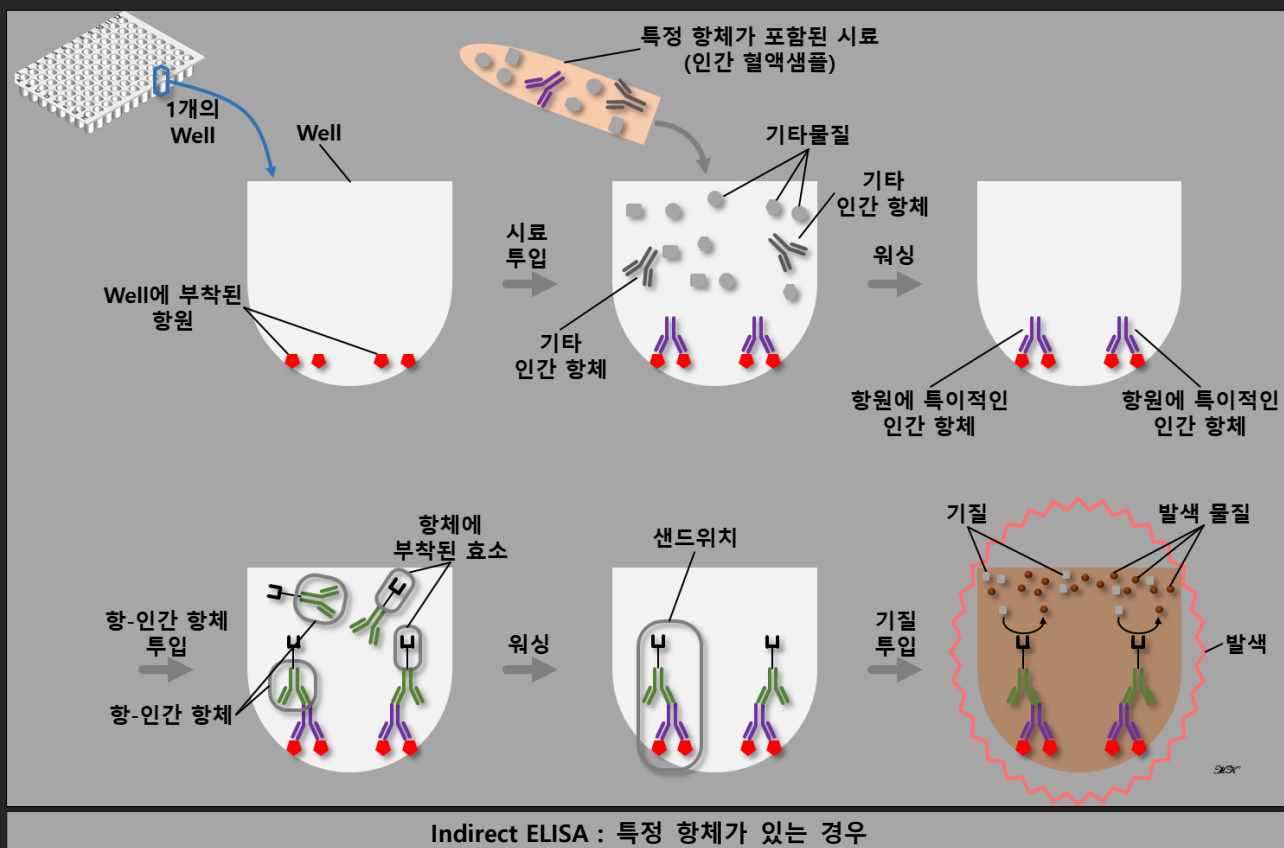


7. Direct ELISA 는 항원의 유무와 항원의 양을 정량하는 기법이다.

항원이 특정 단백질인 경우에는, 이 방식의 ELISA 를 통해 이 특정 단백질의 유무와 양을 정량할 수 있다.

항원은 단백질일 수도 있으며, 탄수화물, 화학물질 등 다양한 물질들도 항원이 될 수 있다.

8. Direct ELISA에서는 항원의 양과 발색 강도가 비례하기 때문에, 항원의 양에 대한 정확한 정량 분석이 가능하다.



9. Indirect ELISA 는 항체의 유무와 항체의 양을 정량하는 기법이다.

10. Indirect ELISA에서는 항체의 양과 발색 강도가 비례하기 때문에, 항체의 양에 대한 정확한 정량 분석이 가능하다.

	Direct ELISA	Indirect ELISA
분석 대상 물질	<u>항원</u>	<u>항체</u>
응용 기법	Ex) 환자의 소변에 존재하는 drug 의 정량 Ex) 인슐린 단백질을 생성하는 조직 세포의 특정 Ex) 특정 <u>단백질의 정량</u>	Ex) AIDS 등 <u>전염병의 감염여부</u> 판단 (응용 예시 1)

11. ELISA 는 항원과 이에 결합하는 항체를 다양하게 이용할 수 있기 때문에, 매우 다양한 응용 기법이 가능하다.

<< 참고 자료 2 : ELISA (효소결합면역흡착측정법) >>

1. ELISA(효소결합면역흡착측정법)의 명칭

ELISA 는 **E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay 또는 **E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**pecific **A**ssay 의 약자이다.

Enzyme(효소)-**L**inked(결합) **I**mmuno(면역)**S**orbent(흡착) **A**ssay(측정법)이므로 '효소결합면역흡착측정법'으로 번역될 수 있다.

실제는 '**엘라이자**'(ELISA)라는 명칭으로 많이 불리는 검사 기법이다.

이 기법에서는 특정 물질의 유무와 그 양을 측정하기 위해 이 특정 물질에 **특이적으로 결합하는 항체**를 사용한다.

이 항체에는 **효소가 결합되어** 있는데, 이 효소는 주로 **발색**을 일으키는 효소이다.

이 기법에서는 '**효소가 결합되어 있는 항체**'가 필수적으로 사용되기 때문에 이러한 명칭을 갖고 있다.

'**I**mmuno(면역)**S**orbent(흡착)'라는 표현은, 항원에 해당하는 특정 물질을 정량하기 위해 이 특정 물질에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하며, 이 '**항원-항체 반응**'(항원-항체 간의 흡착 또는 결합 반응)을 이용한다는 표현이다.

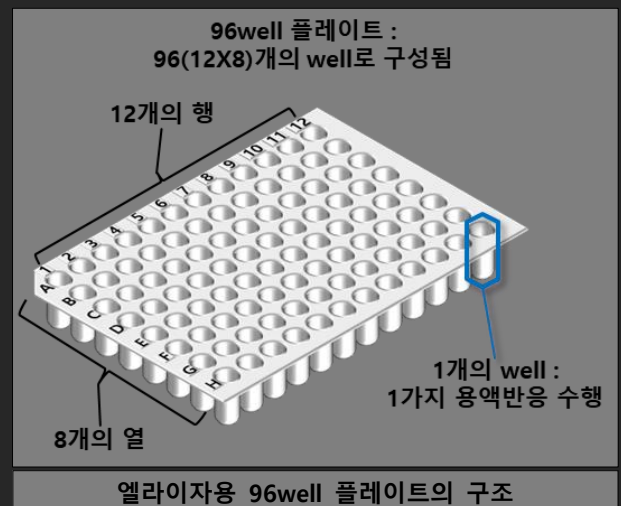
2. 플레이트 및 분석기기



96well 엘라이자 플레이트



엘라이자 분석기기



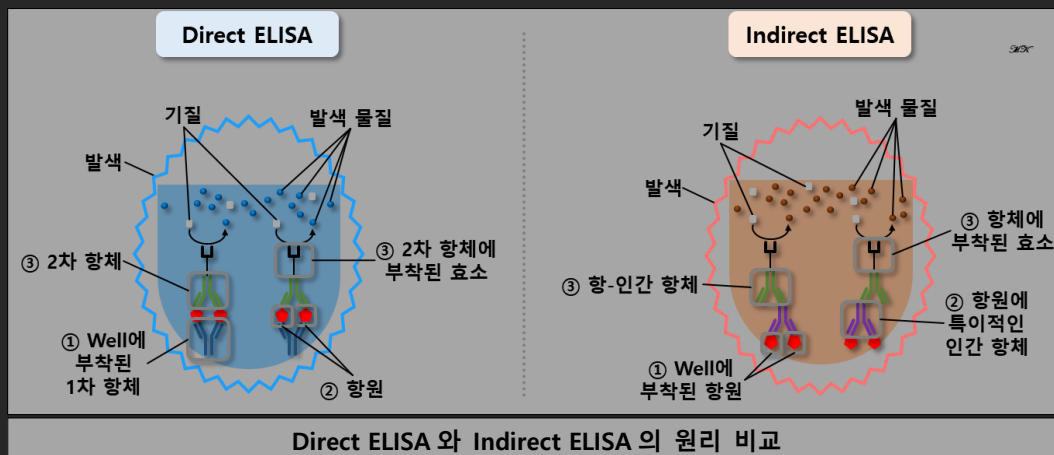
ELISA 에 많이 사용되는 **96-Well 플레이트**의 사진과 구조이다.

96-well 플레이트는 12 개의 행과 8 개의 열에 배열된 well 로 구성된다.

각 well 에서 ELISA 용액반응이 일어나며, 각 well 에서 수행되는 반응은 **일반적으로 well 마다 모두 다른 반응**을 수행한다.

각 well 에서 일어난 반응은 **최종적으로 발색반응**이 이루어지며, **엘라이자 분석기기에서 이 발색량들을 정량적으로 측정**하게 된다.

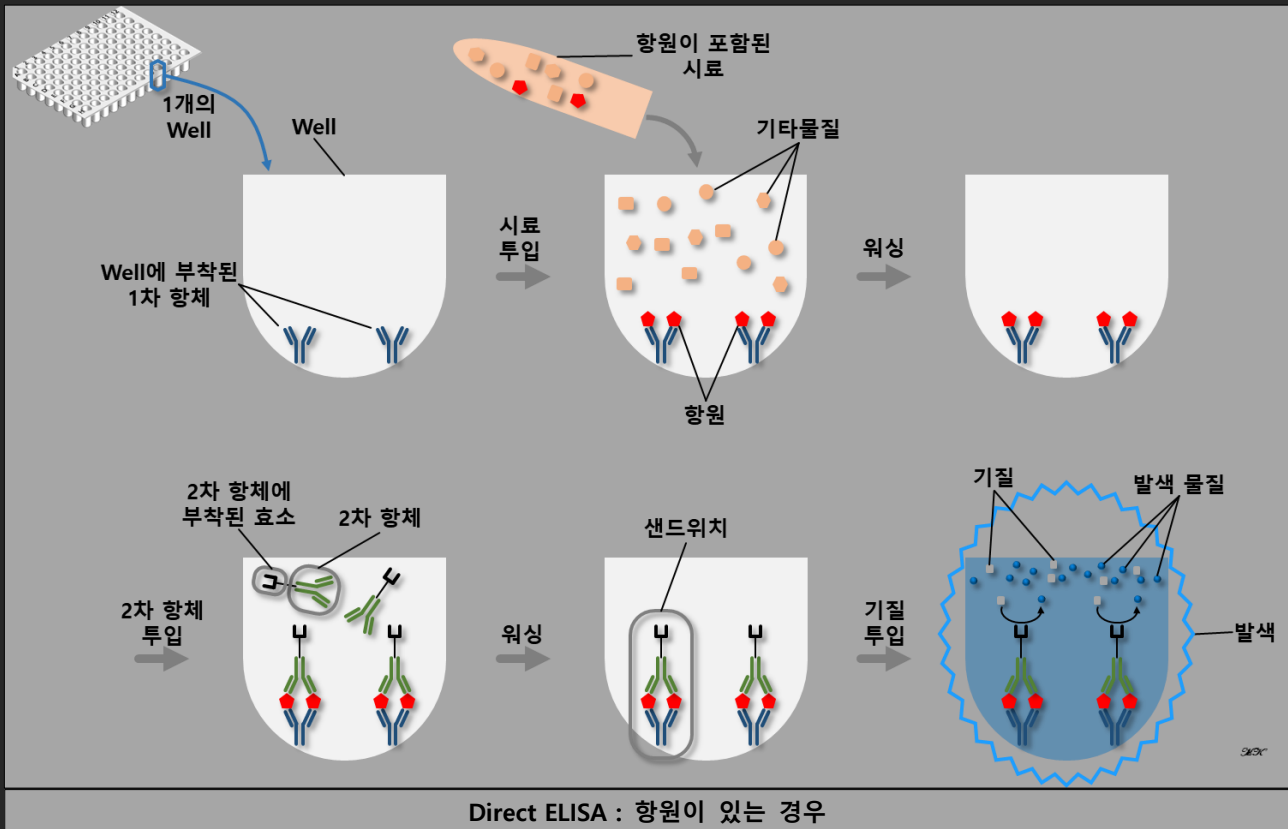
3. 2 가지 유형 : Direct ELISA vs Indirect ELISA



ELISA 에는 대표적으로 2 가지 방식이 존재한다. Direct ELISA 와 Indirect ELISA 가 그것이다.
 Direct ELISA 는 항원의 양을 정량할 수 있으며, Indirect ELISA 는 항체의 양을 정량할 수 있다.

Direct ELISA 와 Indirect ELISA 의 비교		
	Direct ELISA	Indirect ELISA
① Well 부착 물질	1 차 항체	항원
② 분석 대상 물질	<u>항원</u>	항원에 특이적인 인간 <u>항체</u>
③ 추가 투입 항체	효소가 부착된 2 차 항체이며, 항원에 결합하는 2 차 항체	효소가 부착된 '항-인간 항체'이며, 인간 항체의 불변부위에 결합하는 항체
응용	Ex) 환자의 소변에 존재하는 drug 의 정량 Ex) 인슐린 단백질을 생성하는 조직 세포의 특정 Ex) 특정 <u>단백질의 정량</u>	Ex) AIDS 등 <u>전염병의 감염여부</u> 판단

4. Direct ELISA



Direct ELISA 는 항원의 유무와 항원의 양을 정량하는 기법이다.

위의 그림은 96 well 플레이트 중 1 개의 well 에서 진행되는 direct ELISA 기법에 대한 설명이다.

이 well 의 내벽에는 특정 항원에 특이적으로 결합하는 1 차 항체들이 부착되어 있다.

여러 가지 물질이 섞인 시료가 투입되면, 이 중 특정 항원만 이 1 차 항체들에 결합한다.

다음은 워싱을 통해 결합되지 않은 물질들을 제거한다.

여기에 2 차 항체를 포함한 용액을 투입한다.

이 2 차 항체는 특정 항원의 다른 부분에 결합할 수 있는 항체이다.

또한 이 2 차 항체에는 특정 기질을 발색 물질로 변환할 수 있는 효소가 결합되어 있다.

다시 워싱을 통해 결합하지 않은 2 차 항체들을 제거한다.

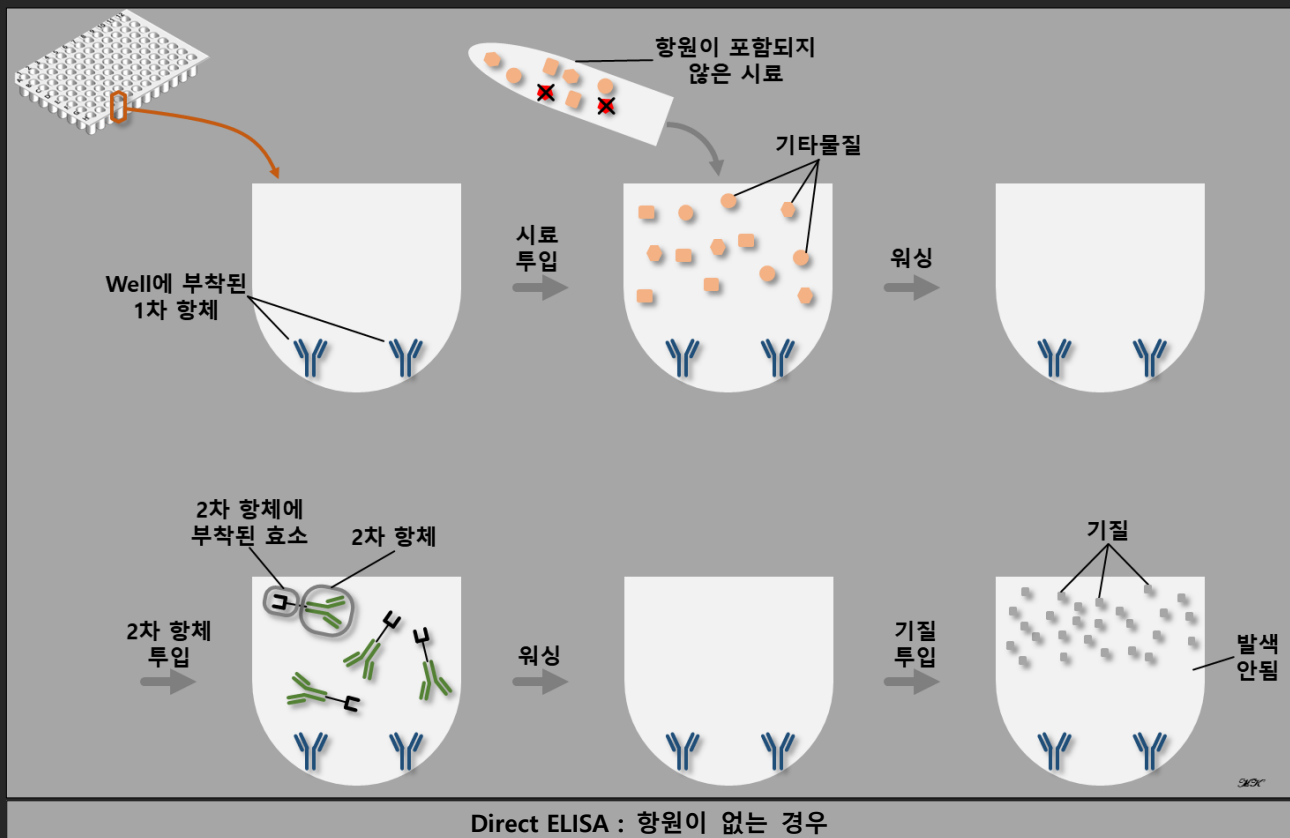
Well 에 결합되어 있는 '샌드위치'(1 차 항체-항원-효소가 결합된 2 차 항원의 샌드위치)만 well 내부에 남게 된다.

여기에 효소의 기질이 포함된 용액을 투입한다.

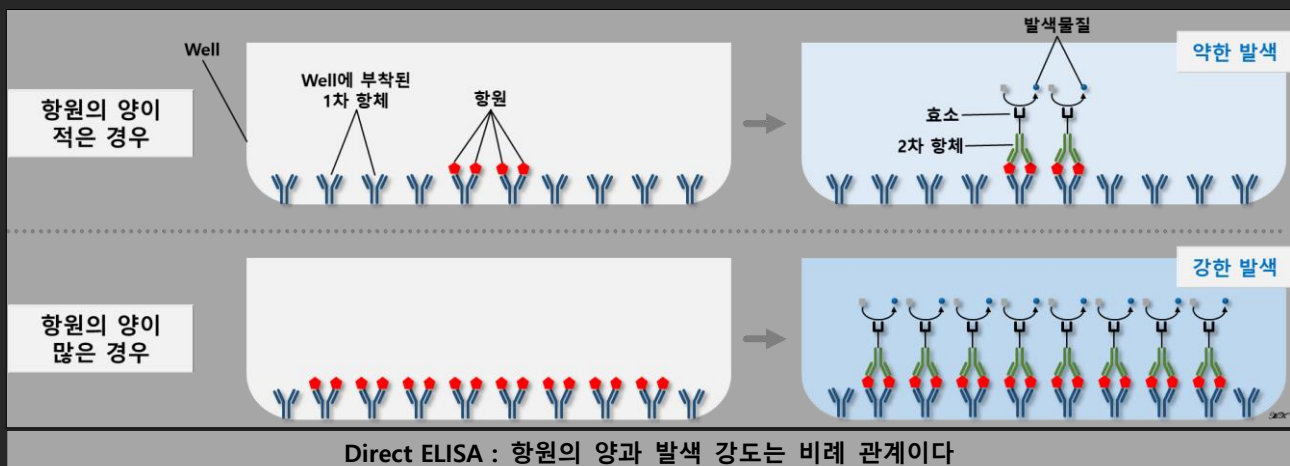
이 기질은 효소에 의해 발색 물질로 변환되고 well 에 담긴 용액이 발색에 의해 색깔을 띄게 된다.

발색 강도는 항원의 양에 비례하기 때문에 항원의 정량에 사용될 수 있다.

항원이 특정 단백질인 경우에는, 이 방식의 ELISA 를 통해 이 특정 단백질의 유무와 양을 정량할 수 있다.



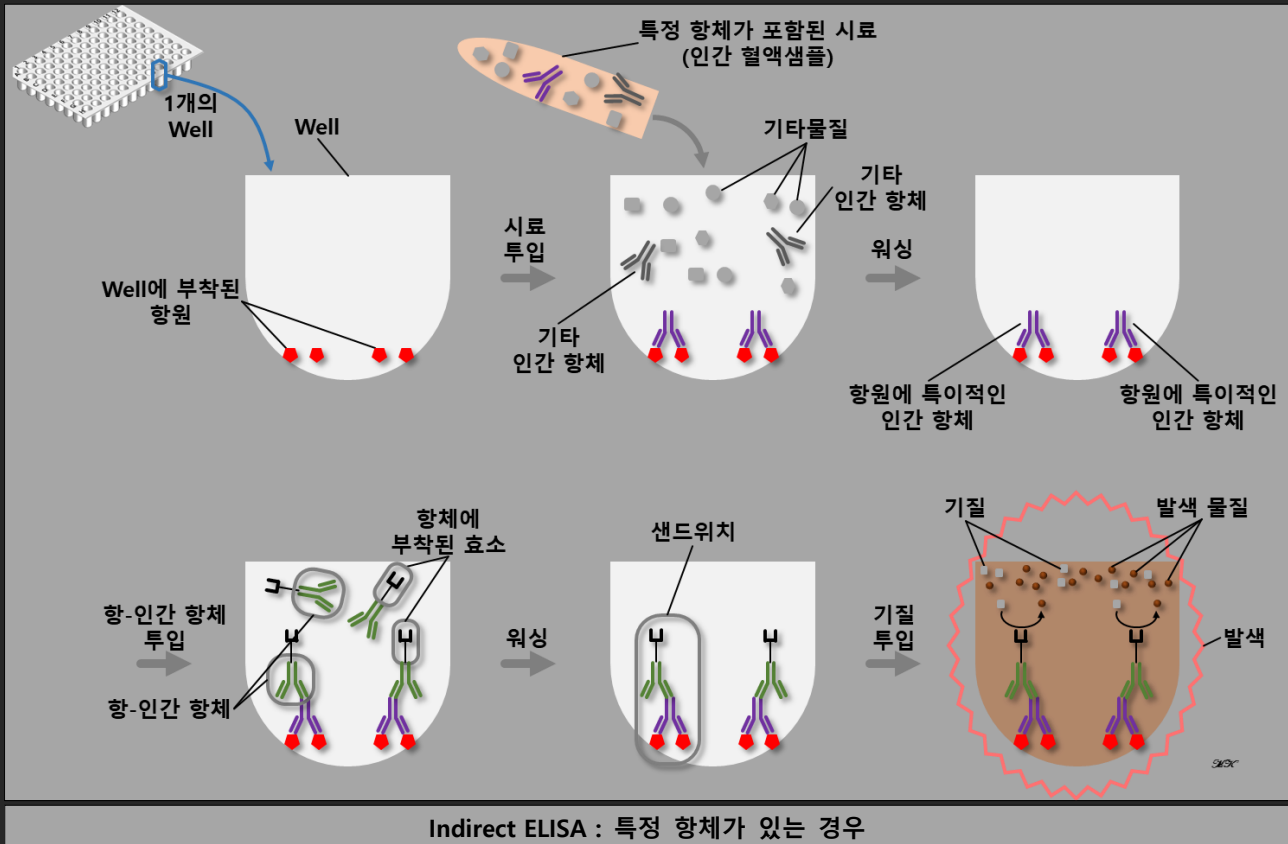
시료에 항원이 없는 경우에는, 위의 그림과 같이, 발색 반응이 전혀 일어나지 않는다.



위의 그림에서와 같이, 이 기법에서는 항원의 양과 발색 강도가 비례한다.

따라서 항원의 양에 대한 정량 분석이 가능하다.

5. Indirect ELISA



Indirect ELISA 는 항체의 유무와 항체의 양을 정량하는 기법이다.

위의 그림은 96 well 플레이트 중 1 개의 well 에서 진행되는 indirect ELISA 기법에 대한 설명이다.

이 well 의 내벽에는 특정 항원들이 부착되어 있다.

이 well 에 추가되는 반응 시료는 일반적으로 인간의 혈액 샘플이다.

혈액 속에는 여러가지 항체가 포함되어 있을 수 있다.

이 시료 중에 이 특정 항원에 결합하는 인간 항체가 포함되어 있으면 이 항체가 특정 항원에 결합한다.

다음은 워싱을 통해 결합되지 않은 물질들과 기타 항체들을 제거한다.

여기에 항-인간 항체를 포함한 용액을 투입한다.

이 항-인간 항체는 인간 항체의 불변 부위(F_c)에 결합할 수 있는 항체이다.

또한 이 항-인간 항체에는 특정 기질을 발색 물질로 변환할 수 있는 효소가 결합되어 있다.

다시 워싱을 통해 결합하지 않은 항-인간 항체들을 제거한다.

Well 에 결합되어 있는 '샌드위치(항원-인간 항체-항인간 항체의 샌드위치)'만 well 내부에 남게 된다.

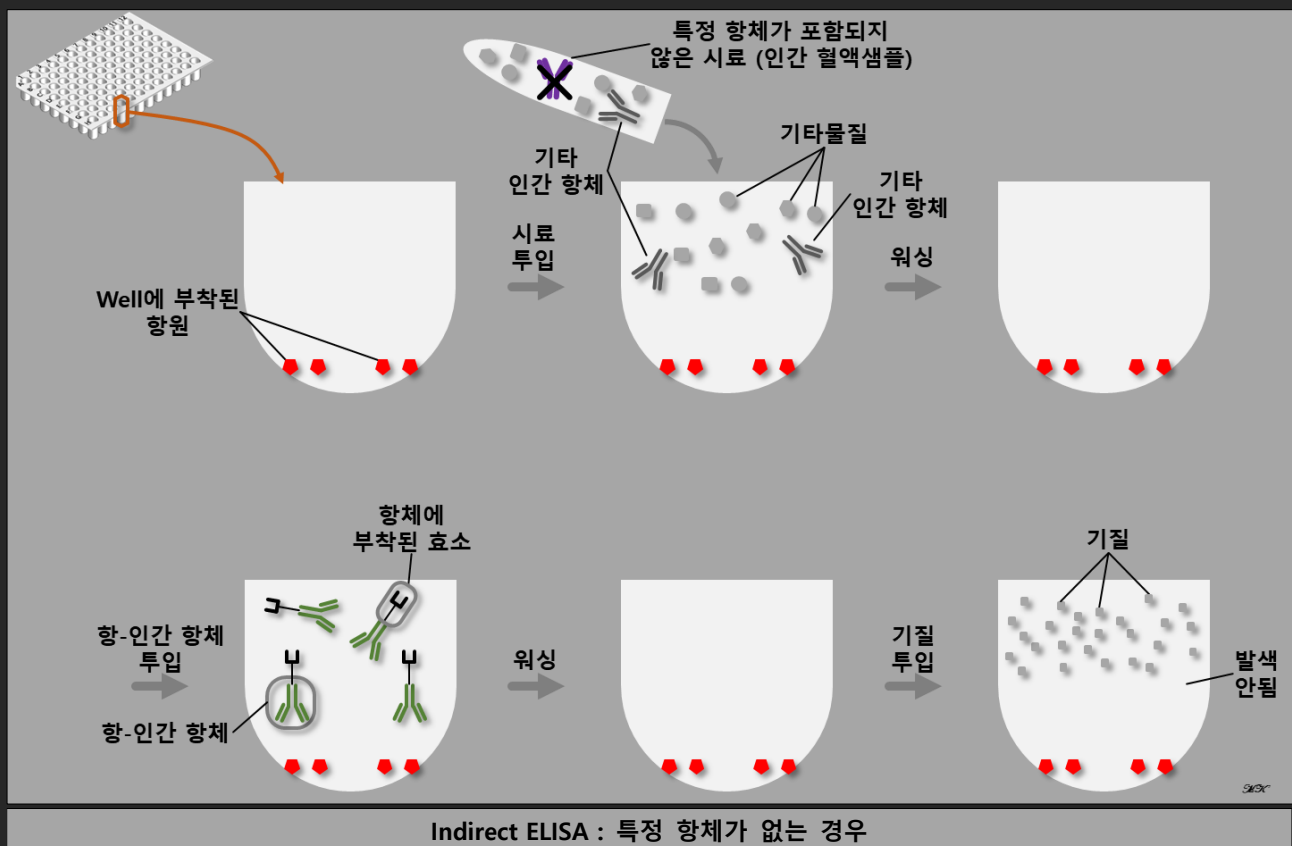
여기에 효소의 기질이 포함된 용액을 투입한다.

이 기질은 효소에 의해 발색 물질로 변환되고 well 에 담긴 용액이 발색에 의해 색깔을 띄게 된다.

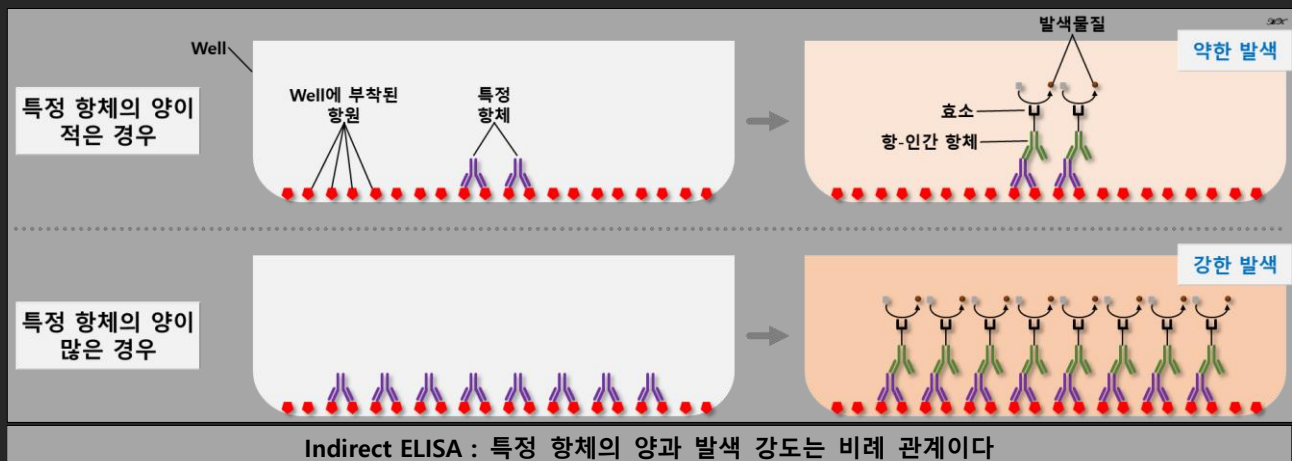
발색 강도는 특정 인간 항체의 양에 비례하기 때문에 특정 인간 항체의 정량에 사용될 수 있다.

F_c : constant(불변) Fragment(부위), 항체의 "Y" 자 형태 중 아래쪽 부위, 항원과 결합하지 않는 부위

항체에서 항원과 결합하는 부위는 F_v (가변 부위, variable Fragment)가 포함된 F_{ab} (항원결합 부위, antigen binding Fragment)이다.



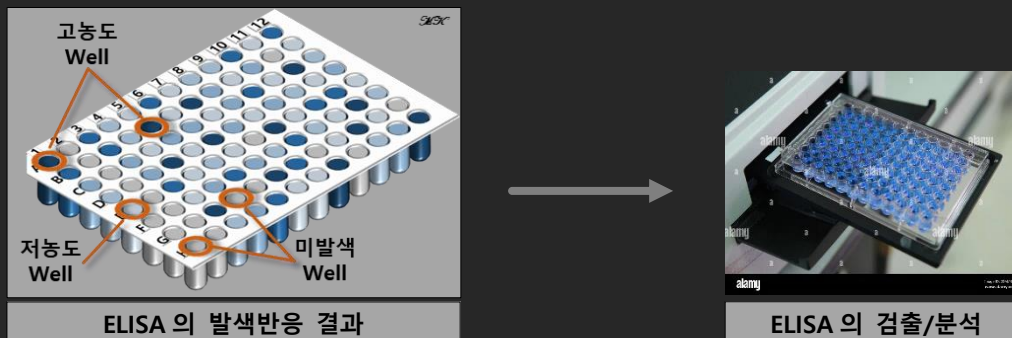
인간 혈액샘플 시료에 특정 인간 항체가 없는 경우에는, 위의 그림과 같이, 발색 반응이 전혀 일어나지 않는다.



위의 그림에서와 같이, Indirect ELISA에서는 특정 항체의 양과 발색 강도가 비례한다.

따라서 특정 항체의 양에 대한 정량 분석이 가능하다.

6. ELISA 의 최종 발색반응 결과/검출/분석



ELISA 에서 최종 발색반응이 진행되면, 96 개 well 각각에 포함된 정량대상 물질의 양에 따라 well 마다 다른 발색 강도의 용액이 생성된다. 정량대상 물질이 없는 well 은 발색이 되지 않아 투명한 용액을 유지한다.

이 플레이트는 우측 그림과 같이 엘라이자 분석기기(ELISA reader)에 넣어 각 well 별로 발색 강도를 검출하고 분석하게 된다.

7. 응용 기법

ELISA 는 항원과 이에 결합하는 항체를 다양하게 이용할 수 있기 때문에, 매우 다양한 응용 기법이 존재한다. 이미 키트화 되어 판매되는 응용 기법도 많으며, 필요한 경우 자신이 디자인하여 맞춤 키트를 제작할 수도 있다.

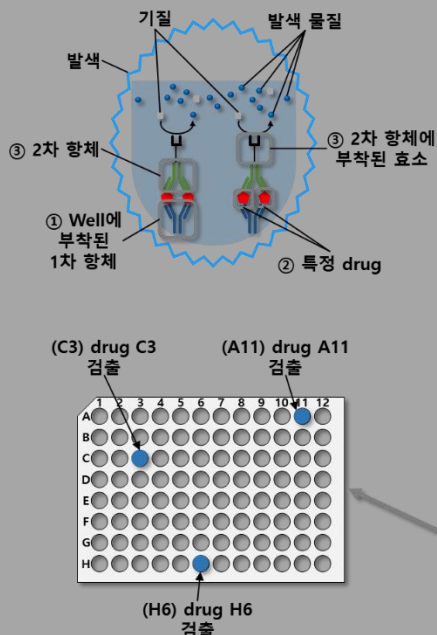
	Direct ELISA	Indirect ELISA
분석 대상 물질	<u>항원</u>	항원에 특이적인 인간 <u>항체</u>
응용 기법	<p>Ex) 환자의 소변에 존재하는 drug 의 정량 (응용 예시 1)</p> <p>Ex) 인슐린 단백질을 생성하는 조직 세포의 특정 (응용 예시 2)</p> <p>Ex) 특정 <u>단백질의 정량</u> (응용 예시 3)</p>	<p>Ex) AIDS 등 <u>전염병의 감염여부</u> 판단 (응용 예시 1)</p>

7-1. Direct ELISA 응용 기법

Direct ELISA 는 시료(샘플)에 존재하는 항원의 유무와 항원의 양을 정량할 수 있다.

항원은 단백질일 수도 있으며, 탄수화물, 화학물질 등 다양한 물질들도 항원이 될 수 있다.

Direct ELISA :
응용 예시 1



① 1차 항체 96종을 각 well에 부착
(1차 항체 96종은 96종의 drug에 각각 특이적으로 결합하는 항체이다)



각 well 마다
다른 항체

② 환자 1인의 동일한 소변 샘플을 96 well에 모두 분주 투입



모든 well 에
같은 샘플

워싱

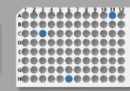
③ 효소가 결합된 2차 항체 96종을 각 well에 각각 투입
(2차 항체 96종은 96종의 drug에 각각 특이적으로 결합하는 항체이다.)



각 well 마다
다른 항체

워싱

발색 반응 / 검출 / 분석

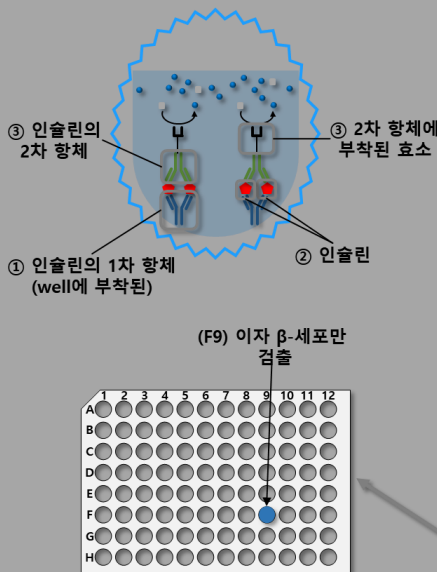


샘플에 존재하는
drug만 발색

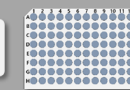
환자 1인의 소변에 존재하는 drug 종류 확인

Direct ELISA 응용 예시 1 : 환자 1 인의 소변에 존재하는 drug 종류 확인

Direct ELISA :
응용 예시 2



① 인슐린 단백질에 특이적인 1차 항체 1종을
모든 well에 부착



모든 well 에
같은 항체

② 동물 1종의 96가지 세포의 세포 파쇄물 용액을 각 well에
각각 투입 (간세포, 근육세포, 뉴런, 피부상피세포, 적혈구 등)
(이자의 β-세포 포함)



각 well 마다
다른 세포 샘플

워싱

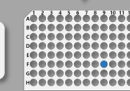
③ 인슐린 단백질에 특이적인 2차 항체 1종의 용액을
모든 well에 투입 (효소가 결합된 항체)



모든 well 에
같은 항체

워싱

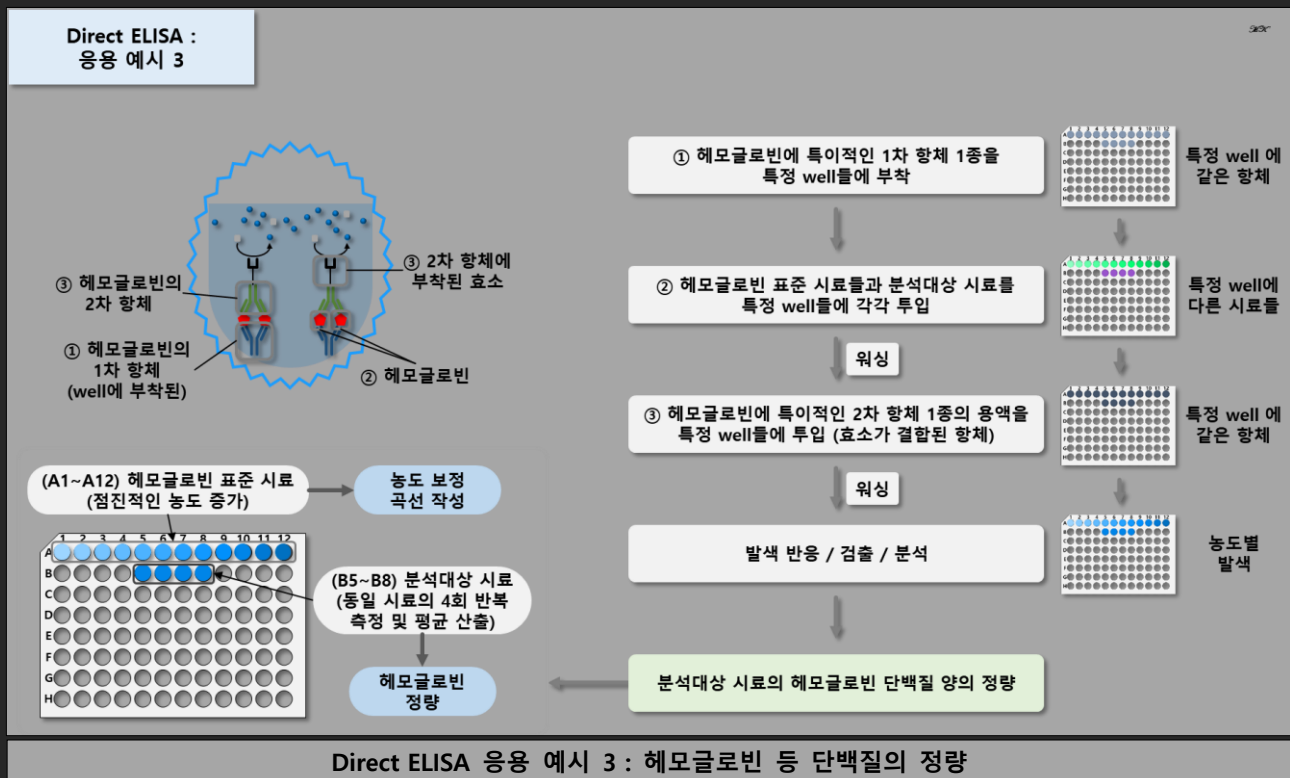
발색 반응 / 검출 / 분석



이자 β-세포만
발색

인슐린 단백질을 생성하는 세포의 종류 확인

Direct ELISA 응용 예시 2 : 인슐린 단백질을 생성하는 세포의 종류 확인



7-2. Indirect ELISA 응용 기법

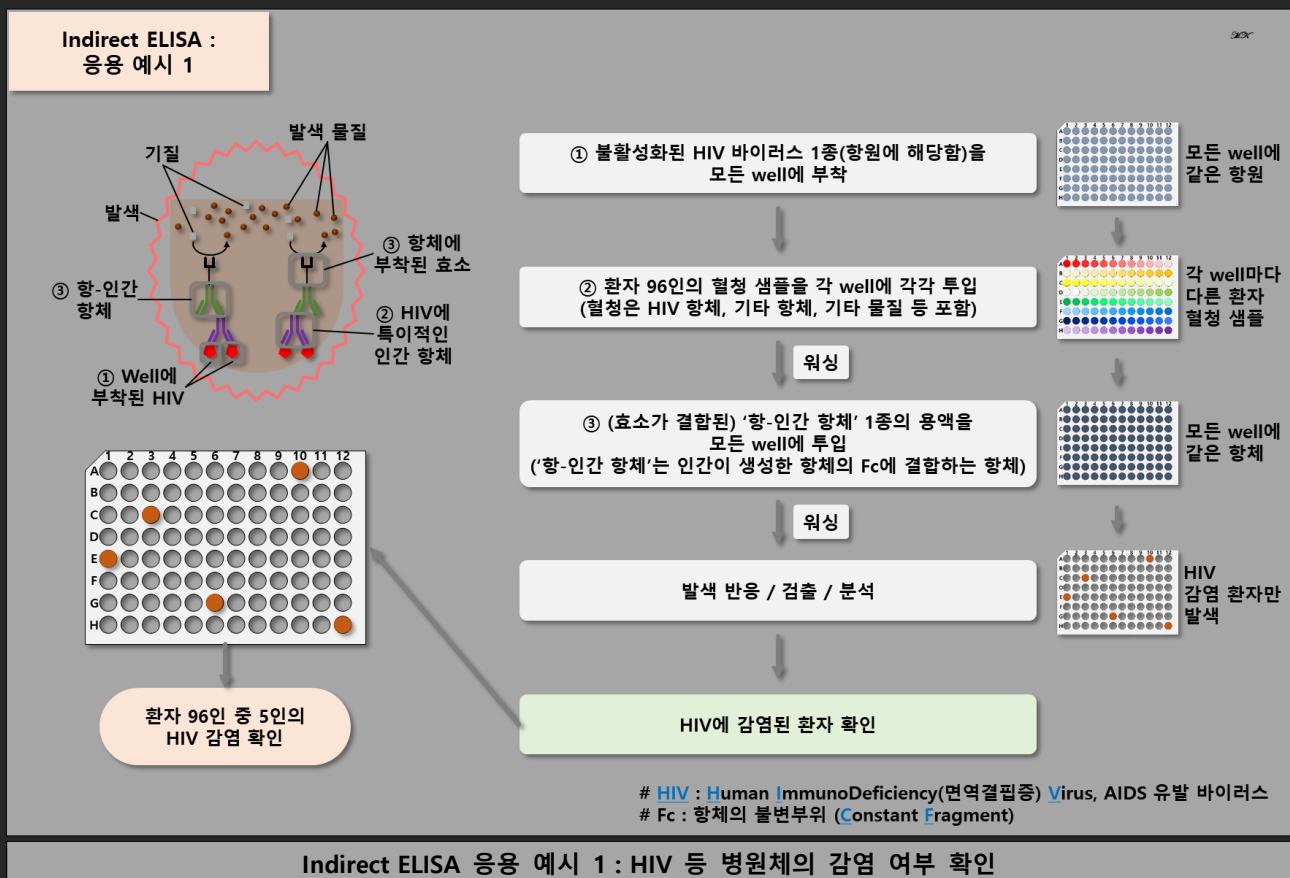
Indirect ELISA 는 시료(샘플)에 존재하는 항체의 유무와 항체의 양을 정량할 수 있다.

이러한 특성 때문에 인간의 병원체 감염 여부 확인에 많이 사용된다.

병원체의 예시는 에이즈를 유발하는 HIV 바이러스, 병원성 세균 등을 들 수 있다.

인간이 이러한 병원체에 감염되면 일반적으로 수일 이내에 이 병원체에 대한 항체가 생성되어 혈액 중에 존재하게 된다.

Indirect ELISA 기법을 이용하여, 환자의 혈액(혈청) 샘플에 특정 병원체에 대한 항체가 존재하는 것을 확인하면 이 환자는 특정 병원체에 감염된 것으로 판단할 수 있다.



HIV : Human ImmunoDeficiency(면역결핍증) Virus, AIDS 유발 바이러스

AIDS : Acquired(후천성) ImmunoDeficiency(면역결핍) Syndrome(증)

Fc : 항체의 불변부위 (constant Fragment)

"The End"