

# ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent assay)

(주)다인바이오 연구소

효소면역정량법 (ELISA)는 오늘날 가장 널리 이용되는 면역정량법이다. 이 방법은 Ag-Ab interaction을 이용하여 Ag or Ab를 정성, 정량할 수 있는 감도가 매우 우수한 실험법 (수 ng/mL)이다. 이 방법은 항체에 효소를 결합시켜 항원-항체 반응을 확인하는 방법으로, 그 방법이 간단하고 비용이 많이 들지 않으며 다량 분석이 가능하여 현재 가장 널리 쓰이고 있는 항원-항체 분석법의 하나가 되고 있다.

1970년대 초 프랑스 (Avrameas와 Guilbert, 1971년)와 스웨덴 (Engvall과 Perlman, 1971년)에 있는 두 그룹에 의해 동시에 고안되었다. ELISA라는 이름에서 알 수 있듯이 이 방법에는 효소가 이용된다. 항원의 농도는 기질 전환 정도에 따라 결정된다. 또한 ELISA라는 명칭으로부터 항체나 항원이 고체상에 흡착 (immunosorbent)되어 있는 원리가 포함되어 있음을 알 수 있다. 고체상의 흡착은 결합하지 않은 자유 (free) 항원을 세척을 통해 제거할 수 있도록 해준다. 이 방법은 mouse나 rabbit 등을 immunization한 후 얻은 serum이나 fusion을 통하여 얻은 hybridoma의 culture supernatant 안에 우리가 원하는 (즉, immunization에 사용한 antigen에 specific한) antibody가 생성되어 있는지를 확인하기 위한 실험이다. 특히 이 방법은 방사능면역시험법 (RIA, Radio Immunoassay)과 같이 매우 민감한 반응이면서도 RIA에서 처럼 방사능을 사용하지 않는다는 이점이 있어서 그 사용이 증가되고 있는 방법이다.

다양한 면역정량법이 개발되고 있지만 샌드위치와 경쟁적 ELISA 방법이 가장 빈번히 이용된다. 대개의 경우, 샌드위치 ELISA는 높은 민감도를 갖는다. Direct ELISA법도 사용되는데 이것은 항체가 아닌 항원이 고체상에 고정된다. Direct ELISA법은 환자의 혈청이나 hybridoma 배양상층액에 존재하는 항원특이적 항체를 검출하기 위해 이용된다.

항체에 결합되는 효소 중에는 간단한 기질 용액을 넣어주면 색깔을 띠는 반응이 이용되는데, 대표적인 효소로는 염기성인산분해효소 (alkaline phosphatase)나 양고추냉이과산화효소 (HRP, horseradish peroxidase) 등이 많이 이용되고 있다. 이들 효소는 항체분자의 Fc 지역에 공유결합 되도록 화학반응을 이용하여 결합시켜 사용한다.

## 1. ELISA의 종류

### 1) Direct ELISA (Direct 정량법)

direct method는 항원과 반응하는 항체에 바로 효소를 결합시켜 사용하는 방법을 말한다.

- a) 항원의 양을 측정, b) 항체에 대한 표지 항체가 요구됨, c) 항원이 요구됨

### 2) Indirect ELISA

항원과 결합하는 항체 (1차 항체, primary antibody)에는 효소가 없고, 그 항체와 결합하는 항체 (2차 항체, secondary antibody)에 효소가 결합되어 있는 분석방법. 일반적으로 isotype에 대한 항체에 효소가 결합된 형태 (enzyme conjugated anti-isotype antibody, 예를 들어 alkaline phosphatase conjugated

anti-mouse IgG 등)으로 판매되고 있으며, 자신이 이용하는 일차항체의 급 (isotype)에 맞는 효소결합항체를 구입하여 사용하면 된다.

### 3) Sandwich ELISA (샌드위치 정량법); 항원의 정량, 정성에 이용

항원이 plate에 잘 결합하도록, 항원에 대한 항체를 먼저 플레이트에 결합시키고, 그 항체에 항원을 결합시킨 다음, 직접법이나 간접법으로 조사하는 방법이다. 항원의 양이 적을 때 또는 미지의 샘플에 들어 있는 항원을 조사할 때 사용한다.

- a) 항원의 양을 측정, b) 두 개의 항원-특이적 항체가 요구됨, c) 합텐 검출에 적합하지 않음,
- d) 민감도가 높음

### 4) Competitive ELISA (경쟁적 정량법); 항체의 정량, 정성에 이용

경쟁적 정량법은 항체의 같은 결합 부위에 대한 2가지 항원간의 경쟁에 의해 이루어진다. 2가지 항원 중 하나는 동위원소나 효소에 의해 표지된 항원이며 다른 하나는 표지되지 않은 것이다. 경쟁적 정량법은 표지된 항원, 표준 곡선(standard curve)을 만들기 위한 비표지된 항원(정량하고자 하는 항원), 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체 (혹은 항혈청) 및 항원을 포함하는 시료가 준비되어야 한다. 시료에 포함되어 있는 비표지된 항원과 항체의 반응에 따라 반응 결합물에서 약한 표지 신호가 검출되는 원리이며 표준 곡선에 의해 미지 시료 속에 포함된 항원을 정량할 수 있다. 경쟁 원리에 따라 항체의 자유로운 결합 부위가 반응용액 내에서 '제한 요인(limiting factor)'이 된다.

- a) 항원의 양을 측정, b) 표지 항원이 요구됨, c) 항원-특이적 항체가 요구됨, d) 합텐 검출에 적합함

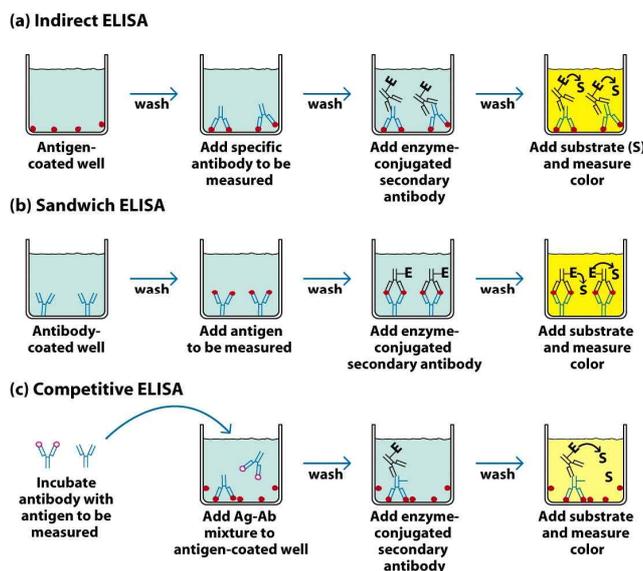
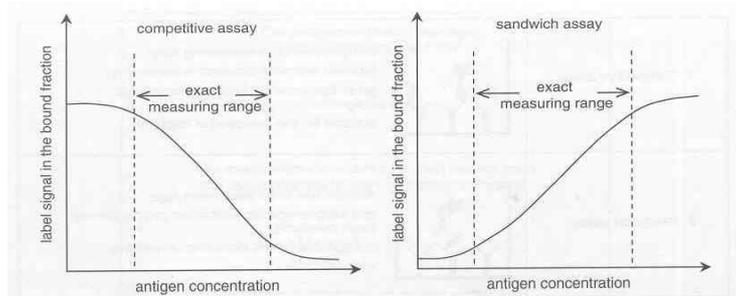


Fig. 1. ELISA의 종류.



**Fig. 2. 경쟁적, 샌드위치 정량법의 전형적인 표준곡선.** 경쟁적 정량법에서는 항원의 농도가 증가함에 따라 표지 신호가 약해지는 반면 샌드위치 정량법에서는 항원 농도 증가에 따라 신호가 증가한다.

## 2. 코팅(coating), 블로킹(blocking), 세척(washing)

### 1) 코팅

ELISA의 첫 번째 단계는 항체 혹은 항원을 고체상에 결합시키는 '코팅 (coating)'이라는 과정이다. 대체로 96-well microtiter 플레이트가 고체상 재료로 이용된다. 항체나 항원의 흡착 (adsorption)이 일반적인 코팅 방법이다. 폴리스티렌 재료의 microtiter 플레이트는 유난히 단백질이 잘 부착한다. 이러한 단백질 결합은 소수성 결합이며 대부분의 경우에 PBS (pH 7.4)나 sodium carbonate 완충용액 (pH 9.6)을 용매로 사용한다 (Table 1).

**Table 1. 코팅, 블로킹, 세척을 위한 용액**

Intended use	Description	Configuration	
Coating	PBS, pH 7.4	NaCl	8.0 g
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.1 g
		KCl	0.2 g
Coating	Na-Carbonate buffer, pH 9.6	H <sub>2</sub> O dest.	ad 1,000 ml
		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.6 g
		NaHCO <sub>3</sub>	2.4 g
Coating	0.1 M Na-Carbonate, pH 9.6	H <sub>2</sub> O dest.	ad 1,000 ml
		NaHCO <sub>3</sub>	8.4 g
		H <sub>2</sub> O dest.	ad 1,000 ml
Washing	PBS/Tween 20 (0.05%), pH 7.4	Tween 20	0.5 ml
		PBS	ad 1,000 ml
Washing	Saline/Tween 20 (0.1%), pH 7.4	NaCl	9.0 g
		Tween 20	1.0 ml
		H <sub>2</sub> O dest.	ad 1,000 ml
Blocking	PBS/BSA (2%), pH 7.4	BSA	20 g
		PBS	ad 1,000 ml
Blocking	PBS/Casein (0.1%), pH 7.4	Casein	1.0 g
		PBS	ad 1,000 ml
Blocking	PBS/low fat milk powder (2%), pH 7.4	Milk powder <sup>1</sup>	20 g
		PBS	ad 1,000 ml

<sup>1</sup>Milk powder(분유)는 따뜻한 PBS에 잘 녹는다.

실험자가 항체나 항원의 안정성을 위해 사용할 코팅 완충용액을 결정해야 한다. 또한 분석에 요구되는 코팅할 적당한 항체 혹은 항원의 농도를 0.5-10.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위 내에서 실험적으로 결정해야 한다. 더 높은 농도를 이용하면 불안정한 2중 혹은 다중 항체 혹은 항원 층이 형성되어 역효과가 나타난다. 코팅은 대체로 96-well 플레이트의 한 well 당 항체 혹은 항원을 포함하는 코팅 완충용액을 50-200  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 2-8°C에서 밤새 (10~18 시간) 반응시킨다. 실험 중 여러 번의 세척 과정 동안에 항원·항체 복합체가 손실되는 것을 피하기 위해서 항체 혹은 항원을 광화학반응에 의해 활성화된 폴리스티렌 microtiter 플레이트에 공유결합시켜 코팅하는 방법도 있는데, 이 방법은 carbonate-bicarbonate 완충용액(pH 9.6) 내에서 45분 만에 코팅이 가능하므로 시간을 절약할 수 있다는 장점이 있다.

## 2) 블로킹

비특이적으로 흡착된 효소-표지 항체 혹은 항원 분자에 의해 생성되는 이면 활성도 (background activity)는 ELISA 정량법에 문제를 야기시킨다. 따라서 자유 단백질 결합 부위의 블로킹은 이면 활성도를 최소화하기 위해 반드시 필요한 단계이다. BSA, FCS, 카제인, 젤라틴 등이 블로킹에 이용된다. 그 중 경제적인 방법은 슈퍼마켓에서 흔히 구할 수 있는 분유 (milk powder)이다. 10 mM PBS - 0.5-5% BSA가 전통적인 블로킹 시약으로 종종 이용된다. Tween 20, Nonidet P-40, Triton X-100과 같은 비이온성 세제를 0.01-0.1%의 농도로 표지 항체 혹은 항원과 반응 시 첨가하면 특이적인 항원·항체 결합은 방해하지 않으면서 고체상에 대한 비특이적인 흡착을 감소시킬 수 있다.

## 3) 세척

각각의 반응 단계 사이에 행하는 세척은 훌륭한 표준 곡선과 만족할만한 ELISA 결과를 얻기 위해 필수적이다. 세척 단계에서 PBS, saline, PBS-세제, 수돗물 등을 사용할 수 있다. 보편적인 세척 완충용액은 PBS/0.05% Tween 20이다 (Table 1).

## 3. 효소와 기질

ELISA에 이용되는 효소에는 소의 혈청으로부터 추출한 horseradish peroxidase (HRP)와 alkaline phosphatase (AP), *Escherichia coli*로부터 추출한  $\beta$ -galactosidase, *Aspergillus niger*로부터 추출한 glucose oxidase 등이 있다 (Table 2).

**Table 2. ELISA에 이용되는 효소와 기질**

효소	최적 pH	기질	효소의 검출 제한 [mol/l]	효소-표지 IgG의 검출 제한 [ng/ml]
Horseradish peroxidase	5-7	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /ABTS (c)	10 <sup>-13</sup>	16.0
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /oPD (c)	10 <sup>-14</sup>	2.0
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TMB (c)	2 x 10 <sup>-15</sup>	0.3
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HPPA (f)	10 <sup>-15</sup>	0.3
Alkaline phosphatase	9-10	pNPP (c)	2 x 10 <sup>-13</sup>	43.0
		MUP (f)	10 <sup>-15</sup>	0.5
β-galactosidase	6-8	oNPG (c)	2 x 10 <sup>-13</sup>	350.0
		MUG (f)	5 x 10 <sup>-16</sup>	1.0
Glucose oxidase	4-7	Coupled reaction with peroxidase; addition of glucose, peroxidase, and substrate for the peroxidase		

(c); chromogenic substrate, (f); fluorimetric-detectable substrate, ABTS; 2,2-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonate, HPPA; 3-(p-hydroxyphenyl) propionic acid, MUG; 4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside, MUP; 4-methylumbelliferyl phosphate, oNPG; o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, oPD; o-phenylenediamine, pNPP; p-nitrophenyl phosphate, TMB; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.

효소 활성도는 색변화 (colorimetric-), 형광 (fluorimetric-) 혹은 발광 (luminometric-) 검출성 기질에 의해 검출될 수 있다. 색변화를 보이는 기질이 널리 이용되며 다음과 같은 장점이 있다: ① 반응을 멈추어도 색깔을 띠는 최종 산물이 오랜 시간 동안 안정적으로 유지될 수 있다. ② 선별 과정 중, microtiter 플레이트를 빠르게 시각적으로 감지할 수 있다. ③ 상대적으로 값싼 광도계로 빠르게 산물을 측정할 수 있다. 형광 및 발광-검출성 기질을 이용하여 측정하면 민감도를 대략 2-10배 증가시킬 수 있지만 측정 장비가 비싸고 최종 반응물이 빨리 사라진다. 그러나 측정할 수 있는 시료가 제한되어 있는 경우에 형광-검출성 기질을 이용하면 검출 시 시작 용액 부피를 감소시킬 수 있기 때문에 유용하다. 표 2-2에서 ELISA 이용되는 효소와 기질을 나타내고 있다. 만약 민감도가 특히 중요한 정량법이라면 효소는 HRP, 기질은 형광-검출성 기질인 HPPA 혹은 색변화-검출성 기질인 TMB를 이용할 수 있다.

#### 4. ELISA 실습

Fig. 3에 전형적인 샌드위치 ELISA와 경쟁적 ELISA 방법을 비교하여 도식화하였다. 제시된 반응 시간은 특정 실험실에서 실험적으로 증명된 방법이다.

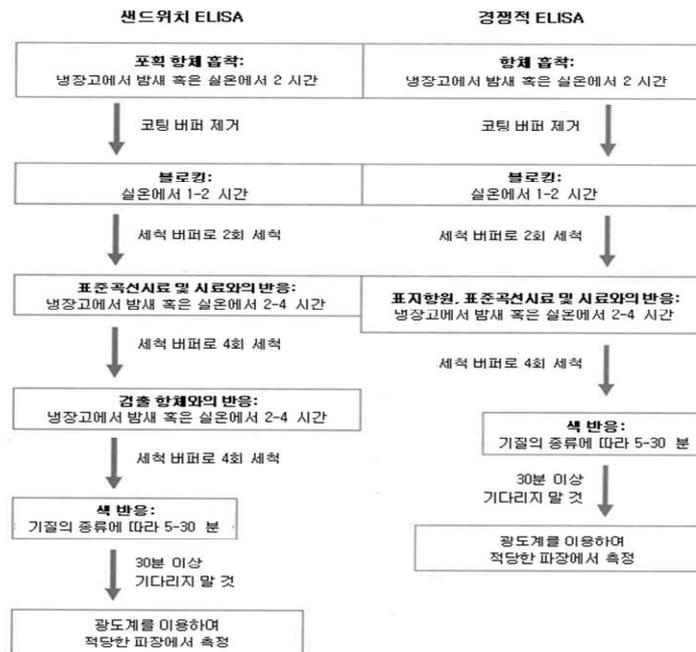


Fig. 3. 샌드위치 ELISA와 경쟁적 ELISA 방법에 대한 모식도.

효소 반응은 적당한 pH의 특정완충용액에서의 기질 첨가로 시작된다. 각각의 효소에 대한 적정 pH와 기질을 Table 2에서 나타내었다. 효소 반응을 끝내기 위한 정지 용액을 첨가한다 (Table 3).

Table 3. ELISA에 이용되는 효소와 기질

기질	정지 용액	측정 파장
ABTS	1M citric acid + 0.05% NaN <sub>3</sub>	405 nm
oPO	2.5M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	490 nm
TMB	2.0M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	370 nm (without stop solution) 450 nm (after addition of H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
pNPP	3M NaOH	405 nm
oNPG	1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	405nm

ABTS; 2,2-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonate, oNPG; o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, oPD; o-phenylenediamine, pNPP; p-nitrophenyl phosphate, TMB; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.

적절한 지점에서 반응을 정지시킨 후 효소-기질 반응의 산물을 적당한 파장에서 측정한다.  
 Table 4에서는 ELISA할 때 예기치 못한 문제가 발생하였을 때 극복하기 위한 방법을 요약하고 있다.

**Table 4. ELISA 실험 문제 발생시 해결책**

문제	가능한 문제발생 이유	해결책
높은 이면도	불충분한 세척으로 인한 기질 용액의 오염	더 세척하거나 다른 세척 buffer를 이용 기질용액의 색이 없어져야 함; 새로운 용액 이용
	효소 접합물의 불충분한 희석	효소 접합물을 더 희석함
	불충분한 블로킹	다른 블로킹 시약을 이용
	Avidin 효소 접합물을 이용할 때: 접합물의 비특이적인 결합	Avidin은 다른 표면에 쉽게 비특이적으로 결합하므로 최대 15 분으로 반응시간을 최소화하거나 streptavidin-효소 접합물을 이용
신호가 없거나 약한 신호	불충분한 코팅	코팅 buffer내 항체나 항원 농도를 증가 다른 코팅 buffer 이용
	효소 접합물의 과희석	희석 배율을 낮춤
	반응시 효소 저해제가 포함	NaN <sub>3</sub> 는 horseradish peroxidase를 저해함. 다른 효소를 이용 하거나 저해제 없는 시료 buffer를 이용함.
불량 표준 곡선 및 동일 시료의 다중결과값	반응 시간이 너무 짧음	반응 시간을 늘림
	시료를 덜 섞었을 때	모든 표준 시료, 시료를 완전히 섞어줌
	Microtiter plate가 더러움	깨끗한 plate를 이용

## 5. References

- 1) 재미있는 분자생물학 그림여행 Biomedical research Lab, 유옥준, 신인철, 분자방, 2009.
- 2) <http://home.inje.ac.kr/~lecture/immunolab/lab03.htm>
- 3) <http://k-medicon.kangwon.ac.kr/>
- 4) <http://www.snupharm.ac.kr/korean/>