

ELISA assay

2021-05-31 Quan HL

➤ Materials

- ELISA assay Kit: 본 프로토콜은 R&D Duoset® ELISA Kits를 기준으로 작성

➤ Process

Step 1: sample 준비

- 배양 종료 후 24 well plate의 배양액을 1.5 ml plastic tube에 옮겨 담고 4°C 1,217 g에서 5분간 원심분리
- 맑은 상층액을 새로운 1.5 ml tube에 옮겨 담고 실험 전까지(1달 이내) -20°C에서 보관

Step 2: cytokine 측정

- ELISA용 96 well plate에 well 당 100 µl의 capture antibody를 희석한 용액을 넣은 뒤 plastic wrap으로 잘 감싸서 실온에서 overnight
- 담겨있는 용액을 버리고 페이퍼 타월에 뒤집어서 내리치며 남은 물기를 제거. Washing buffer를 multi-pipette을 이용하여 well당 380 µl (190 µl씩 두 번) 넣어준 후 다시 버리고 페이퍼 타월에 뒤집어 내리 쳐서 남은 물기를 제거. 3회 반복 [그림 1].



그림 1. ELISA 세척과정

- 세척이 끝나면 well당 300 µl의 blocking buffer (1% BSA)를 넣어주고 plastic wrap으로 잘 감싸서 실온에서 2시간 방치 [그림 2].



그림 2. ELISA blocking buffer의 적용

- Blocking buffer를 넣은 뒤 2시간 동안, reagent buffer 1 ml에 standard stock를 고농도로 희석한 후

7개의 1.5 ml tube에 reagent buffer 500µl씩 넣은 후 고농도부터 2배씩 희석하여 8개 standard 농도를 만듬.

- 2시간이 지난 뒤, washing 3회 반복.
- 준비된 sample, reference sample과 standard를 well 당 100 µl씩 첨가해주고 plastic wrap으로 잘 감싸서 실온에서 2시간 방치
- 2시간이 지난 뒤, washing 3회 반복.
- Detection antibody를 blocking solution에 희석한 용액을 well 당 100 µl씩 넣어준 후 plastic wrap으로 잘 감싸서 실온에서 2시간 방치
- 2시간이 지난 뒤, washing 3회 반복
- Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Streptavidin-HRP)를 blocking solution에 1:40의 농도로 희석한 용액을 well 당 100 µl씩 넣어준 후 호일을 감싸주어 빛을 차단하여 실온에서 20분 방치 [그림 3].



그림 3. Streptavidin-HRP 적용 후 빛의 차단

- TMB solution을 well 당 100 µl씩 넣어준 후 호일을 감싸주어 빛을 차단하여 실온에서 20분 방치 [그림 4].

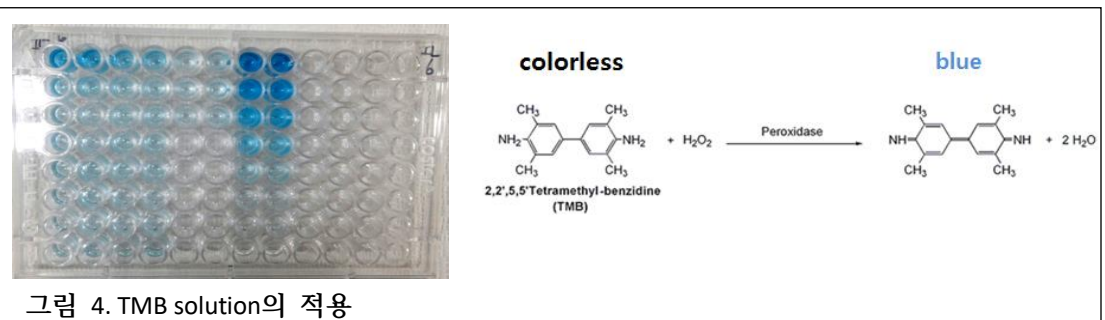


그림 4. TMB solution의 적용

- 2N 황산용액을 well 당 50 µl씩 넣어주어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader기를 이용하여 각각 450 nm와 560 nm에서 두 번 O.D. 값을 측정
- 결과분석: 450 nm의 OD값에서 560 nm의 OD값을 제외한 값을 이용하여 ELISA standard로부터 구한 선형 추세선에 대비하여 sample에 들어있는 cytokine (단위: pg/ml)의 값을 도출