

Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG

사용설명서

1. 사용목적

NKMAX의 Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG)는 SARS-CoV-2에 대한 항체(IgG)의 양을 정량 및 정성하기 위한 목적으로 사용됩니다.

2. 개요

2019년 중국 후베이성 우한시에서 원인불명의 바이러스에 의한 폐렴 집단 발생이 보고되었다. 초기에는 원인을 알 수 없는 호흡기 질환으로 알려졌다. 세계보건기구(WHO)에서 새로운 유형의 코로나바이러스로 확인하였고, 2020년 1월 20일 국제적으로 폐렴 원인 항체가 발생됨에 따라 질병정보를 '중요'로 1월 27일에는 '경계', 2월 23일에는 '심각'으로 격상하였다. 이 원인 병원체는 2020년에 발생한 중증급성호흡기증후군(SARS, Severe Acute Respiratory Syndrome) 코로나바이러스와 구조가 유사하기 때문에 국제 바이러스 명명 위원회(International Committee on Taxonomy of Viruses)에서는 'Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)'로 제안하였다. SARS-CoV-2의 감염에 의한 호흡기 증후군인 코로나19는 기침이나 재채기를 할 때 생긴 비말(방울) 또는 바이러스에 오염된 물건에 접촉하여 전파되는 것으로 알려져 있으며, 잠복기는 1-14일(평균 4-7일)로 발열, 권태감, 기침, 호흡곤란 및 폐렴 등이 나타나며, 기래, 인후통, 두통, 객담과 오심, 설사, 소화 불량도 나타난다.

2.1 제품의 원리

NKMAX의 Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG)는 항체가 존재하는 SARS-CoV-2에 대한 항체(S1 IgG)의 양을 효소면역분석법(ELISA)으로 정량 및 정성하는 체제인단의 효리기이다. Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG)의 플레이트(ATGC001)는 HEX293에서 제조된 발현시킨 Spike Protein의 S1 도메인(제조사: NKMAX, Cat. No.: ATGNP396)이 코팅되어 있다.

2.2 검사 소요 시간

Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG) 검사를 수행하는데 필요한 시간은 아래와 같다.
 * 효소면역분석법(ELISA): 한 플레이트 수행 시 약 3시간 소요(플레이트가 추가될 경우 10-15분 시간 추가)

3. 시약 및 보관

3.1 구성품 및 보관 온도

구성품	용량	성상	보관 온도
플레이트 (주성분: SARS-CoV-2 S1 제조된 단백질)	1플레이트 (12strip)	무색 폴리프로필렌 플레이트	2-8°C
표준액 (주성분: SARS-CoV-2 S1 단클론 항체)	1mL X11병 (8ng)	맑은 무색의 액상제제	2-8°C
표준액희석액 (주성분: 인산 완충액/PBS)	10mL X11병	맑은 노란색의 액상제제	2-8°C
검체희석액 (주성분: PBS)	100mL X11병	맑은 무색의 액상제제	2-8°C
Conjugate (100X) (HRP가 결합된 단클론 항체)	0.15mL X11병	맑은 주황색의 액상제제	2-8°C
검출용항체희석액 (주성분: 소염완충액)	13mL X11병	맑은 주황색의 액상제제	2-8°C
농축세척액, 20X (주성분: 폴리클로르에이트 20)	50mL X11병	맑은 무색의 액상제제	2-8°C
기질액 (주성분: TMB)	12mL X11병	맑은 무색의 액상제제	2-8°C
반응정지액 (주성분: 1N 염산)	12mL X11병	맑은 무색의 액상제제	2-8°C
Calibrator (주성분: SARS-CoV-2 S1 단클론 항체)	1mL X11병	맑은 무색의 액상제제	2-8°C

3.2 기 및 필요한 품목 (제공되지 않음)

- 검고정된 20ul, 200ul, 1000ul pipette
- 50ul와 100ul 사용이 가능한 검-고정된 8-channel multi-pipette
- 2차 또는 3차 중류수 2L
- Microplate washer (자동화 washer 추천)
- 450nm Filter가 있는 microplate reader
- 항응고제(Sodium heparin)가 포함된 진공채혈튜브

4. 주의사항

- ① 연구용으로만 사용한다. 진단의 목적으로 사용 시 결과적 신뢰에 대한 책임은 NKMAX에서 지니지 않는다.
- ② 본 제품설명서를 충분히 숙지한 후 사용한다.
- ③ 기질액(TMB Substrate)은 발암성 물질인 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine을 포함하고 있으므로 섭취하거나 흡입, 피부에 접촉하지 않도록 장갑을 착용한다. 또한 기질액은 산화제 및 차아염소산나트륨(락스) 등에 노출되지 않도록 한다.
- ④ 면역응답은 염색(HCl)을 포함하고 있으므로 섭취하거나 흡입, 피부에 접촉하지 않도록 장갑과 실험복을 착용한다. 또한 본 제품을 포함하여 있는 시약이 피부에 묻거나 눈에 들어갈 시에는 흐르는 물로 세척하고 이상이 있을 시 의사와 상담한다.
- ⑤ 검출용항체희석액은 bovine serum을 포함하고 있어, 알러지 반응을 유발할 수 있으므로 피부에 접촉하지 않도록 주의한다.
- ⑥ 표준액, 표준액희석액은 사람 혈장이 포함되어 있어 HIV, HBV, HCV가 음성인 취급을 사용하여 사용에 문제가 없지만 모든 시약은 잠재적이며 위험이 있다는 전제로 취급해야 하므로 취급에 주의한다.
- ⑦ 기질액을 취급 시 적절한 보호구를 착용 후 진행한다.
- ⑧ 키트 사용 후, 구성품이 파손되거나 파손이 의심되는 경우 반품을 금한다.
- ⑨ 검사 시 시료 다른 내용의 용기를 꺼낼 때 미생물에 오염이 되지 않도록 주의한다.
- ⑩ 유향기가 강한 Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG)는 사용을 금한다.
- ⑪ Plate washer와 plate reader 같은 장비는 사용 전 검고정 상태를 확인한다.
- ⑫ 모든 검체 및 시약을 피펫팅 할 때는 일회용 Tip을 사용하고, 검사에 사용되는 피펫은 주기적으로 Calibration하여 정확도를 보인다.
- ⑬ 검사에 사용한 고형제기들은 121°C에서 15분 이상 고압증기 멸균하여 폐기한다. 또한 검사에 사용되었던 액체 폐기물은 실험실 처리 규정에 따라 폐기한다.
- ⑭ 일회적인 실험실 규정 사항을 잘 준수한다.

5. 검사방법

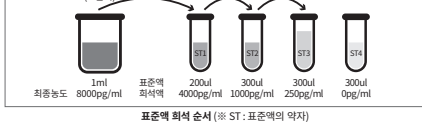
5.1 검사 전 준비사항

- 재질은 항응고제(Sodium heparin)가 포함된 채혈관로 채혈하여 준비한다.
- 정량된 인체(Whole blood)은 적절한 방법으로 원심분리하여 혈장(blood plasma)을 분리한 후 사용한다.
- 너무 많은 양의 검체를 한병에 검사할 경우 처음 plate의 마지막 plate(2)의 검사 시간 차이로 인해 결과 값 오차가 발생할 수도 있으니 1회 적정량 검사한다.
- 검체액 모든 시약은 검사 전 상온에 미리 꺼내둔다. (시약의 온도 차이는 결과값에 영향을 줄 수 있기 때문에, 항상 상온화 한 후 사용한다).
- **검체는 검체희석액을 이용하여 200배 희석하여 사용한다.**
- **Ex) 검체 5ul + 검체희석액 995ul로 희석하여 사용한다.**
- 플레이트는 사용하기 전 상온에서 30분간 방치하고, 사용하지 않는 스트립은 첨부된 비닐포에 봉합제를 넣어 밀봉하여 냉장 보관한다.
- 농축세척액은 얼어오수 또는 중류수로 20배 희석하여 사용한다. 세척액은 제조 후 상온에서 보관한다.

5.2 ELISA 검사 방법

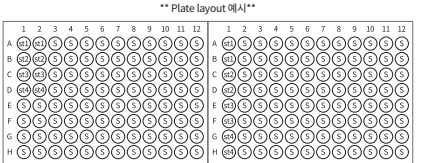
5.2.1 정량적 ELISA 검사 방법

- ① 표준액은 표준액희석액을 이용하여 아래와 같이 검체 희석한다.



ST	표준액희석액(ul)	표준액(ul)	최종 표준액 농도 (pg/ml)
1	200	200	4000
2	300	100	1000
3	300	100	250
4	300	0	0=Blank

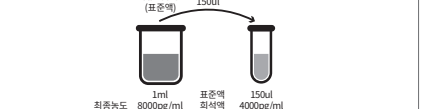
- ② 검사할 검사 수(검체 수, 표준액)에 해당하는 well(항원이 흡착된 스트립)을 준비한다. 이때 사용하지 않는 스트립은 첨부된 비닐포에 봉합제를 넣어 밀봉 후 냉장 보관한다.
 - 보관 시 plate의 바닥에 흡집이 나지 않도록 주의한다. Plate 바닥의 흡집은 결과에 영향을 줄 수 있다.
 - Plate frame과 밀봉 테이프(plate sealer)는 재사용 가능하다.
- ③ 표준액과 검체를 well에 각각 100ul씩 분주하고, frame을 가볍게 저서 잘 혼합한 다음, 밀봉 테이프를 밀봉하여 37°C에서 1시간 반응시킨다.
 - 가장자리와 밀봉 테이프가 잘 부착되지 않으면 공기포를, 온도변화, reagent 증발 등이 발생하며, 이는 부정확한 결과의 원인이 된다.
 - **사용할 검체는 '5.1 검사 전 준비사항'에서 준비된 200배 희석된 검체를 100ul 분주한다.**



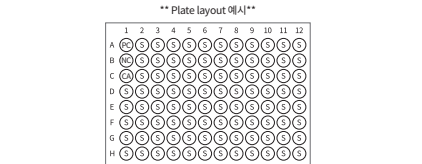
- ST: 표준액, S: 검체
- ④ 1시간 후 밀봉테이프를 제거하고, 모든 well에 미리 희석한 세척액 300ul를 가지고 4회 반복 세척한 후 완전히 제거한다.
 - 세척액이 well에 남아있으면 standard curve의 정확도가 낮아지므로, 잔류된 세척액을 제거하기 위해 plate를 뒤집어 paper towel 위로 '탁탁' 소리가 날 정도의 힘을 주어 세척액을 제거한다.
 - 밀봉 테이프 제거 시 well 내의 용액이 튀지 않도록 주의한다.
 - 세척액 제거 후 plate가 마르지 않도록 주의한다.
 - ⑤ Conjugate는 검출용항체희석액으로 1:100 비율로 희석하여 사용한다.
 - Ex) 10ml 조제 할 경우 (15ml conical tube 사용)
 - : 검출용항체희석액 9.9ml + Conjugate 100ul
 - : 조제량에 따라 적절한 용기를 사용하며, 모든 reagent는 반드시 pipette를 이용하여 제조한다.
 - ⑥ S에서 제조된 검출용 항체를 multi-pipette를 이용하여 모든 well에 100ul씩 분주하고, frame을 가볍게 저서 잘 혼합한 다음, 밀봉 테이프를 주의 깊게 밀봉하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다.
 - ⑦ 반응이 끝난 후 밀봉테이프를 제거하고, 모든 well에 희석한 세척액 300ul를 가지고 4회 반복 세척한 후 잔류액을 완전히 제거한다.
 - 세척액이 well에 남아있으면 standard curve의 정확도가 낮아지므로, 잔류된 세척액을 제거하기 위해 plate를 뒤집어 paper towel 위로 '탁탁' 소리가 날 정도의 힘을 주어 세척액을 제거한다.
 - 세척액 제거 후 plate가 마르지 않도록 주의한다.
 - 밀봉 테이프 제거 시 well 내의 용액이 튀지 않도록 주의한다.
 - ⑧ 기질액을 multi-pipette를 이용하여 모든 well에 100ul씩 분주한다.
 - 분주 전에 기질액의 오염여부를 확인하도록 한다. 오염된 기질액은 푸른색을 띤다.
 - ⑨ 알사에서 30분 동안 반응하는 동안, plate는 빛에 직접 노출되지 않도록 한다. (상온에서 반응)
 - ⑩ 반응이 완료되면 모든 well에 반응정지액을 multi-pipette를 이용하여 100ul씩 분주하며, 이때 ⑨의 기질액 분주 과정과 동일한 순서와 속도로 진행한다.
 - ⑪ 반응정지액 분주 후 frame을 가볍게 저서 잘 혼합한다. 플레이트 밑은 부드러운 흡습성 종이로 잘 닦아 습기와 이물질을 제거한 후 5분 이내에 플레이트 판독기의 450nm에서 흡광도를 측정한다.
 - 반응정지액 분주 후 흡광도 값이 떨어지므로 지체없이 결과 값을 측정하여야 한다.

5.2.2 정성적 ELISA 검사 방법

- ① 양성대조액은 표준액희석액을 1:100로 희석하여 아래와 같이 제조한다.



- **음성대조액은 표준액희석액을 이용하여 100배 분주한다.**
- ② 검사할 검사 수(검체 수, 양성대조액, 음성대조액, 표준액)에 해당하는 well(항원이 흡착된 스트립)을 준비한다. 이때 사용하지 않는 스트립은 첨부된 비닐포에 봉합제를 넣어 밀봉 후 냉장 보관한다.
 - 보관 시 plate의 바닥에 흡집이 나지 않도록 주의한다. Plate 바닥의 흡집은 결과에 영향을 줄 수 있다.
 - Plate frame과 밀봉 테이프(plate sealer)는 재사용 가능하다.
- ③ 양성대조액, 음성대조액, Calibrator와 검체를 well에 각각 100ul씩 분주하고, frame을 가볍게 저서 잘 혼합한 다음, 밀봉 테이프를 밀봉하여 37°C에서 1시간 반응시킨다.
 - 가장자리와 밀봉 테이프가 잘 부착되지 않으면 공기포를, 온도변화, reagent 증발 등이 발생하며, 이는 부정확한 결과의 원인이 된다.
 - **사용할 검체는 '5.1 검사 전 준비사항'에서 준비된 200배 희석된 검체를 100ul 분주한다.**

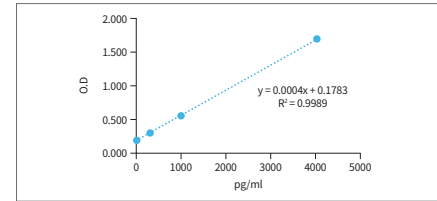


- PC: 양성대조액, NC: 음성대조액, CA: Calibrator, S: 검체
- ④ 1시간 후 밀봉테이프를 제거하고, 모든 well에 미리 희석한 세척액 300ul를 가지고 4회 반복 세척한 후 완전히 제거한다.
 - 세척액이 well에 남아있으면 standard curve의 정확도가 낮아지므로, 잔류된 세척액을 제거하기 위해 plate를 뒤집어 paper towel 위로 '탁탁' 소리가 날 정도의 힘을 주어 세척액을 제거한다.
 - 밀봉 테이프 제거 시 well 내의 용액이 튀지 않도록 주의한다.
 - 세척액 제거 후 plate가 마르지 않도록 주의한다.
 - ⑤ Conjugate는 검출용항체희석액으로 1:100 비율로 희석하여 사용한다.
 - Ex) 10ml 조제 할 경우 (15ml conical tube 사용)
 - : 검출용항체희석액 9.9ml + Conjugate 100ul
 - : 조제량에 따라 적절한 용기를 사용하며, 모든 reagent는 반드시 pipette를 이용하여 제조한다.
 - ⑥ S에서 제조된 검출용 항체를 multi-pipette를 이용하여 모든 well에 100ul씩 분주하고, frame을 가볍게 저서 잘 혼합한 다음, 밀봉 테이프를 주의 깊게 밀봉하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다.
 - ⑦ 반응이 끝난 후 밀봉테이프를 제거하고, 모든 well에 희석한 세척액 300ul를 가지고 4회 반복 세척한 후 잔류액을 완전히 제거한다.
 - 세척액이 well에 남아있으면 standard curve의 정확도가 낮아지므로, 잔류된 세척액을 제거하기 위해 plate를 뒤집어 paper towel 위로 '탁탁' 소리가 날 정도의 힘을 주어 세척액을 제거한다.
 - 세척액 제거 후 plate가 마르지 않도록 주의한다.
 - 밀봉 테이프 제거 시 well 내의 용액이 튀지 않도록 주의한다.
 - ⑧ 기질액을 multi-pipette를 이용하여 모든 well에 100ul씩 분주한다.
 - 분주 전에 기질액의 오염여부를 확인하도록 한다. 오염된 기질액은 푸른색을 띤다.
 - ⑨ 알사에서 30분 동안 반응하는 동안, plate는 빛에 직접 노출되지 않도록 한다. (상온에서 반응)
 - ⑩ 반응이 완료되면 모든 well에 반응정지액을 multi-pipette를 이용하여 100ul씩 분주하며, 이때 ⑧의 기질액 분주 과정과 동일한 순서와 속도로 진행한다.
 - ⑪ 반응정지액 분주 후 frame을 가볍게 저서 잘 혼합한다. 플레이트 밑은 부드러운 흡습성 종이로 잘 닦아 습기와 이물질을 제거한 후 5분 이내에 플레이트 판독기의 450nm에서 흡광도를 측정한다.
 - 반응정지액 분주 후 흡광도 값이 떨어지므로 지체없이 결과 값을 측정하여야 한다.

6. 계산 및 검사결과 해석

6.1 정량적 ELISA 검사

6.1.1 표준곡선곡선(Standard Curve)의 생성
 그래프의 X축을 표준액의 농도(pg/ml)로, Y축을 표준액 흡광도(O.D)으로 하여 그래프를 그리며 (point-to-point), 표준 곡선의 직선화곡선의 상관관계(R²)가 0.98이상이어야 한다. 표준곡선곡선의 예는 후속 상단과 같으며, 후속 상단의 곡선은 단순한 사례이므로 실제 검사지에 적용해서는 안된다. (각 실험에서 얻은 표준곡선곡선을 이용하여 계산하여야 한다.)



6.1.2 결과관리

검사 결과의 정확도는 정확한 표준곡선곡선(standard curve)과 관련이 있다. 그러므로 검사결과를 해석하기 전에 표준곡선곡선을 검토해야 한다.
 ① Standard 4의 흡광도는 1.2 이상이어야 한다.
 ② Standard 4의 흡광도는 0.2 이하이어야 한다.
 ③ Standard의 평균 흡광도 값으로 계산된 상관 계수(R²)가 0.98 이상이어야 한다.
 만약 위 조건들을 만족하지 못한다면 검사 결과는 유효하지 않으며 검사를 다시 한다.

6.1.3 농도계산방법

모든 계산은 검체 흡광도 값에서 표준액 4개의 평균값을 뺀 후 진행한다. 검체의 흡광도 값을 계산하여 그래프 상에서 농도를 읽는다. 실제로, 표준곡선곡선(y=ax+b)이 y=0.0004x+0.1783라고 할 때 검체의 농도계산 방법은 다음과 같다. 검체의 흡광도 값이 0.845라고 가정한다면, 검체농도(pg/ml)=(검체의 흡광도값-b)/a
 검체농도(pg/ml)=(0.845-0.1783)/0.0004=1666.75(pg/ml)

6.2 정성적 ELISA 검사

6.2.1 판정기준

검체의 판정은 Calibrator와 검체의 흡광도 값을 아래와 같이 계산하여 판정한다.

검체 흡광도/Calibrator 흡광도 = 결과값

결과값은 다음과 같이 해석한다.

결과값 < 0.9	음성
0.9 ≤ 결과값 < 1.1	Borderline
결과값 ≥ 1.1	양성

* 해석 결과가 Borderline 일 경우, 일반적으로 항체는 감염 후 10-14일 후에 검출되기 때문에 항체가 형성되고 있는 중 일 수 있으므로 1-2주 후에 다시 검사할 것을 권장함.

6.2.2 결과관리

검사 결과의 정확도는 정확한 양성/음성대조액의 결과값과 관련이 있다. 그러므로 검사결과를 해석하기 전에 양성/음성대조액의 흡광도 값을 검토해야 한다.
 ① 양성대조액의 결과값은 0.9 미미하여야 한다.
 ② 음성대조액의 결과값은 1.1 이상이어야 한다.
 만약 위 조건들을 만족하지 못한다면 검사 결과는 유효하지 않으며 검사를 다시 한다.

7. 참고사항

7.1 판정불명(Indeterminate)의 경우

판정불명의 경우는 드물게 발생하며 다음과 같은 실험 오류로 인해 발생할 수 있다.
 ① 재질 불충분의 검사 과정을 지키지 않은 경우
 ② Plate의 세척이 불충분한 경우

검체를 다루는 과정에서 재질하는 과정에서 의식이 되면 새로운 알사에서 다시 검사를 진행한다. Plate의 세척이나 검사 과정 중 문제가 발생하면 경우에도 동일하게 다시 수행하도록 한다. 4000pg/ml 이상이고 농도 검체일 경우 표준액희석액으로 희석하여 검사하며, 이 때 희석된 검체는 계산된 용도 값에 희석배수를 곱하여 최종 농도를 결정한다.

7.2 검체(상형)의 용법

해당된 검체나 정사된 보관된 검체의 경우 등에서 발생할 수 있으며, 원심분리 후 사용하는 것을 권장한다.

7.3 ELISA Trouble Shooting

문제점	가능한 경우	해결방법
비특이적 배경 / 높은 background	플레이트의 불충분한 세척	플레이트의 세척은 300ul의 세척액(Washing Solution)으로 정해진 횟수만큼 진행한다. 세척 시 세척액을 넣고 5초 이상 정지하여야 한다.
	ELISA well간 오염	검체를 섞는 과정에서 피펫을 다룰 때 특히 조심해야 한다.
	유효기간이 지난 키트 및 구성품의 사용	항상 키트의 유효기간을 확인하고 희석된 표준액은 1회 이상 사용해서는 안된다.
Standard curve 낮은 OD값	기질액(TMB)의 오염	기질액(TMB)에 푸른색이 보일 경우 사용하지 않는다.
	Plate sealer 부위 불량	Plate sealer를 검사전 well에 정확하게 부착 한다.
	표준액(Standard) 희석 오류	사용설명서에 따라 표준액(Standard)은 계산 희석할 것
Non-linear Standard Curve and Duplicate Variability	낮은 반응 온도	ELISA는 상온(22 ± 5°C)에서 진행해야 한다.
	짧은 반응 시간	표준액(Standard) 또는 검체 흡광도는 60 초 ± 5분으로 하고 기질액(TMB)은 30분간 반응하도록 한다.
	다른 파장으로 reading	플레이트는 450nm에서 측정하여야 한다.
불충분한 mixing	낮은 온도의 시약 사용	모든 시약은 반드시 검사 전 상온에 꺼내놓아야 한다.
	키트 유효기간이 지난 키트 및 구성품의 사용	항상 키트의 유효기간을 확인하고 Standard는 희석 후 1회 이상 재사용하지 않는다.
표준액(Standard) 희석 오류	표준액(Standard) 희석 오류	사용설명서에 따라 표준액(Standard)은 계산 희석할 것
	불충분한 mixing	시약을 플레이트에 사용하기 전에 뒤집어주기 습거나 약하게 vortex mixer를 사용해 섞어 준다.

8. 기술문의

(주)엔케이맥스 Global Operation 팀
 본사 : 경기도 성남시 분당구 돌마로 172 분당서울대학교병원 헬스케어혁신파크 6F/1F
 Tel : 031-603-9224
 Fax : 031-8017-8124
 E-mail : info@nkmax.com
 Website : www.nkmax.com / www.nkmaxbio.com

