

식품의약품안전처 공고 제2022 - 488호

「약사법」 제51조제1항에 따른 「대한민국약전」(식품의약품안전처 고시 제2022-73호, 2022. 10. 12.)을 일부 개정함에 있어 국민에게 미리 알려 의견을 수렴하고자 그 취지, 개정 이유 및 주요 내용을 「행정절차법」 제46조에 따라 다음과 같이 공고합니다.

2022년 11월 1일

식품의약품안전처장

대한민국약전 일부개정고시(안) 행정예고

1. 개정이유

「대한민국약전」 기준·규격을 국제조화하여 의약품의 적정한 품질관리를 합리적으로 지원하고, ‘감초’의 기원종에 기존종과의 규격 부합성 및 국내 재배가능성 등이 검증된 종을 추가하여 개정함으로써, ‘감초’의 국산화 기반을 마련함. 또한, 첨단바이오의약품 개발 및 제약업계의 수요사항 등을 반영한 일부 일반정보를 최신 과학수준에 맞게 개선하여 기준·규격을 선진화하고 우수한 품질의 의약품이 유통될 수 있도록 함

2. 주요내용

- 가. 「감초」 품목의 기원에 검증된 종 추가 및 추가된 종에 대한
성상 반영(안 별표 4)

- 나. 일반정보에 유세포 분석법, 효소결합 면역 흡착 분석법(ELISA), 면역 블롯 분석법 추가(안 별표 6)

3. 의견제출

「대한민국약전」 일부개정고시(안)에 대하여 의견이 있는 단체 또는 개인은 2022년 12월 31일까지 다음 사항을 기재한 의견서를 식품의약품 안전처장(주소: (우) 28159, 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 식품의약품안전처, 전자메일: pharmpolicy@korea.kr)에게 제출하여 주시기 바랍니다.

가. 예고사항에 대한 의견(찬, 반 여부와 그 사유)

나. 성명(단체인 경우 단체명과 그 대표자 성명), 주소 및 전화번호

다. 기타 참고사항

식품의약품안전처 고시 제2022 - 호

「약사법」 제51조제1항에 따른 「대한민국약전」(식품의약품안전처 고시 제2022-73호, 2022. 10. 12.)을 다음과 같이 개정 고시합니다.

2022년 월 일

식품의약품안전처장

대한민국약전 일부개정고시

대한민국약전 일부를 다음과 같이 개정한다.

별표 4 감초 중 “광과감초 (光果甘草) *Glycyrrhiza glabra* Linné 또는 창과감초 (脹果甘草) *Glycyrrhiza inflata* Batal.”를 “광과감초 (光果甘草) *Glycyrrhiza glabra* Linné, 창과감초 (脹果甘草) *Glycyrrhiza inflata* Batal., 또는 *Glycyrrhiza korshinskyi* Grig.”로 하고, 성상의 창과감초 이후에 “*Glycyrrhiza korshinskyi* Grig. 이 약은 뿌리 및 뿌리줄기로 목질성이고 질은 단단하며 때로 가지가 갈라져있다. 바깥면은 거칠지 않고 적갈색 또는 회갈색이며, 껍질눈은 뚜렷하다.”를 신설한다.

별표 6 일반정보 제16호부터 제23호까지를 각각 제18호부터 제25호까지로 하고, 일반정보 제7호부터 제15호까지를 각각 제8호부터 제16호까지로 하며, 일반정보 제7호, 제17호 및 제26호를 각각 다음과 같이 신설한다.

7. 면역 블롯 분석법

면역 블롯 분석법은 시험 멤브레인 표면으로 이전(transfer)시킨 하나 이상의 분석물 (예, 단백질, 다당류)의 검출에 항체를 사용하는 모든 방법으로 정의된다. 면역 블롯 분석법은 일반적으로 전기영동 분리법이 면역 블롯 시험법의 일부로 사용되는지 여부에 따라 분류된다. 전기영동 분리법은 분자 집단의 분자량 및 전하 차이에 기반한다. 전기영동 분리법과 관련된 면역 블롯 분석법의 예로는 웨스턴 블롯법(Western blot)이 있다. 면역 블롯 분석법의 또 다른 접근법은 사전에 전기영동 분리를 하지 않고 항체를 사용하여 분자를 검출하는 것이다. 이러한 비 전기영동 유형의 접근법의 예로는 슬롯 또는 도트 블롯(slot/dot)이 있다. 본 일반정보에서는 멤브레인에 결합된 분자의 검출을 위해 항체를 사용하는 시험법만 다룬다.

분석법 선정

1. 비 전기영동 분석법(슬롯/도트 블롯)

슬롯/도트 블롯법은 규칙적인 간격을 둔 직사각형 슬롯을 포함하도록 기계로 가공된 진공 매니폴드(manifold)를 사용하여 검출 대상 분석물을 포함한 혼합물을 멤브레인에 직접 투입하도록 하는 단순한 비 전기영동법이다. 혼합물에 존재할 수 있는 다양한, 각각의 분석물을 전기영동 분리하지 않으므로, 슬롯/도트 블롯법은 더 빠르고 간단하다. 그래서 여러 시스템을 상업적으로 이용할 수 있는 다중 검체의 자동화 분석에 쉽게 적용할 수 있지만, 분자량에 대한 정보는 알 수 없으며, 검체의 양에 관한 정보는 제한적으로만 얻을 수 있다. 정량적인 형식으로 설정 가능하지만, 이 방법은 일반적으로 면역 복합체 검출 시스템을 이용하여 특정 항원의 유무를 증명함으로써 동일성을 확인하는 등의 정성적 결과를 얻는데 사용된다. 분석물을 멤브레인에 결합

시키고 결합 되지 않은 부위를 블로킹한 후, 분석자는 검출기 항체를 사용하여 분석물 또는 목적 대상 분석물의 존재 여부를 확인한다.

슬롯 블롯은 모양이 균일하고, 분석물이 결합할 수 있는 표면적이 더 크므로, 정량적 방법 및 농도 측정에 의한 분석에 있어서 도트 블롯보다 더 적합하다.

2. 전기영동 분석법

전기영동 블롯법 (일반적으로 웨스턴 블롯으로 지칭)은 단백질 혼합물 분석에 널리 사용된다. 웨스턴 블롯은 특정 단백질의 확인, 상대 농도, 상대 분자량 및 번역 후 변형을 연구하는 데 사용되는 강력한 도구이다. 웨스턴 블롯에서, 겔 전기영동을 사용하여 검체 단백질을 분리한다. 분자량 단독 또는 등전점 (isoelectric point, pI)과 분자량에 따라 단백질이 분리될 수 있다. 단백질은 겔을 통해 1차원 또는 2차원 이동한다. 분자량에 따라 단백질이 분리될 때, 작은 단백질은 빨리 이동하며 분자량에 따라 분리된다. 2D 겔을 사용할 때, 단백질은 pI에 따라 1차 분리된 후, 분자량에 따라 2차 분리된다. 분리 후, 단백질을 멤브레인으로 이전시키고, 멤브레인을 블로킹하여 차후 분석 시약의 비특이적 결합을 차단한 후, 목적 단백질을 특이적 항체를 사용하여 검출한다.

결합 항체는 비색법, 형광 검출법, 화학 발광 검출법 및 방사선 검출법을 포함한 여러 방법을 통해 검출할 수 있다. 목적 단백질의 검출 시, 농도에 따라 간접적으로 면역 블롯 정량을 수행할 수 있다.

가. 1D 전기영동법

1D 전기영동의 경우, 웨스턴 블롯법을 사용한 추가 분석을 위해 개별 단백질 또는 단백질 집단을 분자량에 따라 분리한다. 도데실 황산 나트륨 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 (sodium dodecyl sulfate-

polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)을 사용하여, 단백질은 전하의 차이에 따라 섬유 및 기공의 3D 네트워크를 통해 이동한다. 두 가지 기능을 가진 비스아크릴아마이드 또는 다른 교차 가교제에 의해 네트워크가 형성되어, 인접한 폴리아크릴아마이드 사슬을 교차 결합시켜 겔을 형성한다. 겔 기공 크기와 단백질 특성의 조합이 단백질의 이동을 결정한다. 표적 단백질에 특이적인 항체를 사용하는 웨스턴 블롯법을 통해 분리된 단백질을 연속적으로 검출한다. 웨스턴 블롯 분석법을 통해 시험 검체를 표준품과 비교할 수 있으며, 검출 항체가 변이된 단백질의 형태를 여전히 인지할 수 있는 경우 표적 단백질과 관련된 분해물과 불순물의 발생을 모니터링할 수 있다. 이 접근법으로 높은 민감도를 얻을 수 있지만, 유사한 분자량을 가진 개별 단백질의 분리는 불가능할 수 있다. 유사한 분자량을 가진 개별 단백질의 탐색이 필요한 경우, 2D 분리가 필요할 수 있다.

나. 2D 전기영동법

2D 전기영동의 경우, 개별 단백질 또는 단백질 집단을 등전 초점화(isoelectric focusing, IEF; 전하)를 통해 1차원 분리하고 SDS의 존재 하에 전기영동(분자량)을 통해 2차원 분리한다. 이 방법을 통해 단백질을 분리할 경우, 1D 겔과 마찬가지로 분자량뿐만 아니라, 단백질의 전하에 대한 정보도 얻을 수 있다. 2차원 겔은 복잡한 혼합물을 분해하고 단백질 항체 특이성을 평가(예, 숙주 세포 단백질의 평가)하는데 유용한 선택이다.

3. 멤브레인, 시약 및 검출 조건

가. 멤브레인

일반적으로, 니트로셀룰로오스 및 플루오르화 폴리비닐리덴(polyvinylidene fluoride, 이하 PVDF) 멤브레인 모두가 면역 블롯법에

사용된다. 비용 측면에서는, PVDF 멤브레인보다 니트로셀룰로오스 멤브레인이 슬롯/도트 블롯 (또는 진공 블롯법)에 주로 선호되지만, 박리(stripping) 및 재 프로브가 필요한 경우 기계적 강도가 더 큰 PVDF 멤브레인의 사용을 고려해야 한다.

나. 블로킹 시약

멤브레인에 단백질을 이전하거나 결합시킨 후, 다음에 처리할 시약의 비특이적인 결합을 방지하기 위해 멤브레인의 비어있는 결합 부위를 블로킹해야 한다. 대부분의 검출 프로브는 멤브레인에도 결합할 수 있는 단백질이다. 멤브레인 부위를 적절히 블로킹하지 않을 경우, 비특이적 결합 및 높은 배경 값이 발생할 수 있다. 젤라틴, 탈지유 및 소 혈청 알부민을 비롯한 다양한 블로킹 시약을 사용할 수 있다. 단백질은 시험에 사용된 항원과 관련이 없어야 한다. 이들 시약에 로트 간변이가 있는 경우 적격성 평가가 필요할 수 있다. 신호의 손실 없이 최소의 배경 값을 나타내는 최적의 검출 시스템을 통해 평가되어야 한다. 블로킹 시약이 생물학적 물질에서 유래된 경우 배경 값이 증가될 수 있어 미량의 목적 단백질을 포함해서는 안된다.

다. 검출 방법

모든 유형의 면역 블롯법에서 분석물의 면역학적 검출은 직접 또는 간접적일 수 있다. 시험법의 선택은 요구되는 민감도 수준과 사용 가능한 항 혈청 품질의 조합에 따라 달라진다. 확인 또는 검출에는 민감도가 일반적으로 중요하지 않으며, 시험하는데 필요한 시간을 단축시키기 위해 결합된 항체(conjugated antibody)를 사용하는 직접 검출이 일반적으로 사용된다. 또는, 민감도를 높이기 위해 일반적으로 결합된 중 특이적 시약을 사용하여 간접검출을 사용할 수 있다. 약물로 개발 중인 단일 클론 항체와 같은 일부 경우에는 실제로 검출되는 분

석물이 항체이다. 이 경우, 항체에 특이적인 항체(예, 항 유전물질형 항체 [anti-idiotypic antibody])를 사용할 수 있다.

1) 1차 항체: 1차 항체는 분석물 또는 단백질에 대한 특이성에 기초하여 선택한다. 다클론 항혈청은 잠재적으로 큰 단위의 항원 결정기 집단에서 넓은 범위를 검출할 수 있지만, 원하지 않는 교차 반응으로 인해 특이성이 감소할 수 있다. 분석 최적화를 통해 이를 해결할 수 없다면, 단일 클론 항체 또는 선택된 단일 클론 항체 집단을 사용할 수 있다. 단일 클론 항체는 일반적으로 특정 항원 결정기에 대해 일관되게 항체를 공급하기 때문에 장기 시험에 유리하다. 단일 클론 항체의 사용은 표적 검출에 관여하는 항원 결정기의 수를 직접적으로 제한한다. 각 시험법마다 이를 반드시 평가하여야 한다. 1차 항체는 직접 결합하거나 2차 항체 및 적절한 검출 시스템과 함께 사용할 수 있다. 일반적으로 최적의 항체 농도는 항체의 최대 희석으로 간주되며, 최소한의 배경 값으로 강한 양성 신호를 나타낸다. 블로킹 및 선택된 검출 시스템과 함께 고려하여 최적화해야 한다. 분석 사용 전 1차 항체를 적격성 평가해야 한다.

2) 2차 항체: 일반적으로 2차 항체는 1차 항체 면역 글로불린의 중(분석물 특이적, 예, 염소 항 마우스 IgG)에 대해 직접적이다. 호스래디쉬 페록시다아제 (horseradish peroxidase, HRP) 또는 알카라인 포스파타아제 (alkaline phosphatase, AP)와 같은 효소가 일반적으로 2차 항체와 연관되어 있으나, 형광단 (fluorophore) 또는 금 입자와 같은 다른 표지자를 검출에 사용할 수 있다. 2차 항체가 비오틴일화 될 경우, 비오틴-아비딘-HRP 또는 -AP 복합체를 검출에 사용할 수 있다.

3) 효소 및 기질 검출: 효소-결합체 시약을 포함하는 면역 복합체가 형성되면, 분석자는 적합한 기질을 분석물에 첨가한다. 이 반응은 기록, 측정 및 추가 분석이 가능한 착색된 침전물 또는 형광 또는 화학 발광 산물의 생성을 초래한다. 개별적인 방법 및 용도에 가장 적합하도록 넓은 범위에서의 검출 방법이 사용 가능하다.

표 1. 분석물 검출 시약 및 방법

판독법	효소반응 원리	효소	기질	검출	장점	단점
비색법	분석물 농도에 직접 비례하는 흡광도 값을 산출하는 착색 산물 생성	AP ^a HRP ^c	pNPP ^b TMB ^d OPD ^e ABTS ^f	분광 광도법	· 완전성 · 경제성 · 시약 · 접근성	· 시간 소모적 · 다른 시험법에 비해 민감도가 낮음
화학 발광 분석법	분석물 농도에 직접 비례하는 빛 방출을 생성	AP, HRP	CSPD ^g	발광 측정기, 사진 필름 (CCD ^h 카메라)	· 넓은 분석 동적 범위 · 매우 민감도 높음 · 신속한 신호 생성	· 재현성이 문제 될 수 있음
형광법	분석물 농도에 직접 비례하는 여기 유도 (excitation-induced) 빛 방출을 생성	갈락토시다아제, 형광 표지 항체	MG ⁱ NG ^j	형광 광도계 (CCD 카메라 및 필터)	· 신속함 · 민감함	· 첨가제에 의한 간섭
방사선법	방사성 동위원소로 항원 표지 방사선은 분석물의 농도에 비례	-	-	섬광 계수기	· 정량이 용이 · 신속함	· 노출 시 안전 위험 · 방사성 폐기물

^a Alkaline phosphatase

^b *para*-Nitrophenyl phosphate

^c Horseradish peroxidase

^d 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

^e *o*-Phenylenediamine dihydrochloride

^f 2,2'-Azino-bis[3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid]diammonium salt

^g Disodium 3-(4-methoxy spiro{1,2-dioxethane-3,2-(5'-chloro)tricyclodecan}-4-yl)phenyl phosphate.

^h charge-coupled device.

ⁱ 4-Methylumbelliferyl galactoside.

^j Nitrophenyl galactoside.

시험법 개발

시험법 개발 및 최종의 시험법 밸리데이션의 범위는 시험법의 목적에 따라 결정한다. 목적에 따라 분석법의 종류와 시험의 기타 요구사항이 결정되기 때문에, 목적을 먼저 결정해야 한다. 다음 항에서는 각 시험법 목적에 따른 고려사항에 대하여 설명한다.

1. 시험법의 사용 목적

가. 확인시험

확인시험의 경우, 분석자는 단백질의 존재 여부를 확인하고자 한다. 따라서 특이성을 증명하는 것이 필수적으로 요구된다. 이를 위해 분석자는 단백질의 양 또한 조절해야 한다. 검출한계 (limit of detection, 이하 LOD), 정량한계 (limit of quantitation, 이하 LOQ) 및 기타 정량적인 측정은 이 시험법의 필수 속성이 아니다. 그 예로는 면역글로불린 G의 아이소타입(isotype)을 증명하는 물질 확인 분석이 있으며, 경우에 따라 시험법 밸리데이션에서 항체의 특이성을 입증한다. 매트릭스에서 간섭이 없거나 검체 내 존재하는 다른 물질과 교차 반응이 일어날 가능성이 없는 경우, 간단한 슬롯/도트 블롯법으로 충분할 수 있다. 검체 내 여러 단백질이 면역 반응성을 나타내고 서로 구별되어야 하는 경우, 블롯법 및 면역 염색법에 앞서 다른 분리 절차를 사용해야 한다. 검체 내 단백질의 복잡성과 전기영동 분리를 통해 얻은 추가 정보의 유용성은 슬롯/도트 블롯이 시험에서 요구되는 부분을 충족시킬 수 있는지 판단하는 데 도움이 된다.

나. 한계 시험

독성학적인 우려 수준 이하로 불순물이 제거되었다는 것을 입증하는 경우 이 시험법을 사용할 수 있다. 사전에 결정된 수준 미만의 단백질이 존재하는지 여부를 확인할 수 있을 때

한계 시험을 사용한다. 이는 시험법의 개발 및 밸리데이션을 단순화한다. 농도 계측 (스캐닝 또는 영상) 장비를 사용하면 표준곡선과 비교하여 스팟 또는 밴드의 강도를 확인하여 농도를 추정할 수 있다. LOD를 확인하여 시험법에 적절한 한계 역치를 설정하여야 한다. 도트 블롯은 검체 매트릭스 내 항체의 특이성이 나타나는 모든 경우에 적합할 수 있다.

면역 블롯법의 또 다른 일반적인 목적은 배양물에서 발현된 단백질의 존재 유무를 나타내는 것이다. 이러한 경우, 분석자는 면역 염색을 통해 단백질을 확인하고, 단백질이 예상되는 분자량을 나타내는지 확인하고자 한다. 이는 블롯에서 신호를 생성하는 복잡한 매트릭스에서 다른 단백질과의 비특이적 상호작용을 더욱 확실하게 보장한다.

다. 특이성 시험

ELISA 불순물 시험 또는 면역 친화성 컬럼 사용을 위해 시약의 특이성을 확인하는 것 또한 일반적인 면역 블롯법의 목적이다. 이는 또 다른 유형의 확인시험으로, 항원과 항체 간 결합 특이성을 확인하는 것이 평가 변수의 목적이다. 측정 결과는 숙주 세포 단백질 분석에 요구되는 바와 같이, 검체 내의 전체 단백질 집단의 선택적인 집단과 결합하거나 또는 검체 내의 전체 단백질 집단에 결합하는 것을 입증한다. 단백질 집단에 대한 항체의 특이성을 입증하기 위해, 분석자는 일반적으로 전기영동 또는 다른 분리법을 사용한다. 면역 염색법을 통해, 적합한 분자량 또는 등전점의 단백질이 항체에 의해 인식된다는 것을 확인하는 것은, 해당 단백질에 대한 특이성 및 다른 단백질과 결합하지 않는다는 것을 강력하게 증명한다. 또한, 같은 실험에서 단백질을 포함하는 것으로 확인된 적절한 양성 대조 검체 및 단백질을 포함하지 않는 것으로 확인된 적절한 음성 검체를 사용할 경우, 단백질 불순물에 대해 ELISA 방법을 밸리데이션 시 항체의 특이성 및 선택

성을 뒷받침할 수 있다. SDS-PAGE (분자량) 또는 등전 초점화 (IEF, 등전점)을 사용하여 분자량이 알려진 제한된 수의 단백질에 대한 1차원 전기영동 분리를 수행할 수 있다. 전기영동 분리를 2차원 (예, IEF 후 SDS-PAGE)으로 수행하여 (heterogeneous) 단백질 집단에 대한 선택성과 특이성을 나타낼 수 있다. 2D 웨스턴 블롯은 일반적으로 이러한 목적의 정량적 ELISA의 개발 전, 숙주 세포 단백질 항원 시료에 대한 다 클론 후보의 특이성을 입증하는 데 사용된다.

2. 분석 방법 및 검체 투입

각 목적에 필요한 주요 요소를 모두 고려한 후, 다음의 정보를 사용하여 가장 적합한 분석 방법을 선택할 수 있다. 면역 블롯 시험법 개발 시 고려해야 할 주요 사항은 표 2.에 나타나 있다. 적절한 경우에, 멤브레인에 검체를 투입 (spotting)하거나 진공으로 투입하는 것이 검체를 면역 블롯 멤브레인에 투입하는 가장 수월하고 편리한 방법이다. 그러나, 도트 블롯 또는 슬롯 블롯에서 다양한 단백질의 비특이적 결합의 수준이 낮을 경우 비특이적인 간섭이 추가로 일어날 수 있어, 배경 값 수준이 분석대상으로 보일 수 있다.

표 2. 면역 블롯 시험법 개발 시 고려사항

주요 요소	면역 블롯 시험법 개발 시 고려사항
분석 모드/ 검체 투입 결정	<ul style="list-style-type: none"> • 슬롯/도트 블롯 • 1D 분리 • 2D 분리
분석 대조군/ 표준물질	<ul style="list-style-type: none"> • 표준물질 • 음성 대조군 • 민감도 대조군 • 니트로셀룰로오스
막 선택	<ul style="list-style-type: none"> • PVDF • 화학적 염색으로 막의 항원 결합 표시
블롯 이전 최적화	<ul style="list-style-type: none"> • 이전 시간(겔 전기영동) • 진공 시간 • 스폿의 양
항체 특이성	<ul style="list-style-type: none"> • 1차 항체 • 1차 항체와 일치하는 2차 또는 검출 항체 • 선정된 기질/검출 시스템과 일치하는 2차 또는 검출 항체 • 선택된 매트릭스 스파이크 및 대조군
블로킹 시약 선택	<ul style="list-style-type: none"> • 항원 분석물 없음 • 항체 시약 및 2차 검출 시스템의 비특이적 결합 차단
1차 항체와 2차 항체의 적정	<ul style="list-style-type: none"> • 1차 항체 • 2차 항체 • 매트릭스 설계에 의한 동시 적정
기질 배양 및 데이터 수집	<ul style="list-style-type: none"> • 기질 배양 시간 • 데이터 수집 시간 • 데이터 분석

전기영동은 시간이 많이 소요되지만, 특이적 및 비특이적 결합을 분리하여 명확히 확인하는데 유용할 수 있다. 시알산화 단백질 또는 탈아미노화 종에서 나타나는 비균질성 경우와 마찬가지로, 면역 반응 중

에서 단일 밴드를 다중 스팟으로 추가로 분리하기 때문에 분석자는 1차원에서 2차원으로 이동 시 선택성에 대한 민감성을 고려해야 한다.

3. 분석 대조군 및 표준물질

분석법의 목적 및 개발 과정 중 필요한 정보를 바탕으로 대조군 및 표준물질을 선택한다. 단백질 분자량 마커를 사용하여 면역 반응종의 분자량을 정확하게 추정할 수 있다. 양성 및 음성 대조군의 사용은 실험 설계 과정 전반의 문제해결에 도움이 된다. 표준물질 또는 양성 및 음성 대조군을 사용하여 시스템 적합성을 평가하고 시험법의 성능을 확인할 수 있다. 양성 대조군을 통해 적절한 단백질 이동을 확인할 수 있으며, 멤브레인 이전이 완료되었음을 확인할 수 있다. 음성 대조군은 비특이적인 상호 작용 평가에 유용하다. 정량한계(LOQ)와 유사한 시험법 민감도 대조군은 LOQ 근처 시험법의 일관성을 측정하여 분석법 성능의 변화를 평가할 수 있다.

4. 멤브레인 선정

사용 목적 및 측정 대상 단백질에 따라 멤브레인을 선택한다. 상이한 크기의 단백질이 적절히 이전되도록 하기 위해 다양한 기공 크기의 멤브레인을 이용할 수 있어야 하며 목적 대상 단백질의 분자량에 적합해야 한다. 화학적 염색법이 특정 단백질이 있는 특정 멤브레인에서 작용하는 것으로 알려진 경우, 분석을 위해 면역 염색 단계를 수행하기 전 단백질이 멤브레인과 결합하여 염색된다는 것을 입증하는 것이 유리하다. 전기영동 후 멤브레인으로의 이전은, 블롯 최적화에 요구되는 낮은 부하 수준을 수행하기 전 민감한 형광 염색법 또는 은 염색법 등의 화학 염색법 및 가능한 고부하로 최적화되어야 한다. 쿠마시 또는 콜로이드 쿠마시 등의 염색은 특정 시험법에서 요구되는 낮은 수준의 불순물을 검출하기에 민감도가 충분하지 않을 수 있다.

5. 블롯 이전 최적화

시험자는 겔에서 멤브레인으로의 이전 시간을 최적화하여야 한다. 작은 단백질에 비해 큰 단백질 일수록 이전 시간이 더 소요된다. 이전 시간이 길 경우 작은 단백질이 사라질 수 있으며, 겔에서 멤브레인을 통해 이전되어 다른 면에서 소실될 수 있다. 겔 및 구배 겔의 밀도는 겔의 상단과 하단 간의 불균일성을 초래할 수 있다. 이전 최적화 단계 중, 여러 시험 개발자는 첫 번째 멤브레인을 통해 이전되는 단백질을 포획하기 위해 여러 멤브레인을 사용한다. 겔과 멤브레인 모두를 화학적 염색하면, 이전 시간을 연장하거나 감소시키는 겔에서 지지체로 전달된 단백질의 위치에 대한 유용한 정보를 얻을 수 있다.

분석 방법을 선택한 후, 분석자는 다양한 관련 농도 수준에서 항원 스폿팅 또는 겔에서 적절한 멤브레인으로의 이전을 조사한다. 항체에 의한 이전 및 인식이 가능한 지를 확인하기 위해 웨스턴 블롯법에 요구되는 농도를 초과한 수준의 분석물이 필요할 수 있다. 분석물이 낮은 농도로 존재할 경우, 이전 최적화 과정 중 위치를 나타나기 위해 스파이킹이 필요할 수 있다. 면역 염색법 및 이전법의 다양한 가능성 때문에, 배경 값 수준 이상의 분석물 적정에 기반한 시험법에 민감도 조절 또는 여러 수준의 대조군을 고려해야 한다. 이는 시험법 개발을 진행하면서 조정할 수 있다.

6. 항체 특이성

분석자는 면역 블롯법 개발 초기에 항체 특이성을 입증해야 한다. 가능할 경우, 분석물 없이 매트릭스의 시험 검체를 시험해야 하며 반응을 나타내지 않아야 한다. 대조적으로, 매트릭스에 스파이크 된 분석물을 포함하는 검체는 항체의 특이성을 입증하는 양성 반응을 나타내야 한다.

또한, 분석자는 2차 항체 결합체 또는 표지자의 특이성을 입증해야 한다. 1차 항체 및 음성 대조 샘플의 레인(lane)이나 스폿은, 2차 항체가 1차 항체에 결합하고 매트릭스에서 발견되는 다른 단백질에 결합하지 않는다는 것을 보여줄 수 있다. 효소 결합체 또는 형광 표지된 중 특이적 항체는 구매하여 사용 가능하다. 2차 항체 또는 검출 시스템은 검출 장비 및 형광법, 비색성 침전 기질법, 또는 화학 발광법 등 분석의 민감도를 충족해야 한다.

7. 블로킹 시약 선정

분석자가 가장 적합한 블로킹 시약을 선택하고 후속 1차 및 2차 항체 배양을 통해 배경 값을 최소화하는데 필요한 시간을 선택하여 상기 서술된 블로킹 시약을 통해 복제 멤브레인을 블로킹할 수 있다. 멤브레인 상에 다양한 농도로 분석물을 적정하여 다양한 블로킹 시약으로 노이즈 (배경 값)의 양에 대한 신호의 양을 평가한 다음, 1차 항체, 표지된 2차 항체 및 필요한 경우 시각화를 위한 기질로 면역 염색을 수행할 수 있다. 이 적정은 한계 시험 및 정량적 측정에 사용되는 검출한계 및 정량한계를 검사하기 위한 출발점 역할을 한다. 면역 블롯법의 검출한계는 분석물의 특정 신호에 대한 비특이적인 배경값의 수준에 의해 결정된다. 다른 분석 방법과 마찬가지로, 배경 값과 신호가 동일하면, 신호와 노이즈가 구별되지 않는다.

8. 1차 및 2차 항체의 적정

블로킹 시약과 마찬가지로, 저 비율 희석에서 고 비율 희석까지 1차 및 2차 항체를 적정하여 배경 값 결합을 감소시키는 항체 농도를 선택하고 분석물의 신호를 최적화할 수 있다. 2차 신호에 대비 1차 신호 수준을 바꾸는 매트릭스 그리드(grid)는 배경 값을 최적화하고, 분석 물질의 신호를 개선하는데 유용하다.

고도로 정제된 항원에 대한 면역 친화성 크로마토그래피를 사용하여 면역 블롯법에 사용된 모든 면역학적 시약에 대한 비특이적 간섭의 수준을 감소시킬 수 있다. 시험법 개발자는 항원 컬럼에 남아있는 고 친화성 항체 또는 용출 조건에 따른 항체 결합의 파괴로 인해, 친화성 정제에서 1차 항체의 선택성, 특이성 및 친화성이 손실되지 않도록 주의해야 한다. 2차 항체의 경우, 면역 친화성 (immunoaffinity-purified) 방법으로 정제된 항체는 항체에 결합된 다양한 표지와 함께 상업적으로 구입할 수 있다.

9. 기질 배양 및 데이터 수집

분석자는 배경 값을 최소화하고 검출한계 및 정량한계를 향상시키기 위해 효소에 대한 기질 전개 시간을 최적화할 수 있다. 침전 기질의 과도한 기질 발현 시간은 원하는 분석물의 특정 신호에 대한 배경 값 수준의 증가를 초래할 수 있다. 기질 배양 중 블롯을 교반하면, 기질 침전물에서 생성물의 원하지 않는 소용돌이(swirl) 양상이 나타날 수 있다. 배양 시간이 너무 짧을 경우, 특이성이 낮은 신호가 나타나지만, 시간이 너무 긴 경우 배경 값이 증가하여 해상도가 낮아질 수 있다. 대부분의 효소 결합체에는 최적의 발현 시간이 있다. 형광 표지 및 화학 발광 표지는 자료를 전자 방식으로 저장하고 추가적으로 영상 신호를 얻을 수 있는 스캐닝 장비를 통할 수 있다는 장점이 있다. 형광 표지는 시간이 지남에 따라 신호가 안정화되고 단일 블롯과 함께 발현 시간을 위한 다수의 실험을 얻을 수 있으며, 단일 블롯에서 신호 획득 최적화를 수행할 수 있다는 추가적인 장점을 가진다.

절 차

1. 슬롯 또는 도트 블롯

적절한 슬롯/도트 장치를 사용하여, 중력 또는 진공 여과에 의해 목

적 항원을 적절한 멤브레인(예, 니트로셀룰로오스)에 부착시킨 다음, 항원 상의 항원 결정기에 결합하는 항원 특이적 항체를 첨가하여 배양할 수 있다. 멤브레인 상의 남아있는 결합 부위를 비특이적 항원(예, 소혈청 알부민)를 첨가하여 블로킹하고, 항원 특이적 항체를 검출 시스템으로 탐지한다. [예, HRP에 결합된 단백질 A/G는 4-클로로-나프톨 (4-chloro-naphthol, 4-CN) 페록시다아제 기질을 사용하여 가시화되는 항체에 결합한다] 양성 확인은 멤브레인 상의 도트 또는 밴드의 발현이다. 음성 결과는 흰색으로 남아 있거나 양성 밴드보다 훨씬 옅은 희미한 밴드를 나타낸다.

2. 1D 면역 블롯법

가. SDS-PAGE 겔 준비

분석자는 해당 단백질의 분자량에 적합한 아크릴아마이드-비스아크릴아마이드 함량을 가진 SDS-PAGE 겔을 선택해야 한다. 즉, 단백질의 분자량이 작을수록 모노- 또는 비스아크릴아마이드의 비율이 높고 반대로 단백질의 분자량이 클수록 모노- 또는 비스아크릴아마이드 비율이 낮다.

균일 농도 겔은 표 3.의 분리 범위를 나타내며, 구배 겔은 표 4.의 분리 범위를 보인다. 상업적으로 판매되는 겔을 이용하거나 실험실에서 겔을 제작할 수 있다.

표 3. 균일 농도 겔의 분리 선형 범위(kD)

아크릴아마이드 농도 (%)	분리의 선형 범위 (kD)
5	57-212
7.5	36-94
10	20-80
12	12-60
15	10-43

표 4. 구배 겔의 분리 선형 범위 (kD)

아크릴아마이드 (%)	단백질 범위 (kD)
5-15	20-250
5-20	10-200
10-20	10-150
8-20	8-150

나. 검체 및 표준물질

검체 준비를 위해서, 일반적으로 해당 단백질을 분리하기 위해 세포와 조직을 용해해야 한다. 용해 완충액 선택 시 주요 고려사항은 목적 단백질의 검출을 위해 선택한 항체가 변성된 검체를 인지할 수 있는지 여부이다. 인지하지 못할 경우, 계면활성제가 없거나, 상대적으로 약한 비이온성 계면활성제를 포함한 완충액을 사용한다.

검체는 환원, 비 환원 또는 변성과정이 수행되어야 하며, 단백질 함량을 알 수 없는 검체를 사용하는 경우, 일련의 희석을 통해 겔에 투입해야 한다.

다. 전기 영동법

스태킹 겔 (stacking gel) 웰에 검체를 투입하기 전, 검체를 변성시킨다 (예, 95 °C-100 °C에서 5 분간 가열). 적절한 양의 검체를 겔에 투입한 후, 염료가 분리용 겔로 이동할 때까지 8 V/cm의 전압을 가한다. 그 후, 전압을 15 V/cm로 증가시키고, 브로모페놀 블루가 겔의 아랫부분에 도달할 때까지 분리를 수행한다. 시중에 판매되는 겔을 사용하는 경우, 제조업체의 권장 사항을 따른다. 표 5.는 특정 겔에 대한 일반적인 검체 투입량을 나타낸다.

표 5. 일반적인 검체 투입량

웰	겔 두께 (mm)	최대 검체 투입량 (μ L)
10	1.0	25

10	1.5	37
12	1.0	20
15	1.0	15
15	1.5	25

라. 이전 (transfer)

전기영동 후, 목적 단백질의 분자량에 적합한 기공 크기를 가진 니트로셀룰로오스 또는 PVDF 등의 멤브레인에 목적 단백질을 블롯할 수 있다. 니트로셀룰로오스와 PVDF 모두 약 100-200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 단백질 결합 능력을 갖는다. PVDF가 니트로셀룰로오스보다 화학적 내성이 강하며, 다루기가 더 쉽다. 습식 또는 반건식 조건에서 이전을 수행할 수 있다. 반건식 이전의 속도가 일반적으로 더 빠르지만, >100 kD의 큰 단백질에는 습식 이전이 특히 권장된다. 두 가지 종류의 이전 모두, 멤브레인은 겔 옆에 위치한다. 2가지를 흡습성 물질 사이에 샌드위치 형태로 끼우며, 겔과 멤브레인 간의 밀착된 접촉을 유지하기 위해 이 형태를 고체 지지체 사이에 고정한다.

이전에 사용되는 표준 완충액은 도데실황산나트륨을 포함하지 않은 이동 또는 러닝 완충액과 동일하지만, 메탄올을 첨가하여 최종 농도를 20 %로 만든다. 80 kD를 초과하는 단백질의 경우, 최종 농도로 도데실황산나트륨 0.1 % 포함되어야 한다. 트랜스퍼 완충액 (transfer buffer)에서 메탄올의 양을 줄이면 겔의 팽창을 촉진하여 큰 단백질이 더 쉽게 전달되도록 한다. 표 6.에 웨스턴 블롯에 사용되는 일반적인 완충액이 나타나 있다.

표 6. 일반적인 웨스턴 블롯 완충액 제형

완충액	조성
검체 완충액 2 × (비환원) 1D 전기영동법	트리스 1.89 g 도데실황산나트륨 5.0 g 브로모페놀 블루 50 mg 글리세롤 25.0 mL 물 100 mL 염산을 사용하여 pH 6.8로 조정. 125 mL 까지 물을 첨가.
검체 완충액 2 × (환원) 1D 전기영동법	비환원 검체 완충액으로: pH 조정 전 2-메르캅토에탄올 12.5 mL 첨가. 또는, 1.93 g의 트리스를 사용하고 적절한 양의 디티오프레이톨을 첨가하여 최종 농도 100 mM의 DDT 준비.
러닝 완충액 10 × 1D 전기영동법	트리스 151.4 g 글리신 721.0 g 도데실 황산나트륨 50.0 g 5000 mL 까지 물을 첨가. pH 8.1-8.8로 조정.
트랜스퍼 완충액 10 ×	트리스 151.4 g 글리신 721.0 g 5000 mL 까지 물을 첨가. pH 8.1-8.8로 적정
트랜스퍼 완충액 1 ×	10× 원액 100 mL 물 500 mL 메탄올 200 mL 1000 mL 까지 물을 첨가.
TBS 10×	트리스 24.23 g 염화나트륨 80.06 g 초순수 800 mL에 혼합. 순수한 염산을 사용하여 pH 7.6으로 조정. 1000 mL까지 물을 첨가.
TBS-T	TBS 10× 100 mL 물 900 mL 폴리소르베이트 20 1 mL
8.5 M 요소 원액	요소 510 g 1000 mL까지 물을 첨가.
검체 완충액 2D 전기영동법	8.5 M 요소 원액 47 mL 트리부틸포스틴 (tributyl phosphine) 385 mg CHAPS ^a 2 g 브로모페놀 블루 25 mg 1 %의 선택된 운반체 양성 전해질

^a 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

니트로셀룰로오스를 사용하는 경우에만 메탄올이 필요하다. PVDF를 사용하는 경우, 겔과 멤브레인 샌드위치를 조립하기 전 PVDF를 활성화하기 위해서만 메탄올이 필요하며, 트랜스퍼 완충액에서는 제거할 수 있다.

반건식 이전에서는, 종이/겔/멤브레인/종이 순서로 배치된 샌드위치를 트랜스퍼 완충액에 적신 후, 음극과 양극 사이에 직접 배치한다. 습식 이전 중, 멤브레인은 양극에 가장 가깝고, 겔은 음극에 가장 가까워야 한다. 트랜스퍼 완충액의 조성이 이동 또는 러닝 완충액과 반드시 동일하지는 않다. 장비 제조업체의 시험법을 참조해야 하며, 일반적으로 도데실황산나트륨과 메탄올을 첨가한다. 트랜스퍼 완충액 내 도데실황산나트륨과 메탄올의 비율, 단백질의 분자량 및 겔 백분율이 습식 및 반건식 이전의 이전 효율에 영향을 줄 수 있다.

마. 블로킹

멤브레인을 블로킹하면 멤브레인에 대한 1차 및 2차 항체의 비특이적인 배경값 결합이 방지된다. 일반적으로, 다음의 두 가지 블로킹 시약 중 하나를 사용한다: 탈지유 또는 소혈청알부민. 탈지유가 더 저렴하지만 인산화 단백질의 시험에는 권장되지 않는다. 5 % 탈지유 또는 소혈청 알부민 용액을 준비하기 위해, 폴리소르베이트 20 완충액을 포함한 트리스-완충 생리 식염수를 5 g/100 mL 칭량한다 (TBS-T; 표 5 참조). 잘 섞은 후 여과한다. 제대로 여과하지 않을 경우, 발현 중 블롯을 오염시키는 작고 어두운 알갱이가 발생할 수 있다. 서서히 교반하면서 4 °C에서 1 시간 배양하며, 이후 TBS-T로 행군다.

바. 1차 항체 및 배양 완충액

항체를 블로킹 시약에 적절한 희석 배율 (1:100-1:3000, 항체가에

따름)로 희석한 후, 결과에 따라 희석을 최적화한다. 항체의 양이 너무 많을 경우, 불 특정 밴드를 초래할 수 있다.

사. 배양 시간

배양 시간은 수 시간에서 하루까지 다양할 수 있으며, 단백질에 대한 항체의 결합 친화도 및 단백질의 양에 따라 달라진다. 추가로 희석한 항체를 더 긴 시간 동안 배양하면 특이적 결합을 증가시킬 수 있다.

아. 배양 온도

저온에서 배양하는 것이 권장된다. 분석물을 블로킹 시약 내에서 하루 배양해야 하는 경우, 세균 성장에 따른 오염을 방지하기 위해 4°C에서 배양하며, 멤브레인에 적절히 균질한 막을 형성하기 위해 항체 용액을 부드럽게 교반해야 한다.

자. 2차 항체 및 배양 완충액

다음과 같이 2차 항체 및 배양 완충액을 처리한다. 멤브레인을 TBS-T 내에서 교반하면서 세척 하여 잔여 1차 항체를 제거한다. 권장 희석 비율로 2차 항체를 TBS-T에 희석한다. 2차 항체의 양이 너무 많을 경우, 불특정 밴드를 초래할 수 있다. 가볍게 교반하면서 블롯을 실온에서 1-2 시간 배양한다. 표 1은 2차 항체 검출과 방법에 대한 다양한 선택지를 보여준다. 더 자세한 세부 사항은 아래의 면역 블롯법의 데이터 분석 부분에서 확인할 수 있다.

3. 슬롯/도트 블롯

시험 절차는 1D 면역 블롯법과 유사하지만, 단백질 검체가 전기영동으로 분리되지 않고 수동 또는 블로팅 유닛을 사용하여 멤브레인에 직접 스포팅 (도트 또는 슬롯 블롯 방법)하기 때문에 차이가 있다.

가. 수동 스포팅을 사용한 절차

다음과 같이 수동 스포팅을 수행한다. 건조한 종이 타월을 다량 포개어 그 위에 건조한 여과지를 놓는다. 트랜스퍼 완충액을 미리 적신 여과지를 건조한 여과지 위에 놓는다. 미리 적신 여과지 위에 미리 적신 멤브레인을 놓는다. 미리 적신 멤브레인 위에 검체를 스포팅하여 멤브레인으로 흡수되도록 한다. 검체가 흡수된 후, 멤브레인을 깨끗하고 건조한 여과지 위에 놓고 건조시킨다.

나. 진공-블로팅 유닛을 사용한 절차

일반적으로 다음과 같은 진공-블로킹 유닛을 사용한다. 멤브레인을 준비하여, 제조업체의 지침에 따라 블로팅 유닛에 넣는다. 블로팅 유닛에 진공을 가하여 과량의 완충액을 제거한다. 용해도를 높이기 위해, 검체를 완충액에 녹이고, 투명하지 않을 경우 원심 분리하여 침전물을 제거한다. 피펫을 사용하기에 검체의 점도가 너무 높을 경우, 완충액을 추가 희석한다. 진공을 끈 상태에서 피펫으로 검체를 웰에 주입하고, 블로팅 유닛에 진공을 가한다. 모든 검체가 멤브레인을 통과한 후, 진공을 끄고 각 웰에 완충액을 첨가하여 측면을 세척한 후, 진공을 다시 가한다. 멤브레인을 제거하여, 면역 블롯법을 진행한다.

4. 2D 면역 블롯법

가. 검체 준비

단백질을 용해 시키는데 사용되는 화합물은 용액의 이온 강도를 증가시켜서는 안된다. 예를 들어, 일반적인 검체 용해화 용액은 다음과 같다: 8 M 요소, 50 mM 디티오프로판올 또는 2 mM 트리부틸포스핀 (tributyl phosphine, TBP), 4 % 3-[(콜라미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트 (3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]

-1-propanesulfonate, CHAPS), 0.2 % 운반체 양성 전해질 및 0.0002 % 브로모페놀 블루. 운반체 양성 전해질의 첨가는 등전점에 접근 시 단백질의 용해도를 향상시킨다. 양성 전해질의 사용은 pH 구배에 걸쳐 거의 균일한 전도성을 생성하면서도 그 형태에 영향을 미치지 않으며, 이는 운반체 양성 전해질의 농도가 최적화되어야 함을 의미한다.

나. 전하에 따른 분리

고정된 pH 구배(이하 IPG) 스트립은 상업적으로 이용할 수 있으며, 또는 내부적으로 제조할 수 있다. 스트립의 선택은 목적 단백질의 등전점에 따라 달라지며, 크기는 2차원 겔의 크기와 일치해야 한다. 각 검체의 단백질량을 확인해야 하며, IPG 스트립에 투입하는 양은 IPG의 크기에 따라 10-300 μ g의 범위여야 한다.

다. 분자량에 따른 분리

전하 분리 후, 분자량을 확인하기 위한 2차원 분리 전, 도데실황산 나트륨을 포함한 완충액에서 스트립을 평형화시켜야 한다. 스트립을 겔 위에 직접 위치시키고, SDS-PAGE 러닝 완충액 내에 준비된 0.5%-1.0 % 아가로오스를 겹쳐서 스트립 고정시킨다. 2차원에서 이온 프론트를 추적하기 위해, 아가로오스에 브로모페놀 블루를 첨가할 수 있다.

면역 블롯법의 데이터 분석

일반적으로 밴드의 유무는 처리된 항원과 유사한 유형의 대조군 (정확한 또는 예상되는 반응을 나타내는 것으로 알려지거나 적격성이 확인된 특성이 매우 잘 확인되어 있는 항원)과의 비교를 통해 확인한다. 분석자는 일반적으로 정성적인 비교를 수행하지만, 검출 시스템 (예,

4-CN 페록시다아제 기질을 포함한 용액 내에서 항온 보관 후; 표 1 참조)를 사용하여 밴드 또는 도트를 정량하고, 동시에 분석 (예, 동일한 겔에서 분석)한 대조 밴드와 비교할 수도 있다.

1. 검출 방법

가. 증강 화학 발광법 (enhanced chemiluminescence)

증강 화학 발광법은 민감도가 높고 (pg 이하 수준에서 검출) 목적 단백질의 상대 농도의 정량에 사용할 수 있기 때문에 면역 블롯 분석법에서 널리 사용되는 방법이다. 이 방법은 2차 항체의 리포터에 노출되었을 때 발광하는 기질과 함께 배양한 블롯에 따른다. 필름 또는 전하 결합 소자 (charge-coupled device, 이하 CCD) 카메라를 사용하여 빛을 감지하며, 영상을 농도측정법을 통해 분석하여 단백질 염색의 상대적인 양을 광학 밀도 측면에서 평가한다. 적절한 분자량 표준물질 세트를 마커로 사용하여 분자량을 추정할 수 있다.

나. 형광 검출법

직접 형광법은 블롯에서 단백질을 검출하는 데 사용할 수 있다. 직접 형광법은 간단하고 신속하며 민감도가 높고 증강 화학 발광 검출법에 비해 선형 범위가 크다. 다른 많은 형광 신호를 검출할 수 있는 능력이 직접 형광법의 장점이다. 이 분석법은 블롯의 리프로브 (reprobe)가 필요하지 않다. 증강 화학 발광법에 비해, 형광법은 CCD 또는 레이저 스캐닝 영상 시스템으로 시각화하고 정량화하기가 더 용이하다. 일부 데이터 수집 시스템은 수집 시간을 연장하여 신호 대 노이즈 수준을 최적화한다. 재실험이 가능한 형광 표지된 블롯은 이러한 목적에 유용하다.

증강 화학 형광법 (enhanced chemifluorescence, ECF)는 또 다른 일반적인 형광법이다. 증강 화학 형광법은 HRP 또는 AP와 결합된 2차

항체를 사용한다. 효소와 결합한 항체는 효소 절단 후 형광을 생성하는 특정 기질과 반응한다. 분석자는 UV 에피 조명을 사용하여 결과 신호를 시각화하고 디지털 이미지를 수집한다. 증강 화학 형광법 신호는 기존의 향상된 화학발광보다 더 넓은 선형 범위를 가진다. 예를 들어, 직접 형광은 pg 범위에서 검출한계를 가지며, 선형 동적 범위에서 약 2개의 로그도 가진다.

양자점 (quantum dot) 또한 단백질을 검출하는 면역 블롯 분석 방법 중 하나이다. 양자점은 동시에 또는 순차적으로 항체와 결합하여 다중 표지 항원을 검출하는, 블롯 제거가 필요 없는 프로브 유형이다. 유사하게, 근적외선 (near-infrared, NIR) 형광단 결합 항체는 형광 염료의 여기로부터 생성된 빛을 정적 상태에서 측정하는 항체 검출 방법이다. 정적 상태에서 측정한 빛은 동적 상태 (예, 화학 발광법)에서 측정한 빛보다 더 정밀하고 정확한 감지를 가능하게 한다.

다. 방사선 검출법

또한, 항원을 방사성 동위원소 (예, 요오드)로 표지함으로써 단백질을 검출할 수 있다. 한편, 이 방법은 필름 및 농도 측정계의 시간 노출을 통하거나, 또는 멤브레인으로부터 밴드를 직접 절단하고 섬광 계수기를 사용하여 계수함으로써 밴드 내의 방사능을 쉽게 정량화할 수 있다는 장점이 있다. 반면에, 분석자가 방사성 물질을 관리해야 하기 때문에 안전성 측면의 단점이 있으며, 분석 실험실은 폐기물 관리와 개인 노출을 통제하고 모니터링하는 프로그램을 마련해야 한다.

2. 면역 블롯 정량법

가. 비전기영동 정량법

특정 단백질은 블로팅 절차가 적절히 최적화 되고 특정한 시간 범위에 걸쳐 선형 반응 범위를 나타낼 때 정량할 수 있다. 면역 블롯 정량

법은 다음의 몇 가지 요소를 포함한다: 적절한 항원 및 항체 농도 및 순도, 항체 특이성, 블로킹 조건, 충분한 세척, 그리고 신호의 지속 시간 및 강도. 필름이나 전자적으로 최적화된 조건에서 노출이 포착되면, 분석자는 농도 측정 방법을 사용하여 블롯과 표준상의 특정 단백질의 비교를 통해 결과를 정량한다. 분석자는 음성 대조군을 포함시켜 배경값에 대한 결과를 수정할 수 있다.

밴드의 강도는 단백질의 양에 따라 달라진다. 다양한 상업용 소프트웨어 패키지를 사용하여 필름상 밴드를 영상 분석할 수 있다. 또는, CCD 카메라가 포함된 디지털 영상 시스템에 일반적으로 데이터 분석 수행을 위해 설계된 소프트웨어가 포함되어 있다.

나. 전기영동 정량법

분자량이 알려진 미리 염색된 단백질의 상대적 이동도를 외삽하여 다양한 분자량의 단백질을 확인하며, 양성 대조군과 비교 할 수 있다. 양성 대조군은 보통의 농도 측정 결과와 비교하여 밀도측정 결과의 한계 범위를 결정하는데 사용된다. 검출 방법과는 별개로, 유효한 웨스턴 블롯 결과를 얻기 위해서는 다음의 기준을 충족하여야 한다.

- 1) 멤브레인 과다 노출을 최소화하고 염색 과정을 시각화하여 적절히 발현되도록 한다.
- 2) 사전 염색된 분자량 마커는 반드시 나타나야 하며, 예상 범위를 포함해야 한다.
- 3) 표준, 대조 및 목적 단백질에 대한 밴드는 적절한 위치와 강도를 보여야 한다.
- 4) 밴드의 시각화 및 해석을 불분명하게 하는 블롯 또는 염색이 없어야 한다.

시험법 밸리데이션

슬롯/도트 블롯과 같은 정성적 분석에는 특이성에 대한 밸리데이션이 요구된다. 특이성이란 다른 물질 성분이 존재하는 경우 분석물을 검출하는 능력이다. 밸리데이션을 위해, 슬롯/도트 블롯 방법의 특정 단계에서 항원이 존재할 때 항원을 검출할 수 있고, 항원이 없을 때 거짓양성 결과를 보고하지 않는다는 것을 입증해야 한다. 또한, 항원 특이적 항체에 대한 특이성을 증명하는 것은 특이성 평가의 일부이다.

모든 시험법에 대해, 항원에 대한 항체의 특이성 및 매트릭스 내 다른 단백질 및 시약을 인지하지 않는다는 것을 입증해야 한다. 확인 시험에는 특이성만이 요구된다. 한계 시험에는 특이성 및 검출한계가 요구된다. 각 시험에 포함된 민감도 관리는 시험법 민감도의 변화 가능성을 설명하기 위해 각 확인 시 정량한계가 충족된다는 것을 보여줄 수 있다. 정량적 시험에는 완전성 시험을 포함한 모든 밸리데이션 매개변수가 요구된다.

전기영동 면역 블롯법의 특이성 확인에는 다음이 포함되어야 한다 : 단백질 분리 확인을 나타내는 염색된 겔, 멤브레인으로 단백질이 적절히 이전됨을 보여주는 염색 블롯, 1차 항체에 대한 결합체의 특이성을 나타내는 블롯 및 대조 검체, 그리고 적절한 항원에 대한 항체의 결합을 나타내는 블롯. 또한, 시험법 밸리데이션을 통해 시스템 적합성의 척도로서의 단백질 민감도 관리뿐만 아니라, 각 분석법에 대한 대조 멤브레인의 필요성을 확인할 수 있다.

17. 유세포 분석법

유세포 분석법은 세포치료제 및 환자 검체 등에서 세포 집단의 정량적 및 정성적 평가에 이용되는 중요한 분석 방법이다. 유세포분석은 이종(heterogeneous) 세포 집단 내에서 개별 세포의 다양한 특성을 신속하게 분석할 수 있다.

작동원리, 방법, 품질 및 표준화

유세포분석 과정에서는 세포가 하나 이상의 레이저로 구성된 고정 광원을 지나쳐 개별 세포들이 크기, 입도 그리고 세포막 표면 또는 세포내의 항원 또는 분자물질의 존재와 같은 특징에 따라 관찰되거나 분류된다. 유체 안에 현탁되어 있는 세포들은 유세포 분석기에 특정한 튜빙의 크기와 구성, 챔버 및 펌프에 의해 움직임이 제어된다. 레이저 광선이 세포들과 상호작용하면서 발생하는 광신호의 패턴은 기기 고유의 검출 시스템으로 포착되며 검출된 신호는 주어진 시료에서 다른 세포들의 데이터와 함께 분석 및 결합할 수 있는 데이터 요소로 변환된다. 그런 다음 세포 현탁액의 데이터를 1차원, 2차원 또는 3차원 시각적 형식 또는 숫자 형식으로 표현하여 세포 시료와 하위집단의 특성을 정성적 및 정량적으로 나타낼 수 있다.

1. 유세포 분석기

가. 유체 시스템

유체 시스템은 대량의 세포 혼합물을 이동시켜 단일세포의 흐름이 형성되도록 한다. 유세포 분석기 내에서 단일세포 현탁액은 각 세포가 균일한 광원에 의해 순차적으로 조명되는 관찰지점인 제한된 영역을 통과한다. 대부분의 기기는 유체의 흐름을 생성하도록 기하학적으로 설계된 원추형 노즐 장치를 사용하여 세포 시료를 시료 주입 팁으로 주입 시킨 후, 세

포가 등장성 시스(isotonic sheath) 유체에 의해 운반되도록 하는 장치를 사용한다(그림 1). 유체 출구는 일반적으로 직경이 50-250 μm 인 오리피스를 가지고 있으며 이를 통해 유체는 높은 유속으로 배출된다. 세포의 시료 흐름(저압)과 시스 흐름(고압) 사이의 압력 차이에 의해 세포/입자가 제한된 흐름으로 흐른다. 유체가 동일한 방향으로 흐르게 하는 것(동축 흐름 전략)은 매우 효율적이며, 관찰지점의 세포 흐름의 직경은 일반적으로 내부에 포함된 세포 또는 입자보다 약간 크다.

동축 흐름 전략의 대체 접근 방법으로 세포에 초점을 맞추고 방향성을 주기 위해 미세 모세관을 사용하기도 한다. 그런 다음 세포에서 감지되거나 방출되는 광신호를 측정하고 분석한다.

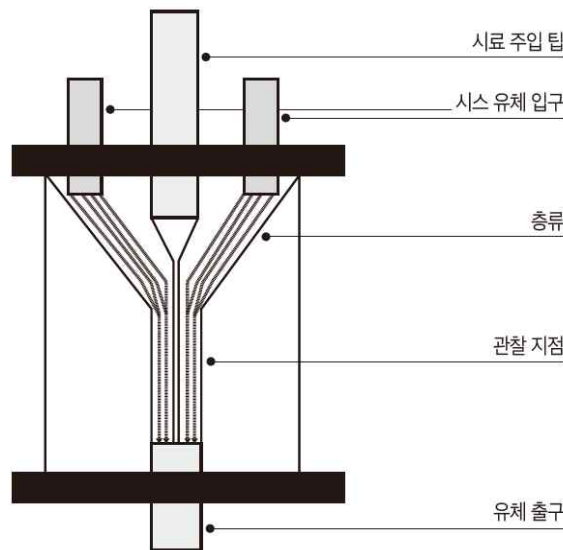


그림 1. 유세포 분석기의 개략도

나. 광학 시스템

세포가 형광 염료나 형광 표지 항체 시약으로 염색되면 레이저에서 방출되는 빛이 형광 염료와 상호작용하여 균일한 파장, 위상, 편광 빛의 일관된(병렬) 파장을 갖는 유도방출이 발생한다. 레이저 빛과 세포 간의 상호작용에서 발생하는 형광 광신호는 들어오는 광선과 직선으로 90° 방향에 있는 일련의 검출기에 의해 수집된다. 상용화된 일반적인 유세포

분석기 레이저(해당 파장을 가진)는 청색 아르곤 레이저(488 nm), 적색 다이오드 레이저(635 nm), 자색 레이저(405 nm)이다.

다. 전자 신호 처리 및 데이터 출력(전자시스템)

세포가 유세포분석기의 광학 시스템을 통과할 때, 세포 표면 또는 세포 안에 있는 모든 형광 색소의 광 산란 패턴 또는 형광은 세포의 특성에 대한 정보를 전산화된 판독 값으로 변환하는 다양한 유형의 광검출기 또는 광전자 증배관(photomultiplier tubes, PMT)에 의해 감지된다. 분석된 각 세포는 전방 산란, 측방 산란 및 형광이라는 매개변수를 통해 이벤트를 생성하고 측정한다. 그림 2.는 일반적인 2색 유세포 분석기 구성의 예를 보여준다. 각각 다른 세포 유형에는 다양한 매개변수에서 고유한 신호 세트가 있다. 예를 들어 세포가 광선을 통과할 때 전방 방향(일반적으로 레이저의 전방 방향에서 약 20°)으로 굴절되는 빛을 전방 산란이라고 하며 전방 산란 채널(Forward Scatter Channel, FSC)에 의해 수집된다. 전방 산란 채널의 굴절량은 세포의 크기에 비례한다. 90° 각도로 굴절된 빛을 측방 산란이라고 하며 측방 산란 채널(Side Scatter Channel, SSC)에 의해 수집된다. 이것은 과립, 막의 거칠기, 또는 핵에 의해 야기된 세포의 구조적 복잡성을 측정하며, 이 모든 것들은 더 높은 측방 산란 채널과 관련이 있다. 특정 대역 통과 필터를 사용하여 다른 광전자 증배관에 의해 굴절된 빛은 특정 형광 채널에 의해 수집된다(그림 2.의 FL1 및 FL2). 광전자 증배관이 감지한 빛에서 발생하는 전기 펄스는 일련의 선형 및 로그 증폭기에 의해 처리된다. 로그 증폭은 종종 세포의 형광을 측정하는데 사용된다. 그림 3.~7.은 특정 형광 색소와 결합된 항체로 염색된 세포의 히스토그램을 보여준다(표 1. 참조). 항체는 면역 표현형 검사에서 논의된 분화 클러스터(CD) 마커의 일부에 특이적이다.

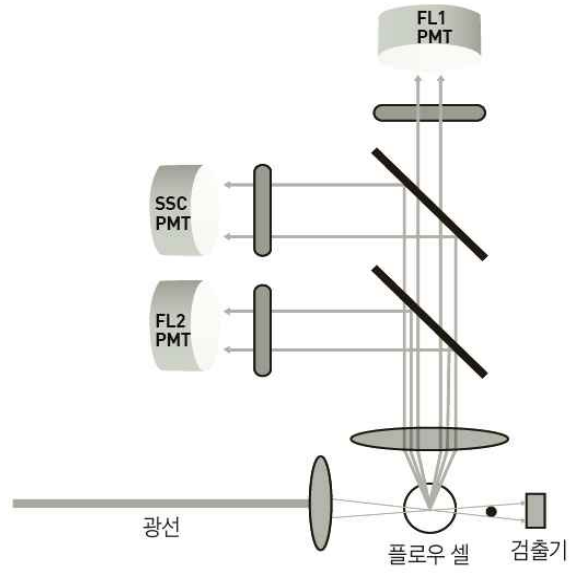


그림 2. 전방 산란 채널(FSC), 측방 산란 채널(SSC) 및 형광 검출기가 있는 일반적인 2색 유세포 분석기 (FL: 형광, PMT: 광전자 증배관)

표 1. 유세포 분석에 사용되는 대표 형광 색소

형광 색소	여기 레이저 (nm)	방출 피크 (nm)
캐스케이드 블루 (Cascade Blue)	375; 401	423
퍼시픽 블루 (Pacific Blue)	403	455
R-피코에리트린 (R-Phycoerythrin, R-PE)	480; 565	578
PE-Cy5 접합체 (PE-Cy5 conjugates)	480; 565; 650	670
PE-Cy7 접합체 (PE-Cy7 conjugates)	480; 565; 743	767
레드 613, 텍사스 레드 (Red 613, Texas Red)	480; 565	613
페리니딘 클로로필 (Peridinin Chlorophyll, PerCP)	490	675
플루오레세인 (Fluorescein, FITC)	495	519
알로피코시아닌 (Allophycocyanin, APC)	650	660
APC-Cy7 접합체 (APC-Cy7 conjugates)	650; 755	767

유세포 분석법의 유용성은 세포의 표면, 세포질, 핵 또는 세포의 생성물에 형광 표지를 부착할 수 있는 능력에서 비롯된다. 세포에 부착된 형광 마커는 레이저로 자극해 특정 파장의 빛을 방출할 수 있으며, 이 빛을 위에서 설명한 방식으로 검출하여 분석한다. 검출된 형광의 종류와 양은 세포에 대한 정량적 및 정성적 정보를 모두 제공한다.

광검출기는 전압의 진폭이 빛의 양에 비례하는 소량의 전류를 생성하여 빛을 분석 가능한 출력으로 변환한다. 전압은 증폭되어 컴퓨터가 여러 가지 방법으로 표시할 수 있을 만큼 큰 전기 신호로 변환된다. 따라서 전방 산란 채널(FSC), 측방 산란 채널(SSC), 형광 검출기는 빛을 수집하여 컴퓨터로 분석할 수 있는 전기 신호로 변환한다. 이러한 방식으로 각 광검출기에서 나오는 신호의 강도(낮음에서 높음)를 측정하고 채널별로 분류

할 수 있다. 큰 세포가 많은 세포 집단은 높은 채널에서 많은 이벤트를, 작은 세포가 많은 세포집단은 낮은 채널에서 많은 이벤트를 가질 수 있도록 채널들이 연속체로 배열되어 있다.

라. 데이터 분석

유세포 분석기의 데이터 출력은 여러 가지 방법으로 나타낼 수 있으며, 그중 가장 기본적인 것은 빛의 강도가 비슷한 이벤트의 전방 산란, 측방 산란 또는 형광을 채널에서 수집한 다음 플롯(plot)하는 단일 매개변수 히스토그램이다(그림 3). 이 플롯은 광학 특성이 유사한 세포의 수를 나타낸다. 그림 4.는 x축과 y축의 두 측정 매개변수와 밀도(점) 플롯 또는 등고선도로 세포 수를 표시하는 그래프의 예다. 매개변수는 전방 산란 채널(FSC), 측방 산란 채널(SSC) 또는 형광일 수 있다. 이러한 매개변수는 하나의 채널에서 수집할 수 있다.

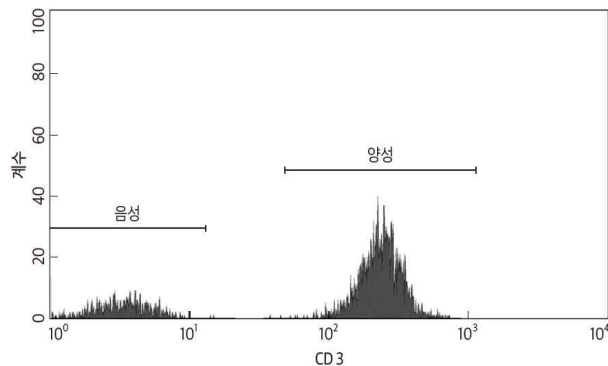


그림 3. 세포의 혼합물에서 세포 항원 CD3의 표현형을 보여주는 단일 매개 변수 히스토그램

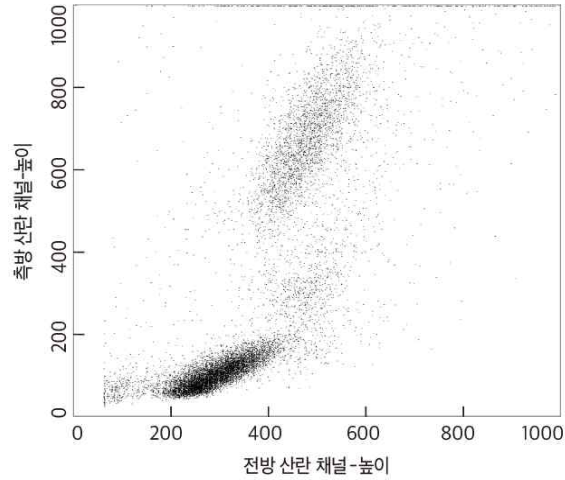


그림 4. 전방 산란 채널(FCS) 및 측방 산란 채널(SSC)에 의해 표시되는 세포의 이변량(bivariate) 점 플롯

점 플롯은 각 세포의 점을 표시하고, 밀도 플롯과 등고선 플롯은 각 채널의 상대적인 세포의 수를 기준으로 각각 히트맵(heat map) 또는 지형 선형 지도(topographical linear map)를 표시한다. 전방 대 측방 산란 히스토그램은 다양한 조혈모세포 유형을 식별하는 가장 일반적인 방법이다. 그림 5.는 다양한 채널의 상대 세포 수를 3차원으로 표현한 등고선 플롯을 보여준다.

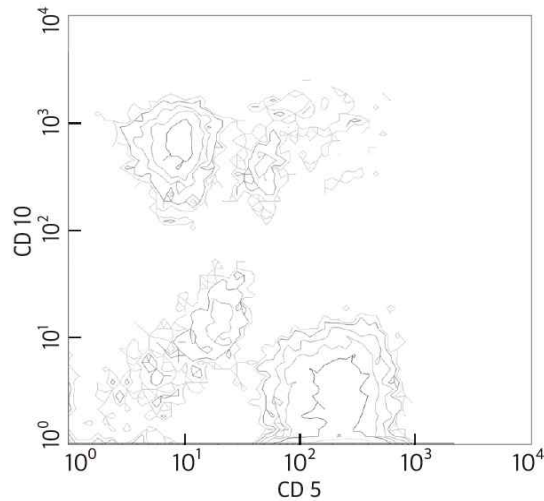


그림 5. 두 CD 마커(CD5, CD10)를 동시에 발현하는 각 채널에 존재하는 세포의 상대적인 수를 나타내는 이변량(bivariate) 등고선 플롯

세포가 두 가지의 다른 형광 색소를 가진 서로 다른 항원 결정기에 대한 항체로 염색되어있는 경우 데이터는 서로에 대립하는 두 개의 매개변수의 플롯으로 나타난다. 각 축에 커서를 설정하여 각 속성에 대해 양성 집단과 음성 집단을 구분할 수 있다. 따라서 두 마커 모두 양성, 두 마커 모두 음성, 두 마커 중 하나에 대해서만 양성인 세포가 그림으로 표시된다(그림 6.).

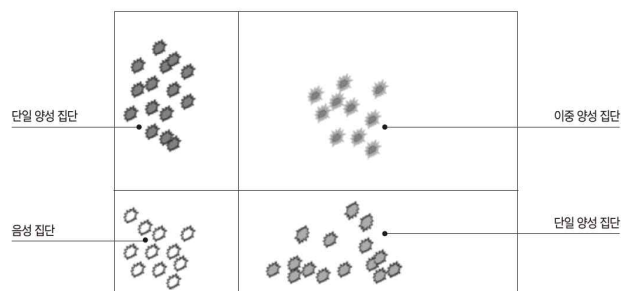


그림 6. 2-매개변수 히스토그램의 도식적 표현

유세포 분석기는 사용자가 각 마커에 대해 양성과 음성의 한계를 설정할 수 있도록 해준다. 각 세포의 각 전자 신호가 수집된 순서대로 표시되는 리스트 모드에서 유세포분석 데이터가 수집된다. 리스트 모드 파일은 나

중에 편집하여 이벤트를 포함하거나 제외할 수 있다. 유세포 분석기의 기본적인 장점은 전방 및 측방 산란, 그리고 다른 집단의 세포를 취급할 때 배경 및 죽은 세포(예: 비세포 입자 또는 부산물) 모두에서 관심 있는 세포 데이터와 분리할 수 있다는 것이다. 사용자는 어떤 신호가 세포에서 나오는 실제 광 출력인지 결정하고 컴퓨터의 게이트 안에 있는 이벤트만 양성으로 계산하도록 전자 게이트를 구성해야 한다. 세포 집단은 조직이나 세포의 유래와 사용되는 유세포 분석기의 특성에 따라 크게 달라질 수 있다. 게이팅은 사용자가 실제 이벤트를 고려하여 출력을 결정할 수 있기 때문에 이 과정은 유세포분석 데이터를 표준화 하는데 가장 중요하다(그림 7.).

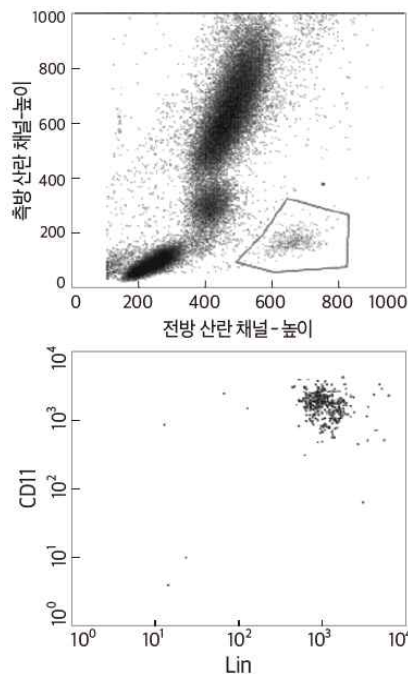


그림7. 시료에서 다른 세포 집단과는 다른 낮은 측방 산란 및 높은 전방 산란을 갖는 세포 집단의 게이팅

유사한 방출 파장을 가진 형광 색소의 스펙트럼 중첩을 분리하도록 보정할 수 있다. 아날로그 방식의 유세포 분석기의 경우 데이터 수집 전에 보정을 설정해야 한다. 최신 디지털 분석기에서는 데이터 수집 전이나 후에 보정을 설정할 수 있다. 보정 조정은 세포 유형이나 실험 조건에 대한

올바른 보정을 결정하기 위한 다양한 방법의 상대적 장점들이 있다. 사용자는 보정의 부적절한 조정으로 발생할 수 있는 표현형 오류를 방지하기 위해 분석대상 세포 유형에 대한 상당한 지식을 필요로 한다.

계산된 이벤트의 수는 결과의 통계적 신뢰도에 적합하여야 한다. 채널에서 특정 횟수의 이벤트가 측정될 때까지 데이터가 수집되도록 기기를 설정할 수 있다. 이 기능을 사용하면 사용자는 시료의 분석 시간 또는 이벤트 수를 변경하여 통계적으로 신뢰할 수 있는 데이터를 생성할 수 있다.

2. 유세포 분석법: 절차의 요소

가. 시료 취급 및 염색

1) 시료 채취, 취급 및 항응고 처리

세포치료제 등을 정확하게 분석하기 위해서 시험자는 의약품에서 추출된 시료가 제품 전체를 최대한 대표하는지 확인해야 한다. 혈액, 성분채집 시료 및 세포 현탁액 제품은 시료 채취 전에 잘 혼합되어야 하며 적절한 시료량을 확보하기 위해 주의를 기울여야 한다.

사람의 혈액/혈장이 포함된 세포 시료는 항응고 처리를 해야 한다. 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)을 사용하는 것보다 시료를 몇 시간 이상 최적으로 보존할 수 있는 시트르산 기반 항응고제(예: 항응고제 시트르산 텍스트로스 용액 A) 또는 헤파린 사용을 권장한다. 장기 보관 시료의 경우 특수 운반/저장 매체가 필요할 수 있으며, 유세포 분석시 해당 시료가 신선한 시료와 동일함을 확인하기 위한 밸리데이션 연구가 수행되어야 한다.

전혈 용해 및 표면 항원 염색을 위한 시료는 실온에서 운반 및 보관해야 하며, 가급적 천천히 혼합하여야 한다. 고정된 시료 또는 살아있는 세포 시료는 4°C에 보관해야 한다. 시료가 고온에 노출될 경우, 온도 조절 물질(실온 팩, 습식 얼음/차가운 팩 및 단열)이 필요할 수 있으며, 시료

무결성을 보장하기 위한 밸리데이션 연구가 수행되어야 한다. 중요 또는 고가 시료의 경우 운반 중에 온도 모니터링 장치가 필요할 수 있다.

시료는 채취 후에 가능한 한 빨리 분석해야 한다. 운반/저장 매체 내에서 세포 증식 및 에너지원의 대사 고갈이 세포사멸로 이어질 수 있는 상황에 특별한 주의를 기울여야 한다. 정확한 계산이 필요 없거나 감염원이 의심되는 경우 상용 용해/고정 용액의 사용은 저장 시간을 늘리고 질병 전염 위험을 줄일 수 있다. 밀도구배 원심분리 방식으로 분리한 시료의 경우 세포 표지 후에 완충 파라포름알데히드 (0.1%~2.0%)에 보관하는 것을 권장한다.

2) 시료 처리, 염색 및 고정

시료 처리, 염색 및 고정에 사용되는 시약은 용도에 적합한지 확인해야 한다. 시약 키트를 사용할 때는 제조업체의 시료 처리 지침을 따른다.

원심분리, 세척, 적혈구 제거 또는 용해 또는 밀도구배 분리와 관련된 시료 처리는 일반적으로 많은 유세포 분석에서 수행되지만 오류 및 인공물이 발생할 수 있다. 적혈구 제거 및 용해에 여러 가지 기술과 시약을 사용할 수 있다. 최적의 품질을 위해 체외 진단(In Vitro Diagnostics, IVD) 시약 또는 분석 특이시약을 권장하지만 여전히 인공물이 발생할 수 있다. 밀도구배 원심분리 기능은 측정 중인 하위집단 사이에서 살아 있는 세포의 손실과 관련된 오류를 발생시킬 수 있다. 이러한 오류 및 인공물의 원인은 가능하면 신선한 전혈을 분석함으로써 피할 수 있다.

대부분의 전혈 용해물은 실온과 암실에서 염색을 권장한다. 많은 분석법에는 형광 캡핑과 내부화를 방지하기 위한 희석 고정제가 포함되어 있다. 반대로 세포 시료인 밀도구배 세포 시료, 성분채집 시료, 조직 배양액은 4°C에서 염색하여야 하며, 차가운 완충액으로 세척하고, 분석이 완료될 때까지 차갑게 보관되어야 한다.

세포 표면 항원을 보존하는 고정은 상용 백혈구 보존제를 사용하거나

완충 포르말데히드 또는 파라포르말데히드를 사용할 수 있다. 고정 시료의 배치 분석을 고려하는 모든 실험실은 시험을 이행하기 전에 이러한 기법을 철저히 밸리데이션 해야 한다.

나. 형광 색소의 사용 및 선택

1) 형광 색소

형광 색소는 세포의 직접 염색에 사용되거나 세포 항원이나 기타 구조를 염색하기 위한 항체 또는 기타 시약에 결합 되는 물질로 사용된다. 표 1은 유세포 분석법에 사용되는 일반적인 형광 색소의 예와 여기 및 방출 파장을 보여준다. 파장(nm)은 환경에 따라 조금씩 다를 수 있다. 특정 제조업체의 합성 프로브도 사용할 수 있다. 형광 색소는 레이저 및 필터 세트의 스펙트럼 범위와 사용자의 유세포 분석기에 특정한 범위와 일치해야 한다.

다색 표현형용으로 형광 색소를 선택할 때 시험자는 특정 기기에 대해 설정된 방법을 참조해야 한다. 일반적으로 가장 밝은 형광 색소는 세포 표면에서 가장 낮은 발현을 가질 것으로 예상되는 항원과 연결되어야 한다. 탠덤 염료의 밝기는 특정 고정제 사용 시 감소 될 수 있다. 이전에 밸리데이션 되지 않은 다색 흐름 및 탠덤 염료 절차를 설계할 때, 시험자는 탠덤 염료/고정제 조합을 비교하고, 시료 대 시료의 일관성을 보장하기 위해 최종 형광 색소 조합에 대한 밸리데이션을 수행해야 한다.

탠덤 형광 염료는 이중 결합형 형광 분자로, 두 가지 표지가 근접하면 도너(donor) 형광을 여기시키는 레이저에 의해 생성된 에너지가 억셉터(acceptor) 형광으로 전달되어 억셉터(acceptor) 형광의 방출 파장에서 광자를 방출하며 이는 형광 공명 에너지 전달이라고 한다. 예를 들어 PECy5는 PE(565 nm)의 파장에서 여기하여 Cy5로 에너지를 전달하고 Cy5(670 nm) 파장에서 방출한다.

2) 형광 표지된 항체

항체 시약은 대부분 단클론항체이지만, 일부 용도에서는 다클론 시약이 사용 가능하고 바람직할 수 있다. 항체의 품질과 특이성은 매우 다양하다. 주어진 항원에 대한 항체는 다른 항원 결정기에 대한 결합 특이성 또는 동일한 항원 결정기에 대한 결합 강도에 차이가 있을 수 있다. 가능한 경우 체외 진단 또는 분석 특이시약 등급의 직접 결합 형광 색소-항체 조합을 사용한다. 원하는 세포 집단에 대한 항체 농도의 최적화는 시험법에 따라 다르지만, 일반적으로 일정한 수의 세포로 증가된 항체 농도를 사용하여 자가형광과 소광현상 사이의 최적의 밝기를 분류함으로써 이루어진다. 소광현상은 과도한 항체가 면역 침강법과 형광 강도의 상실로 이어질 때 발생하는 전지대현상(prozone phenomenon)에 의해 발생한다.

3) 세포 표면 항원 염색

표면 항원 염색 기술은 시료의 종류에 따라 다르다. 전혈 용해 기법은 일반적으로 15~30분 동안 어두운 실온에서 표면 표지한 후 적혈구 용해 및 원하는 경우 고정 작업을 수행해야 한다. 일반적으로 백혈병 면역 표현용 항체 표지 부착 전 전혈 또는 골수 시료를 대상으로 염화암모늄(NH_4Cl) 용해 후, 세척 하는 방법을 사용한다. 살아있는 상태로 착색된 단핵세포 또는 배양된 세포 시료는 항체의 캡핑 및 내부화를 방지하기 위해 4°C 또는 아자이드(azide) 함유 완충액에 보관해야 한다.

4) 세포 내 염색

세포 내 항원과 사이토카인에 표지를 부착하기 위한 몇 가지 표준화된 절차도 존재한다. 시험자는 이러한 절차에 대해 제조업체의 시험법 및 표준화된 시약을 참조해야 한다. 투과성 시약은 절차 및 제조사마다 다르므로 시약을 혼합하여 사용하는 것은 권장하지 않는다. 사이토카인 표지

를 위해서는 충분한 양의 사이토카인이 축적되어 검출될 수 있도록 활성화 단계와 골지 블록을 사용해야 하는 경우가 많다.

5) 항원의 정량

유세포분석법 중에는 세포의 면역학적 작용에 대한 정보를 제공하기 위해 세포 당 항원 분자의 평균 수와 밀도를 정량화해야 한다(예: 세포 외 항원이 자극 활성화와 관련하여 다르게 발현되는 연구). 항체/형광 색소 표지된 세포 시료의 강도는 동일한 광전자 증배관전압 설정에서 수집된 미세 비드 형광 표준 세트의 강도와 비교된다. 표준은 유효 형광 대 항체(ratio of fluorophores to antibody, F/P) 비율, 세포 당 항원 분자 수, 세포 당 가용 부위의 밀도 등을 결정할 수 있는 수용성 형광 분자 단위로 교정된다.

다. 기기 설정 및 작동

1) 보정

대부분의 기기 제조업체는 가장 일반적인 임상시험(예: 림프구 표현형, CD34 분석)으로 발견된 목표값을 설정하기 위해 광전자 증배관 및 보정 설정용 소프트웨어와 시험 시약(일반적으로 형광 비드)을 제공한다. 시험자는 또한 상업적으로 이용 가능한 보존된 혈액 또는 단핵세포와 같은 생물학적 대조군을 사용해야 한다. 아날로그 기기에서는 데이터 수집 전에 보정을 설정해야 한다. 리스트 모드 파일이 생성된 후에는 이러한 설정에 대한 값을 변경할 수 없으므로 디지털 계측기의 광전자 증배관을 올바르게 설정해야 한다. 희귀 이벤트를 검사하거나 세포 내 염료(예: 7-아미노 액티노마이신 D[7-AAD], 프로피듐 아이오다이드[P I], Syto-16 등)를 형광 표지가 부착된 항체와 함께 사용할 경우에 광전자 증배관 전압 및 스펙트럼 중첩의 균형을 면밀히 모니터링 해야 한다.

자가형광은 형광 색소 염색이 없을 때 기준보다 높은 형광이다. 이것은 몇몇 세포, 대표적으로 골수 세포 중 특히 폐포 대식세포와 배양된 1차 세포에서 발생한다. 자가형광은 원하거나 필요한 경우 고정 광전자 증배관 전압에서 직접 측정하거나 형광 참조 비드의 참조 표준에서 계산할 수 있다(위의 항원의 정량 항 참조). 488 또는 532 nm의 여기 파장과 자가형광의 후속 스펙트럼 보정을 추가 형광 색소로 사용하지 않는 것을 권장한다.

2) 데이터 수집 및 게이팅 방법

가능하면 모든 이벤트를 리스트 모드에서 수집해야 한다. 즉, 이벤트의 선택적 게이트 없이 수집해야 한다. 데이터 수집중 이벤트의 선택적 게이트로 정의되는 실시간 게이트는 원하는 집단의 유의한(100 개 이상) 이벤트 수를 계산하기 위해 200 만개 이상의 총 이벤트가 분석될 정도로 충분히 희귀한 경우에만 사용해야 한다. 리스트 모드 데이터는 디지털 기기를 사용할 때 보정되지 않은 상태로 수집할 수 있고, 데이터가 수집되기 전에 적절한 보정 범위 내에 있으면 분석이 수월하지만 많은 시간이 소요된다. 또한 부산물을 배제하기 위한 임계값을 설정하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 전방 산란 임계값을 설정하면 미리 결정된 크기 미만의 이벤트는 제외된다.

3) 대조군 사용

형광 색소 접합 비드 시료는 광전자 증배관 및 보정을 표준화하고 특정 마커의 발현을 정량화하는 데 사용된다. 생물학적 대조군의 사용 또한 강력히 권장된다. 실험실에서 비특정 결합이 검사 결과를 방해하지 않는다는 엄격한 밸리데이션 절차에 의해 확인되지 않는 한, 비특정 결합을 평가하기 위해 아이소타입 대조군과 1차 및 2차 항체로 세포 시료를 염색한다.

항원 양성 및 항원 음성 세포 집단(시험 시료와 동일한 방식으로 준비 및 염색)은 내부 시스템 적합성 표준을 제공한다. 또한 이러한 대조군 세포 집단은 실험실에서 항체 준비와 염색 시약의 로트(lot) 대 로트(lot) 변화를 평가할 수 있다.

4) 세포 생존성을 위한 염료 및 게이팅 사용

7-아미노액티노마이신 D(7-AAD), 프로피듐 아이오다이드(PI), TO-PRO 요오드화물과 같은 세포 생존성 염료는 세포 치료 제품에서 죽은 세포의 비율을 결정하기 위해 일반적으로 사용된다. 이 염료들은 일반적으로 살아있는 세포에서 제외되지만 죽은 세포의 세포막을 통과하여 그들의 DNA를 염색시킨다. 세포 생존성 염색은 표면 막 또는 세포 내 염색과 결합하여 하위집단과 주어진 마커로 염색된 살아있는 세포와 죽은 세포의 비율을 평가할 수 있다. 생존성 염색은 유세포분석 기반 세포독성 측정에서 막 염료와 함께 사용될 수도 있다. 이러한 생존성 염료들은 많은 세포사멸 감지 시약과 혼동하지 않아야 한다. 체외 진단(IVD) 생존성 염료의 밸리데이션 기법에는 살아있는 세포 제품에 순차 희석 시 첨가되는 죽은 세포 집단의 준비가 포함되며, 그런 다음 관심 염료로 염색하여 알려진 비율에 대한 정확도에 대해 세포 혼합물을 평가한다.

5) 세포 수 계산

주어진 시료량의 세포 수로 표현되는 절대 세포 수는 이중 및 단일 플랫폼 방법으로 확인할 수 있다. 이중 플랫폼 방법은 세포 집단을 먼저 계수하기 위해 별도의 자동화된 세포 계수 기기 또는 수동 계수 방법에 의존한다. 그런 다음 관심 부분 집합의 백분율은 유세포 분석법에 의해 결정되며, 해당 백분율에 세포 수를 곱하고 결과는 100으로 나눈다. 단일 플랫폼 방법은 알려진 농도로 해당 시료량에 추가된 참조 비드를 계수하는 동시에 시료의 세포를 계수하여 세포 집단과 부분 집합 수를 직

접 계수한다. 참조 비드는 종종 시료에 첨가되는 비드 현탁액으로 제공된다. 또는 폴리스티렌 튜브에서 고체상 매트릭스로 제공된 알려진 수의 참조 비드에 주어진 시료량을 추가할 수 있다. 이러한 접근방식은 피펫팅 오차의 위험이 있으므로 정확성과 재현성을 보장하기 위해 각별히 주의해야 한다.

6) 기기 설정 및 품질 보증

각 실험실은 정기적인 기기 모니터링, 유지보수 및 세척뿐만 아니라 기기 설정 및 교정을 위한 표준 작동 절차를 정의하는 품질 계획을 수립해야 한다. 기기 로그에는 기기 작동 및 시험자를 문서화해야 한다.

교정 중 레이저 전류, 전압, 출력 및 광전자 증배관 전압과 같은 기기 매개변수는 기기를 사용할 때마다 모니터링하고 기록해야 한다. 기기 설정 매개변수를 주의 깊게 모니터링하는 것은 추세를 감지하고 레이저 또는 광전자 증배관의 고장을 예측하는 데 도움이 될 수 있다. 또한 생물학적 대조군 실험 결과를 모니터링하여 분석법 드리프트를 탐지하고 방지해야 한다.

라. 데이터 관리 및 통계적 고려사항

1) 데이터 관리 및 저장

리스트 모드에 있는 품질관리 검사 및 시료 분석 검사는 실험실에 적용되는 규제 요건을 준수하는 방식으로 보관되어야 한다. 이 작업은 고정된 드라이브, 이동식 미디어 또는 상용 실험실 정보시스템과 같은 서버로 전송하여 수행할 수 있다. 결과 저장은 항상 해당 특정 시료에 대한 원래의 유세포분석 표준(Flow Cytometry Standard, FCS) 리스트 모드 파일, 기기 설정 및 품질관리 매개변수로 추적 가능해야 한다. 파일 손실을 방지하기 위해 데이터를 백업해야 한다. 계산 및 요약 데이터에 사용할 수 있는 수동 기록에도 보관 및 백업 절차를 수립해야 한다.

2) 데이터 분석 및 통계적 고려사항

대부분 유세포분석법의 데이터 분석에는 리스트 모드 파일 또는 실시간 게이트의 데이터를 플롯(단일 매개변수 히스토그램 플롯, 영역이 있는 2-매개변수 점 플롯 또는 3차원 플롯)에 표시하고 해당 플롯 내의 이벤트 분포를 측정하는 작업이 포함된다. 선택한 집단 내의 데이터에 대한 추가 분석은 특정 세포 집단을 게이팅 하여 수행할 수 있다. 데이터에 대한 설명에는 일반적으로 주어진 특성(전방 산란, 측방 산란, 형광 마커)을 가진 집단 내 이벤트의 백분율이 포함된다. 분자는 특성이 있는 이벤트 수이며, 분모는 계수된 총 이벤트 수 또는 게이트 이벤트 수이다. 2차원 플롯의 경우 분석은 일반적으로 사분면 통계를 수행하고 전용 소프트웨어를 이용해 분석된다. 세포 집단 클러스터는 하나의 데이터 파일에서 다른 데이터 파일로 위치를 이동할 수 있기 때문에 클러스터 분석을 위한 소프트웨어가 개발되었다.

정량적 분석법의 통계 분석은 주어진 마커에 대해 세포의 양성 또는 음성으로 간주 되는 정성적 분석법과는 다르다. 세포 표면의 분자 수가 추정되는 일반적인 정량적 분석법 경우 관심 분자에 결합된 형광 항체로 표지된 시료 세포의 평균 또는 중간 형광 강도를 세포의 표준곡선 또는 알려진 분자/물질의 양을 포함한 적절한 대조군과 비교할 수 있다.

세포치료제 등 의약품, 특히 자가 및 관련 기증자 동종 제품의 유세포 분석을 위한 일반적인 고려사항은 치료제 자체의 세포 함량이 제한적이기 때문에 종종 분석 검사를 위한 시료의 크기가 제한된다는 것이다. 따라서 관심 플로우 마커가 포함된 세포가 희귀 이벤트인 경우 특별한 문제가 발생한다. 이 경우 시료 크기에 대한 결정을 내리기 전에 사용자는 추정치의 원하는 정밀도와 관련하여 주어진 총 세포 수(예: 유병률, 변동성, 표본 오차) 내에서 희귀 이벤트를 탐지하기 위한 고려를 해야 한다.

3. 품질 및 표준화

유세포 분석법과 장비의 표준화를 위해서는 밸리데이션, 품질보증, 품질관리가 필요하다. 유세포 분석법이 연구소와 임상실험실에서 폭넓게 사용되고 있지만, 임상 진단 및 치료 관련 시험법 개발을 위한 세포 실험이 증가하고 있어, 보다 포괄적인 규제 요건과 표준화에 대한 관심이 높아지고 있다. 예를 들어, 유세포 분석기 시험자들은 전통적으로 형광 미세 비드 또는 세포를 기기 설정 및 품질관리에 사용해 왔으며, 제조업체의 권장 사항에 따라 사용해 왔다. 그러나 이러한 대조군 표준을 기기 설정 및 품질관리에 적용하는 방법에 대한 일관된 지침은 여전히 명확하지 않다.

중요한 공정 매개변수에 대한 철저한 이해를 바탕으로 한 밸리데이션은 제품 품질을 정의하는데 도움이 되며 일관되고 잘 제어된 제조 또는 시험 절차를 보장하는 데 도움이 된다. 유세포 분석법의 밸리데이션에는 기기 적격성, 분석법 밸리데이션 및 시험자 적격성이 포함되어야 한다.

가. 문서화

우수 실험실 관리 기준 및 우수 의약품 제조 및 품질관리 기준 절차는 모든 실험실 절차에 대해 표준운영절차(SOP)와 같은 적절한 문서가 필요하다. 또한 표준운영절차는 최신 절차를 반영하여 정기적으로 개정 및 승인되어야 한다. 시험자는 주어진 책임에 대해 적절한 수준의 역량을 갖추기 위해서는 훈련과 자격이 필요하다. 시험자 역량은 표준운영절차 및 정책과 관련하여 지속적으로 검토 및 평가되어야 한다.

내부 및 외부 품질 절차를 통합하는 것은 품질보증의 중요한 요소이다. 여기에는 장비 밸리데이션, 제조 관리 및 한계, 제품사양이 포함된다. 공정 및 장비 밸리데이션 절차에는 일반적으로 설치 적격성, 운전 적격성, 성능 적격성이 필요하다.

나. 장비 및 분석 적격성

설치 적격성(IQ)은 기기가 적합한 환경에 적절히 설치되었는지 확인한다. 이는 일반적으로 설비 요구사항을 점검하여 유세포 분석기가 적절히 설치될 수 있는지 확인한다. 적격성 요소에는 일반적으로 기기 제조업체의 요구사항인 온도, 습도, 공간 및 전기 설비 기능이 포함된다. 또한 구입한 모든 하드웨어 및 소프트웨어 구성요소가 적절하게 설치했는지 확인한다.

운전 적격성(OQ)은 기기가 제조업체 규격에 따라 작동함을 보여준다. 일반적으로 기기 제조업체에서 구성요소 수준으로 점검하거나, 사용자가 이 기능을 수행하도록 안내해야 하며, 가능한 경우 이러한 점검은 정량적 관리한계 기준이 있어야 한다. 또한 기기 하드웨어 및 소프트웨어가 제조업체의 규격과 비교하여 작동하는지 확인한다.

성능 적격성(PQ)은 기기와 분석 모두가 기기 규격에 따라 일관되게 수행됨을 보여준다. 유세포 분석법의 경우, 이러한 규격은 일반적으로 유세포분석을 수행하는 실험실에 의해 결정되며, 매일 점검하는 기기나 분석에 대한 대조시험 규격을 포함한다. 특정 검사의 경우 성능 적격성에는 표준화된 방법, 설정 및 보정, 검사 결과의 직선성, 정밀성 및 정확성 규격이 포함되어야 한다.

다. 기기 성능

제조업체의 규격을 확인한 후 실험실에서는 사용할 하드웨어 구성에 적합한 규격을 설정하고 표준화한다. 예를 들어 제조업체는 4색 이중 레이저 유세포 분석기에 대한 기본 규격을 갖추고 있을 수 있다. 기본 사양에 표준 적색 다이오드 635 nm 레이저가 필요하지만, 네온 공랭식 633 nm 레이저가 대체되는 경우 기본 규격은 더이상 시스템에 유효하지 않다. 마찬가지로 규격이 660 nm 대역 통과 필터를 사용하지만 675 n

m 대역 통과 필터를 대체하는 경우, 배출 필터 특성 차이로 인해 기본 규격이 유효하지 않다.

라. 성능 모니터링

상용 형광 비드를 사용하여 매일 기기 성능을 모니터링 할 수 있다. 광 검출에는 광전자 증배관, 광다이오드(photodiode, PD), 에벌런시 광다이오드(avalanche photodiode, APD)와 같은 신호 검출기가 대부분의 시스템에 사용되며, 검출기의 감도를 높이거나 낮추기 위해 검출기의 게인(gain)을 변경할 수 있다. 따라서 이러한 검출기의 설정을 모니터링하는 것은 신호를 모니터링하는 것만큼 중요하며 이러한 설정은 각 미가공 데이터 파일과 연결해야 한다. 가장 쉬운 방법은 매일 동일한 기기의 검출기 설정을 유지하고 형광 신호의 강도를 측정하는 것이다. 이 접근법은 적절한 비드를 사용하여 검증해야 하는 모든 매개변수에 대해 구현되어야 한다. 기기의 감도는 형광이 희미한 세포 또는 비드 집단을 확인할 수 있는 능력을 기반으로 한다. 이러한 이유로, 희미하거나 적당한 형광 강도의 비드 집단의 변동계수를 측정하는 것은 매일 형광 감도를 모니터링하기 위한 수단이다. 기기 제조업체의 권장 사항을 사용하여 성능을 모니터링 해야 한다.

주변 고온은 레이저 및 광전자 증배관 성능에 영향을 미칠 수 있으며 매일 모니터링해야 한다.

스펙트럼 중첩에 대한 잘못된 보정은 다색 분석 중 데이터에 큰 영향을 미칠 수 있다. 이러한 목적을 위해 많은 접근법이 정립되어 왔으며 최근에는 아날로그 회로보다는 수학적 알고리즘이 사용되고 있다. 매트릭스 대수(algebra)를 사용하는 알고리즘은 운영자나 분석자가 모든 데이터가 수집된 후 스펙트럼 중첩을 보정하기 위한 객관적 기준을 적용할 수 있도록 한다. 구형 시스템에서는 모든 데이터가 수집되기 전에 관찰된 예비 데이터에 대한 감산 하드웨어 조정을 사용하여 보정하는 것이

표준 접근방식이었다. 이러한 접근방식은 주관적일 수 있으며 새로운 방법에 의한 보정만큼 정확한 결과를 산출하지 못할 가능성이 있다. 항체 결합 포획 비드는 세포에 사용될 모든 형광 구에 동일한 항체 및 탠덤 염료와 함께 사용할 수 있기 때문에 가치 있는 보정 도구이다. 보정 목적으로 세포 대신 비드를 사용하는지 확인한다.

마. 표준

1) 타입 I

타입 I 표준은 기기의 광학 조정을 위해 사용되는 조정 표준이다. 일반적으로 기기의 감도를 개선하기 위해 광신호 조정을 점검하는 데 사용한다. 이러한 입자는 일반적으로 작고($\approx 2 \mu\text{m}$) 밝으며 가장 균일한 조명을 제공한다.

2) 타입 II

타입 II 표준은 참조 비드이며 가장 일반적으로 사용되는 비드 표준이다. 일반적으로 매일 사용되며, 희미하거나 중간 정도의 형광 강도를 가지며, 다양한 형광 구를 부착하여 얻을 수 있다. 이러한 기능은 세포를 모방하고 전용 소프트웨어를 사용하여 상대적인 기기 감도를 결정하는 데 사용할 수 있다.

3) 타입 III

형광 교정에는 타입 III 표준이 사용된다. 형광 색소의 분자 정량화를 위해 하나 이상의 형광 검출기를 교정해야 하는 특정 시험법에 사용된다. 항체에 대한 유효 형광 대 항체(ratio of fluorophores to antibody, F/P) 비율을 파악하면 세포당 결합된 항체 수를 후속적으로 계산할 수 있다.

바. 기기 설정 및 품질보증

기기 설정 및 품질보증은 생물학적 시험과 독립적인 활동이어야 한다. 기기와 관련된 많은 변수가 생물학적 시험 결과의 인공물로 이어질 수 있다. 기기 품질보증에는 기준 설정 및 일일 설정의 두 가지 작업을 사용할 수 있다.

1) 기준 설정

최신 디지털 기기에서는 최적의 감도를 제공하는 기기 설정의 기준을 수립하는 것이 좋다. 이 설정은 일상적인 절차는 아니지만 기기 구성이 변경되거나 기기가 점검 및 수리되는 경우 수행해야 한다. 광전자 증배관 전압 및 기기 구성은 기기 감도에 큰 영향을 미칠 수 있으므로 이 방법을 사용하여 감도를 개선할 뿐만 아니라 객관성을 제공해야 한다. 광전자 증배관 전압은 낮은 변동계수를 제공하는 범위까지 증가할 수 있다 (그림 8.). 이러한 설정은 생물학적 검사에 사용될 수도 있다.

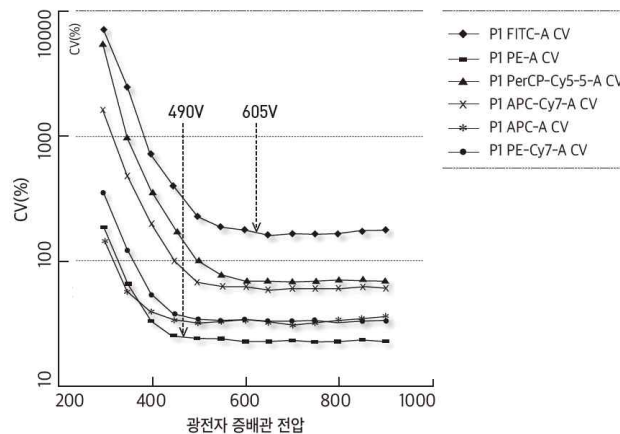


그림 8. 광전자 증배관(PMT) 전압은 낮은 변동 계수(CV)를 제공하는 범위까지 증가할 수 있음

2) 일일 설정

타입 II 표준은 참조 입자로서 신호 강도, 적당히 밝은 입자와 희미한 입자의 분리 및 신호 감도를 모니터링하는데 사용할 수 있다. 형광구 결

합 비드는 기기가 이러한 과장을 감지할 수 있다는 것을 알 수 있을 뿐만 아니라 보정 도구를 제공한다. 그러나 형광구 결합 비드는 변동 계수 측정에 필요한 형광 균일성이 없다. 기기의 광학 성능에 기초하여 변동 계수는 광범위한 스펙트럼 범위에서 형광을 띠는 쿠마린 염료 미세입자와 같이 희미하고 적당히 밝은 비드를 사용하여 측정하는 것이 가장 좋다.

검사 대조군과 기기 대조군을 혼동하기 쉽다. 비드는 세포로는 얻을 수 없는 형광 균일성과 일관성을 제공하므로 기기 성능을 모니터링하는데 유용하다. 따라서 공정 관리 세포 시료를 사용하여 보정 및 형광 투과성을 검증하는 것이 좋다.

일일 설정에 대한 기기 설정은 일반적으로 시험에 사용되는 설정과 동일하다. 모든 시험을 동일한 기기 설정으로 사용할 수 있는 것은 아니며, 밸리데이션에서 필요하지 않는 한 모든 기기 설정에 대해 항상 이러한 작업을 수행할 필요는 없다.

일일 설정으로는 일관된 기기 설정, 광범위한 희미한 ~ 중간 강도 비드 사용, 비드 형광 강도(절대값 및 %CV), 광전자 증배관값, 온도, 레이저 강도, 레이저 파장 등 주요 매개변수 모니터링 등이 있다.

사. 품질관리 및 품질보증

형광 및 광 산란에 대한 이변량 플롯에서 모든 세포 집단을 식별할 수 있음을 입증하기 위해 시험법별 기기 설정을 수립해야 한다. 가장 중요한 것은 양성 집단은 규모에 맞게 적절히 보정되어야 한다는 것이다. 이것은 적색 레이저로 세포를 여기 할 때 매우 중요하며, 적색 레이저는 세포가 유의미한 자가형광을 생성하지 않도록 한다. 이러한 이유로 음성 세포를 식별하기 매우 어려울 수 있기 때문에 양성 집단이 형광 척도의 상부에 있도록 적절한 광전자 증배관 설정을 검증하는 것이 중요하다.

형광 보정은 중요한 조정이다. 디지털 기기는 분석 중에 객관적인 오프

라인 조정을 제공하며 적절한 보정 설정에 대한 자세한 지침을 제공한다. 세포를 사용하거나 단일 항체-형광 색소로 염색된 비드를 포획하는 것이 일반적으로 가장 좋은 방법이지만, 특수화된 형광 색소-비드 혼합물이 여러 가지 색상의 수집 및 분석을 보정 하는데 효과적일 수 있다.

아. 아이소타입(isotype) 대조군

아이소타입 대조군은 시험 대상인 항원과 반응하지 않는 음성대조군 항체로, 시험 항체와 동일한 아이소타입이다. 골수종 단백질 또는 면역글로불린은 시험 대상에 특이성이 없고 시험 항체와 동일한 Ig 사슬 종류(class, subclass)를 가지고 있으며, 시험 항체와 동일한 형광색소에 결합한다. 이상적으로 아이소타입 대조군을 시험과 병행하여 사용할 때 결합이 거의 또는 전혀 발생하지 않는다. 그러나 이디오타입(idiotype)의 비특이적 결합은 자주 발생하며 항체의 아이소타입 유형과는 독립적이다. 이는 항체의 화학반응에서 차이가 있을 가능성이 높으며, 특히 말초 혈액 내 조혈모세포 검사와 같은 희귀 이벤트 검출 검사에서 문제가 될 수 있다.

자. Fluorescence minus one control 대조군

Fluorescence minus one(FMO) 대조군은 다색 검사 중 비특정 염색을 제어하는데 사용된다. 보정이 설정되면 하나를 제외한 모든 형광 색소-표지 항체가 포함된 튜브가 사용된다. 보정이 제대로 설정된 경우 누락된 형광 색소-표지 항체에 해당하는 매개변수의 모든 양성 형광은 비특정 염색에 의해 발생하며 관련 탠덤 염료의 항체 초과 또는 분해를 나타내는 것일 수 있다. Fluorescence minus one(FMO) 대조군은 다른 시약의 맥락에서 특정 검출기의 민감도를 추정하는 데 매우 유용하지만, 대조군은 시험 항체를 추가할 때 발생할 수 있는 비특정 결합을 고려하지 않는다. Fluorescence minus one(FMO) 대조군 튜브는 문제해결 또는 새로운 다색 시약 콕테일을 설정할 때 가장 적절하게 사용된다.

차. 공정 대조군

시스템 적합성 표준이라고도 하는 공정 대조군은 시료 준비 및 데이터 수집을 설명한다. 그것들은 상업적으로 이용 가능한 보존된 대조군 세포, 세포주 또는 정상 말초혈액과 같은 1차 세포를 포함할 수 있다. 공정 대조군을 사용하여 구형 로트에 대한 새로운 항체 시약 로트를 시험할 수도 있다.

카. 생물학적 대조군

시료 처리 및 자극 유무에 따른 세포를 비교할 때, 처리되지 않거나 자극되지 않은 세포일 경우 양성/음성 경계를 설정하는 데 가장 유용한 대조군이 될 수 있으며, 아이소타입 대조군도 적용 가능하다.

자극이 Fc(fragment crystallizable) 수용체 상향 조절로 이어질 수 있고, 결과적으로 배경 염색이 증가할 수 있기 때문에, 이러한 상황은 아이소타입 대조군에 의해 설명될 수 있다.

세포 시료 및 세포치료제의 유세포분석 적용

연구, 임상 진단 및 모니터링, 약물 개발, 세포치료제 특성 확인 및 품질평가(즉, 제조 단위별 출하 승인 관리)를 위해 다양한 유세포분석법이 개발되었다. 임상에서는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 질병 모니터링과 백혈병 및 림프종 진단 및 모니터링이 포함된다. 제약 및 학술연구 분야에서는 유세포분석법 적용을 면역표현형에서 기능 세포형 분석으로 확대했으며, 개별 세포에서 여러 기능 매개변수를 측정할 수 있는 미세비드 기반의 다양한 분석으로 확대했다. 현재 기능성 분석에는 미세비드에 대한 리간드 결합 샌드위치 분석을 사용하여 세포 내 사이토카인 생성 또는 케모카인 또는 사이토카인의 분비를 측정하여 세포 활성화 상태를 직접 연구할 수 있는 시험이 포함된다.

1. 면역표현형

유세포 분석법은 세포에 형광색소 결합 단일 클론 항체를 부착하여 백혈구 하위 유형을 특성화할 수 있도록 한다. 분화 클러스터 시스템은 독특한 세포 표면 항원을 인식하는 단일 클론 항체를 정의한다. 많은 임상시험에서는 유세포분석법의 고유한 기능을 활용하여 수천 개의 개별 세포에서 여러 개의 분화 클러스터 항원을 측정한다.

가. CD4 절대 수 측정

인간 면역결핍 바이러스(HIV)는 CD4 T 세포를 감염시키고 환자의 말초혈액 CD4 T 세포 수가 면역 상태를 나타내는 유용한 지표이다. CD4 절대 수 측정은 항레트로바이러스(anti-retroviral) 치료제의 필요성을 판단하고 항레트로바이러스 약물의 효과를 모니터링하기 위해 인간 면역결핍 바이러스 감염 환자에게 가장 일반적으로 사용되는 진단 시험이다. T 세포 하위 집합 수는 일반적으로 표준화된 시약, 소프트웨어 및 기기 시스템을 사용하여 마이크로리터당 세포와 림프구 백분율로 표현한다.

나. 백혈병 및 림프종

다차원 유세포분석은 백혈병 또는 림프종 환자의 골수, 림프 조직 및 말초혈액에서 이상 세포 집단을 식별할 수 있다. 이는 종양학 관련 및 단일 클론 항체의 혈통별 각테일로 이루어진다. 최적의 형광 비드와 유세포분석기의 개선된 광학/전자 구성을 통해 백혈병 또는 림프종 세포 표현형을 보다 정확하게 식별하고 의사가 환자 상태 평가의 개선을 위한 추가 세포 마커를 검출할 수 있다. 희귀 이벤트 탐지 방법은 최소 잔류 질환을 탐지하는 능력을 개선했다.

다. 수지상 세포

수지상 세포는 특정 항원에 대한 면역반응의 성질과 강도에 영향을 미칠 수 있는 항원 제시 세포의 역할을 한다. 이 발견은 암, 감염병, 자가면역질환의 세포치료제로서 수지상 세포의 발전을 이끌었다. 수지상 세포는 형태학적으로나 표현학적으로 다양하며 여러 세포 유형에서 파생될 수 있다. 골수성 수지상 세포로 알려진 두 개의 주요 수지상 세포 계통은 각각 CD11c와 CD123의 발현에 기초하여 분리될 수 있다. 또한, 수지상 세포 성숙 상태를 결정하기 위해 공동자극분자 CD80과 CD86의 발현을 모니터링할 수 있다.

라. 줄기세포와 전구세포

CD34 발현은 말초혈액, 제대혈, 골수, 이들 기원에서 추출한 정제된 조혈모세포 제제에서의 조혈모세포 특성을 나타내기 위해 흔히 사용된다. CD34 등급 III 항원 결정기에 특이적인 단일클론항체와 함께 특정한 시약, 분석 소프트웨어 및 시험법을 사용하여 조혈모세포를 확인하고 계수할 수 있다. 항 CD45, 항 CD34 및 7-아미노 액티노마이신 D(7-AAD)와 같은 생존성 염료의 시약 조합이 임상 용도로 널리 사용된다. 배아, 태아, 그리고 성인의 조직 유래세포 기반 치료법을 개발하는 것에 대한 관심이 증가하면서, 유래 세포들과 이들로부터 분화된 체세포 특성분석을 위해 다양한 표현형 표지를 사용하게 되었다. 유세포분석은 만능줄기세포 기원에서 파생된 세포 제품을 평가하기 위한 분석방법의 일부로 개발되고 있다. 이러한 분석은 원하는 세포 집단의 적절한 수와 유형을 정의하는데 도움이 될 뿐만 아니라, 피식자에게서 미분화 만능세포 증명하는데 도움이 될 것이다.

마. 백혈구

혈액제제의 백혈구제거는 잔류 백혈구 함량이 단위 당 5×10^6 미만인 혈액제제를 생산하는 데 사용되는 과정이다. 임상 데이터에 따르면 비용

혈성 발열 수혈 반응은 백혈구 감소를 예방할 수 있다. 백혈구 감소는 또한 혈액제제의 수혈이 반복적으로 필요한 환자들에게 인간백혈구항원(HLA)에 대한 동종면역을 예방한다. 유세포 분석법은 백혈구가 감소된 혈액제제의 백혈구 오염을 정량화하기 위해 일반적으로 사용된다.

바. 혈소판

유세포분석법은 구조 또는 기능성 당단백질의 결함과 관련된 많은 1차 혈소판 병증을 진단하는 빠르고 유용한 방법이며 예로는 글란즈만 혈소판무력증에서 gpIIb/IIIa 또는 버나드-슬리어 질병에서 gplb의 비정상적 발현이 있다. RNA 결합 형광 염료인 티아졸 오렌지를 사용하면 미성숙 혈소판인 망상혈소판이 정량화될 수 있다. 망상 혈소판의 계수는 혈소판 생성 비율을 결정하는 데 사용할 수 있다. 이 측정은 설명되지 않은 혈소판 감소증을 파괴가 증가한 것과 혈소판생성 결함이 있는 것으로 구분할 수 있다.

사. 적혈구

Rhesus D-음성 여성은 Rh(D)+ 적혈구로부터의 모든 동종면역을 예방하기 위해 예방적 Rh-면역글로불린을 받는다. 태아 출혈이 의심되면 Rh(D) 항원 또는 헤모글로빈 F에 대한 형광 표지 항체를 사용하여 산모의 혈액에서 태아 적혈구의 존재와 양을 검사한다.

망상적혈구 수는 골수가 적혈구에 대한 신체의 필요성에 적절하게 반응하고 있는지 판단하고 다양한 유형의 빈혈을 분류하는 데 도움을 주기 위해 사용된다. 망상적혈구 수는 미성숙 비핵화 적혈구에서 잔류 리보솜과 RNA의 식별에 기초한다. 망상적혈구의 유세포 수와 성숙한 적혈구와의 구별은 잔류RNA(예: 티아졸 오렌지)와 결합하는 형광 염료를 사용한다.

2. 비드 기반 면역 분석

비드 기반 면역 분석은 다양한 미세구기반 유세포분석에서 별개의 크기 및/또는 형광 강도의 일련의 입자와 일치된 항체 쌍을 결합하여 유세포 분석기에서 여러 수용성 분석물질을 동시에 검출할 수 있도록 한다. 유세포 분석기가 크기와 색상으로 입자를 구별할 수 있는 능력을 통해 단일 튜브 또는 웰에서 여러 결과를 확인할 수 있다. 많은 연구자들은 분비된 케모카인이나 사이토카인, 키나아제, 항 인간백혈구항원 항체 등을 측정하기 위해 이러한 분석을 사용한다.

3. 세포 증식 분석

가. DNA에 염료 혼입

브로모데옥시우리딘(Bromodeoxyuridine, BrdU)은 티미딘 유사체로, S상 동안 세포의 DNA에 혼입될 수 있으며, 그런 다음 특정 라벨이 붙은 단일클론항체를 사용하여 검출될 수 있다. 브로모데옥시우리딘(BrdU)으로 자극된 세포 배양을 통해, 펄스가 진행되는 동안 증식된(S상 통과) 세포를 확인할 수 있다. 이 분석은 방사성 물질을 사용하지 않으며, 여러 마커와 유세포분석법을 사용하여 증식 세포의 표현형을 식별할 수 있기 때문에 ^3H -티미딘을 이용한 증식 측정 수단을 대체할 수 있다.

나. 세포 단백질 또는 세포막에 염료 혼입

카복시 플루오레세인 숙신이미딜에스터(carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE) 및 PKH26과 같은 세포 추적 염료는 세포증식 평가에 유용한 것으로 입증되었다. 카복시 플루오레세인 숙신이미딜에스터는 세포질과 막단백질에 공동 결합하고 PKH26은 세포막에 비공동 결합한다. 세포가 분열될 때, CFSE/PKH26 표지는 딸세포 사이에 균등하게 분할되며, 따라서 모세포보다 절반의 형광을 띤다. 각 세포의 형광은 다음 세대에 따라 더욱 반감된다. 이러한 특성은 CFSE/PKH26 분석을 자

극된 배양에서 증식한 세포의 분율 뿐만 아니라 이상적인 조건에서 경과된 세대 수를 파악하는 데에도 유용하게 만든다. 이러한 방식으로, 며칠에 걸쳐 증식된 소집단의 전구 빈도를 계산할 수 있다.

4. 기능 분석

가. 세포 내 사이토카인 발현

세포 표면 및 세포 내 표지 기법이 특정 기능적 특성을 가진 세포 하위 집합의 식별에 적용되었다. 예를 들어, 단백질이나 펩타이드 항원이 포함된 말초혈액 단핵세포와 같은 세포를 잠깐 자극하면 활성화 마커와 사이토카인이 발현되어 반응 세포 표면에 있는 다른 표현형 마커와 함께 측정될 수 있다. 브레펠딘 A(brefeldin A)나 모넨신(monensin)과 같은 분비 억제제를 사용하면 세포 내 사이토카인의 축적이 가능하다. 그런 다음 세포를 고정, 투과 및 유세포 분석법으로 검출한다. 그러한 분석은 백신, 감염병 치료제 또는 암에 반응하는 T 세포 하위집단을 모니터링 하는데 유용하다. 단핵구, 수지상세포, 자연살해세포를 포함한 다른 세포 유형의 기능적 특성도 적절한 자극과 함께 기능 분석을 사용하여 모니터링 할 수 있다.

나. 키나아제

인산화 특이세포 활성화 매개체는 인산 특이적 항체 및 유세포 분석법을 사용하여 식별할 수 있다. 이러한 시약은 세포 내 신호 메커니즘을 규명하는데 유용하며, 종종 다른 세포 표면 표현형 마커의 맥락에서 유용하다. 따라서, 다색 유세포 분석법은 복잡한 세포 집단에서 세포 내 활성화 상태에 대한 단일세포 평가를 제공할 수 있다. 이러한 분석은 암세포의 변화된 신호 상태를 감지하거나 환자의 종양 세포의 신호 특성에 따라 적절한 치료법을 지시하는 데 유용할 수 있다.

다. 세포 사멸

흔히 프로그램된 세포사멸로 묘사되는 세포사멸은 규제된 생리학적 과정에 의해 야기되는 세포사멸의 과정이다. 세포사멸 과정은 세포에 대한 일련의 형태학적, 생화학적, 분자적 변화로 나타나며 외부 또는 내부 자극에 의해 시작될 수 있다. 세포사멸의 중심 이벤트는 단백질 분해 효소 계열인 카스페이스(caspases)의 활성화이다. 카스페이스는 비활성 전구효소로 합성되며 다른 카스페이스나 유사한 분자에 의해 활성화된다. 그들은 다양한 세포질 또는 핵단백질의 분열로 이어질 수 있는 계단식 구조를 형성한다. 세포사멸 과정에 중요한 것으로 보고된 사례 중 하나는 세포사멸 초기에 활성화되는 카스페이스-3이다. 사멸 세포를 검출하는 유세포 분석법에는 형태학 측정, 세포막 구조의 변화, 핵산중간분해 효소(endonuclease)에 의한 DNA 분열, 미토콘드리아 막 전위 등이 있다. 효소 활성 형태에 대한 천연 또는 인공 카스페이스 기질이나 항체도 이러한 목적으로 사용되어왔다.

라. 세포의 생존력

유세포 분석법은 살아있는 세포와 죽은 세포를 구별하기 위해 종종 사용되며, 핵산 염료 배제(exclusion)가 이 분석법의 원리이다. 프로피듐 아이오다이드(PI) 또는 7-아미노 액티노마이신 D(7-AAD)와 같은 핵산 염료를 세포 현탁액에 첨가한다. 유세포 분석법에서 배경보다 진한 형광이 있는 세포는 형광물질인 염료를 배제하지 못하고 DNA와 결합하기 때문에 죽은 세포로 간주한다.

5. 유세포분석 및 면역글로불린 분석

가. 유세포 분석 교차 일치(Flow Cytometry Cross-matching, FCXM)

장기이식에 앞서 피이식자에게 유세포분석 교차 일치(FCXM)를 실시해 거

부반응을 일으킬 수 있는 항 인간백혈구항원(anti-HLA) 항체를 선별한다. 항 인간백혈구항원 항체는 혈청 시료와 함께 인간백혈구항원(HLA)으로 정의된 백혈구, B-세포주, 인간백혈구항원이 코팅된 비드를 배양한 후, 항 인간면역글로불린 형광 표지 항체를 검출한다. 백혈구는 각 항 인간백혈구항원 등급 I과 II 활성을 구별하기 위한 T 세포와 B 세포를 식별하기 위해 면역 염색된다. 이와 함께 혈액체제가 수혈 관련 급성 폐 손상(transfusion-related acute lung injury, TRALI)을 일으킬 위험이 높아진 기증자를 식별하기 위해 항 인간백혈구항원 항체에 대한 헌혈 심사가 점차 활용되고 있다.

나. 항 사람 중성구 항체 (Anti-Human Neutrophil antibodies, Anti-HNA)

항 사람 중성구 항체는 호중구 감소증을 일으킬 수 있으며 급성 폐 손상(TRALI)에 관여되어 왔다. 자가면역 호중구 감소증(autoimmune neutropenia)은 펠티(felty) 증후군, 전신 홍반성 루프스(systemic lupus erythematosus), 하시모토 갑상선염(hashimoto thyroiditis) 등 자가 면역장애가 있는 환자에서 발병할 수 있다. 항 사람 중성구 항체 항체의 부재는 감별 진단을 골수 기능 상실, 골수 이형성(myelodysplasia) 또는 골수 침윤성(marrow-infiltrative) 과정과 같은 비면역 원인으로 좁힌다. 유세포 분석법은 항 중성구 항체를 검출할 수 있고, 호중구 감소증이나 급성 폐 손상의 유래를 확인할 수 있다.

다. 항 사람 혈소판 항체 (Anti-Human Platelet antibodies, Anti-HPA)

항 사람 혈소판 항체는 간접 및 직접 유세포분석 기반 혈소판 관련 면역글로불린 분석에서 모두 검출된다. 자가면역 혈소판 감소성 자반증은 혈소판 결합 항체만큼 자유 혈청항체가 자주 발견되지 않는다. 동종항체

형성의 경우 혈소판 관련 항체의 증거 없이 혈청 항체가 검출될 수 있다.

유세포 분석법 문제 해결

유세포 분석법을 개발할 때는 먼저 분석의 최종 목적을 파악해야 한다. 연구를 위한 분석의 경우 세포 시료, 시약 및 시험법을 표준화하기 어려울 수 있다. 환자 진단용 검사 또는 환자에게 투여하기 전에 출시할 세포 제품의 적합성을 확인하기 위한 분석에는 보다 엄격한 분석 및 시료 표준화를 요구한다. 규제 지침, 임상 조사의 유형 및 단계, 그리고 분석의 궁극적인 목적은 요구되는 검사 엄격성의 수준을 결정한다.

유세포 분석법 개발에는 염색, 취급, 기기 및 분석 매개변수와 한계의 설정 및 적격성이 포함되어야 한다. 분석법이 잘 개발되었다고 가정하면, 시험자는 적절한 교육을 받고, 기기를 적절하게 설정했으며, 적절한 검사 및 기기 제어를 적용했으며, 문제해결이 필요한 경우 기기 및 시험법 밸리데이션을 수행해야 한다.

유세포분석에 있어서 가장 일반적으로 발생하는 문제는 높은 형광 또는 측방 산란 배경, 비정상적인 이벤트 발생률, 높은 형광 강도 및 낮은 형광 신호이며, 이러한 문제 발생을 완화하는 방법은 아래에 설명되어 있다.

1. 높은 입자 배경

과도한 세포 취급(예: 강력한 혼합), 부적절한 고정, 세포의 세균 오염은 모두 입자 배경을 증가시킬 수 있다. 또한 기기의 전방 임계값이 너무 낮게 설정되어 있으면 세포의 부산물이 이벤트로 감지된다. 조심스러운 세포 취급, 신선한 시약 및 적절한 기기 설정을 통해 일관된 측방 산란 프로파일을 보장할 수 있다.

2. 높은 형광 배경

높은 형광 강도는 과도한 항체 농도, 부적절한 세포 세척 또는 부적절한 Fc 수용체 차단 때문일 수 있다. 또한 기기 광전자 증배관 게인(gain)이 부적절하게 높으면 배경도 높아질 수 있다. 일관된 항체 농도와 세포 밀도, 적절한 세척 및 차단 적절한 기기 설정을 통해 비정상적으로 높은 형광 배경을 방지할 수 있다.

3. 높은 이벤트 속도

비정상적으로 높은 이벤트 속도는 항체 염색이나 최종 세포 시료에서 높은 세포 밀도로 인해 나타나는 경우가 많다. 세포 시료의 부적절한 혼합 및 침전은 부적절하거나 일관되지 않은 게이팅과 마찬가지로 세포 이벤트 속도를 높일 수 있다.

4. 낮은 이벤트 속도

세포 뭉침, 최종 시료의 낮은 세포 밀도, 기기 유체 막힘 또는 부적절한 게이팅으로 인해 비정상적으로 낮은 이벤트 감지 결과가 발생할 수 있다. 기기의 적절한 세척, 유지 보수 및 설정은 물론 일관된 염색법을 통해 충분한 감도로 일관된 결과를 얻을 수 있다.

5. 높은 형광 강도

높은 형광 배경의 경우와 마찬가지로, 높은 평균 세포 형광은 너무 많은 표지가 붙은 항체, 부적절하거나 일관되지 않은 세포 세척 또는 부적절한 차단으로 인해 발생할 수 있다. 특히 세포 내 염색이 있는 동안 세척 완충액에 세정액을 포함하면 비특정 항체 결합을 방지하는 데 도움이 될 수 있다.

6. 약한 형광 강도

많은 요인들이 약한 형광 강도를 야기할 수 있다. 레이저 조정 불량, 잘못된 보정, 잘못된 설정, 일관성 없는 게인 설정, 약한 레이저 출력과 같은 기기 매개변수는 모두 형광 강도에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 또한 항체 농도 부족, 불안정한 표적 항원이나 분비물 표적 항원, 품질 불량 또는 부적절하게 보관된 시약으로 인한 형광 색소 페이딩(fading) 발생, 접근 불가능한 표적 항원 등 세포생리학이나 시약 준비 문제로 인해 모두 신호가 약해질 수 있다. 적절한 검사 개발, 기기 유지 관리 및 검증된 시험법 수행은 형광 신호 강도를 향상시킬 수 있다.

26. 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA)

효소 결합 면역흡착 분석법 (Enzyme-linked immunosorbent assay, 이하 ELISA)은 생물학적 원료의약품 및 완제의약품의 품질을 보장하기 위한 특성 확인, 출하 승인 및 안정성 시험에 가장 널리 사용되는 시험법 중 하나이다. ELISA라는 용어는 효소 면역 측정법 뿐만 아니라 화학 발광법 및 형광법 등의 다른 검출법을 포함한 넓은 의미로 사용한다.

1. 정의

ELISA는 직접적 또는 간접적으로 리포터 기질의 효소 가수분해를 이용하여 면역 흡착제 표면과의 결합, 이에 따른 검출을 통해 분석대상을 측정하는 정성적 또는 정량적 고체상 면역학적 분석법이다. 정성적 결과는 검체가 양성 또는 음성인지 여부의 간단한 결과를 제공한다. 양성 및 음성 결과를 구분하는 제한값을 기준으로 정량적 결과를 정성적 결과로 변환하는 것이 일반적이다. 분석의 성능적 특성은 제한

값에 크게 의존하기 때문에, 제한값을 결정하는 절차는 근거가 기반이 되어야 하며, 적절히 문서화 되어야 한다. 정량적 분석은 농도를 알고 있는 표준품 등 분석물을 동시에 분석하여 표준검정곡선의 내삽법에 근거하여 분석물의 양을 결정한다. 표준품은 가능한 균질하며, 분석하고자 하는 물질을 대표하는 표준물질 또는 교정물질을 사용하여야 한다. ELISA 분석은 항체 또는 항원의 확인, 순도, 역가, 검출 또는 정량 및 기타 목적과 같은 다양한 목적으로 생물의약품 분야에서 널리 사용된다.

2. 기본 원리

ELISA의 주요 단계는 다음과 같다(그림 1).

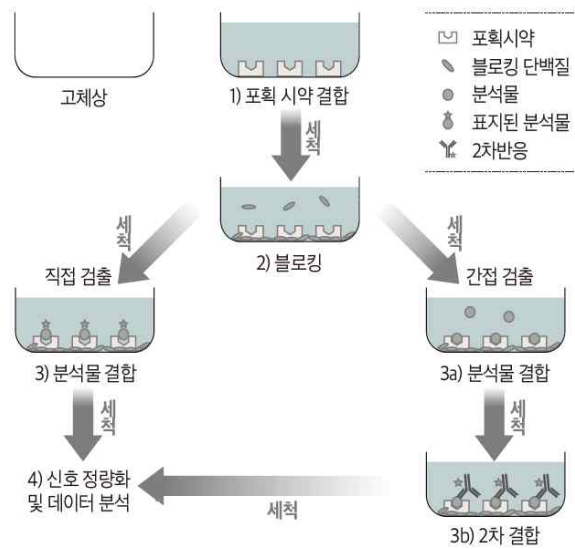


그림 1. ELISA 수행의 필수 단계

그림 1.에서 볼 수 있듯이, 검출기 항체 결합 및 분석이 ELISA의 기본 5단계이다. 포획 시약 결합, 블로킹 및 분석물 결합 단계마다 다음 시약을 첨가하기 전에 결합 되지 않은 시약을 제거하기 위한 세척 단계를 거친다. 분석 전에 적절한 기질을 첨가하고, 검출에 적절한 장비로 기질을 측정한다. 미지물질의 정량은 표준곡선과 비교하여 수행한다.

- 1) 고체 표면에 분석물의 포획을 위한 면역 흡착제로 작용하는 포획 시약 (일반적으로 항체 또는 항원)의 결합
- 2) 과량의 결합 되지 않은 포획 시약을 제거 후, 알부민, 젤라틴, 카세인 또는 다른 적합한 물질 등의 블로킹 단백질을 사용하여 비어 있는 결합 부위를 블로킹
 - 3) 또는 3a) 고체 표면에 분석물을 결합시키기 위해 포획 시약과 함께 분석물을 (시험 검체 또는 표준품) 배양 후, 시험 검체에서 결합 되지 않은 물질을 세척하고 분석물을 검출.
- 3) 분석물이 효소 활성을 보이거나 검출 분자와 결합 되어 있을 때 (예, 효소) 직접 검출
 - 3b) 고체 표면에 분석물을 결합시키기 위해 포획 시약과 함께 분석물을 (시험 검체 또는 표준품) 배양 후, 시험 검체에서 결합 되지 않은 물질을 세척한 후 분석물을 검출 (그림 1, 3a 단계). 2차 효소로 표지된 시약을 첨가하여 분석물을 검출하는 간접 검출 (그림 1, 3b 단계)
- 4) 사용된 검출 항체에 적합한 기질 (예, TMB , 3,3', 5,5'-테트라메틸-벤지딘, 3,3' , 5,5' -tetramethyl-benzidine)을 첨가하여 분석물을 정량한 후, 시험 검체를 표준품과 비교한다.

3. 분석 설계

표 1. 및 다음 항에서 ELISA의 4가지 일반적인 분류를 설명한다. 분석 설계는 유연하게 적용 가능하며, 필요에 따라 절차를 수정할 수 있다. 주로 사용 가능한 시약의 양이나 순도, 이용 가능한 장비에 따라 시험방법의 선택이 달라진다. 약물로 개발 중인 단일 클론 항체와 같은 일부 경우에는 실제로 분석되는 분석물이 항체이다. 이러한 경우에는 항 개별특이적(anti-idiotypic) 또는 항체에 특이적인 다른 항체

를 사용한 분석법을 개발한다.

표 1. 대표적인 ELISA 유형

ELISA 유형	필요 시약	특징	단점
직접 검출	<ul style="list-style-type: none"> 포획 분석물^a 항원 특이적인 표지된 1차 항체 	<ul style="list-style-type: none"> 단 하나의 항체만 사용하기 때문에 신속함 시약 사용이 적음 분석물이 고정됨 	<ul style="list-style-type: none"> 분석물의 구조가 변형될 수 있음 매트릭스 및 보조성분에 민감 흔하게 사용하지 않음 민감도가 낮음
간접 검출	<ul style="list-style-type: none"> 포획 분석물^a 항원 특이적인 1차 항체 1차 항체와 결합하는 표지된 2차 검출 항체 	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 1차 항체와 동일한 2차 검출기를 사용할 수 있기 때문에 다방면으로 사용 가능 신호가 증폭되어 민감도 증가 분석물이 고정됨 	<ul style="list-style-type: none"> 배양 및 세척 단계가 더 많아 시간이 오래 걸림
경쟁적	<ul style="list-style-type: none"> 분석물을 포획 시약으로 사용하거나 검출 표지할 수 있음. 분석물에 특이적인 항체를 포획 또는 검출 표지에 사용할 수 있음 간접 방법을 사용하는 경우 1차 항체와 결합하는 2차 항체를 표지 	<ul style="list-style-type: none"> 항원 교차 반응 평가에 적합 항원 결정기가 하나인 저분자에 적합 하나의 항체만 필요 용액 내 분석물이 1차 항체와 결합하기 위해 경쟁 	<ul style="list-style-type: none"> 문제 해결이 어려움 동적 범위의 제한
샌드위치	<ul style="list-style-type: none"> 분석물 특이적인 1차 포획 항체 분석물^a을 포함한 검체 용액 분석물 특이적인 다른 1차 효소-항체 접합체 	<ul style="list-style-type: none"> 민감도 증가 다양한 항원 결정기를 가진 크기가 큰 분자의 정량 분석에 적합 용액 내 분석물 측정 	<ul style="list-style-type: none"> 정제 또는 반정제된 특이적 항체가 상대적으로 다량 필요 하나의 항원 결정기 또는 몇 개의 밀집된 항원 결정기를 갖는 저분자 단백질에는 적합하지 않음.

^a 분석물은 정제되거나 부분적으로 정제될 수 있다. ELISA를 설명할 때 “분석물” 과 “항원” 용어는 함께 사용할 수 있다.

4. 직접 ELISA

가. 직접 표지된 항체

이 분석법에서 고체 표면에 항원이 코팅되고, 이 외 결합 되지 않은 반응 부위는 블로킹 된다(그림 2. A.). 이후 검출기로 표지된 특정 항체가 포함된 용액을 첨가한다. 배양 후, 결합 되지 않은 항체를 세척하고, 사용된 검출기에 적절한 기질을 첨가한다.

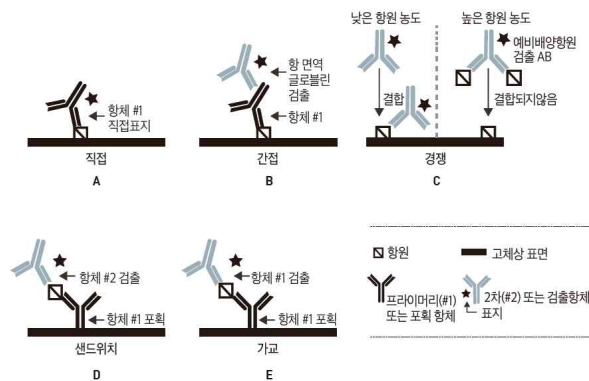


그림 2. 직접, 간접, 경쟁, 샌드위치 및 가교 ELISA의 도식적 표현

그림 2.에서와 같이 ELISA 방법의 유형은 시약의 가용성, 분석의 사용 목적 및 관심 대상 분석물의 물리 화학적 특성에 따라 결정된다. 가교 ELISA의 경우, 포획 및 검출기 항체가 동일한 항원 결정기를 인식하므로, 결합을 위해 최소 2개의 항원 결정기가 표적 항체에 존재해야 한다.

나. 직접 표지된 항원

항체가 고체 표면에 코팅되고 표지된 항원을 검출기로 사용한다는 것을 제외하면 이 분석법은 직접 표지된 항체를 사용하는 것과 유사하다.

5. 간접 ELISA

이 분석법에서, 항원이 고체 표면에 코팅되고 블로킹 후, 특정 항체를 포함한 용액을 첨가한다 (그림 2. B.). 배양 후, 결합 되지 않은 항체를 세척하고, 항면역글로불린 검출기 항체를 첨가한다. 다양한 종류의 특정 면역글로불린 계열 및 하위 계열에 대한 항면역글로불린 검출기가 상업적으로 사용 가능하며, 이 분석법을 통해 아이소타입(isotype)을 확인할 수 있다. 또한, 표지된 항면역글로불린 검출기의 사용은 직접 ELISA 보다 신호를 증폭시켜 분석의 민감도를 증가시킨다.

6. 경쟁적 ELISA

가. 직접 항체 경쟁적 ELISA

이 분석법은 가용성 항원을 검출하거나 정량하는 데 사용한다(그림 2. C.). 이 분석법에는 호스래디쉬 페록시다아제, 알카라인 포스파타아제, 루테늄 또는 플루오레세인 등과 같은 적절한 검출기에 결합된 항원 특이적 항체가 필요하다. 또한, 코팅을 위해 정제된 항원 또는 부분적으로 정제된 항원이 필요하다. 항원을 고체 표면에 코팅 후 블로킹 단계를 거친다. 항체-접합체를 분석하고자 하는 가용성 항원을 포함하는 시험 용액과 함께 배양 한다. 이어서 이 혼합물을 코팅된 항원에 첨가하고, 배양 후, 결합 되지 않은 항원-항체 복합체를 세척한다. 기질을 첨가하고, 경쟁 항원이 첨가되지 않은 경우의 반응과 비교하여 반응의 억제(예, 비색법, 전기화학 발광법, 형광법 또는 화학발광법)를 측정한다. 억제의 정도는 시험 검체 내 항원의 양에 반비례한다. 저분자에 특이적인 항체를 플레이트에 코팅하여 경쟁적 분석법으로 저 분자를 측정할 수도 있다. 저분자는 일반적으로 플레이트 상의 포획 항체와 저분자 사이의 결합을 방해하지 않는 긴 링커로 비오틴화(biotinylation) 된다. 검체 내 항원(저분자)은 포획 항체와 결합하기 위해 표지된 저 분자와 경쟁한다. 세척 후, 결합 복합체를 검출하기 위해 검출 시약(예, HRP로 표지된 스트렙타비딘)을 첨가한다.

나. 직접 항원 경쟁적 ELISA

이 분석법은 가용성 항체를 검출하는데 사용한다는 것을 제외하고 직접 항체 경쟁적 ELISA와 유사하다. 항원은 검출기와 결합 되고 항체는 고체 표면에 코팅된다.

다. 간접 항체 경쟁적 ELISA

이 분석법은 직접 항체 경쟁적 ELISA와 유사하지만 항체를 직접적으로 표지하는 대신 표지된 항면역글로불린 시약을 사용하여 검출한다.

라. 간접 항원 경쟁적 ELISA

이 분석법은 직접 항원 경쟁적 ELISA와 유사하지만 항원을 직접적으로 표지하는 대신 표지된 2차 항체를 사용하여 검출한다.

7. 샌드위치 ELISA

가. 직접 샌드위치 ELISA

이 분석법은 항체를 고체 표면에 고정하여 블로킹한 후, 특정 항원이 포함된 용액을 첨가한다 (그림 2. D.). 배양 후, 결합하지 않은 물질을 세척하고, 표지된 검출기 항체를 첨가한다. 이 분석법에는 크고 복잡한 분자 표면에 존재하는 서로 다른 항원 결정기에 각각 결합하는 두 개의 항체가 필요하다. 두 항체는 항원 특이적이며, 항원은 두 항체의 결합을 수용하기에 충분히 크고 복잡해야 한다.

나. 간접 샌드위치 ELISA

이 분석법은 검출기 항체를 직접 표지 하는 대신에, 항면역글로불린 항체 검출기를 사용하는 방법이다. 간접 샌드위치 면역 분석법은 각각

의 결합 시약이 고유한 종에서 유래된 경우에만 고려할 수 있다. (예, 결과 신호가 항원 농도와 무관할 수 있기 때문에 포획 및 검출기에 대한 2개의 마우스 단일클론 항체를 사용하는 샌드위치 분석법은 간접적으로 검출할 수 없다)

다. 가교 ELISA

샌드위치 ELISA 분석법의 이 하위 방법은 일반적으로 포획 및 검출 모두에 하나의 항체를 사용한다 (그림 2. E.). 단일 클론 항체를 사용하는 경우, 하나의 항원 결정기가 포획 항체에 결합하고 다른 항원 결정기가 검출기 항체에 결합하도록 입체 장애 (steric hindrance)를 방지하기에 적절한 간격을 둔 최소 2개의 동일한 항원 결정기가 표적 항원에 필요하다. 또는, 다클론 항체를 사용할 수 있지만, 이 역시 2개 항체 분자의 결합을 수용할 수 있을 만큼 표적 항원이 충분히 커야 한다. 특이성 및 민감도 측면에서, 가교 분석법은 대부분의 큰 분자에 적합하다.

8. 분석법 선택

일반적으로 사용하고자 하는 ELISA 시험 절차 또는 형식의 결정은 시약, 기기 및 기타 장비의 사용 가능 여부 및 개인적 선택에 따라 달라진다. 예를 들어, 실험실에서 특정 항원 결정기를 여러 용합 단백질로 반복적으로 조작하는 경우가 있는데, 이러한 경우, 실험실에서 신속한 샌드위치 면역 분석법 개발을 용이하게 하는 특정 시약 (예, 다중 용합 단백질 내 글루타티온 S-트랜스퍼라아제 영역에 대한 항체)을 사용할 수 있다. 항체 결합에 사용될 수 있는 항원 결정기의 수가 적은 작은 항원은 ELISA 종류를 선택할 때 제한적이다. 결합을 위한 항원 결정기가 단 한 개만 있는 경우, 항체 결합을 위해 적어도 2개의 가능한 항원 결정기가 필요한 샌드위치/2-부위 결합 또는 다른

가교 방법을 사용하는 ELISA 방법은 사용할 수 없다. 또한, 분석법이 검출 시약과의 결합을 방해할 수 있기 때문에, 작은 분자는 일반적으로 플레이트상의 포획 시약으로 사용하지 않으며, 작은 분자의 예로는 펩타이드, 올리고당, 뉴클레오타이드 및 항균제가 있다. 일반적으로 이러한 작은 분석물의 분석을 위해서는 경쟁적 분석 방법을 선택한다.

다른 분석법 및 유형은, 특이성, 정밀성, 정확성, 민감도, 동적 범위, 용량-반응 비율, 검체 처리 효율, 간섭에 대한 민감도 및 자동화에 대한 단순성 또는 효율성 등의 상이한 특징을 나타낼 수 있다. 밸리데이션의 용이성 또한 다양한 분석법 및 유형 간에 차이가 있을 수 있다. 위치 효과(location effects)가 있는 경우, 인접한 웰에서의 복제물 분석 설계가 편향될 수 있다. 따라서 이러한 경우에는 복제물을 인접한 웰에 주입해서는 안된다. 상대적으로 적은 단일 채널 피펫 작동 및 더 큰 다중 채널 피펫 작동을 사용한, 96-웰 플레이트에서의 수행이 편리한 분석 설계는 자동화에 적용하기 더 용이하다. 가파른 용량-반응 곡선을 나타내는 분석법은 일반적으로 정밀도가 높은 추정치를 더 잘 도출해 낸다; 그러나, 가파른 용량-반응 곡선을 나타내는 분석법 중 일부는 EC_{50} 에서의 정밀도가 낮으며, 더 넓은 용량 범위를 필요로 한다.

9. 절차

가. 고체상

다양한 형태 (예, 멤브레인, 플레이트 또는 비드) 및 화학 물질 (예, 나일론, 니트로셀룰로오스, 플루오르화 폴리비닐리덴 (polyvinylidene fluoride, 이하 PVDF), 폴리비닐, 폴리스티렌 또는 화학적으로 유도된 표면의 고체상을 사용할 수 있다. 고체상의 선택은 가장 가능성 있는 결합 기전, 즉, 소수성, 친수성, 또는 공유 결합 상호작용을 결정한다. 전반적으로, 플레이트에 비해 비드가 더 높은 효율

을 보이며 임상 분석에서 더 일반적으로 사용되는 반면, 생물공학 제품의 시험에는 플레이트가 더 흔하게 사용된다. 플레이트에 대한 추가 정보는 아래와 같다.

1) 고체상 코팅-포획 시약 고정

포획 시약을 포함한 용액을 표면에 가하여 포획 시약을 고체상에 코팅한다. 포획 시약 고정에 가장 흔하게 사용되는 고체상 물질은 플라스틱 96-웰 미량 정량판이다. 바닥이 편평한 웰 플레이트는 분광 광도 측정에 권장되고, 바닥이 둥근 웰 플레이트는 염료 발색의 육안 평가에 사용된다. 코팅의 정도는 포획 시약의 농도, 코팅 중 온도, 포획 시약 흡착 기간, 고체상 물질의 표면 특성 및 포획 시약 용액 완충액의 성질에 의해 영향을 받는다. 각 포획 시약에 대한 최적의 코팅농도가 다르지만, 1-10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도가 가장 일반적으로 사용된다. 각 웰에 첨가될 포획 시약의 부피는 일반적으로 분석대상 검체의 부피인 50-100 μL 에 해당한다. 분석자는 코팅 과정 중 거품이 발생하지 않도록 해야 한다. 플라스틱에 결합하는 단백질은 변성되어 항원성을 변화시킬 수 있다. 이러한 경우, 포획 항체 또는 단백질 A 또는 단백질 G와 같은 중간자 단백질을 사용할 수 있다. 또한, 시약이 비오틴화 된 경우 스트렙타비딘을 사용할 수 있다. 포획 시약의 등전점 및 선택된 분석 플레이트의 표면 특성에 따라 코팅 완충액의 pH를 최적화가 필요하다.

2) 미량 정량판 (microtiter plates)

미량 정량판의 조성 및 제조사는 코팅 중 포획 시약의 결합에 영향을 줄 수 있다. 포획 시약에 대한 높은 특이성 및 낮은 비특이성을 제공하는 플레이트를 선택하기 위해, 단일 코팅 시험법을 사용하여 다양한 제조사의 여러 미량 정량판을 비교해야 한다. 한 제조사의 여러 등급 플레이트의 비교가 필요할 수도 있다. 일반적으로 투명 플레이트는 비

색법 ELISA에 사용되며 불투명 플레이트는 화학 발광 및 형광 분석 ELISA에 사용된다. 산성 포획 시약의 경우 단백질과 고체상 간의 반발력을 중화하기 위해 낮은 pH 용액이 필요할 수 있다. 펩타이드의 경우 분석법 개발 중 최적의 코팅 조건을 위해 전하에 따라 완충액 pH를 최적화해야 한다. 다당류, 지질 다당류 또는 당 단백질은 플레이트에 직접 코팅하기 어려울 수 있으며 라이신 또는 글루타알데히드를 포함하는 포획 항체 또는 완충액이 필요할 수 있다. 항체를 사용한 코팅을 향상시키기 위해 단백질 A 또는 단백질 G 또는 둘을 모두 사용하여 미량 정량판을 예비 코팅함으로써 Fc 영역에 결합하도록 하여, Fab 부분이 관심 대상 분석물과 결합할 수 있도록 할 수 있다. 그러나 이후의 2차 항체가 단백질 A 또는 단백질 G로 코팅된 웰과 반응하지 않도록 주의해야 한다. 이 경우, 예를 들어, 닭의 IgY 또는 다른 적절한 항체 계열을 사용할 수 있다. 처리 효율을 높이고/또는 시약을 보존하기 위해 다양한 96-웰 외의 미량 정량판 방법 (예: 절반 부피 96-웰 또는 384-웰 플레이트)을 사용할 수 있다.

3) 코팅 시간

코팅 시간은 결합 동력학, 안정성, 포획 시약의 농도 및 배양 온도에 따라 달라진다. 다른 코팅 시간과 온도의 조합이 동일한 코팅 효율을 나타내는 경우도 있지만, 포획 시약의 안정성이 선택 조건에 영향을 미친다. 분석 절차의 완전성을 확인하기 위해 코팅 시간 변화의 영향을 평가해야 한다.

4) 코팅 온도

코팅 온도 및 시간은 밀접한 관련 분석 매개 변수이다. 코팅 온도는 항원의 결합 동력학 및 안정성에 따라 다르다. 온도가 높을수록 흡착 속도가 증가하고 코팅 시간이 단축될 수 있지만, 상호 작용 부위에 영향을 미치며 항원-항체 친화도가 감소될 수 있다. 시간 및 온도의 일

반적인 조합은 상온에서 1-4 시간, 37 °C에서 15 분에서 2 시간, 또는 4 °C에서 하루이다. 분석자는 분석 절차의 완전성 평가를 위해 온도 변화가 미치는 영향을 확인해야 한다.

5) 완충액

희석액, 코팅, 블로킹 및 세척 플레이트에 사용되는 완충액은 전체 분석 성능에 영향을 줄 수 있다. 완충액 구성 성분은 시험 검체와 상호 작용하고 결합을 억제할 수 있다. 이는 또한 낮은 항원 민감성 또는 높은 비특이적 배경 활성을 초래할 수 있다.

가) 희석제

일반적으로 폴리소르베이트 20 (0.01 %-0.1 %)을 포함한 완충액 [예, 인산염 완충 식염수 또는 이미다졸 완충 식염수]가 다양한 ELISA 단계에 희석 및 세척 완충액으로 사용된다.

나) 코팅 완충액

코팅 완충액은 분석의 일관성을 최대로 높이고 포획 시약과 고체상의 결합을 촉진해야 한다. 일반적으로 사용되는 코팅 완충액에는 50 mM 카보네이트, pH 9.6; 20 mM Tris-HCl, pH 8.5; 및 10 mM PBS, pH 7.2가 있다. 코팅 완충액의 선택은 각 항원의 특성에 따라 달라지며, 경험에 근거하여 결정되어야 한다.

다) 블로킹 시약 및 완충액

블로킹 시약은 포획 시약 (항체 또는 항원) 결합 후에 남아있는 면역 흡착제 결합 부위를 포화시키는 화합물 (예, 단백질 또는 세척제)이다. 이는 분석물 및 그 외 물질이 면역 흡착제 매트릭스 및/또는 흡착된 시약에 비특이적으로 결합하는 것을 감소시킨다. 비특이적 결합

은 시험 검체 내의 단백질이 관심 대상의 포획 시약에 특이적으로 결합하는 대신 미량 정량판의 플라스틱 또는 흡착된 시약에 결합할 때 발생한다. 비특이적 결합은 블로킹 시약을 웰에 첨가하고 소혈청 알부민(BSA)과 같은 다른 단백질을 희석 완충액에 첨가하여 감소시킬 수 있다. 블로킹 시약의 선택은 포획 시약, 플레이트, 코팅 완충액, 시험 검체 희석제 및 관련 요인의 특성에 따라 결정되어야 한다. 이러한 매개변수 중 하나라도 변경되면 블로킹 시약의 변경이 필요할 수 있다. 일반적으로 사용되는 블로킹 시약에는 소혈청 알부민, 무지방 우유, 젤라틴, 카제인, 정상 말 혈청, 태아 소 혈청, 폴리소르베이트 20 등이 있다. 여러 등급의 소혈청 알부민이 상업적으로 이용 가능하며 최적의 등급은 각 분석에 대해 경험적으로 결정되어야 한다. 또한 면역학적 분석법에 대해 많은 상용 블로킹 시약 및 분석 희석 시약을 사용할 수 있다.

나. 검체 및 시약 첨가

일반적으로 검체와 시약은 ELISA 플레이트 웰에 피펫으로 넣는다. 교차오염, 방울 또는 거품이 생기지 않도록 주의해야 한다. 검체 로딩 패턴은 시험법 절차에 포함되어야 한다. 결과의 재현성과

정확성을 위해, ELISA 플레이트의 웰 사이의 일관성은 매우 중요하다. 이것은 반복 실험을 통하여 충족시킬 수 있다. 그러나 위에서 언급한 바와 같이 인접한 웰에서 반복되지 않도록 주의해야 한다. 엷지 효과를 피하는 일반적인 방법은 가장자리의 웰을 사용하지 않는 것이다. 또한, 저 증발 뚜껑을 사용하거나 투명 또는 통기성 있는 멸균 테이프로 플레이트를 밀봉하여, 분석 시간을 단축시켜 엷지 효과를 피할 수 있다.

전자 피펫, 자동 액체 처리기, 플레이트 세척 장치, 자동 피펫과 같은 노동 절감 장비를 사용하여 정밀도의 향상, 분석자 간의 변동성 감소 및

처리량을 증가시킬 수 있다.

다. 세척

결합 되지 않은 코팅 항원, 검체 및 검출 시약을 제거하기 위한 세척 단계가 ELISA 절차 전체에 포함된다. 세척은 분석 성능에 중요하며, 분석 실패의 원인이 될 수 있기 때문에, 시험법 개발 중에 평가하는 것이 중요하다. 세척에 다양한 접근법을 사용할 수 있다. 수동 절차에는 스퀴즈 보틀 사용, 세척 완충액에 미량 정량판 담그기, 다중 채널 피펫 또는 수동 다중 채널(8 또는 12-핀) 매니폴드(manifold)로 세척 완충액 첨가가 있다. 분석자는 웰 간의 교차 오염에 주의하여 세척 해야 한다. 자동 마이크로 플레이트 세척기는 일반적으로 세척의 일관성을 제공한다. 스트립 웰 및 멀티 웰세척기를 사용할 수 있다. 대부분의 자동 세척기는 서로 다른 분주 부피와 속도, 세척 횟수, 완충액 흡입 속도 및 웰에 남은 잔류 완충액을 프로그래밍 할 수 있다. 불완전하게 청소된 자동세척기 뿐만 아니라 잘못 프로그램되거나 유지 관리가 잘못된 자동 세척기는 변이 및 분석 배경의 상승을 초래할 수 있다.

라. 배양

ELISA는 검체와 시약 첨가 후 배양된다. 시험법 개발 중에 각 배양 단계의 최적 시간, 조건 및 온도를 결정하여야 한다. 배양 시간은 수 분에서 하루까지 다양하다. 일반적으로 사용되는 배양 온도는 상온, 4 °C 및 37 °C이다. 배양 중에 증발 또는 오염을 피하기 위해 일반적으로 ELISA 플레이트는 밀봉하거나 2차 용기에 넣는다. 건조 또는 가습 배양과 같은 대기 조건은 시험법 개발 중에 평가되어야 한다. 결합력에 따라 미량 정량판을 흔들거나, 진탕하거나 교반하는 것이 필요하거나 바람직할 수 있다.

마. 블로킹 조건 및 비특이적 반응

결합 되지 않은 항원 또는 항체를 제거 후, 시료 또는 시약 등이 고체 표면 또는 코팅된 항원이나 항체에 비특이적으로 결합하지 않도록 하기 위하여 결합 되지 않은 결합 부위를 블로킹한다. 비특이적 결합이 나타나는 경우, 보고된 모든 신호가 측정값에 편향될 수 있으며 분석의 민감도와 동적 범위를 감소시킬 수 있다. 블로킹은 분석의 민감도 및/또는 특이성을 보장하기 위하여 중요하다. 비특이적 결합의 원인은 다음 두 가지의 경우로 나뉜다.

1) 이온성 또는 소수성 상호 작용은 분석 시약과 고체 표면 또는 다른 분석 시약 간의 비특이적 이온 또는 소수성 상호작용에 의해 결합이 매개 될 때 발생한다.

2) 면역학적 상호작용은 의도하지 않은 항원-항체 상호작용에 의해 결합이 매개될 때 발생한다. 이는 분석에 사용된 항체 제제가 다른 분석 시약과 상호 작용할 때 나타난다. 예를 들어, 마우스 Ig(또한 이중 친화성 항체로도 알려짐)에 대한 반응성을 갖는 시험 물질 내의 항체가 분석에서 비특이적으로 검출될 수 있다.

블로킹 시약(예시는 블로킹 시약 및 완충액 항목의 선택은 실증적으로 결정되며, 시험법 개발 중에 비특이적 결합 감소와 분석 민감도에 대한 영향 사이의 균형을 평가하여야 한다. 다른 분석 시약과의 교차 반응성을 고려해야 한다; 예를 들어, 내인성 비오틴은 우유와 혈청에서 발견되며, 바이러스 또는 박테리아 단백질에 대한 항체가 혈청에 존재할 수 있다. 따라서, 혈청 로트의 스크리닝이 필요할 수 있다. 웰에 첨가된 블로킹 용액의 부피는 이후의 단계에서 사용되는 최대 반응 부피보다 커야 하므로, 결합 반응을 방해할 수 있는 모든 가능한 표면적을 블로킹한다.

또한, 항체 형태를 억제하거나 이중 친화성 항체를 응집시키는 완충액을 사용하거나, 비면역 혈청을 블로킹, 또는 주요 항체 시약에서 Fc 부위를 제거하여 시험 물질 내의 Ig를 제거할 수 있으며, 이에 따라 상기

기술된 블로킹 시약으로 해결할 수 없는 바람직하지 않은 면역학적 상호작용을 감소시키거나 없앨 수 있다. 비특이적 반응을 모니터링 하기 위해 음성 대조 웰을 포함할 수 있다. 음성 대조 웰의 특성은 분석법에 따라 달라지지만, 항원 코팅 없이 블로킹 된 웰을 포함하여 1차 또는 2차 항체를 제거 또는 검체 대신 완충액을 사용할 수 있다. 대조 웰은 시스템 적합성 시험의 일부로서 유용하다.

바. 검체의 전처리

ELISA 시험법은 복잡한 혼합물에서 분석물을 측정하도록 설계되었지만, 다른 물질의 존재가 분석물 검출을 방해하는 경우 문제가 될 수 있다. 분석의 특이성을 보장하기 위해, 비특이적 간섭 물질 (예, 환원제 또는 침전물)을 제거를 위한 검체 처리 특정 절차를 시험법 개발 과정에서 실증적으로 결정할 수 있으며, 밸리데이션 된 분석법과 함께 사용할 수 있다. 모든 검체 처리 단계는 시험 물질의 특성을 변경 및/또는 편향된 측정 결과를 초래하는 추가 변동성을 유발할 가능성에 대한 평가를 해야 한다. 검체, 표준물질 및 대조 물질은 가능한 한 유사한 절차에 따라 준비하고 처리해야 한다. 분석자는 검체 전처리가 측정이 불가능할 만큼 검체가 손상되지 않았다는 것을 확인해야 한다 (예, 스파이크 실험).

사. 검출기 항체

ELISA 방법에 따라, 효소 또는 다른 표지자로 표지된 검출기 항체를 고정된 분석물을 검출하는 1차 또는 2차 시약으로 사용할 수 있다. 직접 또는 경쟁적 ELISA (그림 2. A. 및 그림 2. C.)에서, 분석물이 면역 흡착제 표면에 결합 된 후, 과량의 분석물을 씻어내고, 1차 항체로 간주 되는 검출기 항체를 사용하여 고정화된 분석물을 검출한다. 다른 ELISA 방법의 경우 (그림 2.B, 2.D, 2.E) 분석물 특이적인

면역글로불린 (비접합된 1차 항체)은 고정된 분석물질에 결합하게 되고, 2차 항체로 불리는 검출기 항체를 첨가하기 전에 과량의 항체를 씻어낸다.

효소 결합 항체를 사용하는 모든 ELISA 방법에서 용이한 검출을 위해, 결합 효소에 특이적인 기질을 분석 시스템에 도입한다. 기질을 적절한 파장과 적합한 판독기를 사용하여 측정할 수 있는 가용성 산물로 전환 시키는 효소 반응이 일어난다.

ELISA 민감도는 표지자 및 기질을 포함한 시약 및 검출 시스템의 품질에 따라 달라진다. 서로 다른 복합 항체가 이용 가능한 경우 분석자는 분석법에 적합한 항체를 선택해야 한다. 이러한 평가 중 적절한 대조군을 사용하여 바람직한 민감성과 특이성을 나타내는 각 접합체의 희석을 결정하여야 한다.

항체 접합에 가장 일반적으로 사용되는 표지자 효소에는 알카라인 포스파타아제 (alkaline phosphatase, AP), 호스래디쉬 페록시다아제 (horseradish peroxidase, HRP) 및 갈락토시다아제(galactosidase)가 있다. 이들 효소는 발색성, 발광성 또는 형광 반응을 촉매하는 데 있어 매우 특이적이며, 민감하고 안정적이다. *para*-니트로페닐 포스페이트 (*para*-Nitrophenyl phosphate, pNPP)는 AP에 일반적으로 사용되는 기질이다. HRP에 일반적으로 사용되는 기질에는 TMB[3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine 3,3', 5,5' -테트라메틸벤지딘], OPD [2,2'-Azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, 2,2'-아지노-비스 (3-에틸-벤조티아졸린-6-술폰산) 디암모늄 염]이 있다 (표 2 참조). AP 및 HRP의 기질은 발색성이며 분광 광도계를 사용하여 측정 할 수있는 비색성 생성물을 생성한다. 화학발광 및 형광 기질도 AP와 HRP에 사용 가능하며, 많은 경우 상업용 키트를 이용할 수 있다. 디소듐 3-(4-메톡시스포로 {1,2-디옥세탄-3,2'-(5'-클로로)트리 사이클로 [3.3.1.1^{3,7}] 데 칸} - 4 - 일) 페닐 포스페이트

(Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan} -4-yl)phenylphosphate, CSPD)는 알려진 AP의 화학 발광 기질이다(표 2 참조). 갈락토시다아제의 잘 알려진 형광성 기질에는 MG (4-메틸룸벨리페릴 갈락토시다아제, 4-methylumbelliferyl galactoside) 및 NG (니트로페닐 갈락토시다아제, nitrophenyl galactoside)가 있다. 화학 발광 기질을 사용하는 경우, 생성된 산물을 정량하기 위해 발광 측정기가 필요하다. ELISA에 형광 기질을 사용하는 경우 형광 측정기가 필요하다.

표 2. 는 또한 여러 유형의 ELISA 기질의 장점과 단점에 대한 요약 을 보여준다. 비색성 기질은 초기 ELISA부터 널리 사용되어 왔으며, 일반적으로 화학발광 및 형광 기질을 사용하는 분석법보다 경제적인 완전한 분석을 도출할 수 있다. 그러나, 화학발광 및 형광 ELISA 방법이 비색성 판독법을 사용하는 분석법보다 넓은 동적 범위에서 보다 빠르고 민감한 분석을 도출할 수 있다. 분석의 목적과 요구사항에 따라 판독법의 최종 선택을 결정하여야 한다.

표2. 효소 접합체 및 기질

판독법	효소 반응의 원리	효소	기질	판독기	장점	단점
비색법	분석물 농도에 직접 비례하는 흡광도 값을 산출하는 착색 산물 생성	AP ^a , HRP ^b	pNPP ^c TMB ^d OPD ^e ABTS ^f	분광 광도계	<ul style="list-style-type: none"> • 완전성 • 경제적 • 시약 가용성 	<ul style="list-style-type: none"> • 민감도 낮음
화학 발광법	분석물 농도에 직접 비례하는 빛 방출을 생성	AP	CSPD ^g	발광 측정기	<ul style="list-style-type: none"> • 넓은 분석 동적 범위 • 낮은 코팅 농도 • 민감도 높음 • 신호를 신속히 생성 	<ul style="list-style-type: none"> • 특수 플레이트 필요 • 고 비용
형광법	분석물 농도에 직접 비례하는 여기 유도 (excitation-induced) 빛 방출 생성	갈락 토시 다아 제	MG ^h NG ⁱ	형광 광도계	<ul style="list-style-type: none"> • 빠름 • 민감함 	<ul style="list-style-type: none"> • 특수 플레이트 필요 • 고 비용 • 첨가제에 의한 간섭

^aAlkaline phosphatase

^bHorseradish peroxidase

^cpara-Nitrophenyl phosphate

^d3,3',5,5' -Tetramethylbenzidine

^eo-Phenylenediamine dihydrochloride

^f2-2' -Azino-bis[3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid] diammonium salt

^gDisodium 3-(4-methoxy Spiro {1,2-dioxethane-3,2' -(5' -chloro)tricyclodecan}-4-yl) phenyl phosphate

^h4-Methylumbelliferyl galactoside.

ⁱNitrophenyl galactoside.

분석법 개발 및 밸리데이션 계획

1. 주요 시약 개발

주요 시약에 대한 핵심 고려사항은 물질의 유래, 순도, 특이성 및 안정성이다. 품질 측정을 위해, 면역학적 분석법은 분석물 포획 및 검출을 위한 주요 시약과 함께 표준품을 사용한다. 주요 생물학적 시약의

모든 변경사항에 대한 평가가 필요하다.

가. 물질의 유래

수십 년에 걸쳐 재현 가능하고 일관되게 (정제된) 시약을 제조할 수 있도록 출발 물질의 사용 가능 여부 및 품질을 관리해야 한다. 주요 시약은 생물학적 분자이기 때문에, 물질의 유래는 화학 합성 (예, 펩타이드)에서 복잡한 생물학적 매트릭스 (예, 혈청에서 유래된 항체, 복수/세포 배양으로부터의 단일 클론 항체, 또는 발효/세포 배양 산물)에 이르기까지 다양하다. 분석법의 사용 목적에 적합한 경우, 실제 공급원을 확정하고 로트 간 변이를 방지하기 위해 주요 시약의 단일 로트를 제조할 수 있다. 다른 경우에는, 사용 목적에 대한 시험법의 충분한 완전성을 증명하기 위해 다수의 로트 또는 다수의 공급업체를 밸리데이션에 포함하는 것이 적절할 수 있다.

나. 순도

일반적으로, 시약 성능 및/또는 안정성에 영향을 줄 수 있는 불순물 및 제조공정 잔류물의 제거를 보장하기 위해 주요 시약의 순도를 평가하여야 한다.

다. 특이성

주요 시약의 특이성은 관심 분석대상 물질만 포획하거나 검출할 수 있는 능력을 의미한다. 시약은 분석물 특이적이어야 하며, 복잡한 시험 물질 내에서 표적이 아닌 분자에 대한 비특이적 결합 또는 교차결합이 거의 없어야 한다.

라. 안정성

시간 경과에 따른 분석 성능을 보장하기 위해 주요한 시약의 안정성을 실증적으로 확인해야 한다(정확성, 정밀도, 재현성 및 분석 추이

포함). 요구되는 보관 조건(예, 지정된 온도 및 용기) 하에서 주요 시약의 장기(수개월에서 수년) 안정성을 확인하여 적절한 사용기한이 지정될 수 있도록 한다. 일상적인 분석의 정확성, 정밀도 및 재현성을 보장하기 위해 단기(수분에서 수일) 안정성(동결된 주요 시약에 대한 동결/해동 및 실온에서의 안정성) 또한 필요하다.

2. 타당성/선행 시험

ELISA 시험법을 개발, 밸리데이션 하여 정기 검체 분석에 사용하는 과정의 단계는 다음과 같다.

- 가. 분석물 측정을 위한 주요 시약의 제조 및 구입. 보관 조건 및 안정성 확인.
- 나. 분석 시스템의 성능 목표 이해.
- 다. 검출 가능한 농도 반응 곡선을 얻을 때까지 분석법 개발.
- 라. 시험법 개발/완건성 시험 수행.
- 마. 표준품/교정물질 및 대조 물질 준비 및 안정성 평가.
- 바. 분석 절차, 적절한 관리 및 한계, 분석과 검체 허용 기준 및 측정 장비 수립.
- 사. 시험법 성능을 확인하고 모든 해당하는 분석대상 검체 유형의 적격성 평가를 포함하여, 시험법의 정확성, 특이성, 정밀도 및 완건성 적격 확인.
- 아. 분석법의 밸리데이션.
- 자. 분석자 교육 및 적격성 평가를 포함하여, 실험실에서 시험법(기술이전) 구현.
- 차. 분석 성능 모니터링.

분석법 개발 중, 분석에 필요한 주요 매개 변수 및 시약을 평가하여 요구되는 분석 성능을 도출하는 수준을 설정해야 한다. 많은 경우 다양한 매개변수가 평가될 수 있으며, 잘 설계된 실험은 분석 개발의 속

도를 증진 시킬 수 있고, 특히 여러 투입물의 상호 작용 가능성 평가에 유용하다.

많은 ELISA 시험 절차는 제품에 따라 다르며, 외부 표준품/교정물질의 사용이 불가능할 수도 있다. 분석법 개발 초기 단계에서 표준품/교정물질의 준비 및 안정성을 고려해야 한다.

3. 분석법 밸리데이션

분석법 밸리데이션을 실시하여 분석물에 사용한 특정 시험이 의도된 목적에 적합함을 입증한다.

데이터 분석

ELISA 자료의 분석은 단순 (예, 역 회귀 분석을 이용한 선형 교정) 하거나 복잡 (역 회귀 분석을 이용한 비선형 교정 곡선) 할 수 있다. 자료 분석의 유형 및 엄격성은 분석 시스템과 분석법의 사용 목적에 크게 의존한다. 예를 들어, 자료의 축약은 검정 곡선을 사용하여 미지 검체의 농도 (예, ng/mL)를 추정할 수 있다. 다른 접근법으로는 반수 최대 억제 농도 (half-maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 또는 유효 농도 (effective concentration, EC_{50})의 추정, 표준곡선에서 EC_{50} (또는 IC_{50})과 동일한 반응을 일으키는 검체량의 추정 및 표준품/교정 물질과 비교한 시험 검체의 상대적 활성 추정이 있다.

일반적으로 ELISA 분석 곡선은 관심 대상 분석물의 농도와 계산된 평균 반응 사이의 비선형 관계의 특성을 나타낸다. 일반적으로, 이 반응 곡선은 반응 대 농도의 S형 관계로 확인된다. 넓은 범위의 수학적 모델이 표준/교정 곡선에 적합할 수 있으며, 시험자는 적절한 곡선 맞춤 알고리즘 선택에 주의를 기울여야 한다. 다른 경우, 민감도 임계값을 기준으로 검체가 양성 또는 음성인지를 확인하기 위한 정성적인 목적으로 ELISA 분석법을 사용한다.

부 칙

제1조(시행일) 이 고시는 고시 후 3개월이 경과한 날부터 시행한다.

제2조(적용례) 이 고시는 이 고시 시행 후 최초로 제조업자가 제조하거나 수입자가 수입한 의약품부터 적용한다.