

Troubleshooting for your ELISA Handbook

Introduction

Immunoassay의 문제는 다양한 원인에서 발생될 수 있습니다.

대부분의 technical errors는 Kit에 포함된 insert를 잘 읽고 이해함으로써 문제 발생을 최소화 할 수 있습니다. 제품 insert를 꼼꼼히 파악하고 recommend하는 대로 실험을 진행 하시길 바랍니다.

기본적으로 ELISA 라는 동일한 method로 진행되는 실험이지만 각 assay마다 buffer나 사용되는 용량, incubation 시간 등 차이가 있으므로 항상 insert를 기본으로 하고 insert는 R&D System home page(www.rndsystems.com)에서 다운받아 항상 최신 버전으로 확인하시기 바랍니다.

만약 kit에 관한 의문점이 있다면 실험을 하기 전에 연락 하여 confirm 한 후 진행 바랍니다.

Before You Begin

- ✓ Kit의 expiration date를 확인 →기한이 넘었다면 사용 불가능
- ✓ 각 component의 storage condition을 확인
- ✓ 각 reagent 의 상태가 불안정하거나 문제가 없는지 (침전 등)확인
- ✓ calibrator diluent와 assay diluent는 원래 침전을 포함하므로 plate에 넣기 전에 잘 섞어 주기
- ✓ 침전이 없는 것도 균일함을 위해 잘 섞어서 사용
- ✓ incubation times /temperatures 정확하게 하기
- ✓ 다른 kit 혹은 다른 lot 으로부터 reagent 섞어서 사용하면 안됨
- ✓ protein solution 을 녹이거나 섞을 때 거품이 나지 않도록
- ✓ sample이 오염되지 않도록 잘 보관.
- ✓ Assay를 시작하기 전에 실험의 layout을 문서화(washing 중 strip 이탈할 경우를 대비해 각 strip에 labeling 필수)
- ✓ 필요한 도구 준비- pipettes, tips, test tubes, washer, plate reader
- ✓ 실험 table 및 bench 깨끗하게 하고 실험
- ✓ 만약 kit에 control이 포함되어 있다면 각, 실험마다 con 함께 실험 수행
→ control의 농도는 insert에 표기되어 있는 control range안에 있어야 함
→ control이 없다면 commercial control set 구입(문의-웅비메디텍)

Washing Technique

정확한 washing은 ELISA 결과에 매우 중요한 요소!!

- 일관적인 plate washing이 필수
- wash buffer를 희석 할 때에는 DW이용

Washing Methods

1. Squirt Bottle or Multi-channel Pipette

-bottle : good pressure

-pipette prong: debris 없이 dispense 가능

-multi-channel pipette 사용시 정확히 보정된 기구를 사용하시고 동일한 volume이 빨려오는지 항상 확인해야 함.

-실험 중 plate holder 에서 strip이 빠질 수도 있으니 미리 numbering 해두기.

- ① Plate 안에 있는 것을 제거
- ② Insert에 나온 vol 대로 wash buffer 넣음
→ Soak time이 프로토콜에 있으면 well이 잘 soak되도록
- ③ Well을 뒤집어서 liquid 따라내고 깨끗한 paper towel에 blotting 해주면서 제거
(towel 위에 plate를 뒤집어 탁탁 털어주면서 남은 wash buffer 제거)
- ④ Insert에 나온 만큼 washing 반복
- ⑤ 마지막으로 well을 비우면 남은 wash buffer 완전히 제거되는지 확인
- ⑥ Well이 마르지 않도록 다음단계 진행

2. Manifold Dispenser or Auto washer

- 기계 매뉴얼에 따라 적절한 vacuum을 걸어줌
 - cannulae 나 prong에서 적절하게 dispensing과 aspirating이 일어나도록
- ① well의 내용물을 aspiration 하거나 따라낸다.
 - ② KIT에 나온 대로 wash buffer 채움
 - ③ 완벽하게 aspiration 하여 남겨진 wash buffer가 없도록
※aspiration이 끝난 후에도 aspirator가 well에 남아서 over-aspiration되지 않도록
 - ④ Insert 나온 만큼 반복
 - ⑤ 마지막 aspiration 후→ wash buffer 남지 않도록 하고 paper towel에 blotting
 - ⑥ Plate를 너무 천천히/너무 빠르게 washing 하거나, 완전하지 않게 washing이나 aspiration 하거나, well이 마르도록 방치하는 것은 실험의 정확도에 영향을 줌
 - ⑦ Well이 마르지 않도록 다음단계 진행

Washing Technique Hints

- Automated washer를 사용하더라도 washing 후에는 확실히 buffer가 제거 되도록 뒤집어서 towel위에 털어주는 과정을 꼭 진행 하세요
- 하지만 plate가 마르지 않도록 다음 단계로 진행하세요;
- 너무 빠르거나 너무 느린 washing을 정확도에 영향을 줄 수 있습니다.

Pipetting

Before You Begin Pipetting

-모든 pipette은 적절하게 calibration 되어 있어야 함

<calibration check>

Pipette의 최소 vol에서 DW로 10회 반복→ CV가 2%이내여야 함→ 최대 vol에서도 10회 반복하여 CV가 2-3% 이상이면 다시 실시→ 계속 2-3% 이상이면 수리해야 함

Pipetting Techniques

1. Forward Mode Pipetting

- ① 원하는 vol으로 set
- ② Reagent/sample로 pre-rinse
- ③ 첫 번째 stop까지 누르고 액체가 tip에 완전히 들어 올 까지 천천히 원위치로 옮기면서 기다린다.
※ 소리 (딸깍) 내면서 빠르게 확 올라오지 않도록
- ④ 분주 할 때에는 첫 번째 stop까지 눌러 액체를 빠지게 하고 살짝 더 눌러 두 번째 stop까지 눌러줌
※tip을 뺄 때까지 이 상태를 유지 (액체가 다시 빨려 오지 않도록)

2. Reverse Mode Pipetting

- 액체의 surface tension에 의한 error를 감소시키기 위해 권해짐

- ① 원하는 vol으로 setting
- ② sample이나 reagent로 pre-rinse
- ③ second top까지 완전히 눌러줌
※절대 소리 나면서 확 올라오지 않게
※액체가 끝까지 올라오도록 천천히 기다리기
- ④ dispense 할 때는 첫 번째 stop까지만 (tip을 뺄 때까지 첫 번째 stop 유지)

Pipetting Tips

- ✓ pipetting에서 반복적으로 정확성을 유지하는 것은 일관적인 pipetting 기법이 중요
- ✓ 갑작스럽거나 빠른 동작은 피하고 일관적인 속도와 부드러움 이 필수
- ✓ Pipette 끝 부분까지 tip이 완전히 끼어지게 적절히 눌러주기
- ✓ 각 sample/reagent 마다 tip 교체
- ✓ Pipette의 최소 vol 보다 낮은 vol은 사용하지 않아야 정확도와 재현성에 관련됨
- ✓ Tip에 달라 붙는 경향을 가진 액체의 경우 이로 인해 생기는 부피차이를 줄이기 위해 pre-rinse pipetting 정확성 높일 수 있음
- ✓ Reagent가 점도 높다면 천천히 다 올라올 때까지 기다리기
- ✓ Tip에 다 들어 간 후 tip 밖을 lint-free tissue로 닦아 줌
- ✓ 액체 올리다 bubble이 생기면 다시 천천히 draw, 두 번째 또 생기면 tip을 새것으로 교체
- ✓ Tip 안에 생기는 bubble은 pipette을 살짝 기울이거나 액체를 천천히 올리면서 방지
- ✓ Reagent 마다 분리된 용기 사용

Pipetting Hints

- ✓ 만약 well에 일정하지 않은 volume의 buffer가 관찰된다면 pipette 보정해야 함
- ✓ 교차오염 방지를 위해 reagent가 바뀔 때 면 항상 tip을 교체 해야 함
- ✓ Tip을 정확하게 장착하지 않으면 부피의 차이가 새기기도 하고 reagent가 세어나갈 수도 있으므로 확실하게 끼워준다.
- ✓ well에서 tip을 빼낼 때는 well의 가장 자리에 tip을 기울여서 tip 밖에 묻어 있는 남은 액체를 제거해 준다.

Sample Information

Sample Handling Tips

- ✓ 어떤 sample이 사용되는지 확인하고 collection/preparation 하는 동안 무균적 방법 사용
- ✓ 여러 가지 sample을 사용하는 경우, sample을 확실히 분리해 놓고, 잘 labeling 해서 cross-contamination 방지
- ✓ Assay 전에 particle제거 위해서 centrifuge하고 각 sample은 fresh tube에 옮기고, 완벽하게 균질화
- ✓ Sample을 mixing 할 때에는 sample vole의 50% 큰 용기에서 진행하여 적절한 mixing이 이루어 지도록

Storage

- ✓ Sample collect 후 바로 사용할 수 없다면 **나누어서 insert에 제시된 방법으로 보관**
- ✓ **녹였다가 다시 얼려 사용하면 안됨**
- ✓ -20°C저장 시에는 **defrost freezer** 매뉴얼 사용

Preparation

Q: kit insert에 나온 방법으로만 sample preparation을 진행 해야 하나요?

Insert에 있는 sample preparation이 각 kit에서 최적의 recovery와 performance를 얻는 방법입니다. 미리 test 된 것이므로 insert대로 하는 것을 추천합니다.

Q: plasma collection 사용해도 될까요?

각 assay는 정해진 procedure로 진행될 때에만 validate됩니다. plasma등은 몇몇 kit에서는 권하지 않기도 하기 때문에 Insert에서 가능한 sample type인지 꼭 확인해야 합니다.

어떤 analyte들은 platelet에 존재하기도 하므로 plasma에서의 양을 측정하려면 platelet을 일정 제거한 것 (platelet-poor plasma)을 추천하기도 합니다.

Q: 본인이 직접 만든 dilutions/buffer를 사용할 수 있나요?

각 kit에는 특정 sample type 별로 formulation 된 diluent가 포함되어 있습니다. test 할 sample type에 따라 정확한 diluents 사용하는 것이 중요 (insert를 따를 것) 합니다.

Q: Diluent가 모자라면 어떻게 하나요?

실험 protocol 대로 했다면 충분한 양의 diluent가 제공됩니다. 미리 계산된 diluent의 양은 STD/sample 모두 duplicate로 실험 되었을 경우에 충분한 양입니다. 실험은 꼭 duplicate로 진행하시고 실험 전 예상되는 dilution factor에 따라서 필요한 Diluent의 양을 계산해 보는 것이 좋습니다. 원칙적으로 kit 내에 제공되는 diluents는 개별적으로 판매되지 않습니다.

Q: insert에 추천되지 않은 sample type을 사용해도 될까요?

각 kit는 insert에서 명시하고 있는 sample type만을 validation 합니다. 이외 sample type은 test가 이루어 지지 않았기 때문에 guarantee 안되며 spike/recovery test 를 거쳐 validation 후에 사용 가능 합니다.

Sample Values

Q: control을 함께 실험하였는데 범위 밖의 값이 나왔습니다. 이 의미는?

Control 실험을 했다면 insert에 표시된 control 특정 범위 내에 농도가 포함되어야 합니다. 범위 밖에 control의 농도가 있다는 것은 invalid 의미 합니다. Control을 제대로 녹였는지 확인합니다.

Q: Kit 안에 있는 sample data를 reference로 사용 가능할까?

Insert data는 매우 제한적인 결과이므로 general guide line 으로만 이용하는 것이 좋습니다.

Q: insert안에 포함된 STD 커브를 이용해 내 실험 sample을 읽어도 될까요?

절대 불가합니다. 각각의 실험값은 각 실험에서 얻은 STD curve 이용해서 계산되어야 한다.

Q: 희석이나 농축된 sample의 농도는 어떻게 계산 할까요?

Sample이 희석된 것이라면 STD curve로 부터 읽은 농도에 희석 배수를 곱해줍니다 .
만약 sample이 농축된 것이라면 농축된 것만큼 나누어 줍니다 .

Q: international unit으로 바꾸는 방법은?

NIBSC/WHO International Standard가 가능한 경우 insert에 변환식이 있으므로 sample 값을 pg/mL 이나 ng/mL 에서 Units으로 나타낼 수 있습니다(IU/ml). R&D Systems 홈페이지에서 확인 가능 하십니다. http://www.rndsystems.com/who_conversion.aspx

Q: 실험 결과 kit의 dynamic range를 벗어 났다면 이 값을 이용해도 될까?

STD curve 범위 이내에 값을 인정하도록 추천하고 있습니다. STD범위 밖의 값은 보통 non-linear 한 추론 값이 됩니다. STD 최고 농도보다 높게 나왔으면 희석해서 다시 실험하고 최저 값 보다 낮게 나왔다면 ND로 판단하게 됩니다.

Q: STD curve는 잘 나왔는데 내가 원하던 결과를 얻을 수가 없었습니다. 이유가 될까요?

Sample이 analyte를 포함하지 않았거나, matrix effect에 의해 detection이 방해 되었기 때문입니다. Dilution이 추천되었다면 적절히 잘 이루어 졌나를 확인해 보세요
(과도한 희석은 STD 농도 이하로 떨어지게 하기 때문입니다.)

Precision/Reproducibility

면역 검사에서의 정확성 (Precision)이란 intra assay(well 간), inter assay(assay 간)의 재현성을 의미하며 이때 CV로 표현되는 정확성은 주로 pipetting과 washing technique에 의해 결정됨

Q: well에서 reagent를 한꺼번에 mixing해도 되나요?

Assay diluent와 sample등 여러 reagents가 한 well에 들어 갈 때는 well에서 mixing 합니다. Sample과 reagent를 well의 중간에 놓고 plate를 살짝 두드려서 섞어주면 되고 보통 protocol상 한꺼번에 들어가도록 설명되어 있습니다. .

Q: sample이나 reagent의 점도가 높아 pipetting이 잘 되지 않을 때 어떻게 할까?

액체가 equilibrium volume에 닿을 때까지 용기에서 빠지 말고 기다리거나 surface tension을 이겨내기 위해 tip을 pre-rinse를 실시합니다.

Washing Technique

Q: wash buffer를 덜 사용 할 수 있을까요?

Wash buffer를 덜 사용하면 CV값이 낮게 나오는 원인이 됩니다. Insert에 나와있는 용량대로 washing하는 것을 추천합니다.

Q: wash buffer 를 다 써버렸는데 다른 kit의 것을 사용해도 될까?

모든 wash buffer가 동일하지는 않기 때문에 techserv에 문의 후 사용할 것을 추천합니다.

Q: wash 과정에서 soak time을 거치지 않아도 될까?

어떤 assay에서는 washing 과정 사이에 soak를 권하고 있습니다. 이 과정을 하지 않고 넘어가거나 이 시간을 줄이는 것은 정확도를 낮게 하는 원인이 될 수 있습니다. 항상 최적의 실험을 위해 insert를 정확하게 따르는 것이 좋습니다.

Q: washing 횟수를 줄여 실험해도 될까?

Insert에 횟수를 따를 것을 추천합니다. Washing은 ELISA의 정확도에 영향을 크게 주는 요소입니다. 이 횟수는 assay의 정확도에 영향을 주게 됩니다.

Miscellaneous

Q: 모든 시약을 한 용기를 이용해 pipetting 해도 될까?

절대 불가합니다. 오염을 방지 하기 위해 각 reagent 마다 각각의 용기를 사용해야 한다. 몇몇의 analyte는 오염에 매우 민감하기 때문이다.

Q: plate sealer를 재사용해도 될까?

재사용되는 plate sealer는 전 단계의 물질을 포함하여 현재 well에 영향을 미쳐 정확성에 영향을 줄 수 있습니다. 따라서 각 단계별로 **새 plate sealer를 사용해야 합니다.**

Standard Curve

Standard Preparation

Q : STD의 농도를 바꿔 사용해도 될까?

추천하지 않습니다. STD의 희석 농도는 insert에 나온 대로 꼭 지켜야 합니다.

이 농도는 다양한 factor에 대하여 영향을 최소화 하고 kit performance가 최대일 수 있도록 설정되어 있기 때문에 좋은 결과를 얻기 위해서는 따르셔야 합니다.

Standard vial을 녹일 때에는

- 1) 정해진 **buffer와 그 volume을 확인하여 넣어 주고**
- 2) 거품이 나지 않도록 **살살 굴러주며 15분간 충분히 녹인 후 (고체 확인)**
- 3) 사용할 용량을 **파악하여 나누어 주거나 혹은 한번에 사용합니다.**
- 4) **Serial dilution** 하실 경우에는 각 농도마다 **tip은 교환해 주시고 mixer를 이용하여 충분히 잘 섞은 후 다음단계로 진행 합니다.**

Q: STD를 calibrator diluents 사용하지 않고 다룰 것으로 희석해도 될까?

Protein의 종류에 따라 다양한 buffer를 희석 용액으로 지시 하고 있습니다. DW/calibrator diluents/PBS등 제품에 따라 buffer가 다르고 이를 지켜야만 STD curve를 얻을 수 있으므로 꼭 insert를 확인해 보시고 지시대로 희석해 주세요

Technique

Q: washing이 STD curve에 어떤 영향을 줄까?

불완전한 washing/aspiration은 **정확도 감소**에 영향을 주어 **부정확한 STD curve**를 얻게 됩니다.

따라서 washing 도구를 정확히 사용하고 aspiration을 확실히 하여 남지 않도록 해야 한다.

Plate를 뒤집어 타월위로 털 때 "탁탁" 소리가 날 정도의 힘을 주어도 coating된 AB에는 영향을 주지 않습니다. 최대한 buffer를 남기지 않는 것이 중요합니다.

Q: Pipetting이 STD curve에 어떤 영향을 줄까?

일정하지 않은 pipetting은 **replicate** 사이에 차이를 주게 되고 이것은 **높은 CV와 부정확한 STD curve**를 얻게 됩니다. 또한 보정되지 않은 파이펫은 STD 희석 과정에서 오류를 발생하게 하여 curve를 줄이거나 **non-linear curve**가 생기게 합니다. **Well 간 동일하지 않은 volume**은 pipette의 고장이나 tip을 제대로 사용하지 않아 생기게 됩니다.

Miscellaneous

Q: 스케줄에 따라서 incubation 시간을 바꿀 수 있을까?

Incubation의 시간이나 온도를 변경 시키면 반응이 덜 되거나 너무 많이 진행되어 STD curve형태에 영향을 줄 수 있습니다. 특별한 경우가 아닌 이상 protocol을 따르는 것이 좋은 결과를 얻을 수 있는 가장 빠른 방법입니다.

Q: 한 STD curve가 여러 개의 plate에 사용될 수 있을까?

한 plate에서 나온 STD curve는 그 plate의 sample 값을 구하는데 만 사용할 수 있습니다. 왜냐면 기술적인 오류나 배양/ 환경적 차이에 따라 plate-to-plate variability가 나타나기 때문입니다. 동일한 plate와 동일한 조건에서 실험된 경우에만 STD curve 사용 가능합니다.

Q: STD curve가 flat하거나 non-linear 한 경우 이유는?

STD curve가 flat하지 않게 하려면 ..

- Insert에 나온 대로 STD를 정확하게 희석한다.
- Insert에 다른 특별한 지시가 없다면 STD와 sample은 15~20분 사이에 넣어야 한다
- 정확한 파장과 wavelength correction을 이용하여 plate를 읽는다.
- Background가 높으면 점검을 한다.
- Plate가 정확히 washing 되도록 한다. 부적절한 washing은 flat STD curve 만들어낸다.
- 항상 insert에 나와있는 reading window이내에서 plate를 읽어야 하며 reading time이 경과 후 읽는 값은 오류가 있는 값을 나타낼 수 있다.
- STD 최고 농도가 plate reader의 최고 limit을 벗어난다면 STD를 정확하게 희석하고 incubation 시간과 온도를 정확하게 맞추어 준다.
- STD는 정확도를 위해 항상 duplicate로 진행한다. (single로 진행했을 경우 guarantee하지 않음)
- con 실험을 수행한다면 특정 농도 내에 있어야 한다.
- assay setup 이나 incubation 동안에 reagent가 오염되지 않도록 한다
- 매우 약하고 평탄한 STD curve의 경우 conjugate enzyme 이나 substrate가 적절하게 작용하지 않았을 것이다. (conjugate와 substrate를 소량씩 섞어서 반응시켜 봅니다.)
- luminometer에서의 한계 때문에 well A1과 A2 에서부터 낮은 농도로 STD 이용해 duplication으로 실험을 수행하는 것을 권장함

Edge Effect

Well의 가장자리와 안쪽에서 나타나는 분명한 차이로 주로 두 가지 요인에 의해 발생합니다.

Temperature

Q: 내가 어떤 조건에서 incubation 했느냐가 큰 문제가 됩니까?

YES! 일정하지 않은 상태에서 배양되면 edge effect가 나타날 수 있습니다. 항상 권장하는 온도를 유지하며 배양하는 것이 중요하며, 온도가 다양하게 변하는 장소에서 실험을 진행하지 않도록 하고 가능하다면 incubator 사용하여 배양하는 것이 좋습니다.

- 사용 전 reagent는 모두 상온에 (insert에 특별하게 없다면)

- 실험을 수행할 탁자의 온도를 관찰하여 curve가 내려간다면 탁자는 공기보다 차가운 것

Plate Sealers

Q: incubation이 거의 끝날 무렵 sealer가 떨어져 있는 것을 발견 하였다. 이것이 실험에 어떤 영향을 줄까?

Plate sealer를 잘 부착하지 않으면 edge effect가 발생할 수 있습니다. 바깥쪽에 sealer가 잘 부착되지 않으면 공기흐름, 온도변화, conjugate와 substrate 오염, reagent의 증발 등이 발생합니다. 따라서 항상 well의 가장자리까지 확실하게 sealer를 잘 붙여 놓는 것이 중요합니다.

Drift

Drift는 plate의 왼쪽에서 오른쪽으로 혹은, 아래에서 위쪽으로 뚜렷한 신호의 변화를 의미

Assay Set-up

Q: 실험 set up 시작 후 멈추게 (Interruption) 되었다. 이것이 결과에 어떤 영향을 미치게 될까?

Assay set up 중에 Interruption이 발생하면 plate에 drift가 발생 할 수 있습니다. Pipetting을 시작하기 전에 std/sample을 모두 만들어 놓아야 하고 15~20min 이내에 plate에 모두 분주해야 합니다. (아니면, insert에 나온 대로)

Q: multi-channel pipette?

Substrate나 conjugate, assay diluent를 넣을 때는 repeater나 multi-channel pipette을 사용합니다.

Reagents

Q: reagent를 warm up하지 않으면 어떻게 될까?

-차가운 시약은 well간의 온도변화를 가져와 plate에서의 signal variation을 나타냅니다. 시약은 항상 사용 전에 상온으로 맞추어야 하고 아니면 insert에 나와 있는 대로 따릅니다.

-각 실험은 표시되어 있는 incubation 시간과 온도에서 최적화 되어 있습니다. 차가운 시약은 incubation 시간을 길어지게 하므로 추천한 시간과 온도에서 벗어나게 됩니다.

Plate Sealers

Q: plate sealer 사용이 필요 할까요?

Insert를 따라야 합니다. 만약 assay protocol이 sealer 사용을 권하고 있다면 반드시 sealer를 꼭 꼭 눌러 가장자리까지 잘 붙여야 합니다. 만약 일정하게 붙지 않고 한쪽이 들리거나 떼어지면 다른 결과가 나타날 수 도 있습니다.

Read Time

Q: Luminometer의 setting이 결과에 어떤 영향을 미칠까?

chemiluminescent assays에서 2.0 sec/well 이상은 drift를 발생시킬 수 있다. 왜냐면 첫 번째 well

에서 마지막 well까지 시간이 길어 지기 때문이다. Substrate가 반응하는 동안 HRP는 더 이상의 substrate가 존재하지 않을 때까지 재사용 된다. 시간이 가면서 substrate가 줄어 들게 되고 빛의 양도 영향을 받게 된다. read time을 1.0 sec/well로 setting 한다.

Signal Development

Signal Development는 다양한 요소에 의해 영향을 줄 수 있습니다.

substrate, incubation, conjugate, substrate failure, wavelength, instrument

Substrate

Q: substrate preparation을 바꿔도 될까?

-만약 solution을 혼합해야 하는 경우라면 정확한 부피를 넣고 잘 섞어주어야 하며 Mixing 후에는 15분 이내에 사용해야 합니다. 만약 너무 일찍 섞어 버리면 용기에서부터 색이 나타날 가능성이 있습니다.

-만약 동결 건조되거나 tablet 상태라면 적절한 부피의 희석액을 넣고 완전하게 녹여주어야 합니다. (insert에 나와있는 희석액으로) 완전히 녹여서 insert에 나와있는 시간 이내에 사용합니다.

Q: pipetting하는 순서는?

시약들은 항상 같은 순서로 pipetting해야 한다.

-H.S assay의 경우는 amplification system을 사용하는데 Amplifier는 substrate를 넣고 incubation한 후 substrate를 넣었던 순서와 같게 넣어줍니다. 이후 plate를 잘 섞어 주어야 합니다.

Q: substrate가 오염되는 게 가능한가요?

가능 합니다. 만약 assay가 AP/HRP가 labeling 된 conjugate라면 assay 중에 오염되지 않도록 더욱 주의가 필요합니다. Substrate의 오염은 plate reader의 한계를 초과한 값을 나타낼 수 있습니다. metal이나 oxidizing reagents와의 접촉을 피하고 깨끗한 시약 용기를 사용하세요.

Q: substrate를 어두운 곳에서 보관해야만 하나요?

꼭 그렇지 않습니다. 하지만 substrate를 incubation 하는 동안 plate에 직사광선이 비치는 것은 피하는 것이 좋습니다. (암소에서 incubation)

Incubation

Q: incubation time을 바꿔도 될까요?

각각의 assay는 정해진 온도와 시간에서 최적화되어 있으므로 변경하면 signal이 많아지거나 줄어 들 수 있습니다. 만약 여러 개의 assay가 수행된다면 시간을 넘기거나 줄이는 것은 피하는 것이 좋습니다.

Q: 온도가 signal에 어떤 영향을 미칠까?

AP와 HRP는 온도에 예민한 효소이기 때문에 온도가 달라지면 OD나 relative light units (RLU)이

달라 질 수도 있다 . 환경 조건의 변화가 큰 장소에서의 incubation은 피하는 것이 좋습니다. (열이나 바람, 창틀 등의 온도와 빛의 영향이 큰 곳)

Q: Conjugate or Substrate Failure Testing

For colorimetric assays

동량의 conjugate와 substrate를 섞는다. HS의 경우 1분 후에 amplifier를 넣어준다.

→색깔이 바로 나타나야 하고 색이 나타나지 않으면 보관이 잘 되었는지 유효기간이 지나지는 않았는지 확인합니다.

For chemiluminescent assays

10ul의 conjugate와 190ul의 substrate를 섞은 후 luminometer를 이용하여 빛이 생성되는지를 확인합니다. 만약 빛이 생성되지 않는다면 component가 제대로 저장되었는지 오염되지 않았는지 유효기간이 지나지 않았는지를 확인합니다.

Wavelength

Q: wavelength correction을 사용해야만 하나요?

colorimetric assays의 경우는 plate의 optical imperfection을 수정하기 위해 사용해야 합니다. 보통 reference 파장을 설정하여 자동으로 correction을 진행 할 수 있습니다.

Q: wavelength correction이 지원되지 않는다면 어떻게 해야 할까?

Main 파장에서 읽고, reference 파장에서 읽어서 reference의 OD 값을 빼주면 된다.

Q: plate reader에 추천되는 correction 파장이 없으면 어떻게 해야 할까요?

추천하는 파장보다 높으면 가능 하지만 제품 별로 다를 수 있으니 이런 경우는 문의 후 실험을 진행하는 것이 좋습니다.

Q: 권장되는 메인 파장이 없는 경우 대체 가능할까?

메인 파장은 사용되는 substrate에 따라 달라지고 그것의 최종 색깔의 흡광도에 의해 결정됩니다. 항상 권장 하는 파 장을 사 용해야 하 고 만약 사용이 불가능 하 다면 최 대한 가 까운 파장 을 사용 하는 것이 좋습니다. 하지만 결과는 차이가 날 수 있습니다.

Instruments (for chemiluminescence)

Q: 왜 측정된 Relative Light Units (RLUs)이 kit insert에 나온 값과 차이가 있을까?

RLUs는 luminometer마다 차이가 큰 값을 보이는데 이는 light unit에 대한 standard가 없기 때문이며 따라서 **RLUs 값은 차이가 날 수 있습니다.**

-다른 luminometer를 사용한다면 제안되는 luminometer settings이나 equivalent settings을 사용

- Read within the suggested reading time window.

- Chemiluminescent assays는 동적이므로 멈추지 않는다 signal은 reading time window내에서 계속적으로 변화한다.

Mist.

Q: protocol을 따라 했는데 아무런 signal도 얻지 못했다 무엇이 문제일까?

*stop reagent 넣는 것을 빼먹었을 경우

→HRP 이용해 발색 실험을 하는 경우 stop solution이 substrate의 색을 바꿔주게 됩니다. 메인 파장이 이 색에 대하여 최적화 되어 있기 때문에 stop sol.을 꼭 사용해야 합니다.

*reagent를 잘 섞어 주지 않았을 때.

Well에 있는 reagent를 잘 섞어 주어야 합니다. Stop sol.을 넣었을 때 푸른색이 노란 색으로 바뀌는데 잘 섞이지 않으면 초록색으로 보이기도 합니다.

*reagent가 잘못된 순서로 넣어졌을 때.

*substrate를 넣고 washing을 한 경우

*STD curve의 serial dilutions에서 STD를 넣지 않은 경우

*만약 substrate가 두 개의 component로 되어 있을 경우 잘 섞이지 않아서

*plate reader가 적절하게 setting되지 않았을 때

*reagent, STD, sample을 잘 만들지 않았을 때

*reagent/STD/sample을 적절하게 넣지 않았을 때.

Q: high backgrounds (NSBs=blank)은 왜 생길까?

Incubation time이나 온도를 바꿔서

Washing을 적절하게 하지 않아서

Component가 오염되어서

실험 중 plate가 오염되어서

Plate sealer나 용기, pipette tip을 재사용하여 오염이 발생한 경우

이 guide는 R&D Systems의 ELISA GUIDE를 쉽게 보시도록 한글로 정리한 내용입니다.

문의 사항 있으시면 웅비메디텍 학술 마케팅 팀(031-776-3300/내선126)으로 연락 주세요.