

# 2014' ELISA Workshop

## ELISA의 개요



웅비메디텍  
학술마케팅팀 이지은

# 차례

1

ELISA란...

2

ELISA의 장점과 적용

3

방법에 따른 ELISA의 종류

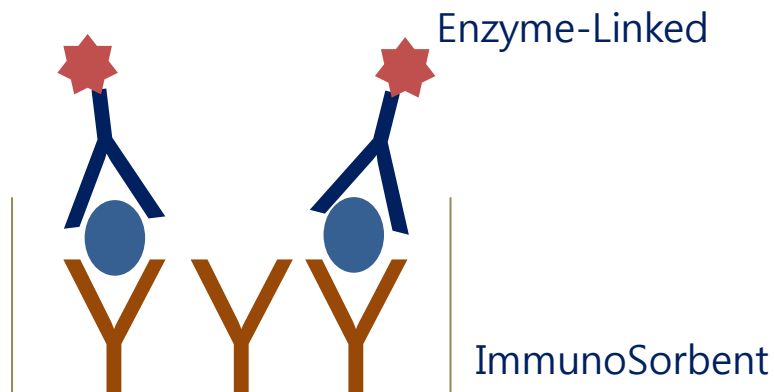
4

ELISA의 실험 과정과 구성

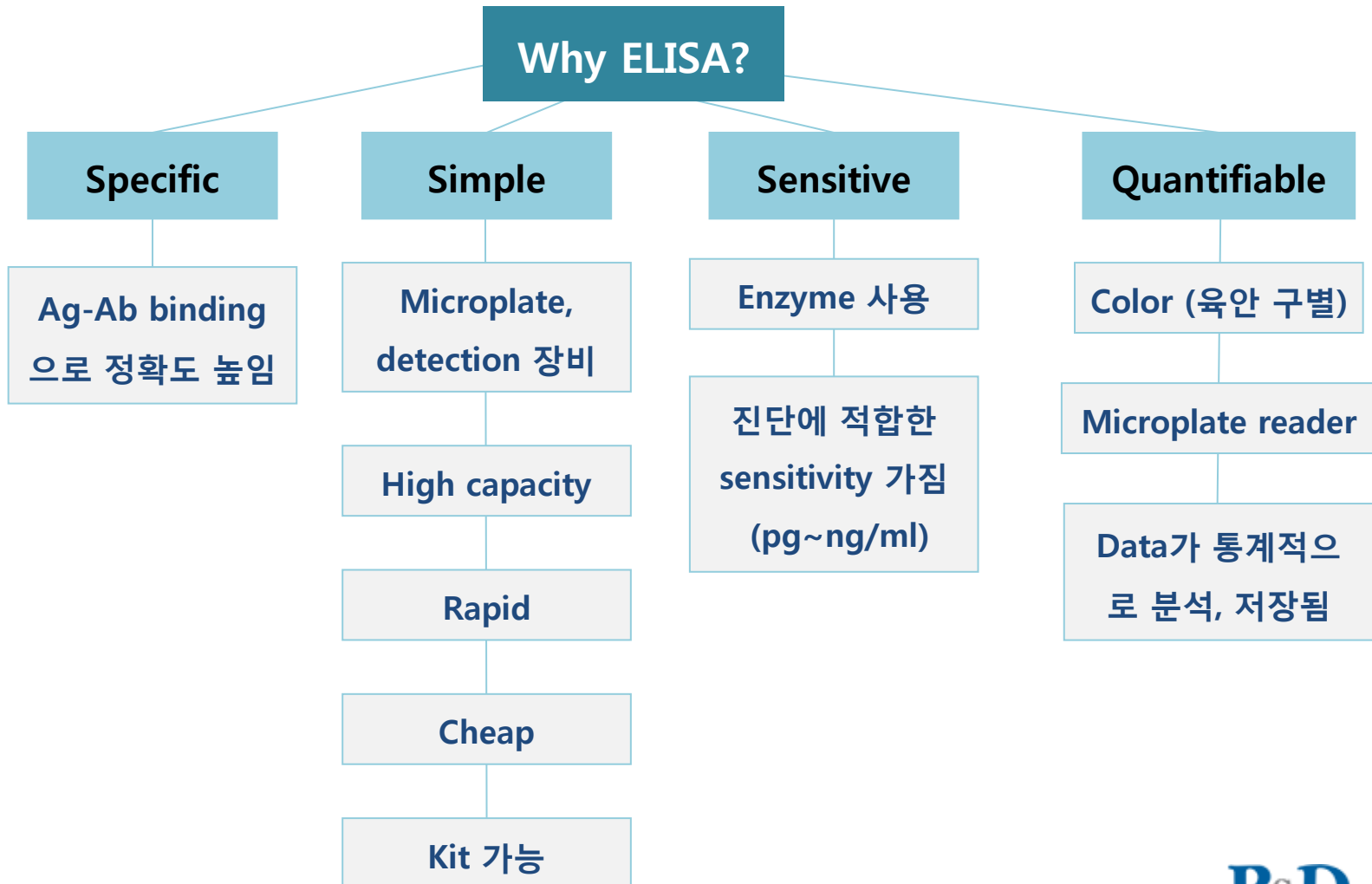
# ELISA란...

## ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

- 효소 결합 면역 흡착 분석법
- 항원-항체 특이적 결합 반응과 효소를 이용한 발색 반응으로 target을 정성, 정량 분석.



# ELISA의 장점



# ELISA의 적용

항체, 항원(cytokine, chemokine, growth factor) 정성, 정량하는 모든 곳

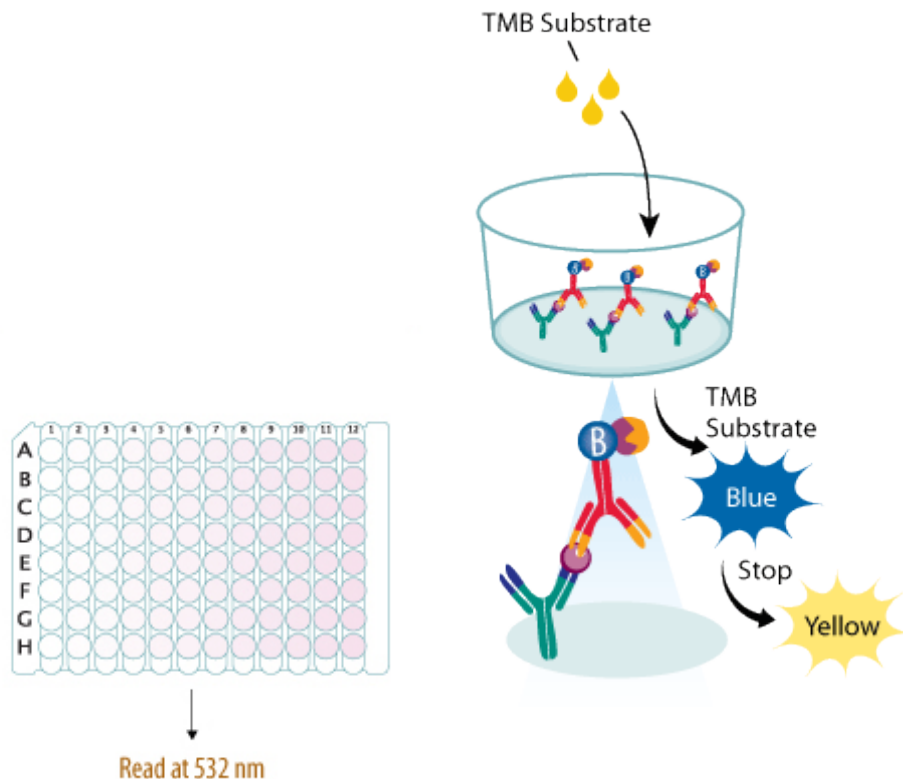
- **진단 분석** (virus, animal, human disease, food allergen..)
- **임상 연구** (toxicology, pharmacy..)
- **기초 연구** (immunology, cancer, neuroscience..)
- **Quality-control check** (food, drug industry..)
- Antibody screening



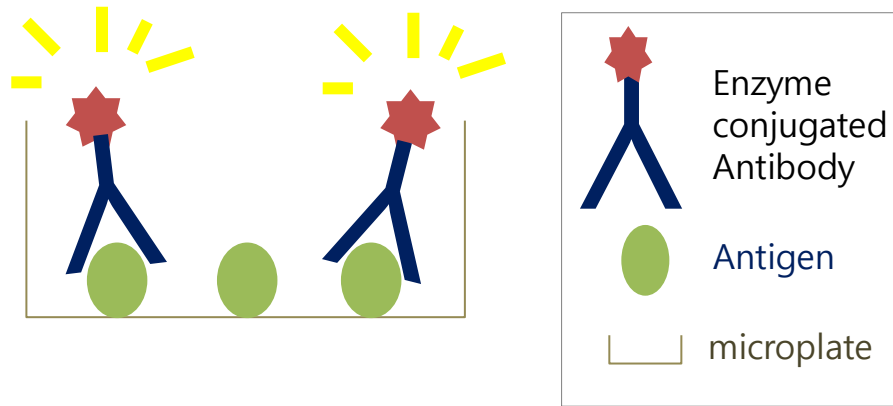
# ELISA의 종류

## 방법에 따른 ELISA 종류

- Direct ELISA
- Indirect ELISA
- **Sandwich ELISA**
- Competitive ELISA

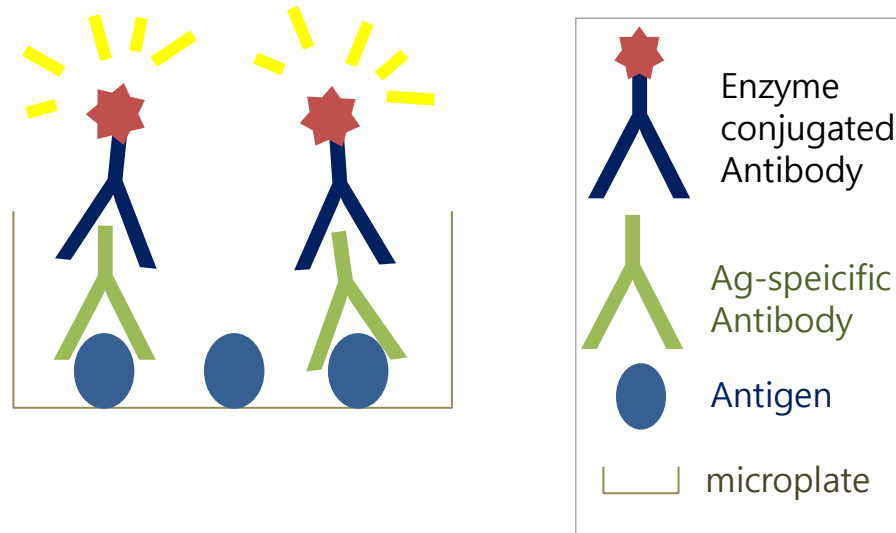


# ELISA의 종류- Direct ELISA



- Antibody 1종 → low sensitivity
- Antigen(sample) coating
- Sample 내의 antigen level 측정

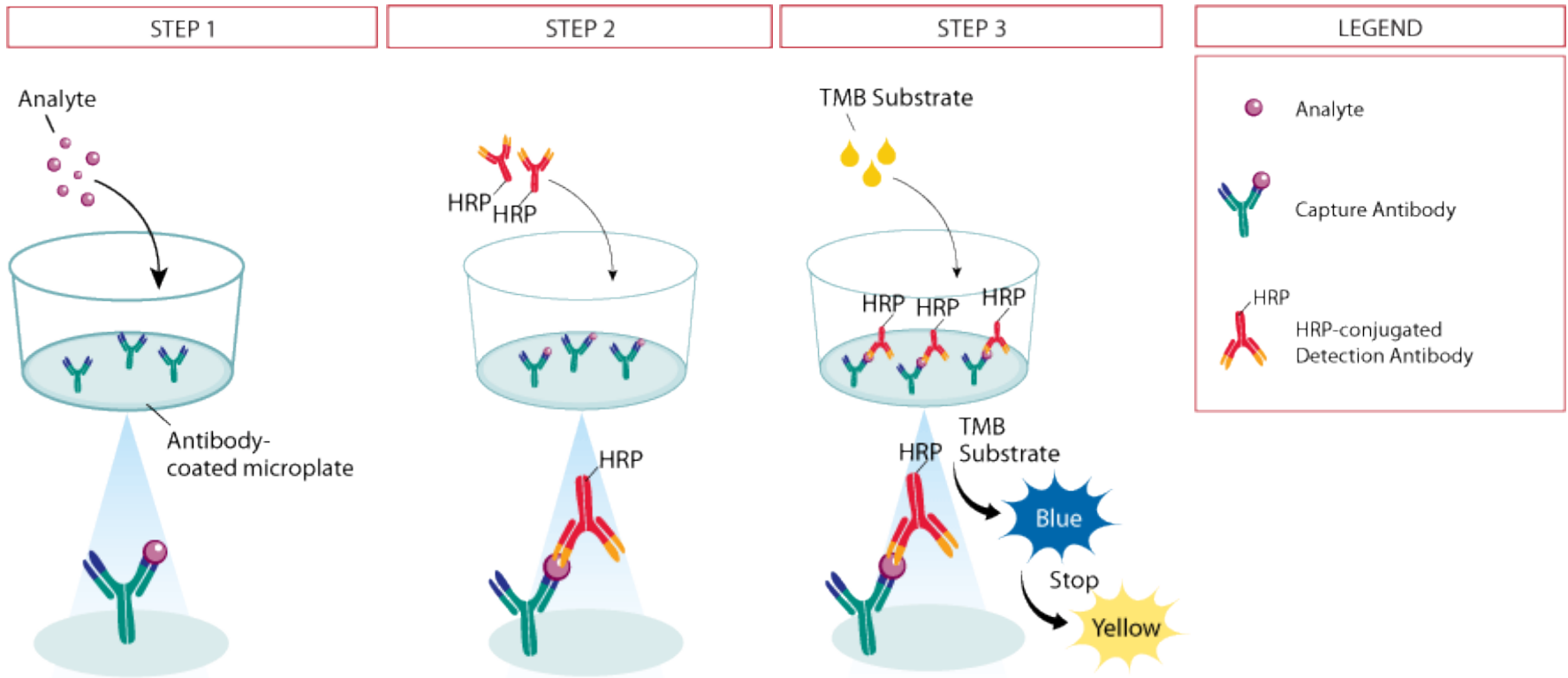
# ELISA의 종류- Indirect ELISA



- Antibody 2종
- Sample 내의 antibody level 측정  
(virus항체 생성 확인, 항체 신약)



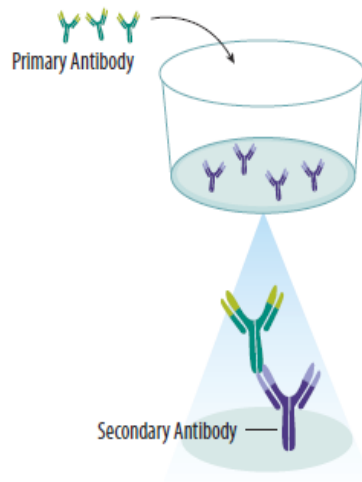
# ELISA의 종류- Sandwich ELISA



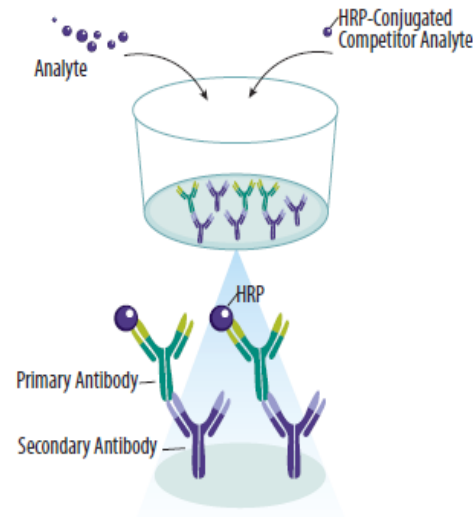
- **Sample 내의 antigen level 측정**  
(Ag level과 OD값 비례)
- **High specificity, Commercial ELISA kit**

# ELISA의 종류- Competitive ELISA

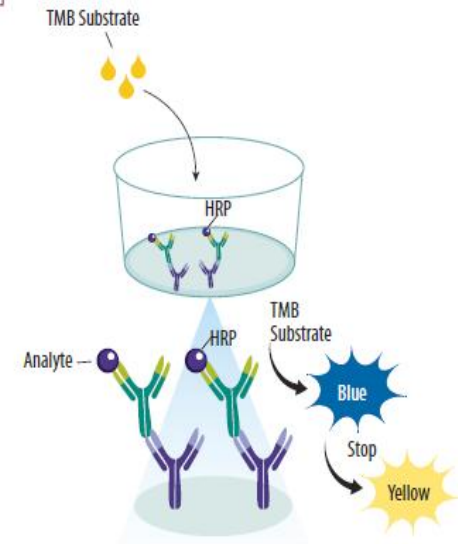
Step 1



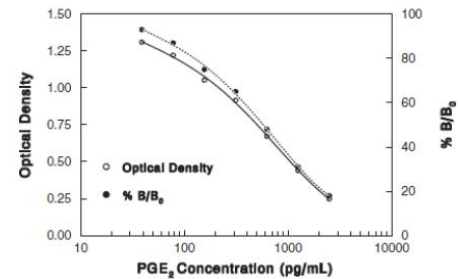
Step 2



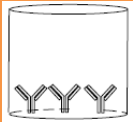
Step 3



- Small molecule level 측정
- Small molecule level과 OD값 반비례
- High specificity

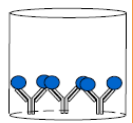


# ELISA 실험 과정- Sandwich ELISA



Capture Ab coating & Blocking

WASH



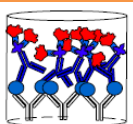
STD, sample incubation

WASH



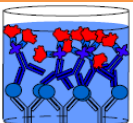
Biotinylated Detection Ab incubation

WASH



SA-HRP incubation

WASH



Substrate incubation



Stop & Detection

## Tip!

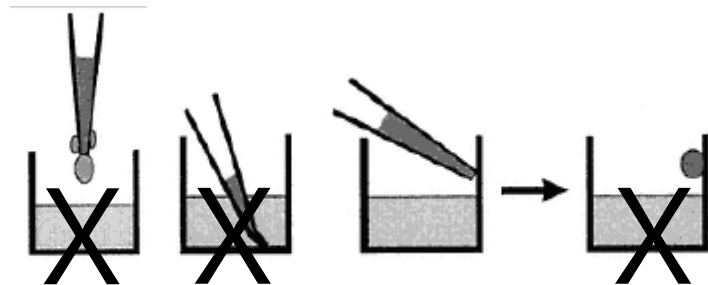
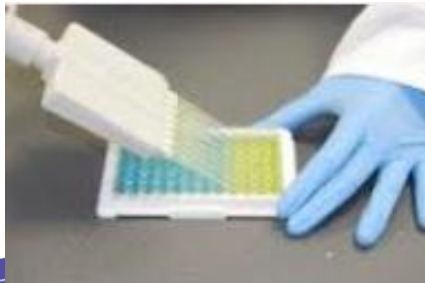
인서트의 주의사항을 꼭 지켜주세요

- Reagent 준비, incubation 시간, 온도..
- 실험 전 시약 warm up~
- pipette technique
- Contamination되지 않도록 주의
- Washing !!!

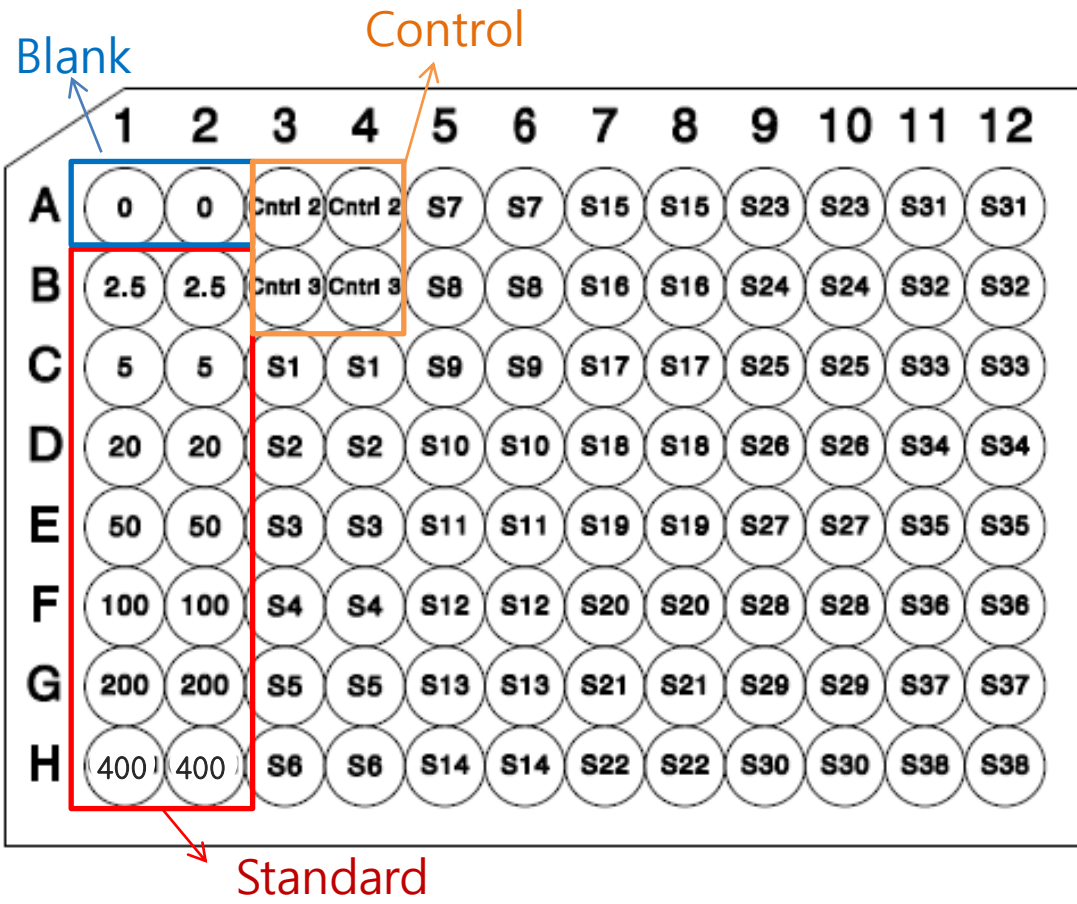
# ELISA assay – Pipetting tip

결과의 정확성과 재현성을 위해, pipette의 calibration과 정밀한 pipetting 기술이 필요

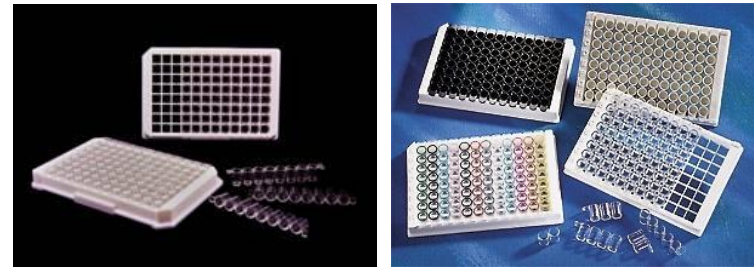
- Tip은 정확히 장착 (용액이 새거나 부피의 차이 방지)
- 일관적인 속도로 부드럽게 pipetting 진행
- **Contamination 주의** (sample/reagent 마다 tip 교체, reservoir 분리 사용)
- Pipette의 최소 volume 보다 낮게 사용하지 않아야 함
- Surface tension이 있는 용액은 tip을 **pre-rinse**하여 tip에 남는 것을 줄일 수 있음
- 점성 높은 경우, 용액이 **tip에 올라올 때까지** 기다릴 것
- **Air bubble**이 생기지 않도록 (천천히 drawing 하거나 tip을 교체)



# ELISA assay – Microplate



- Microplate: ELISA전용 (high binding)
- Coating되어 있는 microplate는 방습제와 함께 밀봉하여 보관
- 정확한 결과를 위해...
  - Duplicate
  - STD, blank, control은 필수
- 가능한 sample수량: 40 sample

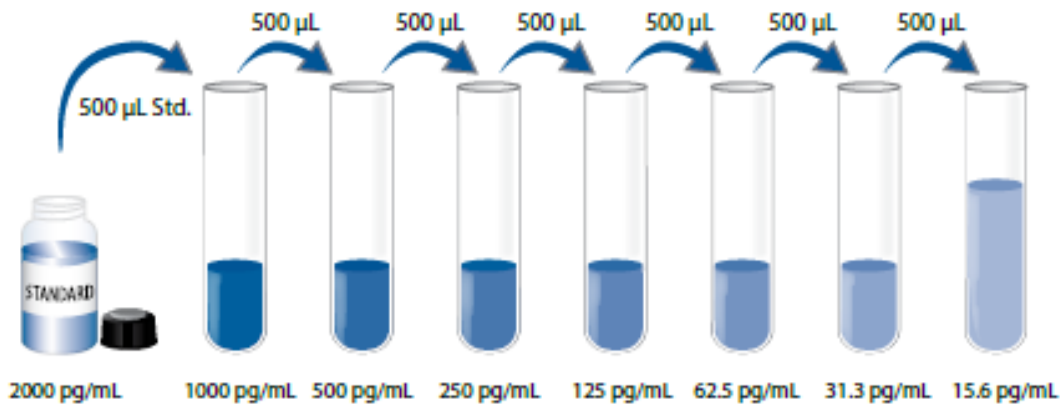
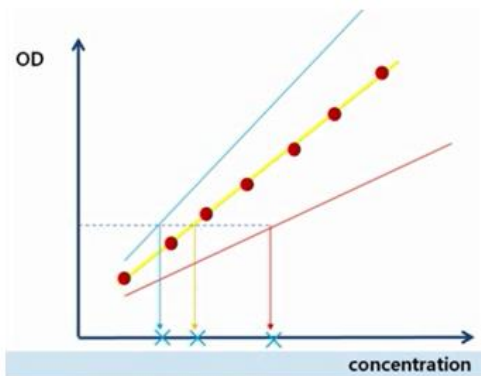


# ELISA assay- Standard

## Standard의 중요성 !!

Sample의 농도는 standard의 mass-value에 대한 O.D값과 sample의 O.D값을 비교하여 결정되므로 정확한 standard를 만드는 것이 중요.

➔ Control 사용 권장



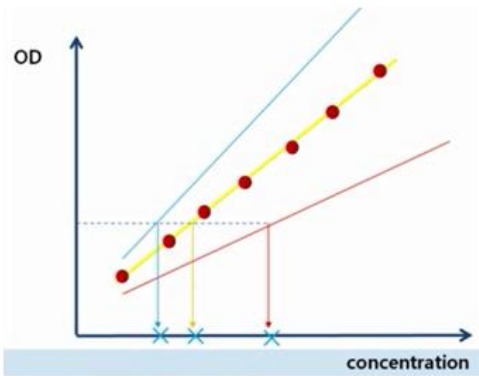
## Reconstitution

- 안내되어 있는 buffer 종류, 양 사용
- 약 15분간 rolling
- 이후 aliquot하여 적합한 농도에서 보관

## Serial Dilution

- 기본 7 point + blank
- Sample type에 맞는 diluent로 희석
- 각 단계마다 vortexing과 tip 교체

# ELISA assay- Control



## Control의 중요성!!

Standard curve와 sample 농도 측정의 정확도, 재현성 확인 목적

- negative control = blank
- positive control = 농도의 범위를 알고 있는 analyte  
= control set (high, medium, low)

### ▶ Control set

- high, medium, low 농도 recombinant protein
- 제시된 범위 안의 농도가 나오면 결과 정확성 보장
- 1회 사용 권장  
(저장 중 degradation될 수 있으므로)

### ▶ Control set가 필요한 경우,

- 정확한 검사 요구하는 곳 (진단검사분야, commercial lab, 검체의 양이 제한된 경우)
- Lot간의 재현성 확인해야 하는 경우
- Sample 내 analyte 농도가 detection range에 포함되는지 확인이 안되는 경우

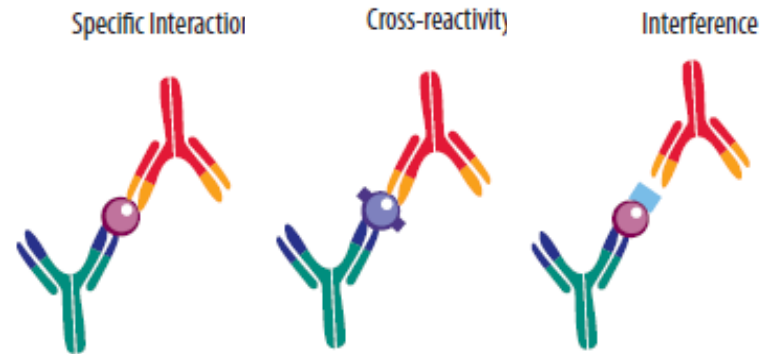


# ELISA assay- Antibody & Diluent

## Antibody

정확하고 높은 감도를 위하여

- High affinity
- High purity,
- High binding capacity

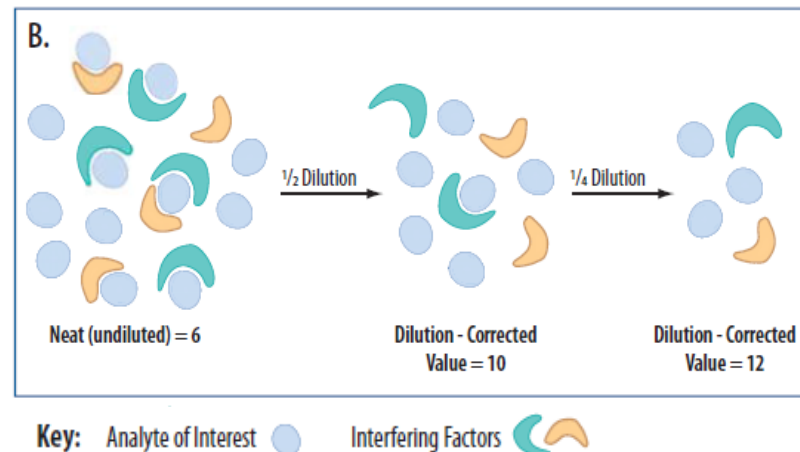


## Diluent

결과의 정확성과 유효성 위하여

- Diluent와 sample내 물질들이 binding하여 interference 생길 수 있음
- Sample type, analyte에 최적화된

**Specific diluent**





# ELISA assay- Washing

## Washing 시 주의 사항 !!!

→ insufficient washing으로 **background**와 **non-specific binding**이 늘어날 수 있음

- Wash buffer의 **volume(400ul)**과 **횟수**는 정확히 지켜야 함
- 30 sec soaking
- 권장되는 washing method

**squirt bottle > multipipette > autowasher**

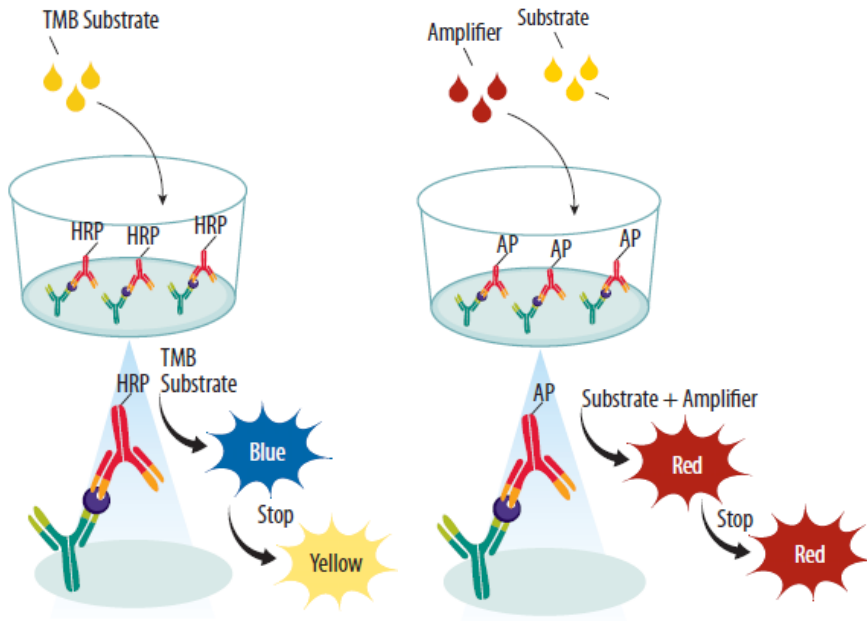


- **마지막 washing시 paper towel에 세게 털어 남아있는 물기가 없도록 함**
- washing 도중 well이 마르지 않도록 주의

# ELISA assay – Detection method

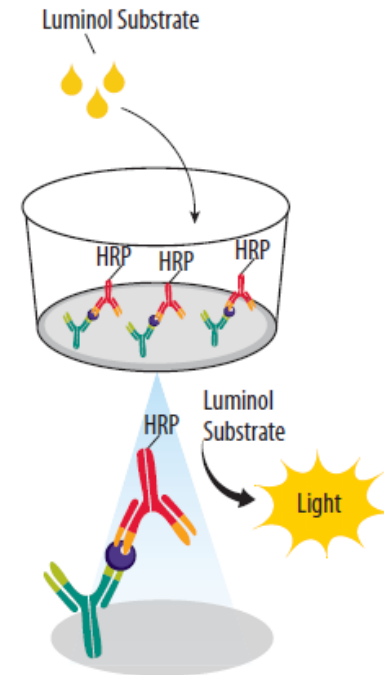
## Colorimetric assay

- HRP + TMB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Alkaline phosphatase + NADPH
- Stop solution 필요
- Microplate reader로 측정



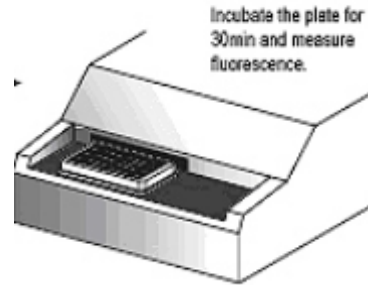
## Chemiluminescent assay

- HRP + Luminol
- Stop solution 필요 X
- Luminometer로 측정



# ELISA assay – Data analysis

- Microplate reader로 측정 (OD값, STD curve)  
프로그램에 설정 값과 농도 등을 알맞게 입력
  - wavelength: 450 nm
  - wavelength correction: 540 nm or 570 nm



**Protocol Definition**

General Information | Read Method | Template | Curve | Cutoffs | Reports

Read Method Type: Endpoint

Primary Wavelength (nm): 405

Reference Wavelength (nm): 630

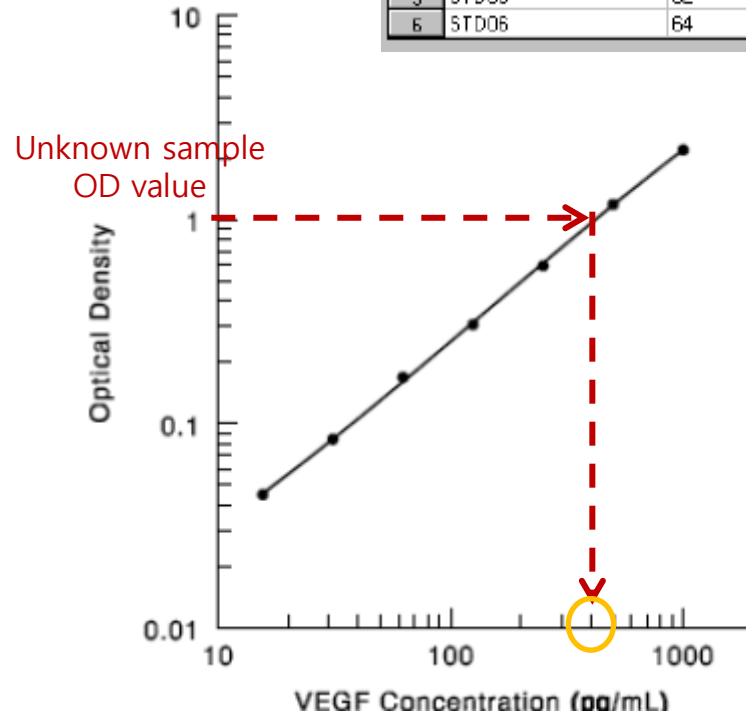
	STANDARD	CONC.
1	STD01	2
2	STD02	4
3	STD03	8
4	STD04	16
5	STD05	32
6	STD06	64

## Standard curve

- X: 농도, Y: OD 값
- X,Y scale: log or linear
- curve fit: 4-parameter

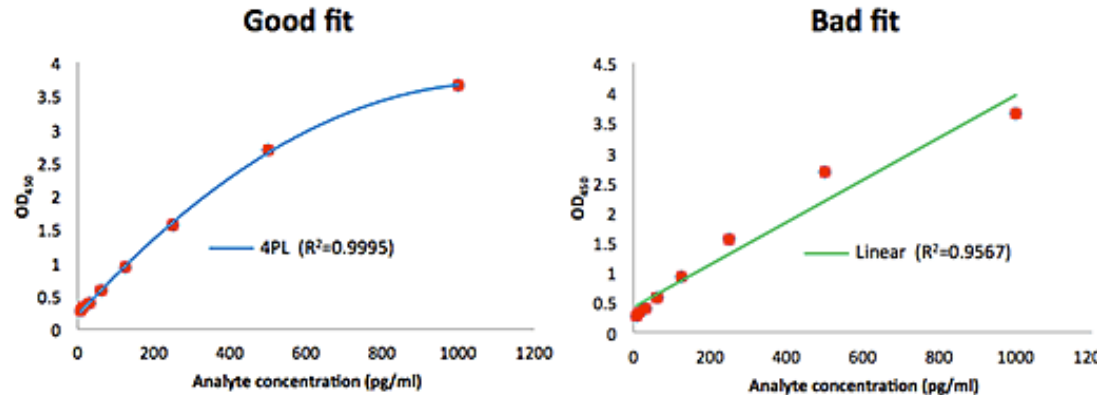
## Sample 농도 계산

- 그래프의 수식에 대입하여 sample의 농도를 구함
- Sample이 dilution되었다면, **dilution factor**를 곱해주어야 함



# ELISA assay – Data analysis

- Corrected 값 = 450 nm – 540/570 nm
- 결과 정확도
  - 측정된 OD 값의 CV < 10%
  - non-specific binding (blank) < 0.1 O.D
  - R<sup>2</sup> value = 0.99~1.0



(pg/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.074	0.075	—
	0.076		
	0.118		
15.6	0.121	0.120	0.045
	0.159		
31.2	0.159	0.159	0.084
	0.246		
62.5	0.242	0.244	0.169
	0.384		
125	0.378	0.381	0.306
	0.666		
250	0.669	0.668	0.593
	1.258		
500	1.263	1.260	1.185
	2.302		
1000	2.233	2.268	2.193

Sample	Intra-Assay Precision		
	1	2	3
n	20	20	20
Mean (pg/mL)	53.7	235	910
Standard deviation	3.6	10.6	46.2
CV (%)	6.7	4.5	5.1

# ELISA assay

## ELISA 달인이 알려준 5가지 Tip!

### Kit Insert

- 꼼꼼히 읽어보기
- Method는 insert대로
- 제품/lot에 따른 specific option주의

### Washing !!!!

- Squirt bottle, manifold washer, autowasher를 권장
- 용량과 횟수는 정확히
- Buffer는 완전히 제거 (세게 털어주세요)

### Reconstitution

- Pre-warming
- 제시된 용량과 buffer를 사용
- 충분히 녹이기
- Aliquot !!!
- 권장되는 온도에 보관

### Pipetting

- 정확한 용량 분주
- Contamination주의

### Data 측정

- Scale: X/Y축 – log, linear
- Curve fit: 4-parameter

감사합니다

# 2014' ELISA Workshop

성공적인 ELISA를 위한 길라잡이





# ELISA 사전 점검 사항

## ★ELISA 시작하기 전, 반드시 check 해 주세요★

1. Kit의 유효기간 확인 → 기한이 넘었다면 사용 불가능
2. Kit 구성품 저장 조건 확인
3. 실험 시작 전 kit 내 모든 시약 실온으로 warm up 시킨 후 assay 진행 (Insert 확인 요망)
4. Calibrator diluent와 assay diluent는 침전을 포함하는 경우가 있으므로 warm up 후 잘 섞은 뒤 사용
5. 침전이 없는 시약도 사용 전 균일함을 위해 잘 섞은 뒤 사용
6. Incubation 시간, 온도, 그리고 shaker 사양 (사용 권장하는 kit 해당) 정확하게 지키기
7. 다른 kit 또는 다른 lot의 kit로부터 시약 섞어서 사용하면 안됨
8. Standard 녹이고 섞을 때 최대한 거품이 나지 않도록 할 것





# ELISA 주요 Technique

## ELISA 결과를 결정 짓는 Wash

### ★최상의 결과를 위한 wash 꿀팁★

1. Wash 중 strip 빠질 수도 있으므로 실험 전 numbering 하기
2. Buffer를 넣은 뒤 약 10-15초 soak time을 갖기
3. Wash buffer 따라내고 깨끗한 paper towel 위에 plate 뒤집어 탁탁 털어주면서 남은 buffer 확실히 제거
4. Well이 마르지 않도록 다음 단계 진행 할 것
5. Buffer 넣고 따라내는 과정에서 well 안에 bubble이 생겼다면 확실히 제거
6. 진공 aspiration으로 buffer 제거하는 방법은 피할 것 (plate 뒤집어서 buffer 버려주세요.)



# ELISA 주요 Technique

## ELISA 결과를 결정 짓는 **Pipetting**

### ★최상의 결과를 위한 pipetting 꿀팁★

1. 모든 pipette은 적절하게 calibration이 되어 있어야 한다.
2. 모든 well에 일정한 volume을 넣는 것이 가장 중요하다.
3. Sample, reagent가 바뀔 때 마다 tip 교체
4. Tip에 달라붙는 성향을 가진 액체의 경우 이로 인해 생기는 부피 차이를 줄이기 위해 pre-rinse pipetting을 한다.
5. 액체 올리다 bubble이 생기면 다시 천천히 내렸다가 올리고, 그래도 생기면 tip 교체
6. 점도가 높은 reagent라면 천천히 올라올 때까지 기다리기



# ELISA 주요 Technique

## ELISA 결과를 결정 짓는 **Pipetting**

### ★ Pipette Calibration ★

- Pipette의 최소 volume에서 D.W. volume 측정 (10회 반복)  
→ **CV가 2% 이내**여야 함
- Pipette의 최대 volume에서 D.W. volume 측정 (10회 반복)  
→ **CV가 2% 이내**여야 함
- CV가 2-3% 이상일 경우 다시 처음부터 test 진행  
→ **CV 2-3% 이상이면 수리** 필요



# 무엇이든 물어보세요

- Q1. O.D. 값이 온도에 따라 영향을 받을수 있나요?
- Q2. Standard 농도를 임의로 조절 할 수 있나요?
- Q3. Reference 파장을 꼭 읽어야 하나요?
- Q4. 4-parameter 분석은 왜 하는거죠?
- Q5. Capture antibody vial이 비어 있어요!
- Q6. Standard와 blank의 적정 O.D. 값은?
- Q7. ELISA용 microplate 가 따로 있나요?
- Q8. Assay procedure을 임의로 조절 가능한가요?
- Q9. Insert에 언급되지 않은 sample type을 사용해도 될까요?
- Q10. 희석한 sample 농도는 어떻게 계산하나요?
- Q11. Wash buffer가 well에 너무 가득 차는데요?



# & Question Answer

Q1. O.D. 값이 온도에 따라 영향을 받을수 있나요?

A1. 네, 그렇습니다. 본사에서 권장하는 실온은 18-23°C 입니다. 급격한 온도의 변화가 있는 경우 O.D. 값이 높아지거나 낮아 질 수 있습니다.



# & Question Answer

Q2. Standard 농도를 임의로 조절 할 수 있나요?

A2. 모든 ELISA는 고유의 detection range와 sensitivity를 가지고 있으며, 해당 range 를 벗어난 standard curve는 정확하다고 말할 수 없습니다.



# & Question Answer

## Q3. Reference 파장을 꼭 읽어야 하나요?

A3. Reference 파장은 plate가 가지고 있는 고유의 흡광도 값을 측정하기 위해서 지정합니다. 메인 파장에서 plate에 의한 파장을 빼주기 위해 측정 하며, 보통 흡광도 값은 0.00xxx.. 으로 낮은 값입니다.

Plate reader에 reference 파장을 지정하게 되어 있는 경우에는 insert 에 안내 되어 있는 파장을 입력 하시면 됩니다. Reference 파장 선택 이 되지 않는 reader기를 사용 하신다면 메인 파장에서 측정한 값만 사용하셔도 결과에 크게 영향을 미치지 않습니다.



# & Question Answer

## Q4. 4-parameter 분석은 왜 하는거죠?

A4. Lot이 바뀔 때 진행 하는 QC test에서 가장 suitable하고 specific한 결과를 얻을 수 있는 방식이 통계분석을 통해 결과를 산출하는 4-parameter 분석이기에 추천 드리는 것 입니다. 이 분석은 보통 ELISA reader에 연결되어 있는 software에서 자동으로 분석이 됩니다.





# & Question Answer

Q5. Capture antibody vial이 비어 있어요!

A5. Antibody를 안정화 시키기 위하여 trehalose라는 당을 첨가하는 경우가 있습니다. 이 경우 antibody가 투명해져 빈 vial처럼 보이는데요, 본사에서 QC과정 통과한 제품이니 지정된 buffer 넣으시고 충분히 녹여주시기 바랍니다.



# & Question Answer

Q6. Standard와 blank의 적정 O.D. 값은?

A6. 가장 높은 농도의 standard O.D. 값은 1.0 이상 이며, blank의 O.D. 값은 가장 높은 O.D. 값의 10% 미만 이 적당합니다.



# & Question Answer

Q7. ELISA용 microplate 가 따로 있나요?

A7. 네, 그렇습니다. Immunoassay용 microplate를 사용하셔야 합니다.  
Cell culture용 microplate 바닥에는 cell 부착 관련 물질이 처리되어  
있기 때문에 capture antibody 코팅을 방해 할 수 있습니다.



# & Question Answer

Q8. Assay procedure을 임의로 조절 가능한가요?

A8. 모든 제품은 안내 하는 procedure 대로 실험 진행을 했을 때 가장 최적의 결과를 얻으실 수 있습니다. 또한 변화된 방법에 대해서는 guarantee를 하지 않으므로 학술지원에 제약이 있을 수 있습니다.



# & Question Answer

Q9. Insert에 언급되지 않은 sample type을 사용해도 될까요?

A9. 모든 ELISA kit는 insert에서 명시하고 있는 sample type에 대해서만 validation 되어있습니다. 이에 해당되지 않은 sample type은 test가 이루어 지지 않았기 때문에 실험 하시기 전 반드시 spike/recovery test (validation test)를 거쳐 validation 후 사용을 하셔야 합니다. 이와 관련된 protocol은 웅비메디텍 학술팀으로 문의해 주세요.



# & Question Answer

Q10. 희석한 sample 농도는 어떻게 계산하나요?

A10. Standard curve로 부터 계산 된 농도에 희석 배수를 곱해 줍니다.  
흡광도 값 (O.D. 값)이 아닌 계산이 된 농도 값에 곱해줘야 한다는 점  
잊지 마세요.



# & Question Answer

Q11. Wash buffer가 well에 너무 가득 차는데요?

A11. Well의 바닥 뿐 아니라 well의 벽까지 완벽하게 washing을 하기 위해 wash buffer를 가득 넣는 것입니다. 넘쳐도 신경쓰지 마시고 반드시 가득 넣어주세요.

감사합니다



# 2014' ELISA Workshop

## Troubleshooting





# Troubleshooting

★ Troubleshooting 전, 알아둬야 할 Check point

Substrate 첨가



Stop solution 첨가



Standard 농도별 O.D.

가장 높은 농도: **1.0 이상**  
Blank: 가장 높은 것의 **10% 미만**

농도 (pg/mL)	STD O.D.	
1	0.084	0.095
2	0.135	0.144
4	0.248	0.267
8	0.542	0.54
16	1.012	1.112
32	1.778	1.918
64	2.876	2.906
Blank	0.014	0.016



# Troubleshooting

## ELISA 결과를 결정 짓는 **Wash Technique**

### ★최상의 결과를 위한 wash 꿀팁★

1. Wash 중 strip 빠질 수도 있으므로 실험 전 numbering 하기
2. Buffer를 넣은 뒤 약 10-15초 soak time을 갖기
3. Wash buffer 따라내고 깨끗한 paper towel 위에 plate 뒤집어 탁탁 털어주면서 남은 buffer 확실히 제거
4. Well이 마르지 않도록 다음 단계 진행 할 것
5. Buffer 넣고 따라내는 과정에서 well 안에 bubble이 생겼다면 확실히 제거
6. 진공 aspiration으로 buffer 제거하는 방법은 피할 것 (plate 뒤집어서 buffer 버려주세요.)



# Troubleshooting

## ELISA 결과를 결정 짓는 **Wash Technique**

### R&D에서 추천하는 wash device 순위

#### 1. Squirt bottle ★ ★ ★

- 적절한 압력과 함께 buffer를 넣을 수 있다.
- Bubble 생기지 않게 유의 할 것



#### 2. Multi-channel pipette ★ ★

- Tip에 동일한 volume이 빨려 오는지 항상 확인 할 것
- 정확히 보정된 pipette 사용 할 것



#### 3. Auto washer ★

- Protocol 대로 buffer volume 및 횟수 지정할 것
- 마지막 wash 후 paper towel에 거꾸로 뒤집어 buffer 확실히 제거 할 것





# 자주 발생하는 문제

**Case 1.** Stop solution을 넣었는데, 투명해요

**Case 2.** Standard 농도별 변화 보이지 않고 전부 진해요

**Case 3.** Blank (only diluent) O.D. 값이 높아요. (High background)

**Case 4.** 전체적으로 O.D. 값이 낮아요

**Case 5.** Duplicate 사이 O.D. 값이 차이가 많이 나요

**Case 6.** Standard는 잘 나왔는데, sample은 예상치 못한 결과가 나왔어요

**Case 7.** Standard O.D. 값이 농도와 상관없는 경향을 보여요  
(Standard curve가 flat 또는 non-linear)



# Troubleshooting

## Case 1. Stop solution을 넣었는데, 투명해요

Conc. (pg/mL)	Standard O.D.	
12000	0.071	0.078
6000	0.006	0.085
3000	0.043	0.048
1500	0.032	0.04
750	0.024	0.022
375	0.022	0.026
187.5	0.009	0.021
Blank	0.007	0.007

### ✓ Substrate 확인

- Substrate 가 두 개의 시약을 섞어 사용 하는 경우 정확한 부피를 넣고 잘 섞어 주어야 한다.
- 섞은 후 15분 이내에 사용해야 한다.
- Substrate activity test: 동량의 conjugate 와 substrate를 섞었을 때 색이 바로 변하는지 확인 → 색이 바로 나타나야 한다.

### ✓ Standard reconstitution protocol 확인

- 정해진 buffer와 volume 확인
- 최대한 거품 피해 살살 굴러 15분간 녹임
- 1회 사용 용량 파악하여 aliquot

### ✓ Shaker 사용 하는 제품인 경우 사양 확인

- RPM과 orbit range를 반드시 확인

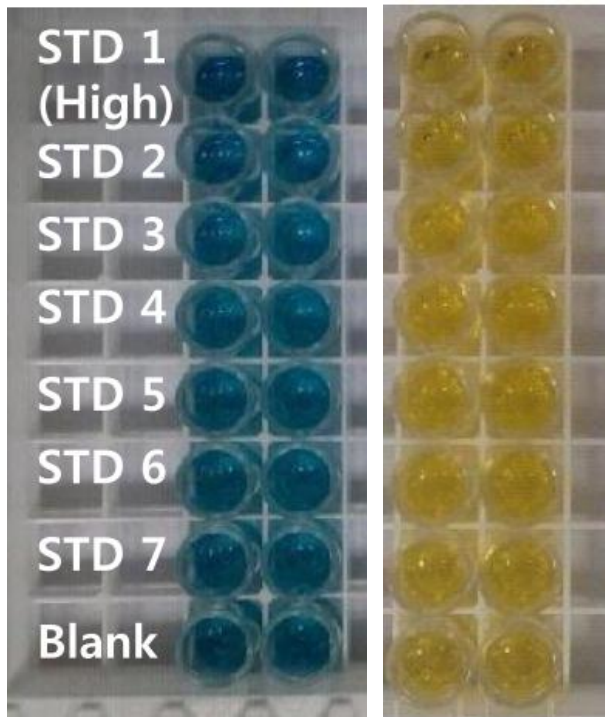
### ✓ Substrate 반응 후 wash 한 경우

- Substrate 반응 후 바로 stop solution 첨가



# Troubleshooting

## Case 2. Standard 농도별 변화 보이지 않고 전부 진해요



### ✓ Wash 확인

- Wash buffer 희석 한 D.W. 오염 확인
- 안내하는 volume 대로 well에 넣었는지 확인
- Well의 wash buffer 확실히 제거 했는지 확인
- Wash 과정 생략 후 다음 시약을 바로 넣지 않았는지 확인

### ✓ Contamination 확인

- D.W., diluent, substrate, pipette, tip 등 assay에 사용 된 시약 및 기구 오염 확인

### ✓ Standard serial dilution 확인

- Dilution시 농도 별로 tip 바꿔서 사용할 것

### ✓ Incubation 시간 및 온도 확인

- 제시한 incubation 시간을 정확하게 지킬 것
- 실온 (18-23°C) 보다 현저히 높거나 낮은 온도 피한다.



# Troubleshooting

## Case 3. Blank (only diluent) O.D. 값이 높아요.

가장 높은 농도 O.D. : **1.0 이상**

Blank O.D. : 가장 높은 것의 **10% 미만**

→ **Blank의 O.D. 값이 0.2 가까이 나오면**

**학술 상담 받아 보세요!**

### ✓ Wash 확인

- 안내하는 volume 대로 well에 넣었는지 확인
- Well의 wash buffer 확실히 제거 했는지 확인

### ✓ Contamination 확인

- D.W., diluent, substrate, pipette, tip 등 assay에 사용 된 시약 및 기구 오염 확인

### ✓ Pipette tip 교체하지 않고 재사용 했는지 확인

### ✓ Plate sealer 재사용 했는지 확인

### ✓ Incubation 시간, 온도 확인





# Troubleshooting

## Case 4. 전체적으로 O.D. 값이 낮아요

conc. (pg/mL)	Standard OD	
2000	0.558	0.571
1000	0.308	0.312
500	0.169	0.171
250	0.104	0.118
125	0.073	0.069
62.5	0.058	0.055
31.25	0.051	0.048
Blank	0.046	0.043

가장 높은 농도 O.D. : **1.0 이상**

- ✓ **Kit 유효기간 확인**
- ✓ **Substrate 확인**
  - Substrate 가 두 개의 시약을 섞어 사용 하는 경우 정확한 부피를 넣고 잘 섞어 주어야 한다.
  - 섞은 후 15분 이내에 사용해야 한다.
  - Substrate activity test: 동량의 conjugate 와 substrate를 섞었을 때 색이 바로 변하는지 확인 → 진한 청색이 바로 나타나야 한다.
- ✓ **Standard reconstitution 확인**
  - 정해진 buffer와 volume 확인
  - 최대한 거품 피해 살살 굴러 15분간 녹임
- ✓ **Shaker 사용 하는 제품인 경우 사양 확인**
  - RPM과 orbit range 맞춰서 사용
- ✓ **실험 전 모든 시약 및 실험실 온도는 실온**
  - 실온보다 낮은 온도는 낮은 signal의 원인



# Troubleshooting

## Case 5. Duplicate 사이 O.D. 값이 차이가 많이 나요

- ✓ 실험 전 모든 시약 warm up 확실히 할 것
- ✓ Well 에 넣는 wash buffer의 volume 확인
  - Wash buffer를 권장 volume 보다 적게 사용하면 well 간 variation이 발생
- ✓ 시약 넣을 때 well 내에 bubble 생겼는지 확인
  - 지나친 bubble은 시약의 reaction을 방해
- ✓ Pipette 적절한 calibration 확인
- ✓ Replicate 시약 넣기 전 충분히 mixing 할 것
- ✓ Capture antibody 직접 코팅 시 충분히 mixing 한 뒤 모든 well에 동일한 volume 첨가



# Troubleshooting

Case 6. Standard는 잘 나왔는데, sample은 예상치 못한 결과가 나왔어요.

- ✓ **Sample type 확인**
  - Validation 되지 않은 sample type인 경우 spike&recovery test (validation test) 후 실험 진행 → protocol은 웅비 학술팀에서 안내
- ✓ **Sample 내 target 단백질 정보 확인**
  - 선행 연구 결과 및 reference 확인
- ✓ **Out of range가 나온다면..**
  - 농도가 낮을 경우
    - ① 희석을 했다면 희석 배수를 낮춘다.
    - ② 희석 배수 조절해도 같은 상황이라면 감도가 높은 제품 사용 권장
  - 농도가 높을 경우
    - ① 적절한 diluent로 희석
- ✓ **Insert에 sample dilution이 추천되었을 경우**
  - Sample 내 matrix effects를 줄여주기 위하여 추천되는 경우가 있으므로 dilution 후 실험



# Troubleshooting

Case 7. Standard O.D. 값이 농도와 상관없는 경향을 보여요. (Standard curve가 flat 또는 non-linear)

- ✓ **Plate reader setting 확인**
  - 권장하는 파장 반드시 확인 할 것
- ✓ **Standard reconstitution 확인**
  - Insert에서 지시하는 buffer와 volume 확인
  - 최대한 거품 피해 살살 굴러 15분간 녹임
  - Aliquot하여 냉동보관 한 standard 녹여서 사용 한 뒤 재사용 금지
- ✓ **Standard serial dilution 확인**
  - Dilution시 농도 별로 tip 바뀌어서 사용할 것
- ✓ **Shaker 사용 하는 제품인 경우 사양 확인**
  - RPM과 orbit range를 반드시 확인
- ✓ **Pipette 적절한 calibration 확인**

감사합니다