

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube 실험 스케줄

Day-1 검체 전처리 과정

AM~ PM 2:00	Blood collection	<p>한 검체당 준비된 Nil/Antigen/Mitogen 3개의 tube에 1ml씩 채혈</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1ml의 눈금이 tube의 옆면에 검정색으로 표시되어 있다. - 오차허용범위 0.8~1.2ml - 채혈 후 즉시 tube의 벽면이 blood로 완전히 코팅될 수 있도록 강하게 흔들어준다 - 10번 가량 위아래로 흔들어주거나 5초간 거세게 shaking - 준비된 3개의 Tube에 환자의 이름을 표기한다.
----------------	------------------	---

PM 02:00 or 03:00	37°C incubation	<p>16~24시간 37°C incubation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tube는 세워서 incubation - 20시간 incubation 추천 - 16시간 이내에 반드시 37°C incubation - 검체 채혈 후 16시간 동안 반드시 상온에서 세워서 보관
----------------------	-----------------	--

Day-2 Plasma 검체 준비 및 IFN-gamma ELISA 검사 수행 과정

AM 9:00		<p>IFN-gamma ELISA Kit는 검사 수행 1시간 이전에 실온에 꺼내 놓는다.</p>
AM 10:00	Plasma 준비과정	<p>37°C incubator에서 검체를 반응시킨 tube를 꺼내어 1500~2000xg에서 5~15분 원심분리를 수행한다.</p> <p>원심분리를 수행하는 동안 96well plate 또는 e-tube를 준비하여</p>

각 검체의 이름을 표기한다.

예를 들어 1N/1A/1M, 2N/2A/2M ...

원심분리가 끝나면, gel위에 분리된 150~200ul의 plasma를 준비된 tube에 분주한다.

AM 10:30

Standard

- Standard 제조

conjugate

Standard bottle에 표기된 양 (lot별로 다름)의 D.W를 넣고

제조과정

microplate shaker에서 10분 shaking

- Conjugate 제조

300ul D.W (Lot상관없이 동일)를 넣고 microplate shaker에서 10분 shaking

- Standard serial dilution

Standard

① 4개의 e-tube 또는 test tube를 준비한다.

conjugate

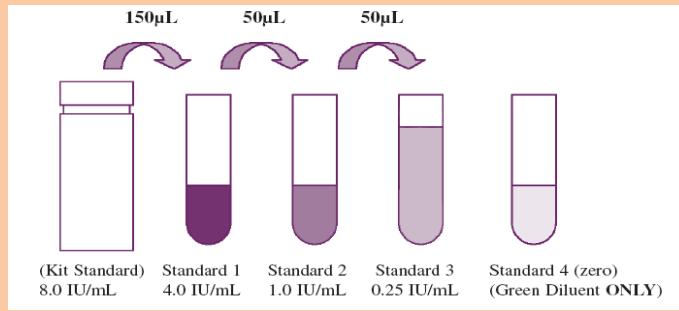
② 각각의 tube에 S1/S2/S3/S4 표기한다.

준비과정

③ 표기된 tube 각각에 150ul Green diluent를 넣는다.

④ 아래 그림처럼 차례로 S1으로 표기된 tube에 8.0 IU/ml stock sol. 150ul를 넣고 잘 섞어주고, S2 tube에 S1 50ul를 넣고 잘 섞어주고, S3 tube에 S2 50ul를 넣고 잘 섞어준다.

이때 S4는 zero standard로 아무것도 섞지 않은 Green diluents 이다.



- 1X Conjugate

사용할 strip 개수에 따라 아래 표를 참고하여 Green diluents로 100배 희석하여 사용한다.

100X Conjugate는 사용직후 냉장 보관한다.

NUMBER OF STRIPS	VOLUME OF CONJUGATE 100X CONCENTRATE	VOLUME OF GREEN DILUENT
2	10µL	1.0mL
3	15µL	1.5mL
4	20µL	2.0mL
5	25µL	2.5mL
6	30µL	3.0mL
7	35µL	3.5mL
8	40µL	4.0mL
9	45µL	4.5mL
10	50µL	5.0mL
11	55µL	5.5mL
12	60µL	6.0mL

AM 11:00

Conjugate

- Plate frame에 필요한 만큼 strip을 준비

Plasma sample

- 냉장 또는 냉동 보관된 plasma 검체를 사용할 경우

standard 분주

- vortexing을 통해 잘 섞어준다.

- 준비된 1X conjugate sol.을 well에 50ul씩 분주

- 50ul의 plasma sample을 well에 분주

- 50ul의 standard를 well에 분주

- Microplate shaker를 이용하여 1분 shaking 수행

AM 11:20

Incubation

2hr 실온 incubation

- AM 11:30~12:00 QFT 원리 및 실험 방법 등 프리젠테이션
- PM 12:00~01:00 점심 식사
- PM 01:00~01:20
 - 1X Washing sol. 준비

Strip number	20 X Wash buffer (ml)	D.W (ml)
1	2	38
2	4	76
3	6	114
5	10	190
7	14	266
9	18	342
10	19	361
11	21	399
12	23	437

- Autowasher기를 사용할 경우 incubation 끝나기 20분 전에 setting

-

PM 01:20 6회 Washing 각 well에 wash buffer 400ul 분주

- step마다 well의 물기를 타월에 두드려서 완전히 제거

PM 01:40 Substrate sol. 100ul substrate 분주

분주

- Microplate shaker를 이용하여 1분 shaking 수행
- substrate는 test tube에 필요한 만큼 덜어서 사용
- 사용 후 남은 substrate는 버린다.

PM 01:50 Incubation 30분 실온 Incubation

		<ul style="list-style-type: none"> - 빛이 차단된 서랍에 둔다. - QFT 프로그램 사용방법 설명 - ELISA Reader 준비
PM 02:20	Stop sol. 분주	50ul Stop sol. 분주 <ul style="list-style-type: none"> - 조심스럽게 tapping하여 섞는다.
PM 02:30	O.D값 Reading	5분 이내에 450nm/620nm 파장에서 reading
PM 02:40	결과 입력	QFT 프로그램을 사용하여 결과값입력 <ul style="list-style-type: none"> - 사용방법 다시 한번 숙지
PM 03:00	Interpretation	결과 보고 <ul style="list-style-type: none"> - Interpretation 방법 - Indeterminate의미 - 질의응답