QuantiFERON TB-Gold In-Tube

◆ Kit component

Tuberculosis and control antigen Blood collection Tubes:	Cat. No. 0590 0301
1. Nil control (Gray cap)	100 x tubes
2. TB Antigen (Red cap)	100 x tubes
3. Mitogen Control (Purple cap)	100 x tubes

◆ 검사 1단계 (Whole Blood Collection과 Incubation)

1. Blood collection

1) 한 환자당 3개의 tube에 각각 blood 1ml씩 채혈한다.
 - 1ml의 눈금이 tube의 옆면에 검은색으로 표시 돼 있다.
 - Butterfly needle을 사용할 경우는 **Purge tube**를 반드시 사용해야 한다.

2) 채혈 후 Tube의 벽면이 blood로 완전히 coating될 수 있도록 강하게 흔들어 준다.
 - 10번 가량 위아래로 흔들어 주거나, 5초 간 shaking을 해 준다.

3) Tube에 환자 이름을 적어 넣는다. 채혈 시간도 적어 넣는다.

4) 16시간 이내에 반드시 37 C incubator에 보관한다.
 - 16시간 동안 보관 시에는 반드시 상온 보관을 하여야 한다.

◆ 일단 Blood가 collection되면 Tube는 반드시 16시간 이내에 37 C Incubator로 옮겨져야 한다.

2. Incubating Tubes and Harvesting Plasma

1) 만약, 채혈 후 바로 37 C Incubation에 들어가지 않으면, 37 C incubation에 들어가기 전에 충분히 Mixing을 더 해 준다.

2) 37 C에서 Tube를 세워서 16~24시간 동안 Incubation을 해 준다.
 - Incubator는 CO_2, Humidity를 필요로 하지 않는다.

3) 37 C Incubation이 끝나고 1500~2000 g에서 5~15분간 centrifuge 해 준다.
 - Gel plug들이 cell과 plasma를 분리 해 준다.
 - 위의 step을 바로 실행 할 수 없을 시에는, Tube를 Centrifuge는 하지 말고 2 C~27 C사이에서 3일 동안 보관이 가능하다

4) plasma를 따서 보관 or 실험 한다.

◆ Tube에서 분리된 Plasma sample은 2 C~8 C에서는 4주간 보관 가능.
 - 20 C이하에서는 그 보다 더 오래 보관이 가능하다.

Tel: 031-776-3300/Fax: 031-776-3303 (주)웅비메디텍 WOONGBEE MeDiTech, Inc. woongbee@woongbee.com

◆ Kit component

ELISA components : Cat. No. 0594 0201	
1. Microplate strips	24 x 8 well
2. Human IFN−r standard, lyophilized	1 x vial
3. Green diluent	1 x 30 ml
4. Conjugate 100 X concentrate, lyophilized	1 x 0.3 ml
5. Washer buffer 20 X concentrate	1 x 100 ml
6. Enzyme substrate solution	1 x 30 ml
7. Enzyme stopping solution	1 x 15 ml

◆ 검사 2단계를 위한 준비 사항.

1. IFN−gamma standard 제조

1) Standard bottle에 적절한 양(standard lable에 표기되어 있음)의 D.W를 넣는다.
(제조된 8.0 IU/ml standard는 2−8°C에서 3개월간 보관 가능)

↓

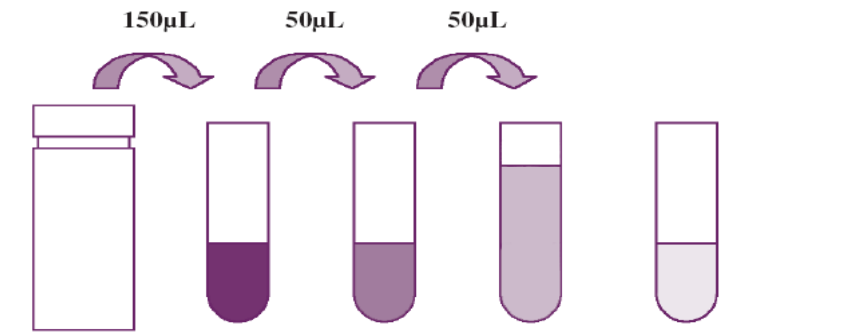
2) Shaking plate에 10분 가량 둔다.

↓

2) 4개의 E−tube를 준비하고 각각의 tube에 150ul의 **Green Diluent**를 넣는다.

↓

3) 그림처럼 차례로 150ul, 50ul, 50ul를 각 tube에 넣어서 4개의 standard로 만들어 사용한다.



(Kit Standard) 8.0 IU/mL | Standard 1 4.0 IU/mL | Standard 2 1.0 IU/mL | Standard 3 0.25 IU/mL | Standard 4 (zero) (Green Diluent ONLY)

2. Conjugate 제조

1) Conjugate bottle에 300ul의 D.W를 넣는다.

↓

2) Microplate shaker에 10분 가량 둔다.

↓

3) 사용시마다 아래 표를 참고로 하여 100배 희석해 사용한다.

(reconstitution된 conjugate은 6시간이전에 사용하도록 한다.)

↓

4) Conjugate 100X Concentrate는 사용직후 냉장 보관

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

3. 1X Washing buffer 제조

1)아래의 table 조성을 참고하여 D.W로 희석한다.

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

◆ 검사 2단계 (IFN-gamma ELISA)

1) Incubaton이 끝난 plate를 clean bench로 옮기고 150~200ul 혈장을 취해 96 well plate에 옮긴다. (4주(2-8°C), 3개월(-20°C이하)보관 가능)

주의) 적혈구가 같이 따라 올라오면 spin down을 실시한다.

↓

2) 사용 전 sample을 Mixing한다.
(분비된 IFN-gamma가 골고루 퍼지도록 하기 위해)

↓

3) 50ul의 Conjugate sol.을 well 분주.

↓

4) 50ul의 sample을 well에 분주. (아래 표 참조)

Row	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	S1	S1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
B	2N	2A	2M	S2	S2	S2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
C	3N	3A	3M	S3	S3	S3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
D	4N	4A	4M	S4	S4	S4	16N	16A	16M	24N	24A	24M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17A	17M	25N	25A	25M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

5) 50ul의 standard를 well에 분주.

↓

6) microplate shaker를 이용하여 골고루 섞은 후 2시간 동안 실온 Incubation.

↓

7) 6회 wash (350ul의 wash buffer)
step 마다 well의 물기를 타월에 두드려서 완전히 제거

↓

8) 100ul의 Substrate 분주.
(substrate은 반드시 덜어서 사용)

↓

9) 빛 차단, 실온에서 30분 incubation

↓

10) 50ul의 Stop solution 분주.
(조심스럽게 tapping하여 잘 섞는다.)

↓

11) 5분 이내에 450nm/620nm 파장 에서 reading