

QFT-Gold In-Tube

검사 1단계 (Whole Blood Collection과 Incubation)

Blood collection

1) 한 환자당 3개의 tube에 각각 blood 1ml 씩 채혈한다.

- ⇒ 1ml의 눈금이 tube의 옆면에 검은색으로 표시 되어 있다.
- ⇒ Blood 채혈 시 0.8~1.2ml의 오차 범위는 허용할 수 있습니다.
- ⇒ Butterfly needle을 사용할 경우는 **Purge tube**를 반드시 사용해야 한다.

2) 채혈 후 Tube의 벽면이 blood로 완전히 coating될 수 있도록 충분히 흔들어 준다.

- ⇒ 이 과정은 매우 중요한 과정입니다. **Tube**표면에 항원이 코팅이 되어 있으므로 채혈한 **blood**가 완전히 잘 섞일 수 있도록 충분히 **10회 이상** 위 아래로 흔들어 줍니다. (동영상 참고)

- 10번 가량 위아래로 흔들어 주거나, 5초간 shaking을 해 준다.

3) Tube에 환자 이름을 적어 넣는다.

- ⇒ 16시간 동안 보관 시에는 반드시 **상온 보관**을 하여야 한다.

4) 16시간 이내에 반드시 37`C incubator에 보관한다.

- ⇒ 일단 **Blood**가 **collection**되면 **Tube**는 반드시 **16시간 이내**에 **37`C Incubator**로 옮겨 져야 한다.

Incubating Tubes and Harvesting Plasma.

1) 37`C에서 Tube를 세워서 16~24시간 동안 Incubation을 해 준다.

2) 37`C Incubation이 끝나고 1500~2000g에서 5~15분간 centrifuge 해 준다.

3) Incubation이 끝난 Tube를 clean bench로 옮기고 150~200ul 혈장을 취해 96 well plate에 옮긴다. plasma를 따서 보관 or 실험 한다.

☞ 만약, 채혈 후 바로 **37`C Incubation**에 들어가지 않으면, **37`C incubation**에 들어가기 전에 충분히 **Mixing**을 더 해 준 다음 세워서 **incubation**합니다.

☞ Incubator는 CO₂, Humidity를 필요로 하지 않는다
☞ 이 과정은 CMI원리에 의해 IFN-gamma를 분비하는 가장 중요한 과정으로 웅비에서는 20시간의 incubation을 추천합니다.
☞ 만약 24시간 이상이 넘을 경우 memory cell에 의한 IFN-gamma가 분비되어 false positive를 초래할 수 있습니다.

☞ Gel plug들이 cell과 plasma를 분리 해 준다.
☞ 위의 step을 바로 실행 할 수 없을 시에는, **Centrifuge**을 수행하지 않고 Tube를 2`C~27`C사이에서 3일 동안 보관할 수 있다.

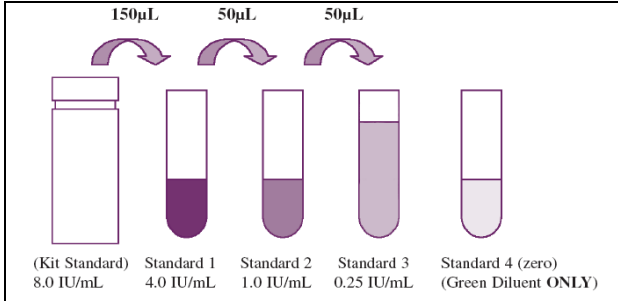
☞ Tube에서 분리된 **Plasma sample**은 2`C~8`C에서는 **28**일, -20`C이하에서는 **3**달 보관 가능하다. 냉동보관 시 **fibrin clot**을 형성할 수 있으니 **28**일 이전에 검사를 수행하실 경우에는 냉장 보관을 권장한다. 그리고, 만약 **fibrin clot**을 형성되었다면, **centrifuge**를 수행한 후 위에 상층 액만을 취하여 사용할 수 있다

검사 2단계 (Human IFN-gamma ELISA)

- ☞ 검사를 수행하기 전에 conjugate를 제외한 ELISA kit을 1시간 이전에 상온에 꺼내 둔다.
- ☞ ELISA를 수행하기 전 IFN-gamma standard, 1x conjugate 및 1x wash buffer, 검체를 준비한다.

IFN-gamma standard 제조

- 1) Standard bottle에 적절한 양(standard lable에 표기되어 있음)의 D.W를 넣는다.
- 2) Shaking plate에 10분 가량 둔다.
- 3) 4개의 E-tube를 준비하고 각각의 tube에 150ul의 Green Diluent를 넣는다.
- 4) 그림처럼 차례로 150ul, 50ul, 50ul를 각 tube에 넣어서 4개의 standard로 만들어 사용한다.



☞ 제조된 8.0 IU/ml standard는 2-8°C에서 3개월간 보관 가능

☞ Green Diluent가 차가울 경우 낮은 O.D값을 초래할 수 있다. 사용 전에 손으로 몇 번 쥐어준 다음 시약의 온도가 체온과 비슷하면 사용한다.

☞ 4개의 test tube를 준비하여 S1,S2, S3, S4 로 표기하고, 각각의 tube에 150ul의 green diluent를 분주한다. 그리고, 제조된 8.0IU/ml standard 150ul을 취하여 S1 tube에 섞은 후 vortexing하고 50ul을 취하여 S2 tube에 섞고, vortexing하고, 50ul를 취하여 S3 tube에 섞은 후 vortexing 한다.serial dilution시 매번 tip을 교체한다.

Conjugate 제조

- 1) Conjugate bottle에 300ul의 D.W를 넣는다.

<p>2) Microplate shaker에 10분 가량 둔다.</p> <p>3) 사용시마다 아래 표를 참고로 하여 100X로 희석하여 사용한다.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ☞ 제조시 거품이 생기지 않게 inverting 하여 섞어준다. ☞ reconstitution된 conjugate은 6시간이전에 사용하도록 한다. ☞ Conjugate 100X Concentrate는 사용직후 냉장 보관한다.
1X Washing buffer 제조	
<p>1) 아래의 table 조성을 참고하여 D.W로 희석한다.</p>	

▶ **Conjugate** 제조

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

▶ **Wash buffer** 제조

Strip number	20 X Wash buffer (ml)	D.W (ml)
1	2	38
2	4	78
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) microplate를 개봉하여 검사할 검체 수를 계산하여 strip을 준비한다.

☞ 실험을 시작하기 전에 standard, conjugate, wash buffer를 준비하고, 검사할 검체의 plasma를 준비한다.

2) 사용 전 sample을 Mixing한다.

☞ 분비된 IFN-gamma가 골고루 퍼지도록 하기 위해 준비된 plasma를 섞어준다

3) 50ul의 Conjugate sol.을 well 분주.

☞ **꼭!! conjugate → sample → standard** 순서대로 처리한다.

4) 50ul의 sample을 well에 분주.

5) 50ul의 standard를 well에 분주.

6) microplate shaker를 이용하여 1~2분 골고루 섞은 후 2시간 동안 실온 Incubation.

7) 6회 wash

☞ manual wash 경우, 350ul wash buffer 첨가하고, Autowasher machine을 사용할 경우 400ul wash buffer를 첨가하여 washing을 수행한다.

☞ **wash는 6회를 꼭 지켜준다.**

6회 이상의 wash는 영향을 미치지 않으나, 6회 이하의 wash는 O.D값에 영향을 미칠 수 있다.

☞ ELISA과정 중 가장 중요한 과정으로, step마다 well의 물기를 타월에 두드려서 완전히 제거한다. **특히 마지막 wash 후에는 물기 제거를 확실히 한 후 그 다음과정을 수행한다.**

8) 100ul의 Substrate 분주.

☞ **substrate는 반드시 떨어져 사용한다.**

9) 빛 차단, 실온에서 30분 incubation

10) 50ul의 Stop solution 분주.

11) 5분 이내에 450nm/620nm 파장에서 reading

☞ 잘 섞이도록 tapping한다