임상검사기기학 및 기초통계

중원대학교 임상병리학과

홍석현

Lecture 실습.
계대희석

• 실험 농도 계산: 검체 및 용액의 희석법

1. 농축(Concentrated) : 용매를 제거해 용질의 농도를 높이는 것

2. 희석(Dilution) : 용매를 더해 용질의 농도를 낮추는 것

3. 계대희석법 (Serial dilution)

- 동일 시료를 필요한 희석단계의 수만큼 시험관을 준비하여 같은 량의 희석액을 넣고, 시료를 첫 시험관에 가하여 연속적으로 희석하는 방법

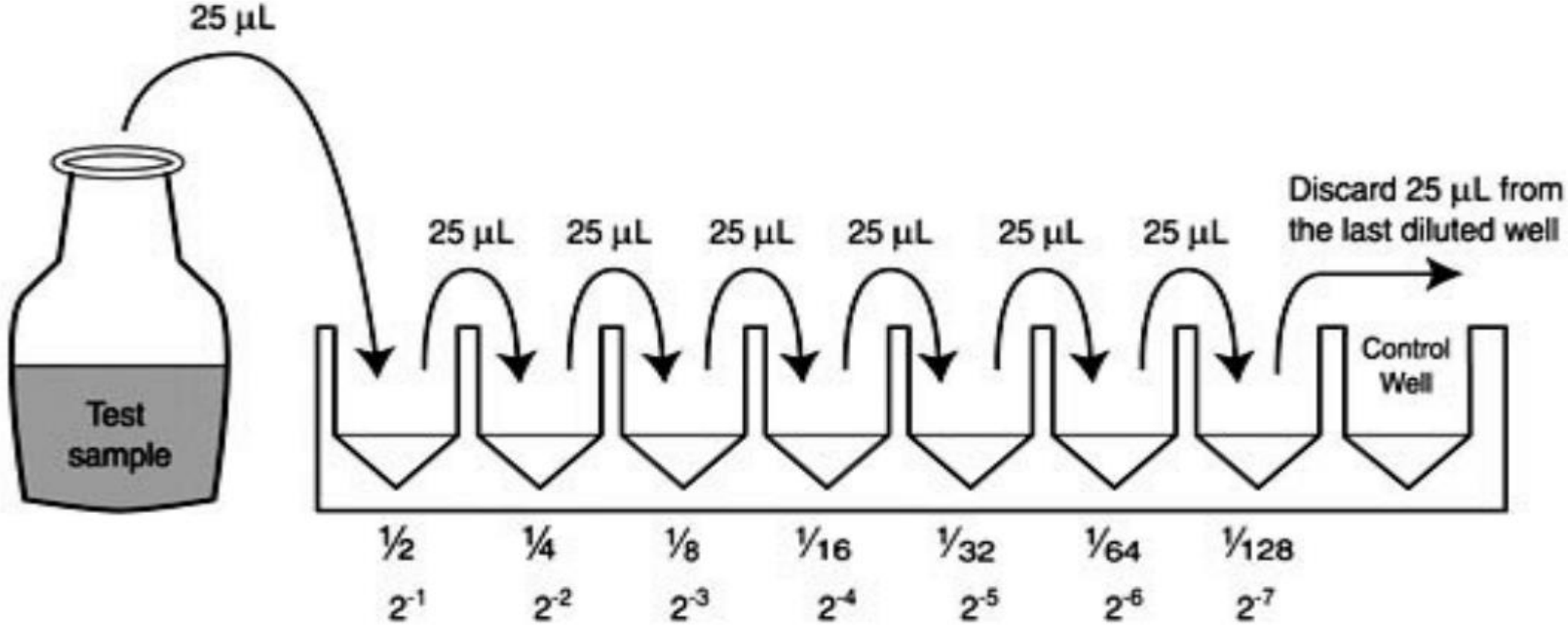
- **<u>검량곡선을 그리기 위함</u>**

$$\text{희석률계산법} = \frac{\text{최종액량}}{\text{원액량}}$$

• 실험 농도 계산: 계대희석법

- 동일 시료를 필요한 희석단계의 수만큼 시험관을 준비하여 같은 량의 희석액을 넣고, 시료를 첫 시험관에 가하여 연속적으로 희석하는 방법

  - 계열희석법 (Serial dilution)



• 실험 농도 계산: 표준곡선 그리기

계대희석법 – Standard curve 작성

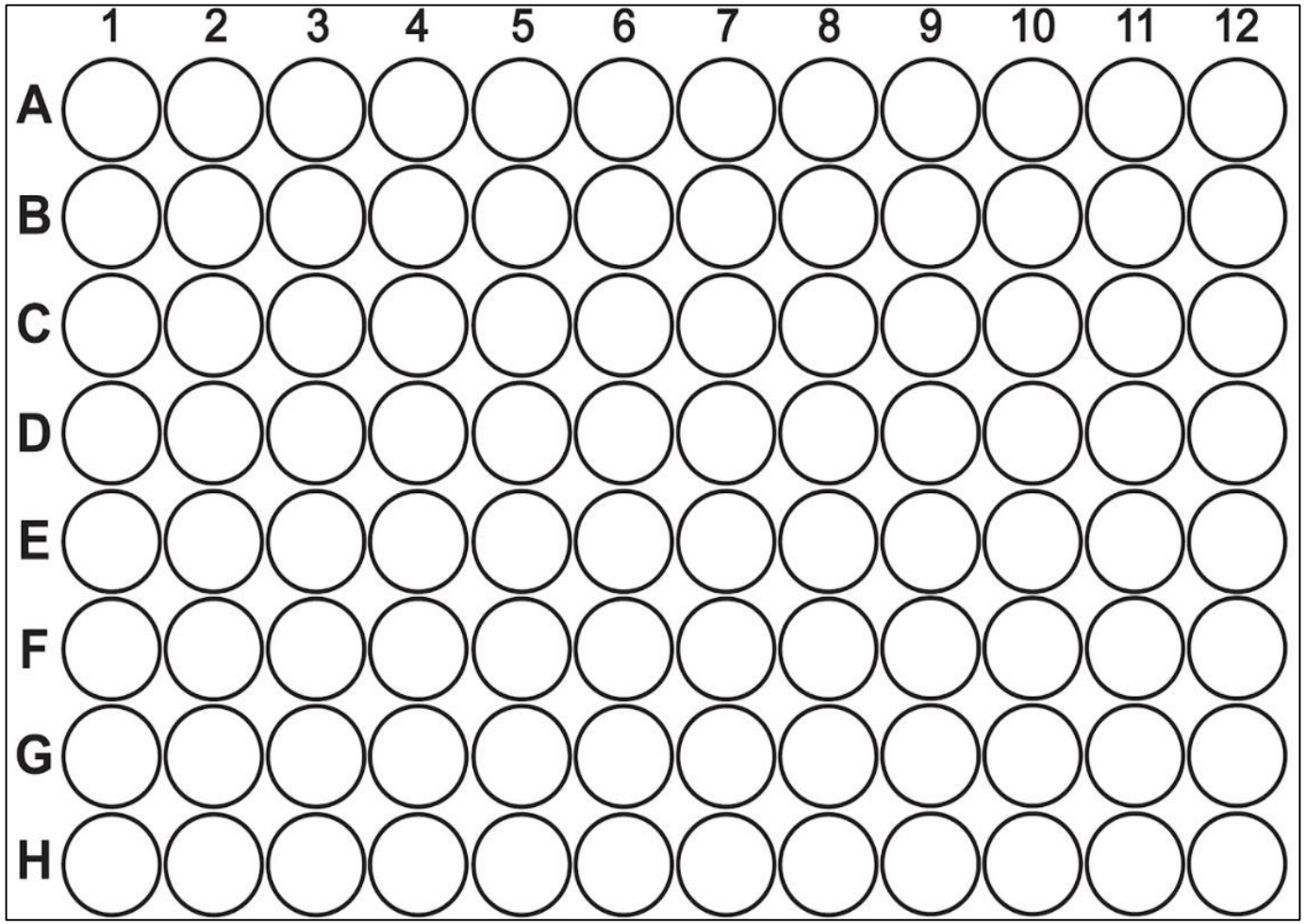
- 모눈종이의 X축에는 표준용액의 농도를, Y축에는 흡광도를 취해서 각 농도에 따른 흡광도를 plot하고 각 점을 직선으로 연결.

No.	사용표준액 (mL)	증류수 (mL)	해당농도 (mg/dL)	흡광도 (O.D)
1	0.00	1.00		0.00
2	0.25	0.75		
3	0.5	0.50		
4	0.75	0.25		
5	1.00	0.00	200	1.00

• 실험 농도 계산: 계대희석

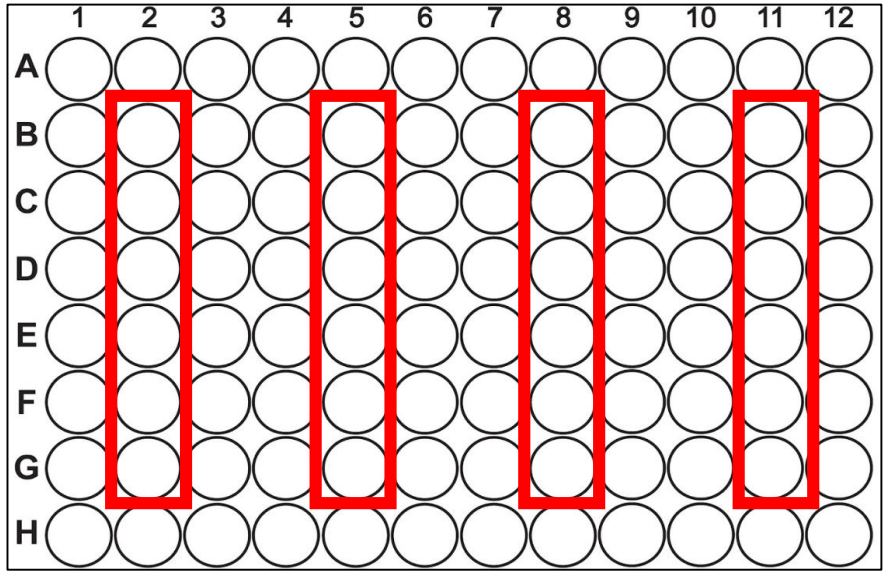
tube (BSA Final Conc.)	처음 Volume(ul)	Volume & Source of BSA	최종 Volume(ul)
1 (2,000ug/ml)	150	-	80
2 (1,000ug/ml)	140	1번 tube의 BSA 70ul + D.W 70ul	70
3 (500ug/ml)	140	2번 tube의 BSA 70ul + D.W 70ul	70
4 (250ug/ml)	140	3번 tube의 BSA 70ul + D.W 70ul	70
5 (125ug/ml)	140	4번 tube의 BSA 70ul + D.W 70ul	70
6 (62.25ug/ml)	-	5번 tube의 BSA 70ul + D.W 70ul	140
7 (0ug/ml)	-	D.W	-

- 96well plate



1. 4명당 1개의 96well plate 사용
2. BSA 표준용액은 각각 제조 예정
3. 실험 과정 숙지(다음주 실습 전까지 숙지)

사용칸: B2~G2/ B5~G5 / B8~G8 / B11~G11 – 6칸씩 사용



• Protocol: microplate

1. Pipette 25 µl of each standard or unknown sample replicate into a microplate well (working range = 20-2,000µg/ml).

Note: If sample size is limited,10µl of each unknown sample and standard can be used sample to Working Solution; WS ratio=1:20).However, the working range of the assay in this case will be limited to 125-2,000µg/ml.

2. Add 200 µl of the Working Solution (WS) to each well and mix plate thoroughly on a plate shaker for 30seconds.

Note: To preparation of Working Solution(WS), see the "PREPARATION of STANDARDS and WORKING SOLUTION"

3. Cover plate and incubate at 37°C for 30minutes.
4. Cool plate to room temperature(RT).
5. Measure the absorbance at or near 562 nm on a plate reader.

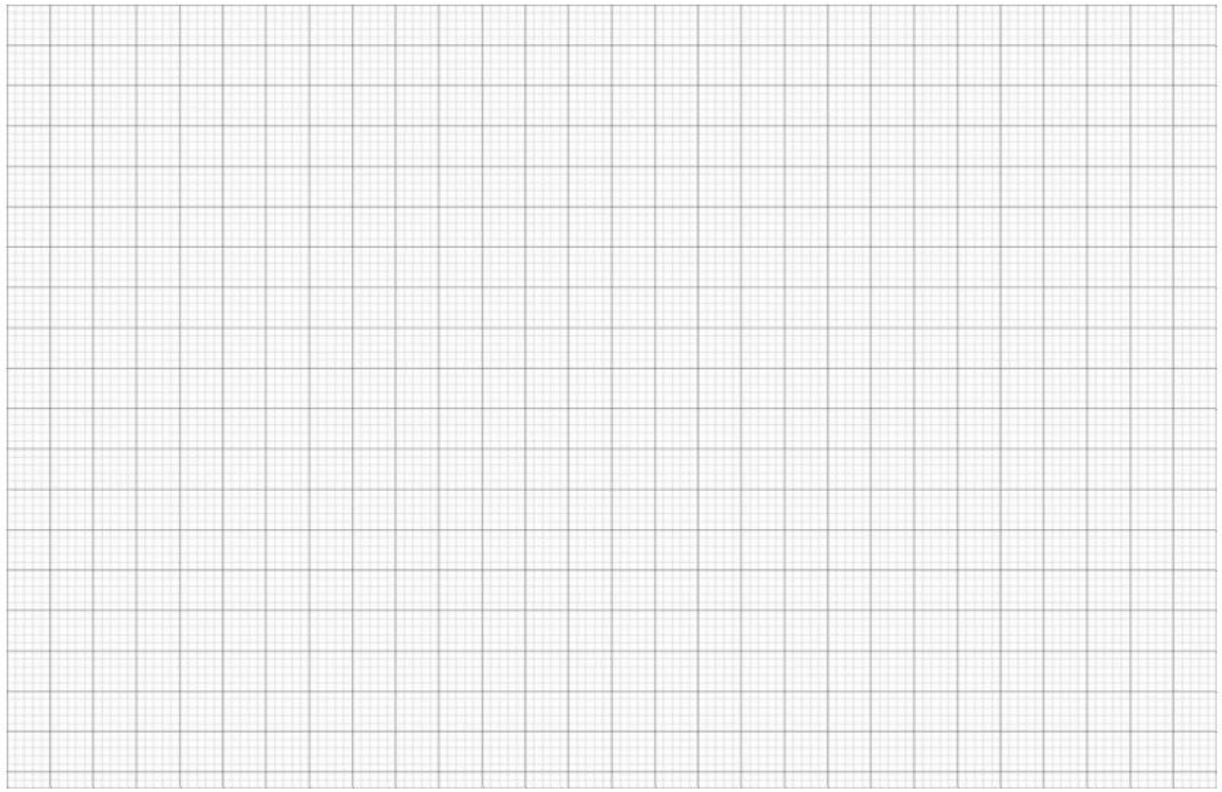
Note: Wavelengths from 540-590nm have been used successfully with this method. If higher 562nm measurements are desired, increase the incubation time to 2-hours.

6. Subtract the average 562 nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562nm measurement so fall other individual standard and unknown sample replicates

• 실험 농도 계산: 표준곡선 그리기

- 모눈종이의 X축에는 표준용액의 농도를, Y축에는 흡광도를 취해서 각 농도에 따른 흡광도를 plot하고 각 점을 직선으로 연결.

흡광도



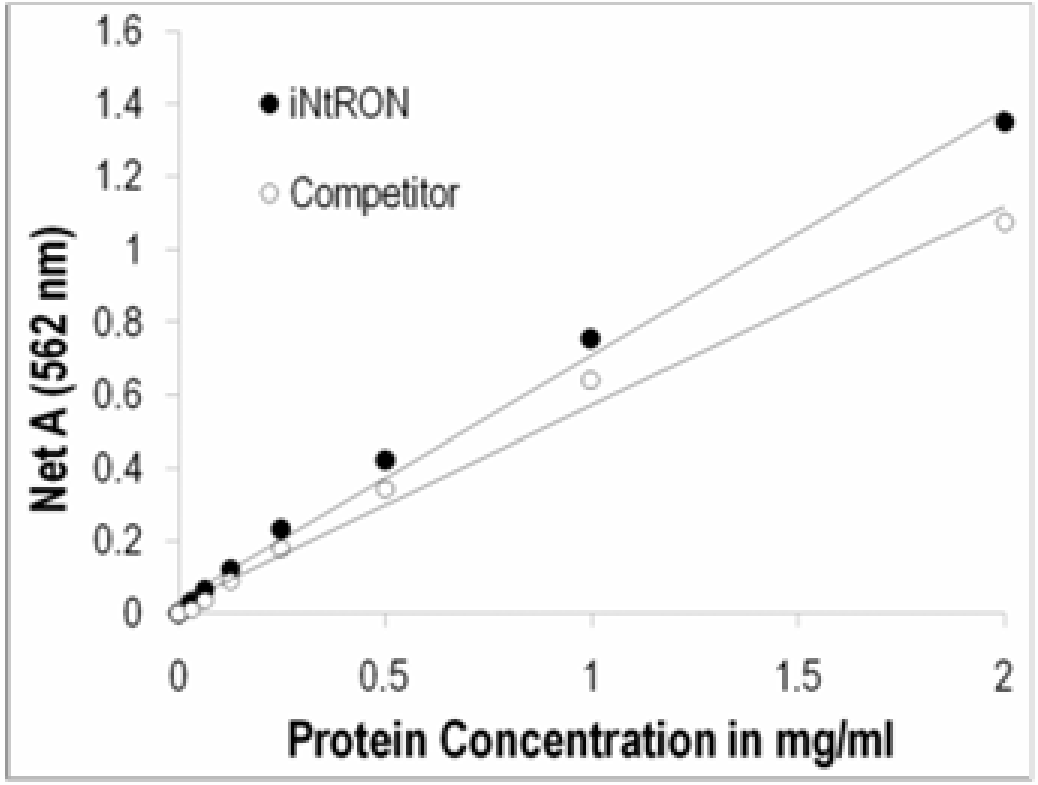
BSA conc.

tube (BSA Final Conc.)	흡광도
1 (2,000ug/ml)	
2 (1,000ug/ml)	
3 (500ug/ml)	
4 (250ug/ml)	
5 (125ug/ml)	
6 (62.25ug/ml)	
7 (0ug/ml)	

- 실험 농도 계산: 표준곡선(검량선) 그리기

EXPERIMENTAL DATA

IMPROVED SENSITIVITY & LINEAR WORKING RANGE



<검량선 평가>

1. 검량선의 회귀식
 - y= ax + b
 - $a^2 \geq 0.99$: 우수 ($a^2 = R^2$ 결정계수)

2. Blank : 흡광도 0

3. 반복 측정 시 재현성 좋은지