

Procedure ELISA

Daniela Bresciani

ELISA con piastre stabilizzate

Precondizioni:

- le piastre sono stabilizzate, pronte per essere processate
- il volume di lavoro è sempre di 50 μ L
- il marcato diluito (HRP) va tenuto sempre a +4 gradi
- TMB va conservato fino al momento dell'uso a +4 gradi e portato a temperatura ambiente poco prima della distribuzione in piastra

DO: Distribuire sieri diluiti in tampone #ES: $\frac{1}{2.5}$ con volume finale 50 μ L

SWITCH(tipo di piastra):

CASE(Tipo di piastra senza agitazione):

DO: 1h a temperatura ambiente

DO: aggiungere 25 μ L HRP

DO: 1h a temperatura ambiente

CASE(Tipo di piastra con agitazione):

DO: 1h a 37 gradi

DO: aggiungere 25 μ L HRP

DO: 1h a 37 gradi

WHILE (la piastra non è pulita && non sono stati fatti almeno 3 cicli di lavaggio)

DO: Lavaggio con almeno 300 μ L per pozzetto

DO: asciugatura della piastra

DO: aggiunta 50 μ L TMB

DO: lasciar reagire per 20 minuti

DO: bloccare la reazione con acido

DO: lettura allo spettrofotometro

DO: eseguire interpretazione del risultato ottenuto

Reazione ELISA indiretta

Precondizioni:

- il marcato diluito (HRP) va tenuto sempre a +4 gradi
- OPD va conservato a +4 gradi protetto dalla luce. Prima dell'uso portarlo a temperatura ambiente e aggiungere H₂O₂, sempre protetto dalla luce fino al momento effettivo dell'uso.

DO: distribuire nelle file (colonne) dispari 50μL di antigene

DO: distribuire nelle file (colonne) pari 50μL di tampone

DO: incubare 1h a 37 gradi in agitazione continua

WHILE (la piastra non è pulita && non sono stati fatti almeno 3 cicli di lavaggio)

DO: Lavaggio con almeno 300μL per pozzetto

DO: asciugatura della piastra

DO: distribuire i sieri in doppio, alla diluizione $\frac{1}{50}$ con volume finale 50μL #riferirsi all'immagine in coda per chiarimenti

DO: incubare 1h a 37 gradi in agitazione continua

WHILE (la piastra non è pulita && non sono stati fatti almeno 3 cicli di lavaggio)

DO: Lavaggio con almeno 300μL per pozzetto

DO: asciugatura della piastra

DO: aggiungere 50μL HRP

DO: incubare 1h a 37 gradi in agitazione continua

WHILE (la piastra non è pulita && non sono stati fatti almeno 3 cicli di lavaggio)

DO: Lavaggio con almeno 300μL per pozzetto

DO: asciugatura della piastra

DO: aggiunta 50μL OPD

DO: lasciare reagire per 10 minuti a temperatura ambiente

DO: bloccare la reazione con acido

DO: lettura allo spettrofotometro

DO: eseguire interpretazione del risultato ottenuto

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	♥	♥	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣
B	♦	♦	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣
C	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣
D	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣
E	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣
F	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣
G	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣
H	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣	♣

♥: siero di controllo

♦: siero di controllo negativo

♣: differenti sieri in esame