

Principi della tecnica

Durante la prima incubazione l'anticorpo virus specifico aderisce sulla superficie al fondo della micropiastra. Durante il secondo passaggio, l'antigene virale si lega all'anticorpo formando il complesso antigene-anticorpo. Durante il terzo passaggio il complesso antigene-anticorpo reagisce con l'anticorpo secondario coniugato alla fosfatasi alcalina formando il complesso anticorpo-antigene-anticorpo coniugato. Segue il saggio enzimatico in cui la presenza dell'antigene virale specifico è indicata dalla reazione positiva della fosfatasi alcalina con il 4-nitrofenilfosfato con produzione di 4-nitrofenolo libero. La reazione enzimatica è letta a 405 nm dopo una e due ore.

Manipolazione e Conservazione

I nostri reagenti sono standardizzati per una diluizione di 1:200 e un volume di 200 µl/pozzeto. Conservare a 4°C e dopo l'apertura consumare entro 5 mesi.

Procedimento

Procedura	Diluizione di Reagenti	Aggiungere (al pozzeto)	Incubazione	a	Lavaggi*
1. Incubazione dell'anticorpo (IgG)	IgG, diluite 1:200 in <u>tampone sensibilizzante</u>	0.2 ml	4 h	37°C	4 x
2. Formazione del complesso anticorpo-antigene	Campione diluito 1:20 in <u>tampone di spremitura</u> , se non specificato altrimenti. (I controlli di LOEWE® devono essere diluiti in 2.1 ml di tampone di spremitura, se non specificato altrimenti.)	0.2 ml	overnight	4°C	4 x
3. Formazione dell'anticorpo coniugato con fosfatasi alcalina.	Anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina diluiti 1:200 in <u>tampone di spremitura</u>	0.2 ml	4 h	37°C	4 x
4. Saggio enzimatico	<u>Soluzione per substrato</u>	0.2 ml	1 - 2 h	Temp. ambiente	-

***Lavaggi:** dopo ciascun'incubazione, i reagenti devono essere rimossi dalla piastra e deve seguire una serie di lavaggi come sopra indicato.

Formulazioni

Tampone di sensibilizzazione	1.59 g Na ₂ CO ₃ 2.93 g NaHCO ₃	Sciogliere in acqua distillata e portare ad 1 l. Aggiustare il pH a 9.6. (Conservazione ca. 4°C)
Tampone di lavaggio	8.0 g NaCl 2.9 g Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O 0.2 g KH ₂ PO ₄ 0.2 g KCl 0.5 ml Tween 20	Sciogliere in acqua distillata e portare ad 1 l. Aggiustare il pH a 7.2-7.4. (Conservazione ca. 4°C)
Tampone di spremitura/coniugato	Formulazione di tampone di lavaggio per 1 l addizionale: 20 g polivinilpirrolidone (K10 - K40) 2 g albumina di siero bovino 0.1 g NaN ₃ (optional)	Sciogliere in acqua distillata e portare ad 1 l. Aggiustare il pH a 7.4. (Si consiglia di conservare in frigorifero più di una settimana. Aliquote può essere congelato e scongelato prima dell'uso.)
Tampone per il substrato	97 ml diethanolammina 0.2 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Sciogliere in acqua distillata e diluire ad 1 l. Aggiustare il pH a 9.8 con 1N HCl. (Conservazione ca. 4°C)
Soluzione di substrato	1 mg/ml di di-Na-4-nitrofenilfosfato in tampone per il substrato	Preparare questa soluzione immediatamente prima dell'uso!

Valutazione

Si consiglia di aggiungere alla piastra i controlli negativi e positivi, per essere sicuri del corretto procedimento del saggio ELISA. Per determinare l'assorbanza del sano, diversi estratti freschi di piante sana della stessa specie dovrebbero essere aggiunte alla piastra. La soglia +/- deve essere determinata dall'operatore.