

Instrucciones ELISA: Standard Double-Antibody-Sandwich Assay (DAS ELISA)

Fundamentos de la prueba

Se detecta la presencia de antígenos del virus con la técnica clásica de Sandwich de Doble Anticuerpo usando el conjugado específico del anticuerpo con Fosfatasa Alcalina (FA).

- 1 Paso:** La placa microtiter se recubre con el anticuerpo específico del virus.
- 2 Paso:** El antígeno de virus es unido al anticuerpo fijado formando el complejo antígeno-anticuerpo.
- 3 Paso:** Reacción del complejo antígeno-anticuerpo con el anticuerpo marcado con Fosfatasa Alcalina.
- 4 Paso:** Reacción enzimática. La presencia del antígeno específico del virus se descubre mediante la reacción positiva de la Fosfatasa Alcalina con 4-nitrofenil Fosfato dando 4-nitro fenol libre.

Manipulación y conservación

Nuestros DAS-ELISA reactivos están normalizados para su uso en una dilución de 1:200 y un volumen de ensayo de 200 µl/pocillo. Los productos deben mantenerse refrigerados (alrededor de 4°C) después de recibirlo. Una vez abierto, se recomienda utilizar los reactivos en un periodo de 5 meses.

Procedimiento Test

Paso	Dilución de los reactivos	Agregar (por pocillo)	Incubar	a	Lavados*
1. Recubrimiento	Anticuerpo, disuelto 1:200 en <u>Tampón recubrimiento</u>	0.2 ml	4 h	37°C	4 x
2. Formación del complejo antígeno-anticuerpo	Dilución de las muestras 1:20 en <u>Tampón Extracción</u> , si no es especificado otro diferente. (Los controles de LOEWE® deben ser disueltos en 2.1 ml de Tampón Extracción, si no especificado diferente.)	0.2 ml	hasta el día siguiente	4°C	4 x
3. Reacción con el Conjugado-Anticuerpo-FA	Conjugado-Anticuerpo-FA, disuelto 1:200 en <u>Tampón Conjugado</u>	0.2 ml	4 h	37°C	4 x
4. Reacción enzimática	<u>Solución Sustrato</u>	0.2 ml	1 - 2 h	Temp. ambiente	-

***Lavados:** Quitar reactivo recubrimiento y enjuagar la placa 4 veces con el Tampón de Lavado.

Buffer Formulaciones

Tampón Recubrimiento	1.59 g Na ₂ CO ₃ 2.93 g NaHCO ₃	Disolver en agua destilada y diluir a 1l. Controlar pH (9.6). (Conservación ca. 4°C)
Tampón Lavado	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	Disolver en agua destilada y diluir a 1l. Controlar pH (7.2-7.4). (Conservación ca. 4°C)
Tampón Extracción/Conjugado	Receta ver Tampón Lavado por 1 l adicional: 20 g Polyvivil Pirrolidona (K10 - K40) 2 g Albúmina de Suero Bovino 0.1 g NaN ₃ (opcional)	Disolver en agua destilada y diluir a 1l. Controlar pH (7.4). (Conservar refrigerado no más de 1 semana.)
Tampón Sustrato	97 ml Diethanolamino 0.2 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Disolver en agua destilada y diluir a 1l. Ajustar pH a 9.8 con HCl 1N. (Conservación ca. 4°C)
Solución Sustrato	1 mg/ml 4-nitrofenil-fosfato (Sal de Na) en Tampón de Sustrato	Preparar la solución inmediatamente antes de usar!

Evaluación

Nosotros recomendamos el uso de nuestros controles positivos y negativos en cada placa. Para disminuir el fondo potencial de plantas sanas, extractos frescos de varias plantas no infectadas deben añadirse a la placa. El límite de detección positivo / negativo debe ser determinado por el usuario, ya que depende de muchos factores, tales como las especies de plantas y sus condiciones fisiológicas (por ejemplo, tipo de tejido, edad).