

I. Принцип процедуры тестирования Double Antibody Sandwich ELISA

Наличие патогена доказывается при помощи твердофазного иммуноферментного анализа по методике "сэндвич" с использованием двух поликлональных антител.

На первой стадии инкубации происходит иммобилизация специфических антител иммуноглобулинов группы Г (IgG) на внутренней поверхности лунок 96-луночного микропланшета. На второй стадии инкубации добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. Антиген реагирует с иммобилизованным антителом и образуется комплекс антиген-антитело. Во время третьей стадии инкубации в лунки добавляют специфические антитела, меченые ферментом щелочная фосфатаза (Alkalische Phosphatase AP) или конъюгат. В результате образуется специфический иммунокомплекс антитело-антиген-антитело-AP-конъюгат. Далее следует ферментативная реакция щелочной фосфатазы AP с бесцветным субстратом 4-нитрофенилфосфат, при которой образуется свободный 4-нитрофенол, придающий раствору жёлтый цвет. Интенсивность окраски при этом пропорциональна количеству фермента, а следовательно количеству исследуемого антигена. Результат оценивается спектрофотометрически при 405 нм после 1-го часа инкубации.

II. Проведение теста

Процедура	Реагент	Объём лунки	время инкубации	температура инкубации	промывка / раз *
иммобилизация антител	IgG, разведённый в 200 раз (1:200) в буфере адсорбции:	0.2 мл	4 ч.	37°C	4 x
образование иммунокомплекса антиген-антитело	образцы, разведённые в 20 раз (1:20) в буфере для разведения контроли, разведённые в 2 мл буфера для разведения образцов	0.2 мл	на ночь	4°C	5 x
образование комплекса антитело-антиген-антитело-AP-конъюгат	антитело-AP-конъюгат, разведённый в 200 раз (1:200) в конъюгатном буфере	0.2 мл	4 ч.	37°C	5 x
ферментативная реакция	раствор субстрата	0.2 мл	1-2 ч.	комнатная температура	-

***Промывка:** После каждого инкубационного шага необходимо удалить реагент из лунок и промыть необходимое количество раз (указано в таблице). При использовании автоматического промывочного устройства уменьшить количество промывок до 4-х раз.

III Формулировки

Буфер адсорбции	1.59 г Na ₂ CO ₃ 2.93 г NaHCO ₃	растворить в 1 л дистиллированной воды, довести pH до 9.6
Промывочный буфер	8.0 г NaCl 2.9 г Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O 0.2 г KH ₂ PO ₄ 0.2 г KCl 0.5 мл твина (полисорбат) 20	растворить в 1 л дистиллированной воды, довести pH до 7.2 - 7.4
Буфер для разведения/ конъюгатный буфер	20 г поливинилпирролидон (повидон) вязкость K10 - K40 2 г бычий сывороточный альбумин БСА 0.1 г NaN ₃ промывочный буфер до 1 л	растворить в 1 л дистиллированной воды, довести pH до 7.4
Субстратный буфер	97 мл диэтанолamina 0.2 г MgCl ₂ x 6H ₂ O	растворить в 1 л дистиллированной воды, довести pH до 9.8
Раствор субстрата	1 мг/мл 4-нитрофенилфосфат-ди-натриевая соль в субстратном буфере	этот раствор должен быть изготовлен непосредственно перед использованием

Оценка: Мы рекомендуем использовать при каждом тесте лиофилизованные препараты, дающие положительные и отрицательные контрольные реакции, что даёт контроль качества проведённого анализа. Для исключения неспецифических реакций необходимо также тестировать свежий сок здоровых растений одного и того же вида.