

## Instrucción 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 dentro de 5 meses.

### Procedimiento Test

Paso	Dilución de los Reactivos	Agregar (por pocillo)	Incubar	a	Lavados*
1. Recubrimiento	Anticuerpo, <b>disuelto 1:200</b> en <u>Tampón Recubrimiento</u>	0.2 ml	4 h	37°C	4 x
2. Formación del complejo antígeno-anticuerpo	Dilución de las muestras <b>1:20</b> en <u>Tampón Extracción</u> , si no es especificado otro diferente. (Los <b>controles di LOEWE®</b> deben ser disueltos en <b>2.1 ml</b> 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, <b>disuelto 1:200</b> 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 Tampón Lavado.

### Recetas

<b>Tampón Recubrimiento</b>	1.59 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2.93 g NaHCO <sub>3</sub>	Disolver en agua destilada y diluir a 1l. Controlar pH (9.6). (Conservación ca. 4°C)
<b>Tampón Lavado</b>	8.0 g NaCl 2.9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O 0.2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 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)
<b>Tampón Extracción/Conjugado</b>	Receta ver Tampón Lavado per 1 l aditional: 20 g Polyvivil Pirrolidona (K10 - K40) 2 g Albúmina de Suero Bovino 0.1 g NaN <sub>3</sub> (opcional)	Disolver en agua destilada y diluir a 1l. Controlar pH (7.4). (Conservar refrigerado por no más de 1 semana.)
<b>Tampón Sustrato</b>	97 ml Diethanolamino 0.2 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Disolver en agua destilada y diluir a 1l. Ajustar pH a 9.8 con HCl 1N. (Conservación ca. 4°C)
<b>Solución Sustrato</b>	1 mg/ml 4-nitrofenil-fosfato (Sal de Na) en Tampón de Sustrato	Preparar la solución inmediatamente antes de usar!

### Evaluación

Nosotros insistimos en recomendar el uso de nuestros controles positivos y negativos en cada placa. Para disminuir el ruido de fondo, anadir varios extractos de varias plantas sanas de la misma especie. El límite de detección +/- debe ser determinado para el usuario.