Technical Information

Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA): test specifications

BIOREBA ELISA reagents were developed and optimized for application in the DAS-ELISA format (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay).

General information

- All available ELISA products are optimized and validated by using certified Nunc MaxiSorp F96 microtiter plates.
- Optimal results are obtained by using certified Nunc MaxiSorp microtiter plates with a working volume of 200 µl per well.
- Buffers should be brought to room temperature before use.
- Laboratory vessels must be exclusively polyethylene (PE) or glass.
- After pipetting, the IgG and conjugate tubes must be stored immediately at 4 °C.
- Antibodies undergo denaturation when the wells are buffer-free between steps. After each washing the wells must be refilled within 10 minutes.
- BIOREBA recommends including a positive and negative control with each test.
- If any of the wells are not used in the test, please ensure that the empty wells do not come into contact with washing buffer. Wells that have been filled with washing buffer cannot be used for further tests.
- Avoid contact with skin when working with the ELISA kit components.
- Please note: The ELISA test for the «Poty group» is in PTA-format (Plate-trapped Antigen).

Recommendations for samples preparation

- For information on how to prepare the samples (sample dilution / appropriate extraction buffer, etc.) refer to the product information (PI) that is included with every delivery. The PI can also be downloaded as a pdf document at www.bioreba.com.
- The HOMEX homogenizer in combination with BIOREBA extraction bags is recommended for sample preparation.

Recommendations for the washing steps

- Initiate the washing only when the subsequent step in the procedure has been prepared.
- If it is not possible to refill the wells right after washing, the plate can be inverted immediately onto a wet, clean paper towel. After the «coating step» and after washing and taping the plate dry, it can be stored in a closed plastic bag for several weeks at –20 °C (does not apply to other steps in the process). Avoid repeated freeze thawing.

Alternative incubation conditions

Our optimized DAS-ELISA protocol is described on the next page. Nevertheless, there are alternative incubation conditions that will give similar results.

Coating step: A shorter incubation time such as 2.5 h at 37 °C gives similar results. Alternatively, an overnight incubation in the refrigerator at 4 °C is possible. Coated plates can be kept in the refrigerator at 4 °C for a maximum of one week (plates covered, preservative such as NaN_3 in the buffer).

Conjugation step: A shorter incubation time at 37 °C for 2 h gives similar results if the substrate incubation is prolonged to 1.5 h as compared to 1 h as standard (see next page).

BIOREBA AG
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach
Switzerland
phone +41 61 712 11 25
fax +41 61 712 11 17
admin@bioreba.ch
www.bioreba.com

Your Partner in Agro-Diagnostics

Procedure



1. Coating: binding specific antibodies

1.1. Dilute the IgG 1:1000 in coating buffer (e.g. 20 µl IgG in 20 ml coating buffer).

1.2. Pipette 200 µl diluted IgG to each well.

1.3. Cover the plate (e.g. Parafilm or plate cover).

1.4. Incubate the plate at 30 °C for 4 h or at 4 °C overnight.

1.5. Wash the plate 3 x with 200 µl washing buffer per well (see point 5. and recommendations on the front page).



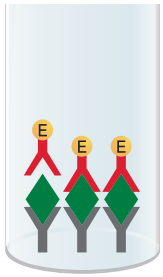
2. Antigen: incubation with plant extract

2.1. Homogenize the samples in extraction buffer (see recommendations on the front page).

2.2. Add 200 µl of the plant extract to each well.

2.3. Cover the plates with Parafilm or a plate cover and incubate at 4 °C overnight.

2.4. Wash the plate 3 x with 200 µl washing buffer per well (see point 5. and recommendations on the front page).



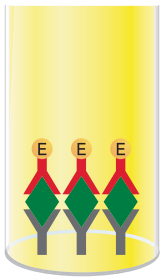
3. Conjugate: incubate with an enzyme-labelled antibody

3.1. Dilute the conjugate 1:1000 in conjugate buffer (e.g., 20 µl conjugate in 20 ml conjugate buffer).

3.2. Add 200 µl to each well.

3.3. Cover the plate with Parafilm or a plate cover and incubate at 30 °C for 5 h.

3.4. Wash the plate 3 x with 200 µl washing buffer per well (see point 5. and recommendations on the front page).



4. Substrate: the colour reaction indicates positive samples

4.1. Dissolve the substrate pNPP (para-nitrophenylphosphate) in substrate buffer to give a final concentration of 1 mg/ml.

4.2. Add 200 µl of the substrate solution to each well.

4.3. Incubate the plate at room temperature (20–25 °C in the dark).

4.4. Monitor the colour development visually and / or photometrically at 405 nm (for ELISA Readers with individual filters) or at 405/492 nm (for ELISA Readers with dual filters). Measure after 30–120 min.

5. Washing steps (washing the plate)

5.1. For the washing procedure empty the content of the plate by taping it dry. Ensure that there is nothing left in the well to avoid contamination from one well to the other.

5.2. Wash each well 3 times with 200 µl washing buffer. After each washing empty the contents of the plate by taping it dry.

5.3. After the last washing remove the remaining liquid by taping it onto a clean paper towel.

Version: 5 - 20.06.2021

www.bioreba.com

BIOREBA AG
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach
Switzerland

Your Partner in Agro-Diagnostics

Phone +41 61 712 11 25
Fax +41 61 712 11 17

admin@bioreba.ch
www.bioreba.com

Information technique

Double antibody sandwich enzyme-linked immuno-sorbent assay (DAS-ELISA): Spécifications du test

Les réactifs ELISA de BIOREBA ont été développés et optimisés pour une utilisation en format DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay).

Informations générales

- Tous les réactifs ELISA disponibles sont optimisés et validés pour une utilisation avec des microplaques certifiées Nunc Maxisorp F96.
- Des résultats optimaux sont obtenus en utilisant des microplaques certifiées Nunc Maxisorp F96 avec un volume de 200 µl par puits.
- Avant utilisation, les tampons doivent être amenés à température ambiante.
- Les récipients de laboratoire doivent être uniquement en polyéthylène (PE) ou en verre.
- Après le pipetage, immédiatement remettre les réactifs IgGs et Conjugués à 4 °C.
- Les anticorps se dégradent lorsque les puits de la plaque sont laissés sans tampon. Après chaque lavage, les puits doivent être remplis dans les 10 minutes maximum.
- BIOREBA recommande d'inclure un contrôle positif et un contrôle négatif sur chaque test.
- Lors d'un test, si tous les puits ne sont pas utilisés, les puits restant ne doivent pas entrer en contact avec le tampon de lavage. Les puits ayant reçu du tampon de lavage ne peuvent pas être utilisés ultérieurement.
- Eviter le contact entre la peau et les composants du kit ELISA.
- Note: le test ELISA pour «Poty group» est au format PTA (Plate-trapped Antigen) ELISA.

Recommandations pour la préparation de l'échantillon

- Les informations concernant la préparation de l'échantillon (dilution, tampon d'extraction approprié, etc.) se trouvent dans le feuillet «Information sur le produit» (PI) inclus avec chaque livraison. Les PI's peuvent aussi être téléchargés au format PDF depuis notre site internet www.bioreba.com.
- L'utilisation de l'homogénéisateur HOMEX et des sacs d'extraction BIOREBA est recommandée pour la préparation des échantillons.

Recommandations pour les étapes de lavage

- Commencer les lavages uniquement lorsque la prochaine étape du protocole a été préparée.
- Si le remplissage immédiat des puits après le lavage n'est pas possible, la plaque peut être placée à l'envers sur une serviette propre et humide. Après l'étape de «coating» et les lavages, le liquide résiduel peut être éliminé en tapant la plaque sur du papier absorbant. La plaque peut alors être stockée à –20 °C dans un sac en plastique scellé pendant plusieurs semaines (ce n'est pas possible après les autres étapes de la procédure). La plaque ne doit pas être décongelée et recongelée à plusieurs reprises.

Conditions d'incubation alternatives

Notre procédure DAS-ELISA optimisée est décrite à la page suivante. Néanmoins, des conditions d'incubation alternatives peuvent donner des résultats similaires.

Etape «Coating»: une incubation plus courte de 2.5 h à 37 °C donne des résultats similaires. Alternativement, il est possible d'incuber la plaque à 4 °C pendant la nuit. Les plaques «coatées» peuvent être gardées jusqu'à maximum une semaine au réfrigérateur (plaques couvertes, avec un agent conservateur tel que NaN_3 dans le tampon).

Etape «Conjugué»: une incubation plus courte de 2 h à 37 °C donne des résultats similaires si l'incubation avec le substrat est prolongée à 1.5 h au lieu de 1 h dans la procédure standard (voir page suivante).

BIOREBA AG
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach
Switzerland
phone +41 61 712 11 25
fax +41 61 712 11 17
admin@bioreba.ch
www.bioreba.com

Your Partner in Agro-Diagnostics

Procédure



1. Coating: adsorption des anticorps spécifiques

1.1. Diluer les IgGs 1:1000 dans le tampon de coating (par exemple 20 µl IgGs dans 20 ml de tampon de coating).

1.2. Ajouter 200 µl de la dilution dans chaque puits.

1.3. Couvrir la plaque (avec du Parafilm ou un couvercle de plaque).

1.4. Incuber la plaque à 30 °C pendant 4 h ou à 4 °C pendant la nuit.

1.5. Laver la plaque 3 x avec 200 µl de tampon de lavage par puits (voir point 5. et les recommandations au recto).



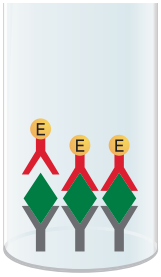
2. Antigène: incubation avec l'extrait de plante

2.1. Homogénéiser les échantillons dans du tampon d'extraction (voir les recommandations au recto).

2.2. Ajouter 200 µl d'extrait de plante dans chaque puits.

2.3. Couvrir la plaque comme au point 1.3 et incuber à 4 °C pendant la nuit.

2.4. Laver la plaque 3 x avec 200 µl de tampon de lavage par puits (voir point 5. et les recommandations au recto).



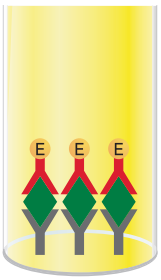
3. Conjugué: incubation avec des anticorps couplés à une enzyme

3.1. Diluer le conjugué 1:1000 dans le tampon conjugué (par exemple 20 µl de conjugué dans 20 ml de tampon conjugué).

3.2. Ajouter 200 µl de la dilution dans chaque puits.

3.3. Couvrir la plaque comme au point 1.3 et incuber à 30 °C pendant 5 h.

3.4. Laver la plaque 3 x avec 200 µl de tampon de lavage par puits (voir point 5. et les recommandations au recto).



4. Substrat: la réaction colorimétrique indique les échantillons positifs

4.1. Dissoudre le substrat pNPP (para-Nitrophenylphosphate) dans le tampon substrat à une concentration finale de 1 mg/ml.

4.2. Ajouter 200 µl de la solution substrat dans chaque puits.

4.3. Incuber la plaque à température ambiante (20–25 °C) dans l'obscurité.

4.4. Suivre le développement de la réaction colorimétrique après 30-120 min, visuellement ou à l'aide d'un lecteur à absorbance à 405 nm (pour les lecteurs à un seul filtre) ou à 405/492 nm (pour les lecteurs à double filtre).

5. Etapes de lavage (lavage de la plaque)

5.1. Pour les lavages, vider la plaque vigoureusement afin d'éviter une contamination entre les puits.

5.2 Laver chaque puits 3 fois avec 200 µl de tampon de lavage. Après chaque lavage, vider la plaque vigoureusement.

5.3. Après le dernier lavage, éliminer le liquide résiduel en tapant sur du papier absorbant.

Version: 5 - 20.06.2021

www.bioreba.com

BIOREBA AG
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach
Switzerland

Your Partner in Agro-Diagnostics

Phone +41 61 712 11 25
Fax +41 61 712 11 17

admin@bioreba.ch
www.bioreba.com

Technische Information

Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA): Testvorschrift

BIOREBA ELISA-Reagenzien wurden für den Gebrauch im DAS-ELISA Format (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) entwickelt und optimiert.

Wichtige allgemeine Hinweise

- Sämtliche ELISA Produkte sind optimiert und validiert unter Verwendung von zertifizierten Nunc MaxiSorp F96 Microtiterplatten.
- Optimale Resultate werden erreicht unter Verwendung von zertifizierten Nunc MaxiSorp Microtiterplatten und einem Arbeitsvolumen von 200 µl pro Vertiefung.
- Vor dem Gebrauch sollen alle Puffer auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Laborgefässe müssen ausschliesslich aus Polyethylen (PE) oder Glas sein.
- IgG- und Konjugatröhrchen müssen unverzüglich nach dem Pipettieren bei 4 °C gelagert werden.
- Antikörper denaturieren, wenn zwischen den einzelnen Arbeitsschritten die Vertiefungen pufferfrei vorliegen. Nach jedem Waschschritt müssen die Vertiefungen innerhalb von 10 Minuten wieder befüllt werden.
- BIOREBA empfiehlt bei jedem Test eine Positiv- und Negativkontrolle mitzuführen.
- Sollten nicht alle Plattenvertiefungen für eine Testdurchführung verwendet werden, bitte beachten, dass die leeren Vertiefungen nicht mit Waschpuffer in Berührung kommen. Die einmal mit Waschpuffer befüllten Vertiefungen dürfen nicht für weitere Tests verwendet werden.
- Beim Arbeiten mit den ELISA Kit-Komponenten ist der Hautkontakt zu vermeiden.
- Bitte beachten: der ELISA Test für «Potygroup» wird im PTA Format (Plate-trapped Antigen) angeboten.

Hinweise zur Probenaufarbeitung

- Informationen zur Probenaufarbeitung (Verdünnung der Probe / Verwendung des geeigneten Extraktionspuffers etc.) sind der entsprechenden Produktinformation (PI) zu entnehmen. Die PI wird jeder Lieferung beigelegt. Ausserdem können die PI Dokumente als PDF unter www.bioreba.com heruntergeladen werden.
- Für die Probenaufbereitung wird das Homogenisiergerät HOMEX in Kombination mit den Extraktionsbeuteln der BIOREBA empfohlen.

Hinweise zu den Waschschritten

- Den Waschvorgang erst dann einleiten, wenn der darauf folgende Arbeitsschritt vorbereitet worden ist.
- Sollte die sofortige Wiederbefüllung der Vertiefungen nach dem Waschen nicht möglich sein, kann die Platte unverzüglich umgedreht auf ein nasses, sauberes Papiertuch gelegt werden. Nach dem «Coating-Schritt» kann die Platte nach dem Waschen und Ausklopfen in einem verschlossenen Plastikbeutel für mehrere Wochen bei –20 °C aufbewahrt werden (gilt nicht für andere Arbeitsschritte). Die Platte soll nicht mehrmals aufgetaut und wieder gefroren werden.

Alternative Inkubationsbedingungen

Unser optimiertes DAS-ELISA Protokoll wird auf der folgenden Seite beschrieben. In diesem Absatz werden alternative Inkubationsbedingungen beschrieben, welche zu vergleichbaren Resultaten führen.

Coating Schritt: Eine auf 2.5 h verkürzte Inkubation bei 37 °C liefert vergleichbare Resultate. Alternativ kann die Inkubation über Nacht bei 4 °C durchgeführt werden. Beschichtete Platten können bis maximal eine Woche bei 4 °C aufbewahrt werden (Platten abgedeckt, Puffer mit NaN_3 als Konservierungsstoff versehen).

Konjugat Schritt: Eine auf 2 h verkürzte Inkubation bei 37 °C liefert vergleichbare Resultate, wenn die Substratinkubation von 1 h auf 1.5 h verlängert wird (siehe folgende Seite).

BIOREBA AG
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach
Switzerland
phone +41 61 712 11 25
fax +41 61 712 11 17
admin@bioreba.ch
www.bioreba.com

Your Partner in Agro-Diagnostics

Testdurchführung



1. Coating: Bindung spezifischer Antikörper

1.1. IgG 1:1000 im Beschichtungspuffer verdünnen (z.B. 20 µl IgG in 20 ml Beschichtungspuffer).

1.2. In jede Vertiefung 200 µl der IgG-Verdünnung pipettieren.

1.3. Platte abdecken (z.B. Parafilm oder Platten-Deckel).

1.4. Platte bei 30 °C für 4 h oder bei 4 °C über Nacht inkubieren.

1.5. Platte 3 x mit 200 µl Waschpuffer pro Vertiefung waschen (siehe Punkt 5. und Hinweise auf der Vorderseite).



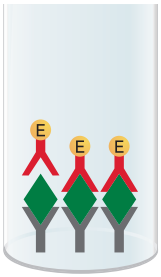
2. Antigen: Inkubation mit Pflanzenextrakt

2.1. Proben im Extraktionspuffer homogenisieren (Hinweise auf der Vorderseite beachten).

2.2. In jede Vertiefung 200 µl des Pflanzenextraktes pipettieren.

2.3. Platte wie im Schritt 1.3 abdecken und über Nacht bei 4 °C inkubieren.

2.4. Platte 3 x mit 200 µl Waschpuffer pro Vertiefung waschen (siehe Punkt 5. und Hinweise auf der Vorderseite).



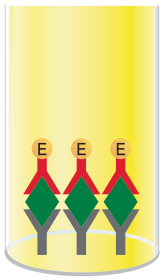
3. Konjugat: Inkubation mit enzymmarkierten Antikörpern

3.1. Konjugat 1:1000 im Konjugatpuffer (z. B. 20 µl Konjugat auf ein Endvolumen von 20 ml Konjugatpuffer) verdünnen.

3.2. In jede Vertiefung 200 µl der Konjugatverdünnung pipettieren.

3.3. Platte wie im Schritt 1.3 abdecken und bei 30 °C für 5 h inkubieren.

3.4. Platte 3 x mit 200 µl Waschpuffer pro Vertiefung waschen (siehe Punkt 5. und Hinweise auf der Vorderseite).



4. Substrat: Farbreaktion zeigt positive Proben an

4.1. Das Substrat pNPP (para-Nitrophenylphosphat) zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml im Substratpuffer lösen.

4.2. In jede Vertiefung 200 µl der Substratlösung pipettieren.

4.3. Platte bei Raumtemperatur (20–25 °C) im Dunkeln inkubieren.

4.4. Farbentwicklung visuell überwachen und / oder photometrisch
bei 405 nm (für ELISA Reader mit Einzelfilter) oder
bei 405/492 nm (für ELISA Reader mit Dual-Filter) nach 30–120 min messen.

5. Waschschritte (Platte waschen)

5.1. Für den Waschvorgang Inhalt der Platte „mit Schwung" verwerfen, so dass es zu keiner Kontamination zwischen den einzelnen Vertiefungen kommt.

5.2. Vertiefungen jeweils 3 mal mit 200 µl Waschpuffer waschen. Nach jedem Waschen den Inhalt der Platte „mit Schwung" auskippen.

5.3. Nach dem letzten Waschen die restliche Flüssigkeit durch Ausklopfen auf einem sauberen Haushaltspapier entfernen.

Version: 5 - 20.06.2021

www.bioreba.com

BIOREBA AG
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach
Switzerland

Your Partner in Agro-Diagnostics

Phone +41 61 712 11 25
Fax +41 61 712 11 17

admin@bioreba.ch
www.bioreba.com

Informacion Tecnica

Double antibody sandwich enzyme-linked immuno-sorbent assay (DAS-ELISA): test specifications

Los reactivos BIOREBA ELISA fueron desarrollados y optimizados para ser aplicados en el formato DAS-ELISA (Double antibody sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay).

Información general

- Todos los productos disponibles para ELISA están optimizados y validados mediante el uso de placas de microtitulación NUNC MaxiSorp F96.
- Optimos resultados se obtienen utilizando placas de microtitulacion Nunc MaxiSorp certificadas con un volumen de trabajo de 200 ul por pocillo.
- Los buffers (tampones) deben ser llevados a temperatura ambiente antes de su uso.
- Los recipientes de laboratorio deben ser exclusivamente de polietileno (PE) o de vidrio.
- Luego de pipetear, los tubos del conjugado e IgG deben ser almacenados inmediatamente a 4°C.
- Los anticuerpos se desnaturalizan cuando los pocillos están sin buffer, entre cada paso del procedimiento. Luego de cada lavado, se deben rellenar las celdas en 10 minutos.
- BIOREBA recomienda incluir un control positivo y uno negativo en cada test.
- Si alguna de las celdas no es usada en el análisis, asegurarse de que los pocillos vacíos no entren en contacto con el buffer de lavado. Los pocillos que han sido llenados con buffer de lavado, no podrán ser utilizados para más pruebas.
- Evitar el contacto con la piel cuando se trabaja con los componentes del kit ELISA.
- Tener en cuenta: El test ELISA para <<Poty group>> es en formato PTA (Plate-trapped Antigen).

Recomendaciones para la preparación de las muestras

- Para información sobre cómo preparar las muestras (dilución de la muestra / buffer apropiado de extrac ción, etc.) consulte la información del producto (PI) que está incluido en cada envío. El PI puede ser des cargado como un documento pdf en www.bioreba.com.
- El homogeneizador HOMEX en combinación con las bolsas de extracción BIOREBA están recomendados para la preparación de la muestra.

Recomendaciones para etapas de lavado

- Iniciar el proceso de lavado sólo cuando los componentes de la etapa siguiente del procedimiento, hayan sido preparados.
- Si no es posible rellenar los pocillos justo después del lavado, las placas pueden ser colocadas inmedia tamente sobre una toalla de papel húmeda y limpia en forma invertida . Luego de la etapa de <<coa ting>> y de lavado, el líquido residual puede ser eliminado, golpeando la placa, sobre papel absorbente. Las placas pueden ser almacenadas en una bolsa plástica cerrada por varias semanas a -20°C (no aplica para otras etapas del proceso). Evitar repetir pasos de congelación y descongelación.

Condiciones de incubación alternativas

Nuestro protocolo optimizado para DAS-ELISA es descripto en la página siguiente. Sin embargo, hay condi-ciones de incubación alternativas que arrojan resultados similares.

Etapa <<Coating>>: Un tiempo de incubación menor de 2,5 h a 37°C arroja resultados similares. Alterna-tivamente, es posible una incubación de toda la noche a 4°C. Las placas revestidas pueden ser guardadas para su uso en el refrigerador a 4°C como máximo una semana (placas cubiertas, con un conservante como NaN3 en el buffer).

Etapa <<Conjugation>>: Una incubación corta de 2h a 37°C arroja resultados similares, si la incubación con el sustrato se prolonga a 1,5h comparado con 1 h del proceso estándar (ver página siguiente).

BIOREBA AG
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach
Switzerland
phone +41 61 712 11 25
fax +41 61 712 11 17
admin@bioreba.ch
www.bioreba.com

Your Partner in Agro-Diagnostics

Procedimiento



1. Coating: unión de anticuerpos específicos.

1.1. Diluir la IgG 1:1000 en buffer de coating (ej. 20 ul de IgG en 20 ml de buffer de coating).

1.2. Pipetear 200 ul de IgG diluida en cada pocillo.

1.3. Cubrir la placa (ej. Parafilm como cobertor de placa).

1.4. Incubar la placa 4h a 30°C o toda la noche a 4°C.

1.5. Lavar las placas 3 veces con 200 ul de buffer de lavado por pocillo (ver el punto 5 y recomendaciones en la página anterior).



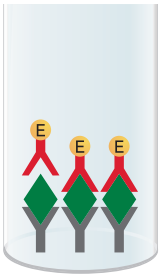
2. Antígeno: incubación con el extracto vegetal.

2.1. Homogeneizar las muestras en el buffer de extracción (ver recomendaciones en la hoja anterior).

2.2. Agregar 200 ul de extracto a cada pocillo.

2.3. Cubrir las placas con Parafilm o similar, e incubar toda la noche a 4°C.

2.4. Lavar las placas 3 veces con 200 ul de buffer por pocillo (ver el punto 5 y recomendaciones en la página anterior).



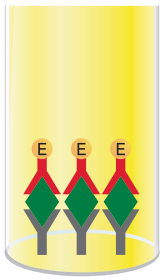
3. Conjugado: incubación con anticuerpo acoplado a una enzima.

3.1. Diluir el conjugado 1:1000 en buffer de conjugado (ej. 20 ul de conjugado en 20 ml de buffer de conjugado).

3.2. Agregar 200 ul a cada pocillo.

3.3. Cubrir la placa con Parafilm u otro cobertor e incubar 5h a 30°C.

3.4. Lavar las placas 3 veces con 200 ul de buffer de lavado por pocillo (ver el punto 5 y recomen daciones en la hoja anterior).



4. Substrato: la reacción colorimétrica indica las muestras positivas.

4.1. Disolver el sustrato pNPP (para-Nitrophenylphosphate) en buffer de sustrato, hasta lograr una concentración final de 1mg/ml.

4.2. Agregar 200 ul de solución de sustrato a cada pocillo.

4.3. Incubar las placas a temperatura ambiente (20-25°C en la oscuridad).

4.4. Controlar el desarrollo de color visualmente y/o fotométricamente a 405 nm (para lectores ELISA con filtros individuales) o a 405/492 nm (para lectores ELISA con filtros duales). Medir luego de 30-120 min.

5. Etapas de lavado (lavado de placas).

5.1. Para el procedimiento de lavado, vaciar las placas con un golpe seco. Asegurar que no quede nada en los pocillos, para evitar la contaminación entre los mismos.

5.2. Lavar cada pocillo 3 veces con 200 ul de buffer de lavado. Luego de cada lavado, vaciar el contenido de la placa con un golpe seco.

5.3. Luego del último lavado, remover el líquido remanente, con golpes secos sobre una toalla de papel seca.

Version: 5 - 20.06.2021

BIOREBA AG
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach
Switzerland
Phone +41 61 712 11 25
Fax +41 61 712 11 17
admin@bioreba.ch
www.bioreba.com

Your Partner in Agro-Diagnostics

Informacja techniczna

Double antibody sandwich enzyme-linked immuno-sorbent assay (DAS-ELISA): specyfikacja testów

Odczynniki firmy Bioreba są opracowane i zoptymalizowane do stosowania z formatem DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme-linked immuno-sorbent assay)

Informacje ogólne

- Wszystkie produkty ELISA są zoptymalizowane i zwalidowane przy użyciu certyfikowanych mikropłytek Nunc MaxiSorp F96.
- Optymalne wyniki osiąga się przy zastosowaniu certyfikowanych mikropłytek Nunc MaxiSorp o objętości roboczej 200 µl na dołek.
- Przed użyciem należy doprowadzić bufory do temperatury pokojowej.
- Naczynia laboratoryjne muszą być wykonane z polietylenu (PE) lub szkła.
- Naczynka z IgG i koniugatem muszą być przechowywane w temp. 4°C natychmiast po pipetowaniu.
- Przeciwciała ulegają denaturacji jeżeli między pojedynczymi krokami dołki są bez buforu. Po każdym płukaniu dołki muszą być napełnione ponownie w ciągu 10 min.
- Bioreba poleca stosować do każdego testu kontrolę pozytywną i negatywną.
- Jeżeli nie wszystkie dołki są użyte do testów, należy uważać aby puste dołki nie miały kontaktu z buforem myjącym. Dołki, które raz miały kontakt z buforem myjącym nie mogą być używane do dalszych testów.
- Przy pracach z odczynnikami ELISA należy unikać kontaktu ze skórą.
- Uwaga: test ELISA do grupy POTY jest zaoferowany w formacie PTA (Plate-trapped Antigen).

Przygotowanie próbki

- Informacje na temat przygotowania próbki (rozcieńczenie/stosowanie odpowiednich buforów ekstrakcyjnych, itd.) są zawarte w odpowiedniej informacji produktowej (PI). Informacja ta jest dołożona do każdej przesyłki. Oprócz tego dokumenty PI można znaleźć na stronie www.bioreba.com w formacie PDF.
- Do przygotowywania próbek polecamy urządzenie homogenizujące HOMEX w kombinacji z workami ekstrakcyjnymi Bioreba.

Przemywanie

- Proces mycia rozpocząć po uprzednim przygotowaniu kolejnych etapów.
- Jeżeli ponowne napełnienie dołków po myciu jest niemożliwe, płytka może być natychmiast odwrócona i położona na wilgotny, czysty ręcznik papierowy. Po etapie „powlekania" płytkę można umyć, osuszyć i przechowywać w szczelnie zamkniętym worku przez kilka tygodni w temp. -20°C (nie ma zastosowania przy innych krokach). Płytka nie powinna być rozmrażana i ponownie zamrażana.

Alternatywne warunki inkubacji

Nasza zoptymalizowana procedura DAS-ELISA została opisana w tabeli. Zawarto również alternatywne warunki inkubacji, prowadzące do porównywalnych rezultatów.

Powlekanie: skrócony czas inkubacji do 2,5 godz. w temp. 37°C daje porównywalne rezultaty. Alternatywnie inkubacja może być prowadzona w temp. 4°C przez noc. Pokryte płytki mogą być przechowywane maksymalnie jeden tydzień w temp. 4°C (płytki muszą być przykryte, zakonserwowane buforem NaN3).

Koniugat: skrócony czas inkubacji do 2 godzin w temp. 37°C daje porównywalne rezultaty jeżeli inkubacja substratu została przedłużona z 1 godziny na 1,5 godz. (patrz tabela).

www.bioreba.com

BIOREBA AG — *Your Partner in Agro-Diagnostics*
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach
Switzerland
phone +41 61 712 11 25
fax +41 61 712 11 17
admin@bioreba.ch
www.bioreba.com

Procedura przeprowadzenia testu



1. Powlekanie: związanie swoistych przeciwciał na powierzchni płytki

1.1. Rozcieńczyć IgG 1000 x w buforze opłaszczającym (Coating): np. 20 µl IgG w 20 ml buforu.

1.2. Roztwór IgG odpipetować do płytki po 200 µl do każdego dołka.

1.3. Nakryć każdą płytkę (np. folią Parafilm lub pokrywką na płytki)

1.4. Inkubować w temp. 30°C przez 4 h lub w temp. 4°C przez noc

1.5. Wypłukać płytkę 3 x 200 µl buforu myjącego na każdy dołek (patrz punkt 5 i wskazówki na pierwszej stronie)



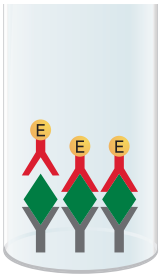
2. Antygen: inkubacja z ekstraktem roślinnym

2.1. Próbkę homogenizować w buforze ekstrakcyjnym (stosować uwagi ze strony 1)

2.2. Odpipetować ekstrakt na płytkę po 200 µl do każdego dołka.

2.3. Nakryć płytki jak w punkcie 1.3 i inkubować w temp. 4°C przez noc.

2.4. Wypłukać płytkę 3 x 200 µl buforu myjącego na każdy dołek (patrz punkt 5 i wskazówki na pierwszej stronie)



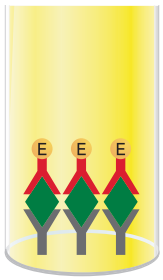
3. Koniugat: inkubacja przeciwciała z markerem enzymatycznym

3.1. Rozcieńczyć koniugat 1:1000 x w buforze koniugującym (np. 20 µl koniugatu na objętość końcową 20 ml buforu koniugującego)

3.2. Odpipetować 200 µl roztworu do każdego dołka.

3.3. Nakryć płytki jak w kroku 1.3 i inkubować w temp. 30°C przez 5 h

3.4. Wypłukać płytkę 3 x 200 µl buforu myjącego na każdy dołek (patrz punkt 5 i wskazówki na pierwszej stronie)



4. Substrat: reakcja kolorystyczna wykazująca reakcję pozytywną w próbkach

4.1. Rozpuścić substrat pNPP (fosforan para-nitrofenolu) do objętości końcowej 1mg/ml w buforze substratowym.

4.2. Odpipetować po 200 µl roztworu substratu do każdego dołka.

4.3. Płytkę inkubować w temperaturze pokojowej (20-25°C) bez dostępu światła.

4.4. Obserwować reakcję barwną i ocenić optycznie i/lub fotometrycznie przy długości fali 405 nm (dla czytników ELISA z filtrem pojedynczym) lub przy długości fali 405/492 nm (dla czytników ELISA z filtrem podwójnym) po 30-120 minutach.

5. Mycie płytek

5.1. Przed myciem opróżnić płytkę „z rozmachem”, tak aby nie doszło do kontaminacji między dołkami.

5.2. Dołki myć 3 razy każdorazowo po 200 µl buforem myjącym na każdy dołek. Po każdym myciu zawartość płytki wylać „z rozmachem”.

5.3. Po ostatnim myciu wytrząsnąć pozostałą ciecz i usunąć czystym ręcznikiem papierowym.

Version: 5 - 20.06.2021

www.bioreba.com

BIOREBA AG
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach
Switzerland

Phone +41 61 712 11 25
Fax +41 61 712 11 17

admin@bioreba.ch
www.bioreba.com

Your Partner in Agro-Diagnostics