

Información técnica

Procedimiento del test ELISA

(ELISA es un acrónimo de «enzyme-linked immunosorbent assay»)

Nuestros reactivos ELISA se han optimizado para su uso en el procedimiento denominado de doble anticuerpo ó «sandwich» (DAS-ELISA), utilizando placas para microtitulación «Nunc Certified Maxisorp microtiter plates» y operando con un volumen de 200 microlitros por celda. Si se usan otros procedimientos (excepcionalmente), Usted encontrará una indicación en la hoja informativa del reactivo.

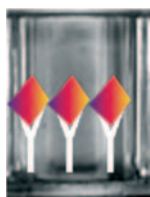
Nuestro procedimiento es adecuado para ser usado en los protocolos de laboratorios orientados a la certificación que usualmente testan un amplio numero de muestras por día. Es un procedimiento altamente seguro (provee alta seguridad en el test) para su aplicación en análisis de papas (patatas), árboles frutales, vid, etc.; de esta manera, el cliente que utiliza nuestros reactivos usa un solo procedimiento, para la mayoría de las combinaciones de patógeno/hospedero.



1. Recubrimiento (vestido): Un anticuerpo específico es adherido a la superficie de las celdas de la placa de microtitulación.

Diluir la IgG 1000x en el buffer de vestido (Coating buffer); por ejemplo, 20 microlitros en 20 mililitros de buffer, ó bien la misma dilución con otros volúmenes.
Adicionar 200 microlitros de la dilución a cada celda (hoyo).
Tapar la placa logrando un buen sellado, y colocarla en caja húmeda.
Incubar a 30°C por 4 horas ó a 4°C durante toda la noche.

1° Lavado: Vaciar las celdas (hoyos) y lavar 3-4 veces con el buffer de lavado (Washing Buffer). Remover completamente el liquido golpeando enérgicamente la placa sobre una toalla de papel. El procedimiento de lavado se adaptará al equipo de lavado, disponible en su laboratorio.



2. Antígeno: Incubación del extracto de macerado de la muestra (tejidos de la planta).

Macerar la muestra y homogeneizar diluyendo 1:20 (u otras diluciones tal como se recomienda en la hoja informativa del reactivo) en buffer de muestra (extraction buffer). Se recomiendan diferentes buffers para diluir muestras de ciertas especies de plantas ó ciertos tejidos, ver hoja informativa del reactivo.
Adicionar 200 microlitros de la dilución a cada celda (hoyo).
Tapar la placa logrando un buen sellado y colocarla en caja húmeda.
Incubar la placa a 4°C durante toda la noche.

2° Lavado: Repetir el procedimiento indicado para 1° Lavado.



3. Conjugado: Incubación de la IgG conjugada con la enzima.

Diluir la IgG conjugada con la enzima 1000x en buffer de conjugado (Conjugate Buffer).
Adicionar 200 microlitros de la dilución por celda (hoyo).
Tapar la placa logrando un buen sellado y colocarla en caja húmeda.
Incubar a 30°C por 5 horas.

3° Lavado: Repetir el procedimiento indicado para 1° Lavado



4. Sustrato de la enzima : una reacción de color indica una muestra con infección.

Diluir el sustrato de la enzima (p-nitrophenyl phosphate) utilizando 1 mg/ml en buffer de sustrato (substrate buffer).
Adicionar 200 microlitros de la dilución por celda (hoyo).
Incubar a temperatura ambiente (18-25°C) en oscuridad.
Luego de 30- 120 minutos observar el desarrollo de la reacción de color amarillo; registrar los resultados visualmente y/o mediante la medición de la absorbancia (OD) a 405 nm. Si el equipo de lectura está equipado con filtros duales, leer a 405/492 nm. La lectura mediante la utilización de doble filtro reduce el «fondo irregular de la placa», si se la compara con la lectura utilizando un solo filtro a 405 nm.