

ELISA

- Sensibilizar a placa com antígeno
O antígeno deve ser diluído em tampão carbonato bicarbonato 0,1M pH=9,0. Neste caso o antígeno apresentou 589 $\mu\text{g}/\text{ml}$, portanto:

$$589 \cdot X = 10\mu\text{g} \cdot 9600\mu\text{l}$$
$$X = 163 \mu\text{l}$$

$$9600\mu\text{l} - \text{volume total} \left\{ \begin{array}{l} 9437 - \text{tampão carbonato} \\ 163 - \text{antígeno} \end{array} \right.$$

Em seguida foram aplicados 100 μl por poço dando uma agitada e deixar "overnight" em câmara úmida a 4°C.

- Lavar com PBS-Tween 0,02% (2 vezes)
-
- Bloquear a placa com uma solução PBSTL [PBS-Tween 0,02% (1000ml) + Leite (3g)] e agitar.
-
- Levar a estufa 37°C por 1 hora
-
- Lavar novamente com PBSTL (2 vezes)
-
- Diluir os soros em PBSTL e aplicar 100 μl por poço e agitar
-
- Levar por mais 1 hora na estufa 37°C
-
- Lavar com PBSTL (3 vezes)
-
- Preparar uma solução de Uréia 6M e aplicar nos poços por apenas 5 minuto
-
- Aplicar o Conjugado 1/10.000 em PBSTL (10ml de PBS-Tween c/ Leite + 1 μl de anti-IgG de porco) e agitar.
-
- Levar a estufa de CO₂ 37°C por 1 hora
-
- Lavar com PBS-Tween 0,02% (3 vezes)
-
- Aplicar o OPD por 30 minutos em câmara escura
-
- Adicionar HCl a fim de para a reação e em seguida proceder a leitura no leitor de microplacas (492 nm)

OBS: Usar para HCl a metade do que foi usado para amostra.

EX: se foi usado 50 ml de amostra por poços de HCl deve-se usar 25 ml por poço

Tampão Carbonato de Sódio

(0,5M pH 9,5)

Solução A – Carbonato de Sódio 0,5M

Na ₂ CO ₃	5,3g
H ₂ O	100ml

Solução B – Bicarbonato de Sódio 0,5M

NaHCO ₃	4,2g
H ₂ O	100ml

Para:

Tampão pH 9.5

10 ml de solução A + 13 ml de solução B

Tampão pH 8.8

0,9 ml de solução A + 10 ml de solução B