

## **Az immunológia alapjai gyakorlat – ELISA**

Az indirekt ELISA során a vizsgálni kívánt antigén már a lemez felszínéhez van kötve. Ehhez adjuk hozzá a mintát, amely a keresett specifikus antitestet tartalmazza.

A kimutatás egy másodlagos antitest segítségével történik, amelyhez egy enzim (peroxidáz - PO) kapcsolódik. Az enzimhez adott szubsztrát (TMB) színreakciót eredményez, melynek intenzitása egyenesen arányos a mintában lévő antitest mennyiségével.

### **Szükséges anyagok és eszközök**

- Előzetesen antigénnel bevont 96-lyukú mikrotiter lemez, zselatinos telítőoldattal (300 µl/lyuk)
- Mosópuffer
- Minták (zárójelben feltüntettük a hígítási faktort) és kontroll oldatok számozott csövekben (100 µl/cső):

<b>1.</b> (1x)	<b>2.</b> (5x)	<b>3.</b> (25x)	<b>4.</b> (50x)	<b>5.</b> (100x)	<b>6.</b> (200x)	neg. ctrl. (mosó)	poz. ctrl. (IgG 1:1000)
-------------------	-------------------	--------------------	--------------------	---------------------	---------------------	----------------------	-------------------------------

- Konjugátum: anti egér-IgG peroxidáz (PO) 1:10000
- Szubsztrát: TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidin)
- STOP oldat

### **A gyakorlat menete**

1. A lemezről távolítsa el a zselatinos telítőoldatot. Határozott mozdulattal öntse ki. Fordítsa fejjel lefelé a lemezt, és ütögesse tiszta papírtörülőhöz.
2. **Mosás (3x)**
  - Pipetázzon a lyukakra **300 µl** mosópuffert. Határozott mozdulattal öntse ki. Fordítsa fejjel lefelé a lemezt, és ütögesse tiszta papírtörülőhöz. Ismételje meg még kétszer. Minden további mosási lépés során ugyanígy járjon el a lemezzel.
  - Ne hagyja, hogy a lemez kiszáradjon a lépések között!
3. **Első inkubáció (Antitest kötődés)**
  - A harmadik mosást követően mérjen be a lyukakba **100 µl**-t a mintákból, illetve a pozitív és negatív kontrollokból.
  - A minták bemérési sorrendje az alábbi:

<b>1.</b>	1x
<b>2.</b>	5x
<b>3.</b>	25x
<b>4.</b>	50x
<b>5.</b>	100x
<b>6.</b>	200x
<b>7.</b>	neg. ctrl. (mosó)
<b>8.</b>	poz. ctrl. (IgG 1:1000)

- **Inkubálás:** Szobahőmérsékleten **35 percig**.

### **4. Mosás 3x**

- Ismételjük meg a mosást 3x a fentiek (2. pont) alapján.

#### **5. Inkubáció a másodlagos antitesttel**

- Mérjen minden lyukba **100 µl** anti egér-IgG PO konjugátumot.
- **Inkubálás:** Szobahőmérsékleten **35 percig**.

#### **6. Mosás 3x**

- Ismételjük meg a mosást 3x a fentiek (2. pont) alapján.

#### **7. Színreakció és leállítás**

- **Szubsztrát adagolás:** Mérjen be **100 µl TMB** oldatot minden lyukba. Várjuk meg a kék szín kialakulását.
- **Leállítás (STOP):** Adjon hozzá **50 µl STOP** oldatot. A kék szín ekkor sárgára változik.