

Informationen zur Durchführung des DLD-Calretinin ELISAs

Notwendige Vorgehensweise:

- Alle Inkubationsschritte werden mit einem Timer gestoppt, es findet keine Verzögerung oder Verlängerung einzelner Inkubationsschritte statt
- Für die Auswertung wird für den Standardkurven-Fit eine 4-Parameter Analyse angewendet

Zusätzlich empfohlene Vorgehensweise:

- Reagenzien werden während der gesamten Versuchsdurchführung in einem Inkubator auf 22°C temperiert (ideal ist z.B. ein Trockenbad mit Kugeln)
- Probenvorbereitung:
 - Während die Standards und Kontrollen inkubieren, werden die Plasma-Proben auf einem Rollmischer aufgetaut
 - Anschließend wird das Plasma über die „Short“-Funktion an der Zentrifuge 10s abzentrifugiert
 - Mit Hilfe einer 8-Kanal Pipette Integra Voyager werden je 15 µl Standard, Kontrolle 1 und 2 bzw. Plasma in die entsprechenden Vertiefungen der Vorbereitungsplatte pipettiert
 - Auf Grundlage des selbst zu schreibenden Programms nimmt die Integra Voyager Pipette 32 µl der Probe/ Standard auf und gibt in zwei Schritten je 15 µl ab, das Restvolumen wird verworfen
- Waschvorgänge
 - Verdünnter Waschpuffer steht am Waschgerät bei Raumtemperatur
 - Platte wird mit TECAN HydroFlex Washer gewaschen (4x 300 µl)
 - Nach vier Waschvorgängen wird die Platte auf Papierhandtüchern ausgeklopft
- Diluent, Antiserum, verdünntes Enzymkonjugat, Substrat und Stopplösung werden der Platte mittels Multipette hinzugefügt
- Die Übertragung der verdünnten Standards, Kontrollen und Proben auf die ELISA-Mikrotiterstreifen erfolgt ebenfalls mittels Integra Voyager (55 µl Aufnahme, 50 µl Abgabe, Restvolumen wird verworfen)
- Alle Pipettierschritte werden mäanderförmig durchgeführt, die Doppelbestimmungen also immer direkt hintereinander (wichtig bei Substratzugabe)
- Platte wird im Photometer bei 450 – 650 nm direkt nach dem Stoppen gemessen

Empfohlene Geräte für die Durchführung:

- Thermomixer: z.B. ThermoMixer C (Eppendorf) mit SmartBlock Plates (Eppendorf), Thermo Scientific Thermomixer, Benchmark MultiTherm Shaker H5000-HC; starlab Thermoschüttler-Mixer HC, IKA Thermoschüttler MATRIX Orbital Delta Plus
- Trockenbad mit Kugeln: z.B. Cole-Parmer™ Trockenbad 0-40°C mit Kugeln (z.B. von fisherscientific)
- Multipipette: z.B. Multipipette E3 (Eppendorf)
- Pipette, z.B. Integra Voyager 8-Kanal VOYAGER Pipette, 5 - 125 µl (Integra)
- Waschgerät: z.B. HydroFlex Microplate Washer (TECAN)
- Photometer: z.B. SpectraMax® M3 (Molecular Devices)