



## 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](http://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<sub>3</sub> 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).

# Procedure



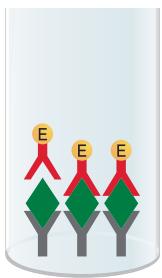
## 1. Coating: binding specific antibodies

- 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).



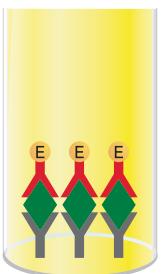
## 2. Antigen: incubation with plant extract

- 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: 4 - 18.10.2017





## Information technique

# Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent 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](http://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<sub>3</sub> 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).

# Procédure



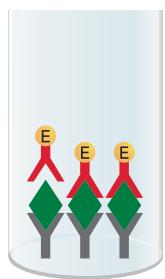
## 1. Coating: adsorption des anticorps spécifiques

- 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: 4 - 18.10.2017



## 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](http://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<sub>3</sub> 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).

# Testdurchführung



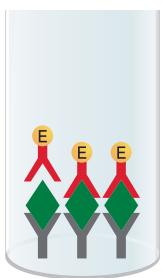
## 1. Coating: Bindung spezifischer Antikörper

- 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).



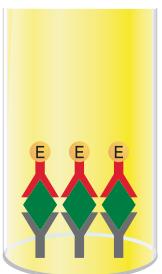
## 2. Antigen: Inkubation mit Pflanzenextrakt

- 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. Waschschrifte (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: 4 - 18.10.2017