Hazırlık:

1. Örneklerin çözünüp, oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
2. Wash Buffer : 720ul dH2O + 30 ml Wash Buffer Konsantresi karıştırıldı.
3. Standart Working Solution: Standart 10.000g de 1 dk. Santrifüj edildi. 1 ml Reference Standart&Sample Diluent ile dilüe edildi ve homojen olarak çözünmesi sağlandı.
4. Biotinylated: 100x Concentrated Biotinylated Detection Ab ile 1x lik Biotinylated Detection Ab dilüe edildi. Bu oranlar HRP için de geçerlidir (örn:100ul biotin + 9900ul biotin diluent).
5. Standartlar için 7 adet 1.5 ml lik ependorf tüplere 500ul Reference Standart&Sample Diluent eklendi ve aşağıdaki adım takip edildi.



Protokol

1. 100ul standart A1 sütunundan sırası ile A8 e kadar eklendi..
2. Örnekler pipetaj yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100ul örnek yüklendi ve plate sealer ile kaplandı. 90 dk. 37° de inkübe edildi.
3. Plate’deki sıvı ters çevrilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Dilue ettiğimiz Biotinden her bir kuyucuğa 100ul eklendi. 60 dk. 37° de inkübe edildi.
4. Biotin ortamdan uzaklaştırıldı ve hazırlanan wash bufferdan her bir kuyucuğa 300ul eklenerek 3 kez yıkama yapıldı (her bir yıkamada max. 1dk beklemek yeterlidir).
5. Hazırlanan HRP’ den her bir kuyucuğa 100ul eklendi. 30 dk. 37° de inkübe edildi.
6. Yıkama işlemi tekrarlandı.
7. Her bir kuyucuğa 90ul Subsrat Reagent eklendi ve plate sealer ile kapatıldıktan sonra aleminyum folyaya konuldu. 15 dk. 37° de inkübe edildi (Bu aşamadan sonra substrat reagent ortamdan uzaklaştırılmaz).
8. Her bir kuyucuğa 50ul Stop Solution eklendi ve Elisa Reader cihazı ile açık okuma yapıldı.