**BT ELİSA KİTİ ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ**

1. **Kit içeriğinde bulunan tüm reaktifler, standart solüsyonları ve numuneler oda sıcaklığına geldikten sonra çalışmaya başlanır.**
2. **96 kuyucuk bulunan plate üzerindeki belirlenen 6 kuyucuğa 50 ul standartlar, kalan kuyucuklara 40 ul numunelerden pipetlenir.**
3. **Numune kuyucuklarına 10 ul biotinli antibody pipetlenir, standart solüsyonunda antibody bulunduğu için standart kuyucuklarına antibody eklenmez.**
4. **Tüm kuyucuklara(standart ve sample) 50 ul HRP pipetlenir.(Blank hariç)**
5. **Plate’ in üzeri koruyucu film ile kaplanarak 60 dk 37º C ‘de inkübe edilir.**
6. **İnkübasyondan sonra film çıkartılarak her kuyucuğa 350 ul yıkama tamponu olacak şekilde 5 kez arka arkaya otomatik yıkama cihazında yıkama işlemi yaptırılır.**
7. **Yıkama işleminden sonra plate üzerinde bulunan tüm kuyucuklara substrat solüsyonu A ve B den sırasıyla 50’şer ul pipetlenir.**
8. **Plate filmle kaplanarak tekrar 10 dk 37º C ‘de inkübe edilir.**
9. **İnkübasyondan sonra film çıkartılarak tüm kuyucuklara 50 ul stop solüsyonu eklenerek mavi renk olan kuyucuklardaki reaksiyon durdurulmuş olur ve kuyucukların rengi sarıya döner.**
10. **Bu aşamadan sonra 450 nm ‘ de mıcroplate reader cihazında plate kuyucuklarının okuması yapılarak absorbansları ölçülür.**
11. **Alınan absorbanslardan blank değeri çıkartılarak standartlar’ın absorbans değerleri ile excel formatında polinom grafiği ile standart eğri oluşturulur ve elde edilen denklem ile sonuçlar hesaplanır.**