**PROTOCOLO DE ENSAIO ELISA EM HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS**
**BDNF (DuoSet ELISA, 15 PLACAS)**

**Equipamentos:**

Leitor de ELISA (Biotek-Elx808) com filtros apropriados

Placas de 96 poços (Nunca toque na placa inferior) Placa Elisa (Greiner Bio-one, ref: 650001)

 Filmes de microplacas ELISA - USA Scientific. Cat: 2920-0000

Pipeta multicanal 200µL

**Reagentes:**

Kit Mouse Mouse BDNF DuoSet ELISA, 15 placas (sistemas de P & D, cat # DY248)

- Materiais fornecidos pelo kit:

Anticorpo de captura

Anticorpo de detecção

Padrão

Estreptavidina-HRP

- Materiais não fornecidos pelo kit:

Placas de 96 poços

Seladores de placa

Tampão de lavagem (Tween 20 a 0,05% em PBS, pH 7,2-7,4)

PBS

Tampão de bloqueio (tampão bloqueador de BSA para ELISA) Santa Cruz, cat # sc-293965 (solução a 5% de BSA)

Soluções de substrato (reagente A-H2O2 e reagente B-Tetrametilbenzidina)

Stop solution (H2SO4 2N)

Diluente do reagente (1% de BSA em PBS, pH 7,2-7,4)

Todas as soluções são armazenadas a 4°C, exceto para tampão de bloqueio, PBS, solução de parada e tampão de lavagem, que podem ser armazenados à temperatura ambiente.

**Preparação dos Reagentes:**

- Trazer todos os reagentes à temperatura ambiente antes do uso. As diluições de trabalho devem ser pré-preparadas e usadas imediatamente.

- O tampão de bloqueio pode ser usado para diluir o padrão, as amostras, o anticorpo de detecção e a estreptavidina-HR.

- Anticorpo de captura: Consulte o Certificado de Análise para a quantidade fornecida. Reconstituir com 1mL de PBS e diluir para a concentração de trabalho indicada no Certificado de Análise.

**KIT BDNF:** 360µg (por frasco reconstituir em 1,0 ml de PBS). A concentração de trabalho é: 2000 ng / ml (2,0 µg / ml).

360 µg …………… ..1 ml

2 µg ……………… ..X

360X …… .2

X = 0,00555 ml ou 5,555 µl em 1 ml, se você quiser 10 ml, que serão 55,6 µl

- Padrões: Consulte o Certificado de Análise para a quantidade fornecida. Reconstitua cada frasco com 500 uL. Uma curva padrão de sete pontos usando diluições em série de duas vezes (você pode fazer 250 uL, já que precisará de 200 uL por placa).

KIT BDNF: 75 ng em 0,5 ml. A concentração de trabalho: 23.4 - 1500 pg / ml

Padrão (Std) (concentração de trabalho: 1500 pg / ml)

150 pg / µl (X) = 1500

X = 10 µl do BDNF padrão e adicionar 990 µl do tampão de bloqueio para preparar o Std1 (Padrão 1). Para os outros padrões (Std2 - Std7), vá para diluições em série. Por exemplo. Std2: 500 µl tampão de bloqueio + 500 µl do BDNF; Std3: 500 µl tampão de bloqueio + 500 µl do STD2; Std4: 500 µl tampão de bloqueio + 500 µl do STD3; Std5: 500 µl tampão de bloqueio + 500 µl do STD4; Std6: 500µl tampão de bloqueio + 500 µl do STD5; Std4: 500 µl tampão de bloqueio + 500 µl do STD6.

- Anticorpo de detecção: Consulte o Certificado de Análise para a quantidade fornecida. Reconstituir com 1 mL e diluir para a concentração de trabalho indicada no Certificado de Análise.

- Solução de estreptavidina: Reconstituir e diluir para a concentração de trabalho especificada no rótulo do frasco.

- Solução de substrato: Misture 1: 1 reagentes A e B.

**Preparo da amostra**

1. As amostras devem ser pesadas e homogeneizadas em 200µL de tampão PBS 1x estéril.
2. Em seguida deve ser posto uma bead de metal dentro de cada eppendorf.
3. Procede-se à maceração no TissueLiser.
4. Centrifuga-se as amostras e coleta o sobrenadante.
5. Centrifugar 8000 rpm por 5min a 4ºC (Centrífuga Eppendorf 5804 R).
6. Realize a quantificação de proteínas segundo método de Lowry (kit BCA ThermoFischer Scientific).
7. A concentração de proteínas deve ser usada para corrigir a concentração de BDNF por amostra.

**Procedimento**

1. Dilua o Anticorpo de Captura na concentração de trabalho e imediatamente adicione 100 μl a cada poço da placa em PBS. Selar a placa e incubar durante a noite à temperatura ambiente.

Se todos os poços forem utilizados, 96 x 100 = 9600 µl ou (9,6 ml)

2. Aspirar cada poço e lavar com Tampão de Lavagem, repetindo o processo duas vezes para um total de três lavagens. Lave preenchendo cada poço com Tampão de Lavagem usando um distribuidor de coletor. Verifique se o dispensador está pingando em todos os poços. A remoção completa do líquido em cada etapa é essencial para um bom desempenho. Após a última lavagem, remova qualquer tampão restante, invertendo a placa e borrando-a contra toalhas de papel limpas.

3. Bloqueie as placas adicionando 300 µL de tampão de bloqueio a cada poço. Incubar à temperatura ambiente por pelo menos 1 hora. Você pode cobrir a placa com um selador (Santa Cruz, cat # 293965). Tenha em atenção que a pipeta multicanal (FinnPipette, Fisherbrand) não pode receber pontas de 1 ml. Pipetar duas vezes: uma com 100 µl e outra com 150 µl para um total de 250 µl.

4. Repita o passo 2.

5. Adicione 100 µl de padrões a cada poço (faça em duplicatas). Para as amostras, adicione 50 µl de tampão de bloqueio e 50 µl das amostras a cada poço. Cubra com um novo selante e incube 2 horas à temperatura ambiente (1 hora + 30 minutos funciona bem). Vortex brevemente padrões (antes e após a diluição) e amostras antes da carga da placa.

Prepare e rotule os tubos eppendorf para os padrões. Você pode adicionar o tampão de bloqueio primeiro. Adicione 500 µl aos tubos Std 2-7.

(veja a preparação dos padrões acima)

6. Repita o passo 2.

7. Adicione 100 µL do anticorpo de detecção a cada poço. Cubra com um novo selante e incube 2 horas à temperatura ambiente (1 hora funciona bem). A solução de anticorpos de detecção é calculada com base no certificado da folha de análise:

**PARA O KIT BDNF:**

Anticorpo de detecção: 4,5 µg e concentração de trabalho de 25 ng / ml

0,025 µg / ml, se desejar, por 10 ml = 0,025 x 10 = 0,25 µg

4,5 µg / ml (x) = 0,25

X = 0,05555 X 1000

X = 55,6 µl

8. Repita o passo 2.

9. Adicione 100 µl da diluição de trabalho da Streptavidin-HRP a cada poço (em tampão de bloqueio). Cubra a placa e incube por 20 minutos em temperatura ambiente. Evite colocar a placa na luz direta. Observe que a estreptavidina-HRP precisa de uma diluição de 200 vezes (1: 200).

A.X = 10 ml X A / 200

X = 0,05 ml ou 50 µl

10. Repita o passo 2.

11. Adicione 100 µL de Solução de Substrato a cada poço. Incubar por 20 minutos (ou mais) à temperatura ambiente. Evite colocar a placa na luz direta.

12. Adicione 50 µl de solução de paragem (2N H2SO4) a cada poço. Bata suavemente na placa para garantir a mistura completa.

13. Determine a densidade óptica de cada poço imediatamente, usando um leitor de microplacas configurado para 450 nm. Se a correção de comprimento de onda estiver disponível, ajuste para 540nm ou 570nm.