

- *Буфер для розведення.* PBS, що містить 5 г/л альбуміну бичачого Р та 0.5 г/л полісорбату 80 Р.
- *Блокуючий буфер.* PBS, що містить 5 г/л альбуміну бичачого Р.
- *Розчин тетраметилбензидину.* 6 г/л тетраметилбензидину Р розчиняють в 96 % спирті Р. Речовина розкладається протягом 30-40 хв при кімнатній температурі.
- *Субстрат для пероксидази.* Змішують 90 мл води Р, 10 мл ацетатно-натрієвого буфера рН 5.5, 1.67 мл розчину тетраметилбензидину Р та 20 мкл водню пероксиду розчину концентрованого Р.
- *Промивний розчин.* Водопровідна вода, що містить 0.5 г/л полісорбату 80 Р.

Метод

▼ *Мікропланшети* ▲ блокують, поміщаючи в кожну лунку по 150 мкл блокуючого буфера. Накривають планшети кришкою або герметиком. Інкубують у вологому середовищі за температури 37 °С протягом 1 год. Планшети ретельно промивають, використовуючи промивний розчин. Поміщають 100 мкл PBS у кожну лунку. Вносять 100 мкл стандартної протиправцевої сироватки мурчаків в першу по рахунку лунку в ряду. Вносять 100 мкл нерозбавленої випробовуваної сироватки в першу по рахунку лунку наступного ряду(ів) (необхідну кількість разів). Використовуючи мультиканальну мікропіпетку, роблять двократне серійне розведення уперек планшета (до стовпця 10), переносячи по 100 мкл з однієї лунки в наступну. Видаляють 100 мкл з останнього ряду, залишаючи тим самим у всіх лунках по 100 мкл. Готують 0.1 Lf/мл розчин токсину правця або анатоксину, використовуючи PBS як розчинник. Додають 40 мкл цього розчину в кожну лунку окрім лунок стовпця 12. Лунки стовпця 11 — це позитивний контроль. Додають 40 мкл PBS у лунки стовпця 12 (негативний контроль). Планшети обережно струшують та накривають їх кришками. Покриття планшетів для ELISA: безпосередньо перед використанням роблять відповідне розчинення протиправцевого IgG коня в карбонатному буфері рН 9.6 та додають 100 мкл в кожну лунку. Інкубують 2 паралелі планшетів протягом ночі у вологому середовищі при температурі 37 °С. Щоб уникнути ефектів температурного градієнта, більше 4 планшетів у висоту не складають. Накривають планшети кришками або іншим підходящим засобом. Наступного дня ретельно промивають планшети для ELISA промивним розчином. Блокують планшети, вносять в кожну лунку 125 мкл блокуючого буфера. Інкубують у вологому середовищі при температурі 37 °С протягом 1 год. Ретельно промивають планшети для ELISA промивним розчином. Переносять 100 мкл суміші після інкубації з планшета для мікротитрування у відповідні лунки планшета для ELISA, починаючи з стовпця 12 і потім продовжуючи від 1 до 11. Накривають планшети кришкою. Інкубують за температури 37 °С у вологому середовищі протягом 2 год. Ретельно промивають планшети для ELISA,

використовуючи промивний розчин. Роблять відповідні розведення (раніше було виявлено, що відповідним є 4000-кратне розведення) кон'югованого пероксидазою протиправцевого IgG коня в буфері для розведення. У кожну лунку додають 100 мкл розчину та накривають планшети кришкою. Інкубують за температури 37 °С у вологому середовищі протягом 1.5 год. Ретельно промивають планшети для ELISA, використовуючи промивний розчин. У кожну лунку додають 100 мкл субстрату для пероксидази; з'являється синє забарвлення. Інкубують планшети за кімнатної температури. Зупиняють реакцію у встановлений термін (в межах 10 хв) додаванням 100 мкл 2 М розчину кислоти сірчаної Р в кожну лунку з вже доданим субстратом; забарвлення має змінитися від синього в жовтий. негайно після додавання кислоти сірчаної Р вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 450 нм або тримають планшети в темному місці до вимірювання.

2.7.9. ВИПРОБУВАННЯ ІМУНОГЛОБУЛІНУ НА Fc-ФУНКЦІЮ

Випробовування імуноглобуліну на Fc-функцію здійснюють із використанням методу А або Б. Метод Б — це адаптована процедура методу А з використанням мікропланшетів для вимірювання ступеня комплемент-опосередкованого гемолізу. Відмінності у процедурах між методами А та Б розглядаються у випробуванні.

РЕАКТИВИ

Стабілізована кров людини. Збирають кров людини групи 0 в розчині антикоагулянту АСД. Зберігають стабілізовану кров за температури 4 °С протягом не більше 3 тижнів.

Фосфатно-сольовий буфер ■ рН 7.2. Розчиняють 1.022 г динатрію гідрофосфату безводного Р, 0.336 г натрію дигідрофосфату безводного Р та 8.766 г хлориду натрію Р в 800 мл води Р та доводять до 1000 мл тим же розчинником.

Магнію та кальцію основний розчин. Розчиняють 1.103 г кальцію хлориду Р та 5.083 г магнію хлориду Р у воді Р та доводять до 25 мл тим же розчинником.

Барбіталовий основний буферний розчин. Розчиняють 207.5 г натрію хлориду Р та 25.48 г барбітал-натрію Р в 4000 мл води Р та доводять значення рН до 7.3 з використанням 1 М хлористоводневої кислоти. Додають 12.5 мл магнію та кальцію основного розчину та доводять до 5000 мл водою Р. Зберігають за температури 4 °С у прозорих контейнерах.

Барбітал-альбуміновий буферний розчин. Розчиняють 0.150 г альбуміну бичачого Р у 20 мл барбіталовому основному буферному розчині та доводять до 100 мл