

# Praktikum Cortisolbestimmung durch ELISA

## 1. Herstellung der Speichelproben

Es werden gut 500 µl Speichel gesammelt. Von der Speichelprobe werden 400 µl in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt dann 5 Minuten zentrifugiert. Danach werden 300 µl Überstand vorsichtig abgenommen und in ein anderes Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

## 2. Antikörperreaktion

Es werden jeweils 50 µl der Eichlösungen (A - F), der Kontrollen (1 + 2), sowie von drei Praktikanten (P1 – P3) jeweils 4 Speichelproben wie folgt aufgetragen (20 Wells):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					A	K1	P2					
B					B	K2	P2					
C					C		P2					
D					D		P2					
E					E	P1	P3					
F					F	P1	P3					
G						P1	P3					
H						P1	P3					

Anschließend werden 100 µl Enzymkonjugat dazugegeben, die Platte mit Haftfolie abgedeckt und mindestens eine Stunde auf einem Orbitalschüttler inkubiert.

## 3. Waschen

Nun werden die Folien vorsichtig entfernt und die Wells durch Ausschlagen auf Papiertüchern geleert. Anschließend wird vier mal gewaschen. Dazu werden 250 µl Waschpuffer in jedes Well pipettiert und die Platten erneut ausgeschlagen.

## 4. Enzymreaktion

Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 100 µl TMB Substratlösung gestartet. Es erfolgt eine Inkubation für 30 Minuten. Danach wird die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 µl TMB Stopplösung beendet.

## 5. Auswertung

Die Absorptionen der einzelnen Wells werden nun in einem ELISA-reader bei 450 nm gemessen. Aus den Messwerten und den Konzentrationen der Eichlösungen A - G (0 / 0,015 / 0,04 / 0,17 / 0,7 / 3,0 µg/dl) wird dann eine semilogarithmische Eichkurve erstellt. Anhand dieser Eichkurve können nun die Cortisolkonzentrationen der Speichelproben abgelesen werden.