

**APPLICATION**

La trousse de dosage d'immunoglobulines de souris RD-Biotech permet par une méthode simple et rapide (**ELISA en une étape**) l'analyse quantitative des IgG murines dans les surageants de culture de cellules ou dans les liquides d'ascites. Les réactifs prêts à l'emploi sont en quantité suffisante pour l'analyse de **90 échantillons** et permettent d'obtenir **des résultats en moins de 30 min**. Cette trousse comprend des solutions colorées afin de faciliter et contrôler le dépôt des échantillons dans les puits (Brevet déposé).

**PRINCIPE DU TEST**

Les anticorps capteurs, fixés dans les puits, lient les anticorps de l'échantillon et forment des complexes qui sont révélés par un anticorps détecteur couplé à la peroxydase. La présence de l'anticorps détecteur fixé est mise en évidence par la réaction enzymatique de transformation d'un substrat chromogène (TMB). **L'absorbance mesurée est directement proportionnelle à la concentration en immunoglobulines dans l'échantillon.**

**SPECIFICITES**

Détection de toutes les classes d'IgG. Les IgG3 nécessitent une gamme étalon spécifique.

Les réactions croisées ont été déterminées par ELISA. Ig humaines : inférieures à 1%. Ig de vache : inférieures à 1,5%. Ig de chèvre : inférieures à 2%. Ig de cochon d'inde et de rat : environ 15%. Ig de porc : environ 5%. La réaction croisée au sérum humain au sérum de veau foetal est typiquement inférieure à 0,2%.

**SEUIL DE DETECTION**

La plage de détection s'étend de **6 ng/ml à 2000 ng/ml**.

**CONSERVATION**

Conserver la trousse entre 2-8° C. Dans ces conditions, les réactifs sont stables pendant 12 mois. Ne pas congeler.

**COMPOSITION DE LA TROUSSE**

Références	Contenant	Quantité
RDB3256-1	Microplaques sensibilisées avec l'anticorps capteur : anticorps polyclonal anti-IgG de souris	6 barrettes sécables de 16 puits
RDB3256-2	Gamme de standards d'IgG de souris Concentrations : 0 – 0,02 – 0,1 – 0,2 – 0,75 – 1,9 µg/ml (Solutions bleues)	6 x 0,3 ml
RDB3256-3	Diluant d'échantillon (PBS 1X, BSA 1%, Tween 20 à 0,1%) (Solution bleue)	1 x 30 ml
RDB3256-4	Anticorps conjugué : Anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Solution rouge)	12 ml
RDB3256-5	Substrat TMB	12 ml
RDB3256-6	Solution d'arrêt	12 ml

Toutes les solutions sont prêtes à l'emploi

**MATERIEL ADDITIONNEL NECESSAIRE NON FOURNI**

Pipette 20-200 µl.  
Laveur de plaques automatique (recommandé).  
Lecteur de microplaques mesurant l'absorbance à **450 nm** et à **620 nm**.

**PREPARATION DES REACTIFS**

Solution de lavage : H<sub>2</sub>O + 0,05% Tween 20.

**PREPARATION DES ECHANTILLONS**

Diluer les échantillons avec le diluant afin d'obtenir une concentration finale comprise entre 6 ng/ml et 2000 µg/ml.

Echantillons	Dilutions recommandées
Surageant de culture	1/100
Miniperme®, CELLLine®	1/1000
Liquide d'ascite	1/10000

**PROCEDURE**

Toutes les étapes du test se font à température ambiante. Sortir les réactifs 30 min avant de commencer le test. Retirer le film protecteur des barrettes.

ETAPE 1	Déposer successivement 20 µl de standards et d'échantillons dilués dans chaque puits ( <b>solutions bleues</b> ) Il est recommandé de traiter les échantillons en double.
ETAPE 2	<p>Ajouter sans délai 100 µl d'anti-IgG de souris couplés à la peroxydase (<b>solution rouge</b>) Agiter doucement jusqu'à l'obtention d'une <b>coloration violette homogène</b>. Incuber 15 min à température ambiante.</p>
ETAPE 3	Après incubation, laver la plaque trois fois avec <b>300 µl</b> de la solution de lavage.
ETAPE 4	Ajouter 100 µl de substrat TMB dans chaque puits. Incuber <b>10 minutes</b> à température ambiante.
ETAPE 5	Stopper la réaction avec 100 µl de solution STOP.
ETAPE 6	Mesurer l'absorbance <b>450 nm</b> et <b>620 nm</b> .

**INTERPRETATION ET VALIDATION DES RESULTATS**

Tracer la courbe de **A450 nm – A620 nm** en fonction de la concentration. Déterminer la concentration en immunoglobulines dans l'échantillon à partir de la courbe. Si la valeur d'absorbance obtenue n'est pas comprise dans la gamme, répéter le test en modifiant la dilution de l'échantillon. Corriger la valeur obtenue par le facteur de dilution pour obtenir la concentration finale de l'échantillon.

**VALIDITE DU TEST** : L'absorbance du standard 0 ng/ml doit être inférieure à 0,1. Le test ne permet pas l'analyse d'échantillons non dilués de concentration supérieure à 2 µg/ml. Dans certains cas il peut s'avérer nécessaire de recalibrer la gamme étalon par rapport aux étalons du laboratoire utilisés habituellement.

**EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE**

A450nm-A620nm	Concentration en µg/ml
0,045	0
0,096	0,02
0,351	0,1
0,604	0,2
1,327	0,75
1,881	1,9

