

APPLICATION

La trousse de dosage d'immunoglobulines G bovines RD-Biotech permet par une méthode simple et rapide (**ELISA en une étape**) l'analyse quantitative des IgG bovines dans les sérums bovins (SVF, SVNN) et des Ig bovines contaminantes présentes dans les anticorps produits *in vitro*.

Les réactifs prêts à l'emploi sont en quantité suffisante pour l'analyse de **89 échantillons** et permettent d'obtenir **des résultats en 45 min**.

Cette trousse comprend des solutions tampons colorées afin de faciliter et de 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

Les réactions croisées ont été déterminées par ELISA. Aucune réaction croisée n'a été observée pour les Ig des espèces suivantes : souris et humain.

SEUIL DE DETECTION

Le seuil de détection du test est de **10 ng/ml**. Pour des anticorps d'une concentration de 1 mg/ml, le kit permet de détecter des contaminations en Ig bovines de l'ordre de 20 ppm.

CONSERVATION

Conserver la trousse entre 2-8° C. Dans ces conditions, les réactifs sont stables pendant 6 mois. Ne pas congeler.

COMPOSITION DE LA TROUSSE

Références	Contenant	Quantité
RDB3258-1	Microplaques sensibilisées avec l'anticorps capteur : anticorps polyclonal anti-Ig G (H+L) bovin	6 barrettes sécables de 16 puits
RDB3258-2	Gamme de standards d'IgG bovines Concentrations : 0 – 31 – 125 – 250 – 500 – 1000 – 2000 ng/ml (solutions bleues)	7 x 0,3 ml
RDB3258-3	Diluant d'échantillon (solution bleue)	30 ml
RDB3258-4	Anticorps conjugué : Anti-IgG (H+L) bovin couplé à la peroxydase (solution rouge)	12 ml
RDB3258-5	Substrat TMB	12 ml
RDB3258-6	Solution STOP	12 ml

Toutes les solutions sont prêtes à l'emploi

MATERIEL ADDITIONNEL NECESSAIRE NON FOURNI

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

PREPARATION DES REACTIFS

Solution de lavage : H₂O + 0,05% Tween 20.

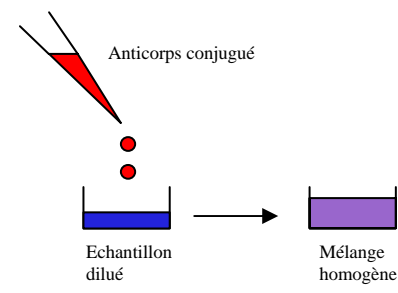
PREPARATION DES ECHANTILLONS

Dosage des IgG Bovines dans un sérum :
- Sérum déplété : diluez l'échantillon au 1/4
- Sérum non déplété : diluez l'échantillon au 1/200
Dosage des IgG bovines contaminantes dans un anticorps produit *in vitro* :
- Avec sérum déplété : diluez l'échantillon de manière à avoir une concentration en anticorps de 1 mg/ml
- Avec sérum non déplété : diluez l'échantillon de manière à avoir une concentration en anticorps de 50 µg/ml

NB : Les dilutions sont des dilutions recommandées, si la valeur d'absorbance obtenue n'est pas comprise dans la gamme, répéter le test en modifiant la dilution de l'échantillon.

PROCEDURE

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

ETAPE 1	Déposer successivement 20 µl de standards et d'échantillons colorés en bleu dans chaque puits. Il est recommandé de traiter les échantillons en double.
ETAPE 2	 <p>Ajouter sans délai 100 µl d'anti-IgG bovines couplés à la peroxydase (solution rouge). Agiter doucement jusqu'à l'obtention d'une coloration violette homogène. Incuber 30 minutes à température ambiante.</p>
ETAPE 3	Après incubation, bien laver la plaque trois fois avec 300 µl de la solution de lavage.
ETAPE 4	Ajouter 100 µl de substrat TMB dans chaque puits. Incuber 10 minutes à température ambiante.
ETAPE 5	Stopper la réaction avec 100 µl de solution STOP.
ETAPE 6	Mesurer l'absorbance à 450 nm et 620 nm

INTERPRETATION ET VALIDATION DES RESULTATS

Tracer la courbe de **A450 nm – A620 nm** en fonction de la concentration. Déterminer la concentration en IgG bovines dans l'échantillon à partir de la courbe. Corriger la valeur obtenue par le facteur de dilution pour obtenir la concentration finale de l'échantillon en IgG bovines.
Pour le dosage d'une contamination d'un anticorps par des IgG bovines, la concentration en IgG bovines obtenue peut être rapportée (en pourcentage) à la concentration de l'anticorps.
Exemple : un anticorps de concentration 1 mg/ml est dosé à 16 µg/ml en IgG bovines, l'anticorps est donc contaminé par 1,6% d'IgG bovines.
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

