



Bio-X Diagnostics

ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-NPI (BIO 345)

(Réactif pour l'immunofluorescence ou l'immunoperoxydase indirecte)

REACTIF POUR LA DETECTION DU VIRUS DE LA NECROSE PANCREATIQUE INFECTIEUSE (NPI) SUR CULTURES CELLULAIRES.

I – PROCEDURE POUR L'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Fixer la préparation cellulaire 15 minutes à 21°C +/- 3°C en utilisant un des fixateurs indiqués dans la liste suivante :

- Paraformaldehyde 2 % en PBS
 - Solution d'acétone (9 volumes d'acétone et 1 volume d'eau).
 - Solution pure d'isopropanol
- Rincer ensuite au PBS.

Diluer le réactif au 1/20 dans du PBS – Blue Evans préparé selon la formule suivante:

PBS - Blue Evans

NaCl:	8 gr
KH ₂ PO ₄ :	0.2 gr
KCl:	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O:	1.15 gr
Blue Evans:	0.01 gr
NaN ₃ :	0.1 gr
H ₂ O	1 L

Incuber la préparation sur l'échantillon 1 heure à 21°C +/- 3°C de préférence dans une chambre humide.

A l'issue de cette période d'incubation, rincer la préparation avec une solution de PBS.

Ajouter ensuite le conjugué (anti-immunoglobulines de souris couplé à la fluoresceine) à la dilution préconisée par le fabricant. Le conjugué fabriqué par Bio-X Diagnostics (BIO 156) est à diluer au 1/20 en PBS Blue - Evans

Incuber la préparation sur l'échantillon 1 heure à 21°C +/- 3°C de préférence dans une chambre humide.

A l'issue de cette période d'incubation, rincer la préparation avec une solution de PBS.

Sécher la préparation puis ajouter y le milieu de montage préparé de la façon suivante:

Milieu de montage

Glycérol	9 volumes
PBS	1 volume

Placer une lamelle couvre-objet sur la lame puis observer la à l'aide d'un microscope équipé pour la fluorescence.

L'anticorps peut être conservé entre +2°C et +8°C plus d'un an dans son flacon d'origine. Ne jamais congeler ce réactif.

La stabilité de l'anticorps dilué dans la solution de PBS Blue Evans est d'une semaine entre +2°C et +8°C.

II – PROCEDURE POUR L'IMMUNOPEROXYDASE INDIRECTE

Fixer la préparation cellulaire (cellules en culture ou coupes tissulaires) 15 minutes à 21°C +/- 3°C en utilisant un des fixateurs indiqués dans la liste suivante :

- Paraformaldehyde 2 % en PBS
- Solution d'acétone (9 volumes d'acétone et 1 volume d'eau).
- Solution pure d'isopropanol

Rincer ensuite au PBS.

Diluer le réactif au 1/20 dans du PBS préparé selon la formule suivante:

PBS

NaCl:	8 gr
KH ₂ PO ₄ :	0.2 gr
KCl:	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O:	1.15 gr
NaN ₃ :	0.1 gr
H ₂ O	1 L

Incuber la préparation sur l'échantillon 1 heure à 21°C +/- 3°C de préférence dans une chambre humide.

A l'issue de cette période d'incubation, rincer la préparation avec une solution de PBS.

Ajouter ensuite le conjugué (anti-immunoglobulines de souris couplé à la peroxydase) à la dilution préconisée par le fabricant. Le conjugué fabriqué par Bio-X Diagnostics (BIO 157) est à diluer au 1/20 en PBS.

Incuber la préparation sur l'échantillon 1 heure à 21°C +/- 3°C de préférence dans une chambre humide.

A l'issue de cette période d'incubation, rincer la préparation avec une solution de PBS.

Ajouter ensuite le chromogène (AEC, TMB précipitant, DAB...) et le substrat (eau oxygénée) en suivant la procédure du fabricant. Observer au microscope l'apparition du marquage.