



Bio-X Diagnostics

ANTICORPS MONOCLONAL ANTI- *LAWSONIA INTRACELLULARIS* (BIO 323)

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

REACTIF POUR LA DETECTION DE *LAWSONIA INTRACELLULARIS* SUR COUPES D'ORGANES.

I – PROCEDURE POUR L'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Fixer les coupes tissulaires 15 minutes à 21°C +/- 3°C en utilisant de la Paraformaldehyde 2 % en PBS

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 y ajouter le milieu de montage préparé de la façon suivante:

L'organe est fixé durant 10 minutes dans une solution tamponnée de formol à 10 %. Après la fixation, le matériel est déshydraté, inclus en paraffine et des coupes sont réalisées au microtome selon la procédure conventionnelle. Les lames sont ensuite déparaffinées avant d'ajouter l'anticorps monoclonal.

L'étape de déparaffinage est réalisée de la façon suivante :

Xylène 100 %	2 X 5 minutes
Ethanol 100 %	2 X 2 minutes
Ethanol 95 %:	1 X 2 minutes
Ethanol 70 %:	1 X 2 minutes

Eau:

Protéinase (P8038 Sigma 50 mgr/ml en TBS) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6)

Si on envisage de réaliser une procédure d'immunoperoxydase, il est nécessaire d'inhiber les peroxydases tissulaires endogènes de la façon suivante : traiter la coupe durant 20 minutes avec une solution à 0,6 % d'H₂O₂ en TBS. Cette étape n'est évidemment pas nécessaire pour les tests d'immunofluorescence. Rincer la lame au PBS puis procéder ensuite comme décrit aux points I ou II.

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 à 4°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 les coupes tissulaires 15 minutes à 21°C +/- 3°C en utilisant de la Paraformaldehyde 2 % en PBS

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.

III - PROCEDURE POUR L'IMMUNOFLUORESCENCE OU L'IMMUNOPEROXYDASE INDIRECTE SUR DES COUPES DEPARAFFINEES