

Trousse de dosage de l'ovalbumine

Version 2010/01

FR

Trousse contenant :

- 1 cadre pour barrettes précoâtées
- 4 sachets contenant chacun :
 - 3 barrettes pré-coâtées par des anticorps anti-ovalbumine,
 - 1 flacon de solution S4 d'ovalbumine (Réf : S4OVA),
 - 1 flacon de contrôle positif (Réf : CTLOVA),
 - 1 flacon d'anticorps anti-ovalbumine conjugué à la peroxydase.
- 1 flacon de TMB (tétraméthylbenzidine) (Réf : ABGB-TMB),
- 1 flacon de tampon de dosage (Réf : TD),
- 1 flacon de tampon de lavage (Réf : TL).

Réf : LT02100

1- PRINCIPE DU DOSAGE

Dosage par méthode immuno-enzymatique (ELISA) de l'ovalbumine soluble.

Un support plastique recouvert d'un anticorps de capture anti-ovalbumine (barrettes ovalbumine) fixe l'ovalbumine soluble contenue dans l'échantillon à tester. L'ovalbumine fixée est révélée à l'aide d'un second anticorps anti-ovalbumine soluble couplé à la peroxydase (conjugué anti-ovalbumine) qui se fixe sur les déterminants antigéniques libres. Le taux de peroxydase lié est mesuré par son activité sur le substrat (TMB). L'intensité de la coloration, après arrêt de la réaction par un acide fort, est fonction de la concentration initiale d'ovalbumine soluble présente dans le milieu. La concentration d'ovalbumine dans les échantillons et des contrôles positifs est calculée par l'intermédiaire de la courbe de dosage.

2- COMPOSITION DE LA TROUSSE

La trousse est composée de :

- 4 sachets contenant chacun :
 - **Réactif 1 :** 3 barrettes de 8 puits recouvertes d'un anticorps anti-ovalbumine pour le dosage de 4 à 6 échantillons, conditionnées en sachet aluminisé sous vide.
 - **Réactif 2 :** Solution S4 : solution mère d'ovalbumine à 30 ng/mL après reconstitution (flacon à bouchon noir).
 - **Réactif 3 :** Contrôle positif : solution d'ovalbumine à une concentration d'environ 12 ng/mL après reconstitution (voir la limite d'acceptation sur le certificat d'analyse correspondant au lot des trousse) (flacon à bouchon blanc).
 - **Réactif 4 :** anticorps anti-ovalbumine couplé à la peroxydase, à reconstituer (flacon ambré bouchon noir).
- Un cadre blanc en plastique utilisé comme support des barrettes.
- **Réactif 5 :** flacon de 12 mL de tétraméthylbenzidine (TMB), substrat de la peroxydase, prêt à l'emploi.
- **Réactif 6 :** flacon de 50 mL de tampon de dosage (TD), prêt à l'emploi.
- **Réactif 7 :** flacon de 30 mL de tampon de lavage (TL), 10 fois concentré.

3- PRECAUTIONS

Le coffret intact doit être conservé à 2-8°C. Ces réactifs sont destinés exclusivement à un usage *in vitro*.

Tous les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur chacun des produits.

Prudence lors de l'utilisation du TMB (réactif 5), c'est un produit irritant. De plus, il est sensible à la lumière.

L'élimination des déchets sera effectuée conformément à la réglementation locale en vigueur.

4- PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS

Tous les réactifs de la trousse doivent être maintenus pendant 30 minutes à température ambiante (18-25°C) avant utilisation.

Réactifs	Consignes	Stabilité
Réactif 1 : Barrettes ovalbumine	Maintenir à TA pendant 30 min avant ouverture de l'emballage.	NA
Réactif 2 : Solution S4 (bouchon noir)	Reconstituer par très exactement 1 mL de TD. Homogénéiser avant emploi à l'aide d'un agitateur de type vortex.	Après reconstitution : 4 heures à 20 ± 2°C
Réactif 3 : Contrôle positif (bouchon blanc)	Reconstituer par très exactement 1 mL de TD. Homogénéiser avant emploi à l'aide d'un agitateur de type vortex.	Après reconstitution : 4 heures à 20 ± 2°C
Réactif 4 : Anticorps anti - ovalbumine conjugué peroxydase (flacon ambré bouchon noir)	Reconstituer par très exactement 3 mL de TD. Homogénéiser avant emploi à l'aide d'un agitateur de type vortex.	Après reconstitution : 4 heures à 20 ± 2°C

Réactifs (suite)	Consignes (suite)	Stabilité (suite)
Réactif 5 : Substrat TMB (ABGB-TMB)	Maintenir à TA pendant un minimum de 30 minutes avant utilisation. PRECAUTIONS : • Eviter tout contact avec un élément métallique ou des agents oxydants. • Produit sensible à la lumière.	Après ouverture : 1 mois à 2-8°C en dehors de toute contamination.
Réactif 6 : Tampon de dosage (TD)	Maintenir à TA pendant 30 min avant utilisation. Réactif prêt à l'emploi.	Après ouverture : 15 jours à 2-8°C en dehors de toute contamination.
Réactif 7 : Tampon de lavage (TL)	Reconstituer le flacon de 30 mL avec 270 mL d'eau distillée ou désionisée à TA, puis agiter avant emploi. Maintenir à TA pendant 30 min avant utilisation.	Après ouverture : 15 jours à 2-8°C en dehors de toute contamination.

5- REACTIFS ET MATERIELS SUPPLEMENTAIRES NECESSAIRES ET NON FOURNIS

- Tubes,
- Acide sulfurique 1N (soit 0,5 mol/L),
- Lecteur de plaque à 450 nm et 620 nm,
- Equipement habituel des laboratoires (agitateur de type Vortex, parafilm, chronomètre, pipettes multicanaux, eau purifiée...).

6- PROTOCOLE

6.1. Préparation de la gamme d'étalonnage

L'étalonnage est réalisé à l'aide du Réactif 2 (flacon à bouchon noir) qui a été préalablement reconstitué par 1 mL de Réactif 6 (Tampon de Dosage) et maintenu 30 min à température ambiante avant utilisation (cf paragraphe 4).

Cette solution mère (S4) constitue le point le plus élevé de l'étalonnage soit 30 ng/mL. A partir de cette solution mère, préparer la gamme d'étalonnage avec le réactif 6 (tampon de dosage) :

Solution S4 à 30 ng/mL	Reconstituée par 1 mL de Réactif 6 (tampon de dosage). (Cf. § 4)
Solution S3 à 15 ng/mL	500 µL de S4 + 500 µL de Réactif 6 (tampon de dosage).
Solution S2 à 7,5 ng/mL	500 µL de S3 + 500 µL de Réactif 6 (tampon de dosage).
Solution S1 à 3,75 ng/mL	500 µL de S2 + 500 µL de Réactif 6 (tampon de dosage).
Solution S0 à 0 ng/mL	1 mL de Réactif 6 (tampon de dosage).

Veillez à bien homogénéiser chaque solution à l'aide d'un agitateur de type Vortex avant de préparer la solution suivante.

6.2. Préparation des échantillons à doser

Si nécessaire, les échantillons à doser peuvent être dilués dans le Réactif 6 (tampon de dosage).

6.3. Préparation du contrôle positif

Se référer au tableau du paragraphe 4.

6.4. Préparation du conjugué anti-ovalbumine

Se référer au tableau du paragraphe 4.

6.5. Dosage

Le dosage peut être réalisé pour 4 ou 6 tests suivant un plan de barrettes représenté ci-dessous :

PLAN 4 TESTS				PLAN 6 TESTS			
	Barrette 1	Barrette 2	Barrette 3		Barrette 1	Barrette 2	Barrette 3
A	S4	S4	Ech 1	A	S4	S4	Ech 1
B	S3	S3	Ech 1	B	S3	S3	Ech 1
C	S2	S2	Ech 2	C	S2	S2	Ech 2
D	S1	S1	Ech 2	D	S1	S1	Ech 2
E	S0	S0	Ech 3	E	S0	S0	Ech 3
F	S0	S0	Ech 3	F	Ctrl +	Ctrl +	Ech 3
G	Ctrl +	Ctrl +	Ech 4	G	Ech 5	Ech 6	Ech 4
H	Ctrl +	Ctrl +	Ech 4	H	Ech 5	Ech 6	Ech 4

Les 12 barrettes peuvent également être utilisées en une seule fois. Dans ce cas, les points étalons, les contrôles positifs et les blancs peuvent être déposés sur les 2 premières barrettes et sur les 10 autres barrettes, les échantillons peuvent être déposés en duplicat. Dans ce cas, reconstituez les 4 conjugués puis rassemblez-les avant d'effectuer les dépôts.

❖ **LAVAGE**

Une fois les 30 minutes de remise à température ambiante écoulées, les barrettes peuvent être sorties de leur emballage. Réaliser le lavage des barrettes avec le Réactif 7 reconstitué (tampon de lavage) (Cf. § 4.) :

- Ouvrir le sachet aluminisé, sortir les trois barrettes et les enclencher sur le cadre blanc.
- Déposer 300 µL de Réactif 7 reconstitué (tampon de lavage) par puits à l'aide d'une pipette multicanaux.
- Jeter le contenu des barrettes, les taper sur du papier absorbant et réaliser les dépôts.

Ne pas laisser sécher les barrettes. Les barrettes peuvent être laissées remplies de tampon de lavage, le temps de terminer la préparation de la gamme d'étalonnage, du contrôle positif et des échantillons à doser.

❖ **DEPOTS****Dépôts de l'ovalbumine et des échantillons**

Déposer aux emplacements prévus à cet effet :

- 100 µL par puits de chaque point de la gamme d'étalonnage S0, S1, S2, S3 et S4,
- 100 µL par puits de solution de contrôle positif,
- 100 µL par puits des échantillons à doser.

Dépôts du conjugué anti-ovalbumine

Dans chaque puit, déposer 100 µL de Réactif 4 (anticorps anti-ovalbumine conjugué).

Consignes de dépôts :

Il est conseillé de débiter le dépôt du conjugué dans les puits les moins concentrés (S0) jusqu'aux puits les plus concentrés (S4).

La durée totale des dépôts sur les barrettes ne doit pas dépasser 10 minutes.

❖ **INCUBATION**

A la suite des dépôts, recouvrir les barrettes d'un parafilm et laisser incuber une heure à température ambiante (18-25°C).

❖ **LAVAGE**

Une fois l'incubation terminée, réaliser les 3 lavages des barrettes avec le tampon de lavage comme décrit précédemment. A la suite des 3 lavages, taper les barrettes sur du papier absorbant et réaliser la révélation.

❖ **REVELATION**

Dans chaque puit, déposer 100 µL de Réactif 5 (Substrat TMB).

Laisser incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité.

A la fin de l'incubation, stopper la réaction par l'ajout de 50 µL d'acide sulfurique 1N par puits.

Mesurer l'absorbance à 450 nm et 620 nm.

7- RESULTATS

Retrancher les valeurs d'absorbances obtenues à 620 nm à celles obtenues à 450 nm.

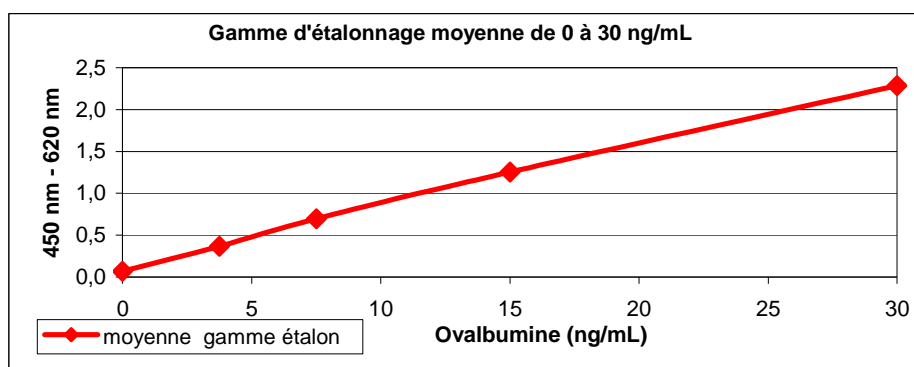
Sur du papier millimétré ou par l'intermédiaire d'un logiciel d'étude graphique, porter en abscisse le taux d'ovalbumine soluble des différents points de la gamme d'étalonnage et en ordonnée la valeur de l'absorbance correspondante.

Tracer la courbe d'étalonnage.

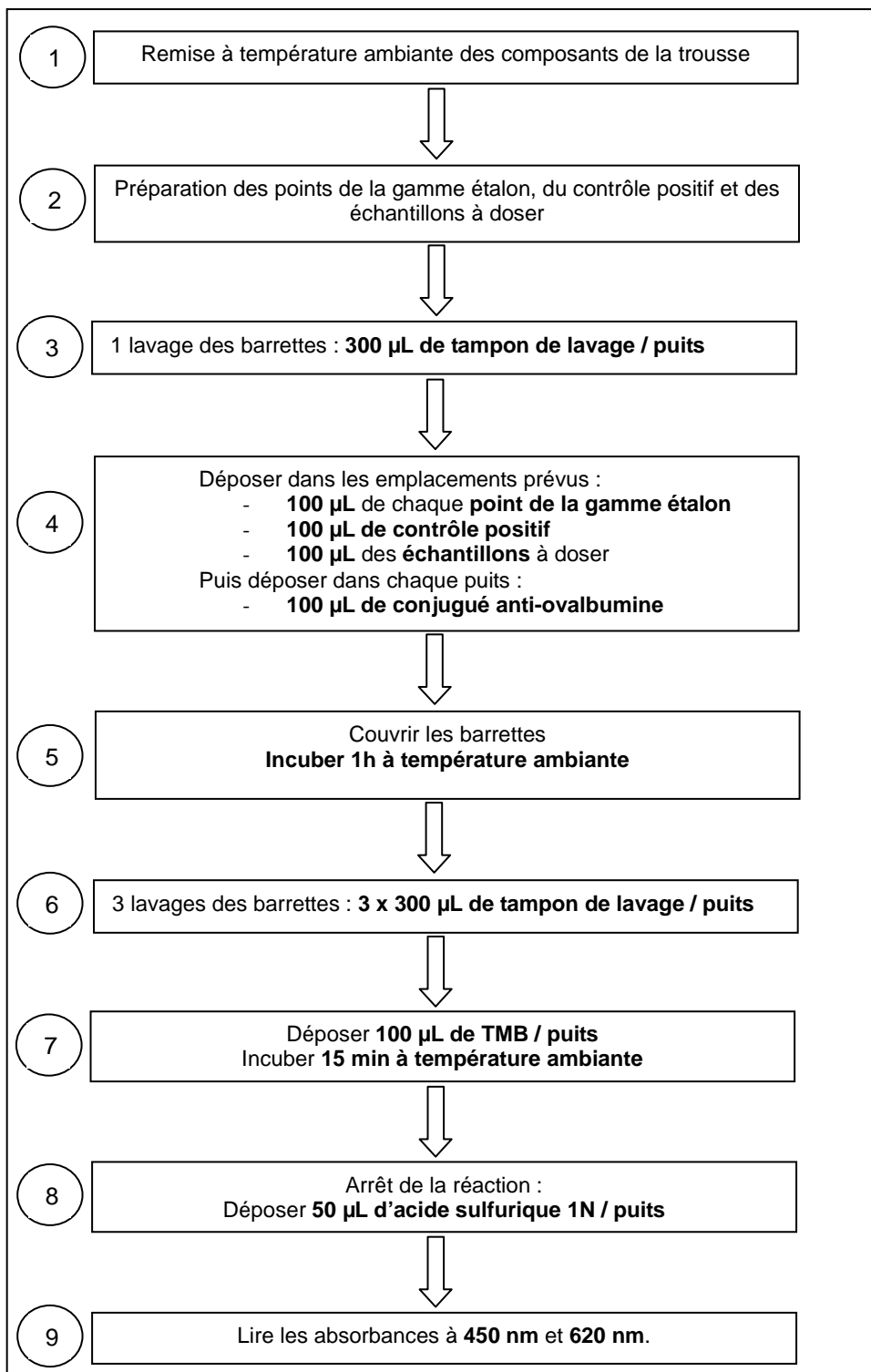
Le taux d'ovalbumine soluble des échantillons testés est lu directement sur la courbe d'étalonnage.

Attention à faire intervenir le facteur de dilution pour le calcul du taux d'ovalbumine des échantillons, si ceux-ci ont été dilués pour le dosage.

Vérifier que les résultats obtenus pour le contrôle positif se situent dans les limites d'acceptation inscrites dans le certificat d'analyse correspondant au lot des trousse. Si ce n'est pas le cas, s'assurer du bon fonctionnement du test : conditions opératoires, réactifs, étalonnage, échantillons à tester, etc... Si besoin, recommencer les dosages.

**8- SIGNIFICATION DES SYMBOLES D'ETIQUETAGE**

Xi	FR	Irritant (réactif 5)	RUO	FR	Research Use Only (à usage de recherche seulement)
-----------	----	----------------------	------------	----	--

9- RECAPITULATIF DU PROTOCOLE**10- PRODUITS ASSOCIES**

LT02101 : Trousse de dosage de l'ovalbumine grade III.

LT02102 : Trousse de dosage de l'ovalbumine grade VI.

11- SUPPORT TECHNIQUE

Si vous avez des questions à propos de cette trousse de dosage ou si vous souhaitez des informations sur d'autres produits Agro-Bio, n'hésitez pas à nous contacter.

Commandes / Support Technique

techsupport@agro-bio.fr

Numéro Vert : 0 800 36 38 50

Fax: 02 38 64 83 59