

Sérums normaux (non immuns)

Description des produits

Sera non immuns, dérivés de sang normal, pour application d'immunodetections (saturation) :

Espèce	Référence Sérum normal	IgGAM normales	IgG pures normales
Bovine	UP89243C, 2 ml UP89243A, 10 ml UP89243B, 100 ml	sur demande	0 15 mg
Cat	989140, 5 ml	-	869310, 10 mg
Chicken	UP37908A, 10 ml	-	773320, 25 mg
Dog	78411B, 5 ml	-	M08943, 10 mg
Donkey	UP77719A, 10 ml	-	866573, 10 mg
Goat	534439, 10 ml (UP379030) 534439, 100 ml (UP379031)	-	UP767093, 15 mg
GuineaPig	UP37916A 10 ml	-	M09853, 10 mg
Hamster(Syrian)	UP28432A 2 ml	-	826543, 10 mg
Horse	UP24741A, 10 ml UP24741B, 100 ml UP24741C, 500 ml	-	495882, 10 mg 495883, 100 mg
Human	UP697906, 10 ml	-	UP408603, 15 mg
Mouse	UP379120, 2 ml UP379121, 10 ml	-	UP386674, 5 mg
Rabbit	UP37906B, 5 ml	-	UP378416, 15 mg
Rat	UP37911A, 2 ml UP37911B, 10 ml	-	UP443086, 5 mg
Sheep	UP697927, 10 ml	-	UP797560, 15 mg
Swine	UP379021 10 ml UP379022 100 ml	-	UP062701, 15 mg

Autres conditionnements disponibles à www.interchim.com ou [sur demande](#). Consulter Interchim pour d'autres spécifications: lot réservé, bulk, absence d'azide, plasma sur EDTA, citrate ou héparine (et non sérum),

Considérations générales

Sérums normaux :

Le sérum est collecté après coagulation du sang prélevé chez des animaux sains non immunisés. Il est conditionné avec 0,09% d'azide de sodium (agent conservateur), filtré à 0,45µm. Conservation/ stockage à -20°C 1 an.

IgGAM normales :

Les IgGAM sont les immunoglobulines purifiées à partir de sérums normaux par précipitation au sulfate d'ammonium. Elles contiennent majoritairement des IgG (180000 Da ; 75-85% déterminé par électrophorèse) et des IgM (env.300000 Da, 1-5%). Elles sont conditionnées à 5mg de protéine / ml en tampon PBS avec 0,09% d'azide de sodium, filtrées à 0.45µm. Conservation/ stockage a -20°C 1 an.

IgG pures normales :

Les IgG sont les immunoglobulines purifiées à partir de sérum normaux par précipitation au sulfate d'ammonium et ou à l'acide caprylique. La pureté, déterminée par électrophorèse est supérieure à 90%. La concentration est mesurée par

FT-749118

spectrométrie. Elles sont conditionnées à 5mg IgG/ml en tampon PBS avec 0,09% d'azide de sodium, filtrées à 0,45µm, sous 15 mg (Bœuf, Chèvre, Homme, Porc, Lapin, Mouton, Cerf) sauf pour la souris et le rat qui sont sous 5mg.

Conservation/ stockage à -20°C, 1 an.

Informations scientifiques et techniques

• Composition

- Le sérum résulte de la coagulation du sang, il contient des centaines de composés organiques différents, des ions minéraux et des composés lipidiques. Les principaux composés, quantitativement, sont les protéines dont l'albumine et les immunoglobulines.

Le sérum normal humain contient par exemple environ 40 mg d'albumine, 10 mg d'immunoglobulines G et 1-5mg IgM par ml pour une concentration protéique totale d'environ 120 mg/ml.

- Les Immunoglobulines G (IgG) sont des protéines (poids moléculaire environ 180 000Da selon les isotypes et l'espèce) qui participent à l'immunité. Les IgG, obtenues après immunisation, sont largement utilisées dans les biotechnologies, en raison de leur capacité à reconnaître spécifiquement, et se fixer sur certaines molécules (antigènes) dont elles sont spécifiques. Les Immunoglobulines de sérums normaux résultent de l'immunité naturelle : elles ne présentent aucune spécificité particulière, les animaux étant sains et non immunisés volontairement. Elles sont à cet égard utilisées comme contrôles d'IgG spécifiques, car elles ne reconnaissent théoriquement pas, ou avec une affinité insignifiante, les antigènes étudiés.
- Les protéines sériques, et notamment l'albumine adsorbent fréquemment de petites molécules à leur surface. Les sérum normaux sont ainsi utilisés pour des études de l'équilibre entre la fraction libre et liée des médicaments. Le même type d'interactions hydrophobes et ioniques sont responsables de la capacité de protéines sériques à se lier à certains supports utilisés en biologie (tubes, filtres...), ce qui est mis à profit pour prévenir ces sites de fixation, et donc l'adsorption indésirable de molécules d'intérêt. C'est même une application majeure.

• Applications

Les dérivés de sang normaux, notamment les immunoglobulines, sont utilisés de façons variées, notamment comme contrôles dans diverses techniques d'analyses. L'application principale de nos sérums reste leur utilisation comme agents de saturation dans des techniques d'immunodétection, pour empêcher la fixation des immunoréactifs secondaires sur le support de détection, ou entre eux, qui générerait un signal non spécifique.

Exemples d'applications particulières :

- comme standards de dosage d'IgG ou d'autres composants sanguins (ex. standard IgG en néphélogéométrie, Ouchterlony, ELISA...)
- comme standards en blotting (profil protéique sérique, poids moléculaire, identifier des chaînes H et L...)
- comme échantillons standardisés (ex: sérum contenant 10 µg/ml d'une hormone)
- pour diluer des échantillons sériques à doser à concentration protéique ou IgG constante
- pour stabiliser des réactifs (ex: l'ajout de 500µg/ml limite l'adsorption d'un AcM sur un filtre ou un récipient)
- pour saturer des tubes, flacons, gels, colonnes, ou filtres avant application d'une molécule très diluée
- pour étudier l'équilibre entre fractions libre et liée d'un médicament
- pour entraîner un anticorps monoclonal dilué lors d'une précipitation au PEG ou au sulfate d'ammonium
- pour suspendre des cellules vivantes et les faire agir / fixer un composant sanguin à leur surface
- pour opsoniser des bactéries (ex: bactéries recouvertes d'IgG naturels)
- pour étudier les anticorps auto-immuns, les complexes immuns...
- pour purifier certains composants sanguins
- pour saturer les sites de fixation IgG (récepteurs d'IgG, fixation non spécifique...) sur des coupes histologiques, les plaques ELISA, ou les blots, avant détection immunologique par une IgG de même espèce.

Utilisation

Il est conseillé d'**aliquoter le sérum** et de le congeler (ou à +4°C pour utilisation que quelques jours).
Il est préférable de le **filtrer** pour certaines applications car des agrégats invisibles, un trouble, voire un dépôt, se forment fréquemment.

Protocole 1 : saturation de site de fixation IgG en immunohistologie

En immunohistologie, il est essentiel d'éviter que les cellules fixent les réactifs de révélation (dont des Immunoglobulines anti Ig, par les récepteurs membranaires aux immunoglobulines), ou de façon non spécifique (liaison hydrophobe et électrostatique). Une solution consiste à saturer au préalable ces sites de fixation.

Cas d'un anticorps primaire directement marqué par un fluorochrome ou une enzyme, ou indirectement par un système biotine / streptavidine :

>Incuber 1 H à 37°C la lame sur laquelle a été fixé l'échantillon (coupe histologique, bactéries...) avec le tampon d'incubation (ex PBS) additionné de 1/10 de sérum de l'espèce autologue à l'anticorps de détection. Effectuer 3 lavages de 3-6 min.

Protocole 2 : standards en blotting

Préparer des fractions aliquotes de sérum dilués au 1/10 en eau, ou d'IgG purifiées diluées à 1mg/ml. Conserver à -20°C.

>Pour une coloration au Coomassie après SDS-PAGE, déposer 5µl de sérum 1/10, ou 1-10µg d'IgG dans 10µl de Laemmli X (SDS5%, mM Tris, %glycérol, Bleu de Bromophénol) avec ou sans agent réducteur.

>Pour un blot ou les IgG, ou leurs chaînes H ou L seront révélées immunochimiquement (témoin de révélation, témoin de PM...) déposer 0.1-1µg d'IgG en Laemmli X avec ou sans mM de DTT

Protocole 3 : contrôles et saturants en ELISA

1/ sérum normal :

>*saturation de microplaques coatées*, ceci permet de réduire le bruit de fond si la révélation se fait par une antiglobuline de la même espèce que le sérum saturant ; Incuber 100µl par puits de sérum dilué au 1/10 en PBS à +37°C pendant 1 H ; laver 2 fois avec du PBS additionné de Tween20 à 0.05%.

>*auxiliaire de préparation d'échantillons* : le dosage d'un antigène dans un échantillon sérique doit comprendre un témoin de sérum normal à la même dilution ; pour un test en inhibition (compétition), les échantillons de sérum doivent être dilués avec du tampon contenant du sérum normal de manière à maintenir constante la concentration sérique totale.

2/ IgG normales :

>*Coating* ; pour détecter / doser des anticorps anti IgG : déposer 100µl par puits d'une solution à 1-10µg/ml d'IgG en PBS, ou en tampon carbonate pH9,5, incuber 1H à +37°C ou une nuit à +4°C, laver 2 fois en PBST, saturer la microplaque comme usuellement

>*Témoin de coating* : déposer 100µl par puit d'une solution à 1-10µg/ml d'IgG de la même espèce que l'IgG spécifique coaté (en PBS, ou en tampon carbonate pH9,5), incuber 1H à +37°C ou une nuit à +4°C, laver 2 fois en PBST, saturer la microplaque comme usuellement.

>*Echantillon témoin* : préparer une solution à 1mg/ml d'IgG purifiées, puis le diluer dans le tampon d'incubation pour servir de gamme de référence dans un dosage d'IgG

>*Tampon de lavage et diluant d'anticorps* : 10µg/ml d'IgG dans le tampon de lavage et 0,1mg/ml dans le tampon de dilution de l'ac secondaire, diminuent certains bruits de fond

Protocole 4 : co-précipitation d'un anticorps très dilué

Il est souvent difficile de détecter un anticorps donné ou un complexe immunitaire très dilué. Une solution est de le concentrer. Simple, la précipitation au sulfate d'ammonium ou au PEG, n'est pas efficace sur un anticorps dilué, aussi

FT-749118

doit-on ajouter des IgG en quantité, qui précipitent massivement et entraînent l'anticorps d'intérêt. Bien sur les analyses ultérieures doivent être indifférentes aux IgG normales.

>Ajouter 1mg /ml d'IgG à la solution diluée d'anticorps spécifique dilué (<0.1mg/ml), ou au complexe immun ac-ag formé dans un test. Le pH doit être neutralisé au préalable. Ajouter 0,346g de sulfate d'ammonium par ml, ou du PEG à 50% ; Bien mélanger et incuber >4H à +4°C. Centrifuger à >2000g 10min (davantage selon le volume centrifuge) ; éliminer le surnageant par retournement ; reprendre le culot en eau distillée ; dialyser extensivement en PBS pour analyse

Protocole 5 : pré-saturation de filtres, colonnes, tubes...

Les ac s'adsorbent toujours plus ou moins sur les tubes, flacons, colonnes et filtres...la perte d'ac devient significative pour de faibles concentrations et quantités initiales.

> Il peut être utile de pré-saturer un filtre (ou autre support...) avant filtration : mouiller le filtre avec du sérum pur ou dilué 1/2, laisser agir 5min, filtrer un petit volume, rincer très abondamment avec un tampon jusqu'à avoir un DO280nm négligeable en sortie de filtre pour éviter la contamination de l'échantillon.

Protocole 6 : étude de l'équilibre fraction libre / liée d'un haptène

Mélanger le plasma (ou le sérum) et le haptène (médicament, hormone...) à des concentrations connues

Dialyser à l'équilibre en tampon adéquat (ex. PBS * pH7.8 a pH plus acide pour étudier l'effet d'une acidose)

Analyser le plasma et le tampon de dialyse

Rem: ajouter de l'EDTA au tampon pour maintenir un effet anti-coagulant

Autres informations

Produits liés : Anticorps secondaires Uptima Autres agent de saturation PBS et autres tampons

Pour toute information à ces sujets, ou supplémentaire, s'adresser à :
Interchim, 213 av.J.F.kennedy, 03103 Montluçon,
Fax : 04 70 03 82 60, Hot line Interbiotech : 04 70 03 76 06

Rev.M01E