



TeSeE™ WESTERN BLOT

32 TESTE

355 1169

**REACTIVI PENTRU CONFIRMAREA *in vitro* A PROBELOR
SUSPECTATE POZITIVE EST**

OIE

Validare si certificare OIE pentru scopul utilizarii
Numar de inregistrare: 20090105

I 160005959 – 2018/06

BIO-RAD





CUPRINS

- 1 – GENERALITATI
- 2 – PRINCIPIUL DE TESTARE
- 3 – CONTINUTUL TRUSEI
- 4 – PROBE
- 5 – PROCEDEUL DE TESTARE CU GEL MINI BLOT™
 - 5.1 Reactivi si materiale necesare dar neincluse in trusa
 - 5.2 Pregatirea reactivilor
 - 5.3 Purificarea probelor
 - 5.4 Electroforeza
 - 5.5 Transferul proteinelor
 - 5.6 Imunoblotarea
- 6 – PROCEDEUL DE TESTARE CU GEL CRITERION™ XT
 - 6.1 Reactivi si materiale necesare dar neincluse in trusa
 - 6.2 Pregatirea reactivilor
 - 6.3 Purificarea probelor
 - 6.4 Electroforeza
 - 6.5 Transferul proteinelor
 - 6.6 Imunoblotarea
- 7 – INTERPRETAREA REZULTATELOR
- 8 – PRECAUTII
- 9 – INSTRUCIUNI DE IGIENA SI PROTECTIA MUNCII
- 10 – BIBLIOGRAFIE



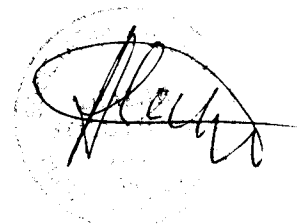
1 - GENERALITATI

Encefalopatiile Spongiforme Transmisibile (EST) au fost pentru prima data raportate in secolul al 18-lea la oaie (Scrapie) si mai recent la cervidee cum ar fi caprioara si elanul (Boala casectizanta cronica, MCC) si la vite (Encefalopatia Spongiforma Bovina, ESB). Si oamenii sunt sensibili la anumite forme de EST cum ar fi boala Kuru, boala Creutzfeld-Jakob (CJD) sau sindromul Gertsmann-Straüssfer-Scheinker (GSS). Aparitia unei noi variante a bolii Creutzfeld-Jakob (vCJD) la om a fost corelata cu certitudine de consumul de carne sau produse din carne infectate cu ESB. Una din caracteristicile principale ale EST este acumularea progresiva in sistemul nervos central a unei izoforme anormale a proteinei prionice naturale (PrP^c), denumita PrP^{res}. Aceasta PrP^{res} specifica de boala se caracterizeaza printr-o rezistenta crescuta la proteaze. TeSeE™ WESTERN BLOT permite identificarea calitativa a PrP^{res} dupa tratamentul proteolitic care duce la reducerea masei moleculare datorita trunchierii capatului 'N' amino-terminal.

Programele de supraveghere activa si pasiva au fost aplicate la nivel mondial pentru detectia ESB, a scrapiei sau a MCC la animalele infectate. Acele programe au dus la identificarea unui numar crescut de cazuri pozitive in laboratoarele de screening. Acele probe pozitive (ce definesc animalele suspecte de infectie) sunt confirmate sistematic ca "infectate EST" prin demonstrarea modificarilor de tip spongiform tipice prin analiza histopatologica, sau prin detectia PrP anormale prin Imunohistochimie (IHC), sau a SAF (Scrapie Associated Fibrils) prin microscopie electronica. Aceste metode de confirmare necesita expertiza tehnica la interpretarea rezultatelor si sunt in general consumatoare de timp si costisitoare. Si tehnica Western Blot poate fi luata in considerare ca metoda alternativa de confirmare a probelor suspectate EST pozitive.

Validarea datelor pentru acest kit a fost certificata de catre OIE, bazandu-se pe expertiza specialistilor, in ce priveste detectia post-mortem a encefalopatiilor spongiforme transmisibile (EST) la bovine (encefalopatia spongiforma bovina, ESB), la ovine si caprine (ESB si scrapie), si la cervidee(MCC) avand urmatoarele deziderate:

1. Confirmarea probelor suspecte pozitive EST in tarile in care se deruleaza programe de supraveghere activa/pasiva. Orice proba cu rezultat negativ conform criteriilor de interpretare ale testului TeSeE™ WESTERN BLOT, urmate de un rezultat pozitiv prin test rapid, trebuie testate printr-una din celelalte metode de confirmare certificate de catre OIE, respectiv Imunohistochimie(IHC) si SAF-Immunoblot;



2. Pentru a confirma prevalența la infecție cu una din bolile asociate EST (ESB, SCAPIE, MCC) în contextul unei anchete epidemiologice într-o țară cu prevalența scăzută;

3. Estimarea prevalenței la infecție pentru a facilita analiza riscului (de ex: anchete, implementarea măsurilor de control al bolilor) și pentru a ajuta la demonstrarea eficienței politicilor de eradicare.

Testul TeSeE™ WESTERN BLOT folosește același principiu de testare ca și testele rapide ELISA Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ oaie/capra) incluzând etapele de purificare și concentrare preliminară ale PrP^{res}, asociate cu detectia extrem de sensibilă prin imunoblotare. Astfel, acesta se poate folosi eficient pentru confirmarea oricărei probe suspecte EST și identificarea susei (tipului) de EST la ovine.

2 – PRINCIPIUL DE TESTARE

Testul TeSeE™ WESTERN BLOT permite detectia PrP^{res} în probe de țesut nervos (bovine, ovine, caprine, cervide, ...) sau țesuturi periferice (cervide) recoltate de la animale infectate.

Procedeele de testare încep cu digestia proteinei prionice celulare (PrP^c), urmată de purificarea și concentrarea PrP^{res} specifică de boală. Detectia PrP^{res} se efectuează prin migrare electroforetică urmată de imunoblotare, folosind un anticorp monoclonal cu specificitate înaltă pentru PrP^{res}.

Procedeele de testare includ următoarele etape:

- Omogenizarea probelor,
- Digestia PrP^c cu proteinaza K,
- Purificarea și concentrarea PrP^{res},
- Electroforeza și transferul pe o membrană,
- Imunoblotarea.



3 – COMPOZITIA TRUSEI

Etichetare	Tipul reactivului	Prezentare	Conditii de stocare
Tuburi de omogenizare	Tuburi de omogenizare ce contin sfere ceramice in solutie tamponata ⁽¹⁾ .	1 punga (35 tuburi)	+2°C la +25°C
A	Solutie de denaturare. Gata de utilizare	1 flacon (20 ml)	+2°C la +25°C
B	Solutie de clarificare. Colorant: albastru de bromfenol. Gata de utilizare	1 flacon (20 ml)	+2°C la +25°C
PK	Proteinaza K. Colorant: rosu de fenol	1 vial (0,5 ml)	+2°C la +8°C
Ab I	Anticorp monoclonal primar ⁽¹⁾ anti-PrP (10x)	1 flacon (8 ml)	+2°C la +8°C
Ab II	Anticorp secundar ⁽¹⁾ : IgG oaie (Sheep) anti-soarece (Mouse) (H+L) marcati cu peroxidaza (HRP) (10x)	1 flacon (10 ml)	+2°C la +8°C
BI	Solutie de blocare ⁽¹⁾ (10x)	1 flacon (10 ml)	+2°C la +8°C

⁽¹⁾ Acesti reactivi contin conservantul ProClin® 300 in proportie de 0,1%

4 – PROBELE

Testul TeSeE™ WESTERN BLOT este destinat detectiei EST la bovine (Encefalita Spongiforma Bovina, ESB), la ovine si caprine (ESB si scrapie) si la cervide (Maladia Casectizanta Cronica, MCC).

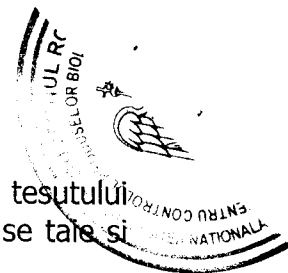
Acest test se poate efectua direct din omogenatul de proba (tubul de omogenizare) preparat pentru testul rapid Bio-Rad ELISA (TeSeE™ SAP, TeSeE™ oaie/capra) .

La bovine: purificarea PrP^{res} se efectueaza din probe de la nivelul Sistemului Nervos Central (SNC). Deoarece distributia PrP^{res} este eterogena in sistemul nervos central, pentru detectia optima este preferabila prelevarea din aria obexului a trunchiului cerebral. Seringa de prelevare (cod 355 1175) permite recoltarea rapida si usoara a probelor de obex intr-o maniera sigura si lipsita de risc. Va rugam consultati protocolul de prelevare furnizat impreuna cu seringile de prelevare pentru instructiuni detaliate asupra bunei practici de recoltare.

La rumegatoare mici: purificarea PrP^{res} se efectueaza din probe de la nivelul tesutului nervos central (SNC). Probele se taie si se cantaresc individual.



La cervide: purificarea Pr^{Pres} se efectueaza din probe de la nivelul tesutului nervos central SNC sau tesuturi periferice (ganglioni limfatici). Probele se taie si se cantaresc individual.



5 – PROCEDEUL DE TESTARE CU GEL MINI BLOT™

5.1 – REACTIVI SI MATERIALE NECESARE NEINCLUSE IN TRUSA

5.1.1 – REACTIVI SI CONSUMABILE

Pipete gradate (5, 10, 25 ml), eprubete conice (50 ml), microtuburi de polipropilena de 2 ml cu capac. PARAFILM®M.

Purificarea probelor

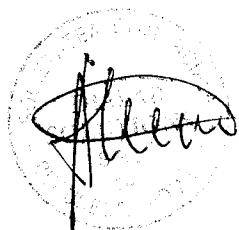
Tampon Laemmli pentru probe	30 ml	Bio-Rad, cod 1610737
2-Mercaptoethanol	25 ml	Bio-Rad, cod 1610710
SDS	100 g	Bio-Rad, cod 1610301
Seringi de calibrare	200	Bio-Rad, cod 3551174

Electroforeza in gel

Acrilamida 40% 29:1	500 ml	Bio-Rad, cod 1610146
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	1 L	Bio-Rad, cod 1610799
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	1 L	Bio-Rad, cod 1610798
Albastru de Bromfenol	10 g	Bio-Rad, cod 1610404
Sucroza	1 kg	Bio-Rad, discontinuat
Persulfat de Amoniu	10 g	Bio-Rad, cod 1610700
TEMED	5 ml	Bio-Rad, cod 1610800
Tris/Glicina/SDS(tampon de migrare) (10x)	1 L	Bio-Rad, cod 1610732
Standarde precolorate Kaleidoscope	500 µl	Bio-Rad, cod 1610375
MagicMark™ XP Western Standard (Standard de Masa Moleculara)	250 µl	Invitrogen, cod LC5602

Imunoblotare

Etanol (Normapur)	1L	VWR, cod Nr. 20821-296
Tris/CAPS (tampon de transfer) (10x)	1L	Bio-Rad, cod 1610778
Hartie de filtru (hartie de transfer pt geluri turnate manual Mini Blot™)	50 bucati	Bio-Rad, cod 1703932
Membrana PVDF (0.2 µm)	10 bucati	Bio-Rad, cod 1620175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, cod 1706531
PBS (tampon de spalare) (10x)	1 L	Bio-Rad, cod 1610780
ECL (substrat pt conjugat)	125 ml	Amersham, cod RPN2109



ECL Hyperfilms (18 x 24 cm)	25 filme	Amersham, cod RPN2103K
Development folders	30 bucati	Applied Biosystems, cod T2258
Solutie de dezvoltare Kodak LX24	pt 20 L	VWR sau Kodak
Solutie fixatoare AL4	pt 20 L	VWR sau Kodak

5.1.2 - ECHIPAMENT

Pipete reglabile (10, 40, 200, 1000 µl)
 Cilindri gradati (1 L si 2 L), forceps (pensa) de plastic, tavite, Vortex®
 Caseta de expunere si camera obscura pentru dezvoltare filme.

Purificarea probelor

TeSeE Precess 48™	Bio-Rad, cod 3590200
TeSeE Precess 24™	Bio-Rad, cod 3591070
Heating block/baie uscata(3 bucati)	Bio-Rad, cod 3589057
Bloc de incalzire pt Heating block - 20 tuburi	Bio-Rad, cod 3589072
Centrifuga - 220/240 V	Bio-Rad, cod 3591396
Drum rotor/rotor vertical	Bio-Rad, cod 3589189
Adaptoare pt rotor - (x6)	Bio-Rad, cod 3589191

Electroforeza in geluri

Mini-PROTEAN® Tetra Cell, modul electroforeza	Bio-Rad, cod 1658007
5 placi spatiatoare	Bio-Rad, cod 1653312
Sursa de tensiune PowerPac HC 220/240 V	Bio-Rad, cod 1645052

Transfer

Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, cod 1703946
------------------	----------------------

Imunoblotare

Western Processor baza	Bio-Rad, Discontinuat
Western Processor Mini Blot™ kit	Bio-Rad, Discontinuat



5.2 - PREGATIREA REACTIVILOR

5.2.1 – PURIFICAREA PROBELOR

• **Proteinaza K**

Solutie de proteinaza K diluata in reactivul A:

- 1 ml Reactiv A
- 20 µl Proteinaza K

Amestecati bine prin rasturnare pana se obtine o solutie omogena. Dupa reconstituire, proteinaza K diluata este stabila 10 ore la temperatura camerei (+18°C la +30°C).

• **Solutia Laemmli**

Solutie de SDS + 2-Mercaptoetanol + Tampon Laemmli pentru probe:

- 0,6 g SDS
- 1,5 ml 2-Mercaptoetanol

Amestecati prin rasturnare.

- 28,5 ml tampon Laemmli pentru probe

Solutia se portioneaza in alicote de 4 ml si se pastreaza la -20°C. Alicotele decongelate pot fi recongelate.

Nota: Se recomanda prepararea solutiei Laemmli cu 1 ora inainte de utilizare, permitand SDS-ului sa fie dizolvat complet.

5.2.2 – ELECTROFOREZA

• **Turnarea manuala a gelurilor discontinue de acrilamida**

Gelul trebuie sa aiba o grosime de 1,5 mm.

Folosind modulul de turnare Mini Blot™, gelul de separare se toarna primul (13,5% acrilamida, pH 8,8), apoi odata ce acesta s-a polimerizat se adauga deasupra gelul de concentrare (3% acrilamida, pH 6.8).

Gelul de separare (1 gel)

- 2,8 ml Acrilamida 40%, 29:1
- 1,7 ml tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 / SDS (1)
- 1,3 ml solutie de sucroza 50% (2)
- 2,5 ml apa distilata

Amestecati prin rasturnare, apoi adaugati:

- 43 µl persulfat de amoniu 10% (3)
- 9 µl TEMED

Turnati 7 ml de solutie de gel in placi si pastrati solutia ramasa pentru controlul polimerizarii. Acoperiti usor pana la partea superioara cu 1 ml de tampon Tris-HCl 0,3 M pH 8,8 / SDS tampon (4) astfel incat suprafata gelului sa nu se usuce.





Lasati gelul la polimerizat timp de 15-20 minute la temperatura camerei (+18°C la +30°C). Verificati daca solutia ramasa a polimerizat.
Eliminati tamponul in exces prin rasturnarea ansamblului de placute de sticla.

Gel de concentrare (Stacking) (1 gel)

- 4 ml solutie acrilamida 3% (7)
- 28 μ l persulfat de amoniu 10% (3)
- 6 μ l TEMED

Amestecati prin rasturnare.

Turnati incet si cu atentie gelul de concentrare peste gelul de separare si pastrati solutia ramasa pentru controlul polimerizarii. Asezati pieptenele, avand grija sa nu prindeti bule de aer pe langa dintii acestuia.

Lasati gelul la polimerizat timp de 5-10 minute la temperatura camerei (+18°C la +30°C). Verificati daca solutia ramasa de control s-a polimerizat.

(1) Solutia de tampon 1,5 M Tris-HCl buffer, pH 8,8 / SDS

- 0,2 g SDS
- 50 ml tampon Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Solutia se poate pastra la +2°C/+8°C timp de 2 saptamani.

(2) Solutia de sucroza 50%

- 25 g Sucrose
- Se aduce la 50 ml cu apa distilata

Solutia de sucroza se poate pastra la +2°C/+8°C timp de 2 saptamani.

(3) Solutia de persulfat de amoniu 10%

- 5 g Persulfat de Amoniu
- Se aduce la 50 ml cu apa distilata

Solutia de persulfat de amoniu se portioneaza si se pastreaza la -20°C. Solutia decongelata se poate pastra la +2°C/+8°C timp de 2 saptamani.

(4) Solutia de tampon Tris-HCl 0,3 M, pH 8,8 / SDS

- 40 ml apa distilata
- 10 ml tampon Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 / SDS

Solutia se pastreaza la +2°C/+8°C timp de 2 saptamani.

(5) Solutia de tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 / SDS

- 0,2 g SDS
- 50 ml tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

Solutia se pastreaza la +2°C/+8°C timp de 2 saptamani.

(6) Solutia de albastru de bromfenol 1%

- 0,5 g Bromophenol Blue
- 50 ml apa distilata



Solutia de albastru de bromfenol se pastreaza la temperatura camerei (+18°C la +30°C) timp de 6 luni.

(7) Solutia de acrilamida 3%

- 3,8 ml acrilamida 40%, 29:1
- 10 ml tampon 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 / SDS (5)
- 6 ml Sucroza 50% (2)
- 500 µl albastru de bromfenol 1% (6)
- Se adauga pana la 50 ml apa distilata

Solutia se pastreaza la +2°C/+8°C timp de 2 saptamani.

• Standard precolorat Kaleidoscope

Standardul Kaleidoscope se prepara in cursul denaturarii probelor inainte de incarcarea in gelul de acrilamida. Preparati o dilutie 1/12 in solutie Laemmli (de exemplu 10 µl de standard Kaleidoscope + 110 µl de solutie Laemmli). Consultati prospectul de utilizare al standardului Kaleidoscope precolorat pentru conditiile de pastrare.

• Standardul MagicMark™ XP Western

Markerul de masa moleculara MagicMark™ XP se prepara in cursul denaturarii probelor inainte de incarcarea in gelul de acrilamida.

Preparati o dilutie 1/12 in solutie Laemmli pentru probe (de exemplu 10 µl de MagicMark™ XP + 110 µl de solutie Laemmli pentru probe.

Consultati va rugam prospectul MagicMark™ XP pentru conditiile de pastrare.

• Tamponul de migrare Mini Blot™

Solutia Tris-Glycine-SDS (1x).

Preparati o dilutie de 1/10.

Pentru 1 rezervor este nevoie de 1 L de tampon diluat:

- 100 ml tampon Tris-Glycine-SDS (10x)
- 900 ml apa distilata

Omogenizati. Solutia nu se poate pastra.





5.2.3 – TRANSFERUL PROTEINELOR

● Tampon de transfer

Solutia de Tris/CAPS-Etanol 15%. **Pentru 1 rezervor de transfer sunt necesari 2,5 L :**

- 750 ml apa distilata
- 150 ml etanol pur
- 100 ml Tris/CAPS (10x)

Omogenizati. Solutia nu se poate pastra.

5.2.4 – IMUNOBLOTARE

● Solutie de spalare 1

Solutie TFS (1x) + 0,1% Tween[®] 20. **Prelucrarea completa a 1 membrane necesita aproximativ 500 ml:**

- 900 ml apa distilata
- 100 ml TFS (10x)
- 1 ml Tween[®] 20

Omogenizati temeinic. Solutia se poate pastra peste noapte la +2°C/+8°C.

● Solutie de spalare 2

Solutie TFS (1x). **Prelucrarea completa a 1 membrane necesita aproximativ 100 ml:**

- 900 ml apa distilata
- 100 ml TFS (10x)

Solutia trebuie pastrata la temperatura camerei (+18°C to +30°C) peste noapte.

● Solutia de blocare

Solutia de blocare se prepara pe durata etapei de transfer, diluand solutia BI in proportie de 1/10 cu solutie de spalare 1. **Pentru 1 membrana sunt necesari 20 ml de solutie de blocare de lucru 1x.**

- 18 ml solutie de spalare 1
- 2 ml solutie de blocare (10x)

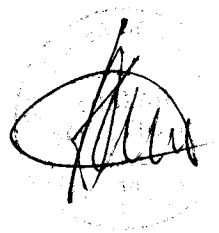
Se omogenizeaza prin rasturnarea tubului.

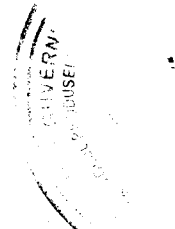
● Anticorpi primari diluati

Solutia se prepara chiar inainte de utilizare, prin diluarea anticorpilor primari 1/10 in solutie de spalare 1. **Pentru 1 membrana sunt necesari aproximativ 15 ml.**

- 13,5 ml solutie de spalare 1
- 1,5 ml Anticorpi primary (10x)

Omogenizati prin rasturnarea tubului.





● **Anticorpi secundari diluati (conjugat)**

Chiar înainte de utilizare, diluati amestecul de anticorpi primari in proportie 1/10 in solutia de spalare 1. **Pentru 1 membrana sunt necesari 20 ml de amestec diluat.**

- 18 ml solutie de spalare 1
- 2 ml anticorpi secundari (10x)

Omogenizati prin rasturnarea tubului.

● **ECL**

Substratul (ECL) trebuie preparat chiar inainte de folosire. **Pentru 1 membrana este suficient 1 ml de substrat.**

- 0,5 ml Reagent 1
- 0,5 ml Reagent 2

Omogenizati solutia.

● **Solutia de dezvoltare**

- 800 ml apa distilata
- 200 ml produs de dezvoltare

Solutia se poate pastra la temperatura camerei (+18°C la +30°C), intr-o camera obscura timp de maxim 15 zile.

● **Solutia fixatoare**

- 800 ml apa distilata
- 200 ml produs fixativ

Solutia se poate pastra la temperatura camerei (+18°C la +30°C), intr-o camera obscura timp de maxim 15 zile.





5.3 – PURIFICAREA PROBELOR

Testul TeSeE™ WESTERN BLOT se poate efectua direct din același omogenat de proba (tub de omogenizare) preparat cu ocazia testului rapid TeSeE Bio-Rad de screening (TeSeE SAP, TeSeE sheep/goat).

Prelevarea probelor

Pentru tesuturi periferice (ganglioni limfatici) introduceți 1 sferă medie (Cod: 3551171) în tubul de omogenizare, înainte de a adăuga proba de tesut.

Cantăriți o cantitate de 350 mg ± 40 mg de tesut nervos (de preferat din aria obexului) sau 200 ± 20 mg de tesut periferic. Introduceți proba în tubul de omogenizare (grinding tube), închideți bine și treceți la etapa de omogenizare folosind omogenizatorul (sisteme tip Ribolyser®, TeSeE Precess 48™ sau TeSeE Precess 24™).

Omogenizarea probelor

Introduceți tuburile în locurile din omogenizator.

Efectuați un ciclu de agitare cu următorii parametri programați pe instrument.

	Ribolyser®		TeSeE Precess 48™ sau TeSeE Precess 24™	
	Tesut nervos	Tesuturi periferice	Tesut nervos	Tesuturi periferice
Time (Timp de omogenizare)	45	2 x 45 ⁽¹⁾	-	-
Speed (Viteza de vibrație)	6.5	6.5	-	-
Program	-	-	Program 1	Program 2

Dacă omogenizarea nu este satisfacătoare, se pot repeta ciclurile de omogenizare, de 1-2 ori⁽²⁾.

⁽¹⁾⁽²⁾ Așteptați 5 minute între 2 cicluri de agitare.

Calibrarea probelor

Scoateti tuburile de omogenizare din aparat, resuspendati omogenatul prin rasturnarea tubului înainte de a-l deschide, deschideți tubul și aspirați 500 μl cu seringă de calibrare, având grijă să scufundați acul sub sferele de ceramica pentru a evita aspirarea fragmentelor de tesut prost omogenizate.

Transferati fiecare 500 μl de proba în câte o eprubeta Eppendorf de 2 ml.

Nota: În această etapă, atât tuburile de omogenizare după procesul de omogenizare cât și micro-tuburile după calibrarea probelor se pot depozita, închise:

- La temperatura camerei (+18°C/+30°C) timp de 15 ore.
- La +2°C/+8°C timp de 72 ore.

- La -20°C timp de 1 an. Probele congelate trebuie decongelate la temperatura camerei (+18°C/+30°C).
Probele se pot congela/decongela de maxim 3 ori. Inainte de utilizare, probele trebuie intotdeauna omogenizate prin inversare.

Tratarea cu Proteinaza K

Distribuiti cate 500 µl de solutie de Proteinaza K de lucru (a se vedea paragraful 5.2.1) in fiecare eprubeta de testare.

Omogenizati tuburile inchise prin rasturnare (de 10 ori) si incubati la 37°C ± 2°C intr-o baie uscata termostata (heating block) timp 10 minute.

Precipitarea PrP^{res} cu reactiv B

Scoateti tuburile din termobloc. Deschideti-le si pipetati in fiecare tub cate 500 µl de reactiv B. Omogenizati prin rasturnare pana la obtinerea unei culori uniforme.

Concentrarea PrP^{res} prin centrifugare

Centrifugati tuburile timp de 7 minute la 15000 x g la 20°C .

Clarificarea probelor

Aruncati supernatantul prin rasturnarea tuburilor deasupra unui container de deseuri. Apoi uscati tuburile asezandu-le cu gura in jos pe hartie absorbanta timp de 5 minute.

Pipetati cate 100 µl de solutie Laemmli (a se vedea paragraful 5.2.1) in fiecare micro-tub de testat.

Incubati 5 minute la temperatura camerei (+18°C/+30°C).

Resolubilizati complet precipitatul prin aspirare/respingere cu o pipeta.

Incubati 5 minute la 100°C ± 5°C in baie uscata termostata (termobloc).

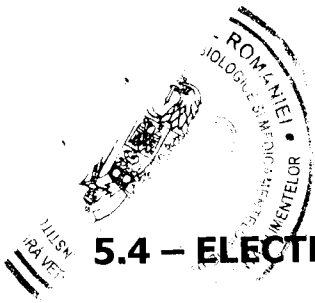
Scoateti tuburile de la incubare, omogenizati prin vortexare.

Centrifugati tuburile timp de 15 minute la 15000 x g la 20°C.

Transferati supernatantul intr-un micro-tub nou. Aruncati eprubeta cu precipitat.

In aceasta etapa, supernatantul se poate pastra inghetat la -20°C timp de 24 de ore; probele trebuie apoi decongelate si aduse la temperatura camerei (+18°C/+30°C) inainte de utilizare.





5.4 – ELECTROFOREZA

Testul TeSeE™ WESTERN BLOT se poate folosi atat pentru confirmarea probelor suspecte pozitive EST cat si pentru identificarea tipului EST la oaie. Procedeeul ce urmeaza se aplica pentru confirmarea probelor suspecte pozitive EST. Pentru instructiunile de lucru in caz de identificare tipizata suse EST va rugam sa luati legatura cu Rezentantanta Bio-Rad.

Pregatirea gelului

Introduceti gelurile de acrilamida in tanc de migrare (a se vedea paragraful 5.2.2). Turnati tamponul de migrare (a se vedea paragraful 5.2.2) in tancul de electroforeza, de fiecare latura a gelurilor, pana la partea superioara a godeurilor. Scoateti pieptenii cu grija si clatiti fiecare godeu cu tampon de migrare, folosind o pipeta.

Incarcarea probelor

Incalziti probele timp de 4 minute la $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ chiar inainte de incarcarea a 15 μl /godeu. Incarcati un godeu cu 15 μl de standard precolorat Kaleidoscope si un altul cu 15 μl de MagicMark™ diluat (a se vedea paragraful 5.2.2).

Nota: In cazul in care migrati mai multe geluri in acelasi timp, asigurati-va ca ati plasat controalele in pozitii diferite pentru identificarea usoara ulterioara a gelurilor.

Migrarea diferentiaa a probelor

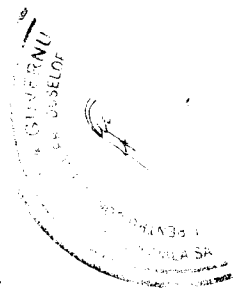
Migrati gelul la temperatura camerei ($+18^{\circ}\text{C}/+30^{\circ}\text{C}$) timp de 90 minute la 150 V. Linia albastra trebuie sa iasa din gel.

5.5 – TRANSFERUL PROTEINELOR

Tamponul de transfer trebuie preparat inainte de terminarea perioadei de migrare a probelor (a se vedea la paragraful 5.2.3).

Pregatirea transferului proteinelor

Taiati membrana la dimensiunile gelului. La manipularea membranei folositi intotdeauna un forceps. Imersati membrana timp de 15 secunde in etanol pur, clatiti cu apa timp de 5 minute, apoi imersati in tampon de transfer timp de 10 minute. Scoateti gelul cu grija dintre placile de sticla si lasati-l la echilibrat timp de 10 minute in tampon de transfer.



Pregatirea sandwichului cu gel

Inmuiati hartia de filtru si tampoanele fibroase in tampon de transfer.

Deschideti caseta de transfer, mentinand catre stanga latura transparenta. Respectiv asezati pe rand pe latura transparenta un tampon fibros, o bucata de hartie de filtru, membrana* si gelul*.

Completati cu hartie de filtru si celalalt tampon fibros si inchideti caseta.

Imersati caseta in tancul de transfer umplut in prealabil cu tampon de transfer pana la limita indicata.

*Indepartati orice bule de aer care s-ar fi putut forma.

Nota: In caz ca prelucrati mai multe membrane in acelasi timp, etichetati corespunzator fiecare membrana intr-un colt.

Transferul pe membrana PVDF

Agitati pe durata transferului cu ajutorul unei bare magnetice si agitator magnetic si transferati 60 minute la 115 V.

5.6 – IMUNOBLOTAREA

- a) Dupa terminarea transferului proteinelor, deschideti ansamblul de blotare si scoateti membrana pentru dezvoltare. Imersati rapid membrana in Solutie de spalare 2 (a se vedea paragraful 5.2.4), apoi plasati-o in etanol timp de 10 secunde inainte de a o clati in apa distilata 5 minute.

Nota: in aceasta etapa, membrana se poate pastra peste noapte in apa distilata, la o temperatura de +2°C/+8°C

- b) Eliminati apa distilata si incubati membrana timp de 30 minute in solutie de blocare (paragraful 5.2.4). Incubati cu agitare medie.

20 ml sunt suficiente pentru 1 membrana. Nota: din aceasta etapa si pana la etapa g), se poate folosi Bio-Rad Western Processor pentru etapele de agitare si de spalare (setarile se gasesc in manualul de instructiuni).

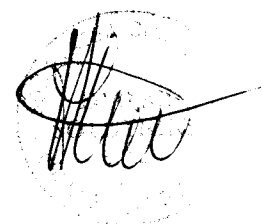
- c) Eliminati solutia de blocare si incubati membrana in **anticorpi primari** diluati (paragraful 5.2.4) timp de 30 minute la temperatura camerei (+18°C / +30°C) cu agitare medie. **Pentru 1 membrana sunt necesari 15 ml de anticorpi primari diluati.**

- d) Eliminati solutia de anticorpi primari si clatiti rapid membrana cu Solutie de spalare 1, apoi spalati-o de doua ori, o data 5 si o data 10 minute, sub agitare rapida. **Pentru fiecare ciclu de spalare si 1 membrana sunt necesari 50 ml de solutie de spalare 1.**





- e) Eliminati solutia de spalare 1 si incubati membrana timp de 20 minute in **anticorpi secundari** diluati (paragraf 5.2.4) la temperatura camerei (+18°C / +30°C) cu agitare medie.
20 ml de anticorpi secundari diluati sunt suficienti pentru 1 membrana.
- f) Scurgeti solutia de anticorpi secundari si folosind solutie de spalare 1, clatiti scurt, apoi spalati respectiv 5, 10 si 10 minute cu agitare rapida.
Pentru 1 membrana si 1 ciclu se folosesc 50 ml de solutie de spalare 1.
- g) Plasati membrana in 50 ml solutie de spalare 2, sub agitare usoara.
- h) Scurgeti membrana pe hartie absorbanta fara a o presa si introduceti-o in mapa de plastic.
- i) Adaugati reactivul ECL (a se vedea paragraful 5.2.4). Eliminati excesul de reactiv ECL si bulele de aer cu hartie absorbanta. Puneti totul intr-o caseta de expunere.
- j) In camera obscura, acoperiti mapa cu un film si expuneti 15 minute. Filmul se poate expune mai mult sau mai putin timp pentru a obtine semnalul optim.
- k) Imersati filmul in solutia de developare 45 secunde (paragraful 5.2.4). Clatiti in apa distilata. Imersati filmul in solutie fixatoare pana cand filmul devine complet transparent.
- l) Spalati cu apa distilata si lasati filmul sa se usuce.



6 – PROCEDEUL DE TESTARE CU GEL CRITERION™ XT



6.1 – REACTIVI SI MATERIALE NECESARE

6.1.1 – REACTIVI SI CONSUMABILE

Pipete gradate (5, 10, 25 ml), tuburi conice (50 ml), micro-tuburi de polipropilena de 2 ml cu capac.

Filme adezive de tip PARAFILM®M.

Purificarea probelor

Tampon Laemmli pentru probe	30 ml	Bio-Rad, cod 1610737
2-Mercaptoetanol	25 ml	Bio-Rad, cod 1610710
SDS	100 g	Bio-Rad, cod 1610301
Seringi de calibrare	200	Bio-Rad, cod 3551174

Electroforeza gel

Criterion™ XT 12 % Bis-Tris 1 gel - 18 godeuri		Bio-Rad, cod 3550118
XT-MOPS (tampon migrare) (20 x)	500 ml	Bio-Rad, cod 1610788
Standard Kaleidoscope precolorat	500 µl	Bio-Rad, cod 1610375
MagicMark™ XP Western Standard (standard de masa moleculara)	250 µl	Invitrogen, cod LC5602

Imunoblotare

Etanol (Normapur)	1L	VWR, cod 20821-296
Tris/CAPS (tampon de transfer) (10x)	1L	Bio-Rad, cod 1610778
Hartie de Filtru (hartie de transfer pentru Criterion™ XT gel gata turnat)	50 bucati	Bio-Rad, cod 1704085
Membrana PVDF (0.2 µm)	10 bucati	Bio-Rad, cod 1620175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, cod 1706531
TFS (tampon de spalare) (10x)	1 L	Bio-Rad, cod 1610780
ECL (substrat pt conjugat)	125 ml	Amersham, cod RPN2109
ECL Hyperfilms (18 x 24 cm)	25 films	Amersham, cod RPN2103K
Development folders	30 bucati	Applied Biosystems, cod T2258
Kodak solutie de dezvoltare LX24	pt 20 L	VWRsau Kodak
Kodak solutie de fixare AL4	pt 20 L	VWR sau Kodak





6.1.2 – ECHIPAMENT

Pipete reglabile (10, 40, 200, 1000 µl).

Cilindre gradate (1L si 2L).

Forceps de plastic, Tavite, Vortex.

Caseta de expunere si camera obscura pentru dezvoltarea filmului.

Purificare probe

TeSeE Precess 48™	Bio-Rad, cod 3590200
TeSeE Precess 24™	Bio-Rad, cod 3591070
Bloc de incalzire(3 blocuri)	Bio-Rad, cod 3589057
Adaptoare pt blocul de incalzire - 20 tuburi	Bio-Rad, cod 3589072
Centrifuga - 220/240 V	Bio-Rad, cod 3591396
Rotor vertical (Drum rotor)	Bio-Rad, cod 3589189
Adaptoare Rotor - (x6)	Bio-Rad, cod 3589191

Electroforeza in gel

Criterion™ XT Cell	Bio-Rad, cod 1656001
PowerPac HC sursa: 100/120 V - 220/240 V	Bio-Rad, cod 1645052

Transfer

Criterion™ XT blotter	Bio-Rad, cod 1704070
-----------------------	----------------------

Imunoblotare

Western Processor baza	Bio-Rad, Discontinuat
Western Processor Criterion™ XT kit	Bio-Rad, Discontinuat

6.2 – PREPARAREA REACTIVILOR

6.2.1 – PURIFICAREA PROBELOR

● **Proteinaza K**

Solutie de proteinaza K diluata in reactiv A :

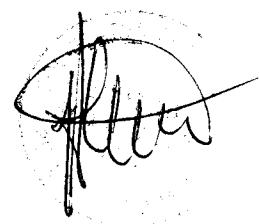
- 1 ml Reagent A
- 20 µl Proteinase K

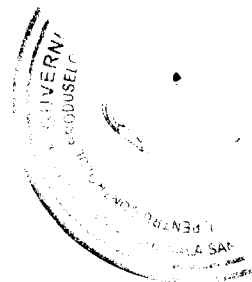
Amestecati bine prin rasturnare pentru a obtine o solutie omogena. Dupa reconstituire, proteinaza K diluata este stabila 10 ore la temperatura camerei (+18°C la +30°C).

● **Solutia Laemmli**

Solutie de SDS + 2-Mercaptoetanol + tampon pentru probe Laemmli:

- 0,6 g SDS
- 1,5 ml 2-Mercaptoethanol





Amestecati prin rasturnare.

- 28,5 ml tampon Laemmli pentru probe

Solutia se portioneaza in alicote de 4 ml si se pastreaza la -20°C. Alicotele decongelate se pot recongela.

Nota: Se recomanda prepararea solutiei Laemmli cu 1 ora inainte de utilizare, permitand dizolvarea corecta a SDS.

6.2.2 – ELECTROFOREZA

• Standard precolorat Kaleidoscope

Standardul Kaleidoscope se prepara pe durata denaturarii probelor, inainte de incarcarea in gelul de acrilamida. Preparati o dilutie 1/12 in solutie Laemmli, de exemplu 10 µl de standard precolorat Kaleidoscope + 110 µl de solutie Laemmli. Consultati prospectul standardului Kaleidoscope precolorat pentru conditiile de pastrare.

• MagicMark™ XP Western Standard

Markerul de masa moleculara MagicMark™ XP se prepara in timpul denaturarii probelor inainte de incarcarea in gelul de acrilamida.

Preparati o dilutie 1/12 in solutie Laemmli, de exemplu 10 µl de MagicMark™ XP + 110 µl de solutie Laemmli.

Consultati prospectul de utilizare MagicMark™ XP pentru conditiile de pastrare.

• Tampon de migrare Criterion™ XT

Solutie de MOPS (1x).

Preparati o dilutie 1/20. Pentru 1 tanc preparati 1 L de tampon diluat:

- 950 ml apa distilata
- 50 ml tampon MOPS (20x)

Omogenizati. Solutia nu poate fi pastrata diluata.

6.2.3 – TRANSFERUL PROTEINELOR

• Tampon de transfer

Solutie de Tris/CAPS-Etanol 15%. **Pentru 1 tanc de migrare preparati 2 L.**

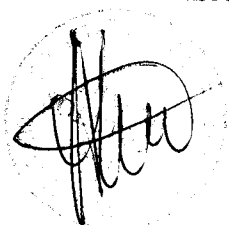
- 750 ml apa distilata
- 150 ml etanol pur
- 100 ml Tris/CAPS (10x)

Omogenizati. Solutia nu poate fi pastrata diluata.

6.2.4 – IMUNOBLOTAREA

• Solutia de spalare 1

Solutie de TFS (1x) + 0,1% Tween® 20. **Pentru prelucrarea completa a 1 membrane este necesar aproximativ 1 L.**





- 900 ml apa distilata
- 100 ml TFS (10x)
- 1 ml Tween® 20

Omogenizati foarte bine. Solutia se poate pastra peste noapte la +2°C pana la +8°C.

● Solutia de spalare 2

Solutie de TFS (1x). **Pentru prelucrarea completa a 1 membrane sunt necesari aproximativ 200 ml.**

- 900 ml apa distilata
- 100 ml TFS (10x)

Solutia se poate pastra la temperatura camerei (+18°C pana la +30°C).

● Solutia de blocare

In timpul etapei de transfer, solutia de blocare (BI) se dilueaza 1/10 cu Solutie de spalare 1. **Pentru prelucrarea completa a 1 membrane sunt necesari 40 ml de solutie de blocare.**

Adaugati intr-un tub de 50 ml:

- 36 ml solutie de spalare 1
- 4 ml solutie de blocare (10x)

Omogenizati prin rasturnarea tubului.

● Anticorpi primari diluati

Preparati solutia chiar inainte de utilizare, diluand 1/10 in Solutia de spalare 1.

Pentru 1 membrana sunt necesari 30 ml de anticorpi diluati.

- 27 ml solutie de spalare 1
- 3 ml anticorpi primari (10x)

Omogenizati prin rasturnare.

● Anticorpi secundari diluati (conjugat)

Se prepara chiar inainte de utilizare, diluand 1/10 in Solutia de spalare 1. **Pentru 1 membrana sunt necesari 40 ml de anticorpi secundari diluati.**

- 36 ml solutie de spalare 1
- 4 ml anticorpi secundari (10x)

Omogenizati prin rasturnare.

● ECL

Substratul (ECL) trebuie pregatit chiar inainte de utilizare. **Pentru 1 membrana aveti nevoie de 2 ml de substrat.**

- 1 ml Reagent 1
- 1 ml de Reagent 2

Omogenizati.



• Solutie de dezvoltare

- 800 ml apa distilata
- 200 ml produs de dezvoltare

Solutia se poate pastra la temperatura camerei (+18°C pana la +30°C), intr-o camera obscura, maxim 15 zile.

• Solutie fixatoare

- 800 ml apa distilata
- 200 ml produs de fixare

Solutia se poate pastra la temperatura camerei (+18°C pana la +30°C), intr-o camera obscura, timp de maxim 15 zile.

6.3 – PURIFICAREA PROBELOR

TeSeE™ WESTERN BLOT se poate efectua direct din acelasi omogenat de proba (tub de omogenizare) preparat pentru efectuarea testelor rapide Bio-Rad de screening (TeSeE™ SAP, TeSeE™ oaie/capra).

Prelevarea probelor

Pentru tesuturi periferice (ganglioni limfatici) introduceti 1 sfera medie (Ref.: 3551171) in tubul de omogenizare, inainte de adaugarea probei.

Cantarii 350 mg ± 40 mg de tesut nervos (de preferat din zona obexului) sau 200 mg ± 20 mg de tesut periferic. Introduceti proba in tubul de omogenizare, inchideti capacul bine si treceti la etapa de omogenizare in omogenizator (sistemele Ribolyser®, TeSeE Precess 48™ sau TeSeE Precess 24™).

Omogenizarea probelor

Introduceti tuburile in locasurile din omogenizator.

Efectuati un ciclu de agitare cu urmatoorii parametri programati pe instrument.

	Ribolyser®		TeSeE Precess 48™ sau TeSeE Precess 24™).	
	Tesut nervos	Tesuturi periferice	Tesut nervos	Tesuturi periferice
Timp de omogenizare (sec.)	45	2 x 45 ⁽¹⁾	-	-
Viteza de vibratie	6.5	6.5	-	-
Program	-	-	Program 1	Program 2

Daca omogenizarea nu este satisfacatoare, se mai pot repeta 1 -2 cicluri de omogenizare⁽²⁾.

⁽¹⁾ ⁽²⁾ Lasati un interval de 5 minute intre 2 cicluri de omogenizare.



Calibrarea probelor

Scoateti tuburile de omogenizare din aparat, resuspendati omogenatul prin rasturnarea tubului inainte de a-l deschide, deschideti tubul si aspirati 500 µl cu seringa de calibrare, avand grija sa scufundati acul sub sferele de ceramica pentru a evita aspirarea fragmentelor de tesut prost omogenizate.

Transferati fiecare 500 µl de proba intr-un micro-tub Eppendorf de 2 ml.

Nota: In aceasta etapa, atat tuburile de omogenizare dupa procesul de omogenizare cat si micro-tuburile dupa calibrarea probei se pot pastra, inchise:

- La temperatura camerei (+18°C pana la +30°C) timp de 15 ore.
- La +2°C pana la +8°C timp de 72 ore.
- La -20°C timp de 1 an. Probele congelate trebuie decongelate la temperatura camerei (+18°C pana la +30°C).

Probele se pot congela/decongela de maxim 3 ori. Inainte de utilizare, probele trebuie intotdeauna omogenizate prin inversarea tubului.

Tratarea cu Proteinaza K

Distribuiti cate 500 µl de solutie de Proteinaza K reconstituita (a se vedea paragraful 6.2.1) in fiecare eprubeta de testare.

Omogenizati tuburile inchise ermetic prin rasturnare (de 10 ori) si incubati la 37°C ± 2°C intr-o baie uscata termostata (heating block) timp 10 minute.

Precipitarea PrP^{res} cu reactiv B

Scoateti tuburile din incubator. Deschideti-le si pipetati cate 500 µl de reactiv B in fiecare tub. Omogenizati prin rasturnare pana la obtinerea unei culori uniforme.

Concentrarea PrP^{res} prin centrifugare

Centrifugati tuburile timp de 7 minute la 15000 x g la 20°C.

Clarificarea probelor

Aruncati supernatantul prin rasturnarea tuburilor deasupra unui container de deseuri. Apoi uscati tuburile asezandu-le cu gura in jos pe hartie absorbanta timp de 5 minute.

Pipetati cate 100 µl de solutie Laemmli (a se vedea in paragraful 6.2.1) in fiecare micro-tub.

Incubati timp de 5 minute la temperatura camerei (+18°C pana +30°C).

Resolubilizati complet precipitatul prin aspirare/respingere cu o pipeta.

Incubati timp de 5 minute la 100°C ± 5°C in baie uscata termostata.

Scoateti tuburile din incubator, omogenizati prin vortexare.

Centrifugati tuburile timp de 15 minute la 15000 x g la 20°C.

Transferati supernatantul intr-un microtub nou. Aruncati eprubeta cu precipitat.

In aceasta etapa, supernatantul se poate pastra inghetat la -20°C timp de 24 de ore; probele trebuie apoi decongelate si aduse la temperatura camerei (+18°C pana la +30°C) inainte de utilizare.



6.4 – ELECTROFOREZA

Testul TeSeE™ WESTERN BLOT se poate utiliza atat pentru confirmarea probelor suspectate ca pozitive EST cat si pentru tipizarea susei EST.

Procedeeul urmator se aplica in scopul confirmarii probelor suspectate ca pozitive EST. Va rugam sa luati legatura cu reprezentanta Bio-Rad pentru instructiunile de utilizare in cazul in care se doreste identificarea (tipizarea) susei EST.

Prepararea gelului

Indeprtati banda de plastic de la partea inferioara a placii de plastic si introduceti gelurile de acrilamida (vedeti paragraful 6.2.2) in tancul de migrare. Turnati tamponul de migrare (vedeti paragraful 6.2.2) de fiecare parte a gelurilor pana la partea superioara a godeurilor si in tancul de electroforeza. Scoateti pieptenii cu atentie si clatiti fiecare godeu cu tampon de migrare, folosind o pipeta.

Incarcarea probelor

Incalziti probele 4 minute la $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ chiar inainte de a incarca cate 15 μl /godeu. Incarcati 15 μl de standard precolorat Kaleidoscop diluat si 15 μl de standard MagicMark™ diluat (vedeti paragraful 6.2.2).

Nota: In caz ca migrati mai multe geluri in acelasi timp, asigurati-va ca plasati controalele in linii diferite pentru a le putea identifica ulterior mai usor.

Migrarea diferentiala a probelor

Migrati gelul la temperatura camerei ($+18^{\circ}\text{C}$ la $+30^{\circ}\text{C}$) timp de 50 minute la 200 V.

6.5 – TRANSFERUL PROTEINELOR

Tamponul de transfer trebuie preparat inainte de terminarea perioadei de migrare a probelor (paragraful 6.2.3).

Pregatirea transferului proteinelor

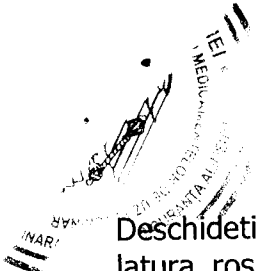
Taiati membrana la dimensiunile gelului. Folositi intotdeauna un forceps la manipularea membranei.

Imersati membrana in etanol pur timp de 15 secunde, clatiti cu apa distilata 5 minute, apoi timp de 10 minute in tampon de transfer.

Scoateti cu grija gelul din placutele de plastic si lasati-l sa se echilibreze timp de 10 minute in tamponul de transfer.

Prepararea sandwichului cu gel

Inmuiati hartie de filtru si tampoanele fibroase in tamponul de transfer.



Deschideti caseta de transfer, cu latura rosie catre stanga. Asezati pe rand pe latura rosie un tampon fibros inmuat, o hartie de filtru, membrana* si apoi gelul*. Completati cu o hartie de filtru apoi un tampon fibros si inchideti caseta. Imersati-o in tancul de transfer, umplut in prealabil cu tampon de transfer pana la nivelul indicat. Se adauga o bricheta de congelare inghetata in prealabil (pinguin), inainte de a umple complet tancul.

*Indepartati bulele de aer care s-ar putea forma.

Nota: In caz ca prelucrati mai multe membrane in acelasi timp, marcati fiecare membrana intr-un colt pentru identificare.

Transferul pe membrana PVDF

Agitati pe durata transferului cu ajutorul unui dispozitiv cu bara magnetica si migrati 60 minute la 115 V.

6.6 – IMUNOBLOTAREA

- a) Dupa terminarea transferului proteinelor, deschideti ansamblul de blotare si scoateti membrana in vederea dezvoltarii. Scufundati-o rapid in Solutia de spalare 2 (vedeti paragraful 6.2.4), apoi introduceti in etanol timp de 10 secunde inainte de clatirea in apa distilata 5 minute.

Nota: in aceasta etapa membrana poate fi pastrata peste noapte in apa distilata la +2°C pana la +8°C.

Lasati membrana sa ajunga la temperatura camerei(+18°C la +30°C) inainte de a incepe procesul de imunoblotare.

- b) Eliminati apa distilata si incubati membrana timp de 30 minute in solutie de blocare (vedeti paragraful 6.2.4). Incubati cu agitare medie.

40 ml sunt suficienti pentru 1 membrana.

Nota: de la aceasta etapa si pana la etapa g), se poate folosi aparatul Bio-Rad Western Processor atat pentru etapa de agitare cat si pentru etapele de spalare (a se consulta manualul de instructiuni pentru setari).

- c) Eliminati solutia de blocare si incubati membrana in anticorpi primari diluati (vedeti paragraful 6.2.4) timp de 30 minute la temperatura camerei (+18°C la +30°C) sub agitare medie.

Pentru 1 membrana sunt necesari 30 ml de anticorpi primari diluati.

- d) Eliminati solutia de anticorpi primari si utilizand Solutie de spalare 1, clatiti rapid membrana, apoi spalati-o de 2 ori pentru 5 minute si respectiv 10 minute, sub agitare rapida.

Pentru fiecare ciclu de spalare a unei membrane sunt necesari cate 100 ml de solutie de spalare 1.

- e) Eliminati Solutia de spalare 1 si incubati membrana timp de 20 minute in anticorpi secundari diluati (a se vedea in paragraful 6.2.4) la temperatura camerei (+18°C/+30°C) cu agitare medie.

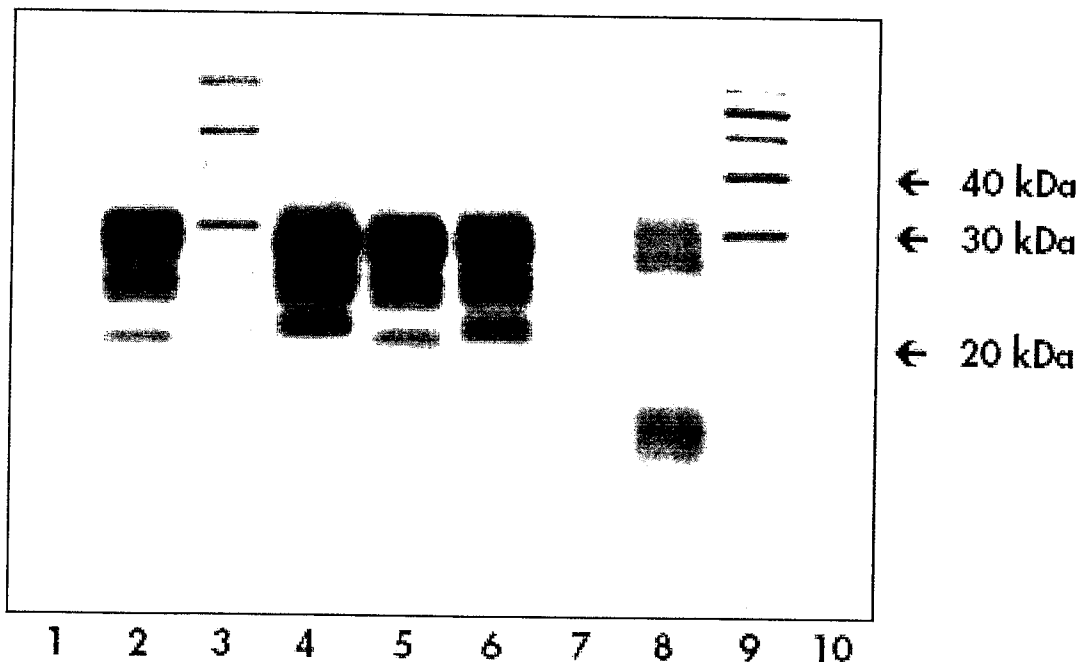


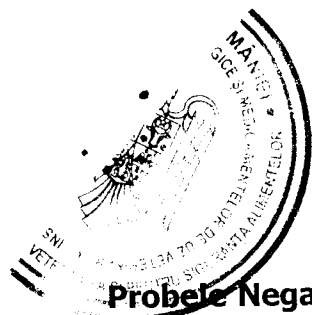
Pentru 1 membrana sunt necesari 40 ml de anticorpi secundari diluati.

- f) Eliminati solutia de anticorpi secundari si folosind Solutia de spalare 1, clatiti repede timp de 5, 10 si respectiv 10 minute sub agitare rapida.
100 ml de Solutie de spalare 1 sunt necesari pentru fiecare ciclu de clatire si pentru 1 membrana.
- g) Introduceti membrana in 100 ml de Solutie de spalare 2 sub agitare lenta.
h) Scurgeti membrana fara a o apasa pe hartie absorbanta si introduceti-o in mapa de plastic.
i) Adaugati reactivul ECL (paragraful 6.2.4). Eliminati excesul de reactiv ECL si bulele de aer cu ajutorul unei hartii absorbante. Introduceti in caseta de expunere.
j) Intr-o camera obscura, acoperiti mapa cu un film si expuneti timp de 15 minute. Filmul se poate expune o perioada mai mare sau mai mica de timp pentru un semnal optim.
k) Imersati filmul in solutie de developare 45 secunde (paragraful 6.2.4). Clatiti in apa distilata. Imersati filmul in solutia fixatoare pana cand acesta devine complet transparent.
l) Spalati cu apa distilata si lasati filmul sa se usuce.

7 – INTERPRETAREA REZULTATELOR

Figura 1 prezinta profilul benzilor probelor EST negative, probe EST pozitive la diferite specii animale si controlul de masa moleculara (pozitiile 3 si 9).





Probele Negative (pozitiile 1 si 10) au fost tratate cu proteinaza K. Acestea nu arata nici un semnal, deoarece PrP^c a fost complet digerata.

Probele Pozitive au fost de asemenea toate tratate cu proteinaza K.

Proba de bovina pozitiva ESB (pozitia 2), **proba pozitiva de scrapie clasica** (pozitia 6) si **proba pozitiva MCC** (pozitia 4) arata un profil tipic cu 3 benzi, demonstrand digestia PrP^c si transformarea proteinei prionice specifice de boala intr-un fragment core rezistent la proteinaza cu masa moleculara redusa prin indepartarea capatului N-terminal al proteinei. Cele 2 benzi superioare corespund formelor mono- si di-glicozilate (27-30 kDa) in timp ce banda inferioara corespunde formei neglicozilate.

Proba de ovina infectata experimental cu ESB (pozitia 5) prezinta un semnal mai intens la banda di-glicozilata fata de cea mono-glicozilata. Totusi, acest profil de glicozilare nu se poate considera ca dovada suficienta de infectie a animalului cu ESB. In conformitate cu recomandarile Laboratorului Comunitar de Referinta (CRL), in cazul acestui tip de probe trebuie efectuat testul diferential pentru a concluziona daca este scrapie sau ESB. Va rugam contactati Bio-Rad pentru mai multe informatii privind testul Bio-Rad de discriminare suse EST.

Proba de ovina (pozitia 8) afectata de scrapie atipica (de ex. Nor98) prezinta un profil atipic de glicozilare. O banda inferioara este vizibila la aproximativ 12 kDa, in timp ce alte benzi superioare nu sunt in aceleasi pozitii comparativ cu cazurile de scrapie "tipice". Semnalul este de asemenea mai intens la banda inferioara fata de banda superioara.

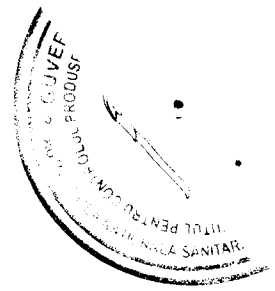
Citirea gelului trebuie considerata cu prudenta deoarece o proba intens pozitiva detectata cu trusa TeSeE™ WESTERN BLOT poate masca probele adiacente negative sau slab pozitive.

Limitele testului:

Un rezultat negativ inseamna ca proba testata nu contine PrP^{res} detectabila la testarea cu trusa TeSeE™ WESTERN BLOT. Totusi, deoarece nivelurile foarte mici de PrP^{res} ar putea fi nedetectabile, un rezultat negativ nu exclude posibilitatea unei infectii.

Orice proba cu rezultat negativ conform criteriilor de interpretare a testului TeSeE™ WESTERN BLOT, dar pozitiva printr-un test rapid pentru EST, trebuie testata folosind una dintre celelalte metode de confirmare certificate de catre OIE, imunohistochimie (IHC) sau SAF-Imunoblot.

Orice proba cu rezultat pozitiv reproductibil in conformitate cu criteriile de interpretare ale testului trebuie verificata conform reglementarilor legale in vigoare.



8 – PRECAUTII

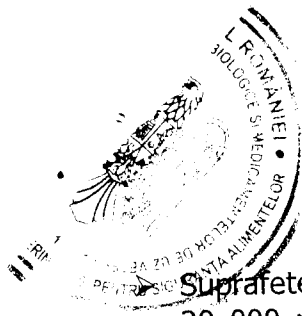
Calitatea datelor obtinute depinde de respectarea urmatoarelor reguli ale Bunelor Practici de Laborator:

- Reactivii trebuie pastrati la temperatura adecvata (consultati indicatiile furnizorilor).
- Nu lucrati cu reactivi expirati.
- Nu folositi proteinaza K reconstituita dupa 10 ore de stocare la temperatura camerei (+18°C la +30°C).
- Nu amestecati si nu combinati reactivi proveniti din truse TeSeE™ WESTERN BLOT din loturi diferite in aceeasi manopera, cu exceptia tuburilor de omogenizare, reactivului A, reactivului B si a proteinazei K.
- Permeteti reactivilor si solutiilor tampon sa ajunga la temperatura camerei (+18°C/+30°C) cu 30 minute inainte de utilizare.
- Reconstituiti cu multa grija reactivii, evitand orice contaminare.
- Nu efectuati testarea in prezenta vaporilor reactivi (acizi, baze, aldehide) sau praf, deoarece acestia pot altera activitatea enzimatica a conjugatului.
- Reactia enzimatica este foarte sensibila la prezenta oricaror metale sau ioni metalici. Prin umare, trebuie evitat contactul conjugatului cu elemente metalice.
- Folositi numai eprubete de polipropilena.
- Folositi sticlaria curata, clatita cu apa distilata, sau de preferinta vase de unica folosinta.
- Folositi pentru fiecare proba un varf nou de pipeta.
- La inceperea electroforezei si a transferului, verificati daca cei 2 electrozi vin in contact cu tamponul.
- Toti timpii de clatire indicati trebuie respectati intocmai, pentru a evita coloratia nedorita de fond excesiv la colorarea finala cu reactivul ECL.

9 – INSTRUCIUNI DE IGIENA/PROTECTIA MUNCII

In general, conditiile de igiena, masurile de biosecuritate si bunele practici de laborator trebuie sa respecte recomandarile autoritatilor nationale de reglementare.

- Toti reactivii trusei sunt destinati diagnosticului "in vitro".
- Purtati manusi de protectie de unica folosinta la manipularea reactivilor si a probelor si apoi spalati-va mainile.
- Nu pipetati cu gura.
- Utilizati containere de polipropilena pentru a evita spargerea sticlarii.
- Toate materialele ce vin in contact direct cu probele si solutiile de spalare trebuie considerate contaminate.
- Evitati stropirea cu probe sau solutii ce contin probe biologice.



Suprafetele contaminate trebuie curatate cu solutie de hipoclorit de sodiu 20 000 ppm (clor menajer). Daca lichidul de contaminare este un acid, suprafetele contaminate trebuie mai intai neutralizate cu hidroxid de sodiu inainte de a le trata cu clor. Suprafetele trebuie apoi clatite cu apa distilata, uscate cu etanol si zvantate cu hartie absorbanta. Materialul folosit la curatenie trebuie aruncat in containerul special de materiale contaminate.

- Probele, materialele si produsele contaminate trebuie eliminate dupa decontaminare:
 - fie prin inmuiere in hidroxid de sodiu 1 M (concentratia finala) timp de cel putin 1 ora la temperatura camerei (+18°C pana la +30°C),
 - fie prin inmuiere in solutie de hipoclorit de sodiu 20 000 ppm minim 1 ora la temperatura camerei (+18°C pana la +30°C),
 - fie prin autoclavare la 134°C minim 18 minute, la presiune de 3 bari.

Nota: nu autoclavati niciodata solutii care contin clor sau reactivul B.

- Toate operatiile implicate de testarea de screening pentru Encefalopatia Spongiforma Transmisibila (EST) se supun reglementarilor adecvate si trebuie efectuate in laboratoare izolate, cu acces limitat si controlat dedicate in mod exclusiv acestei activitati. Protectia operatorului trebuie asigurata prin purtarea halatului de laborator, a botosilor de protectie, a manusilor de protectie, a unei masti cu vizor sau o masca simpla completata cu ochelari de protectie.
- Operatorii trebuie sa fie instruiti in mod adecvat asupra riscului la care sunt expusi privind lucrul cu agenti EST sau prioni si cu modalitatile specifice de decontaminare validate a agentilor infectiosi neconventionali. Masurile de biosecuritate trebuie sa fie conforme recomandarilor autoritatilor de reglementare din tara respectiva.
- Neutralizati si/sau autoclavati toate solutiile de spalare sau orice alt lichid ce contine probe biologice inainte de a le arunca.
- Pentru masurile de precauzii si substante toxice privind acest kit de testare, va rugam consultati pictograma(pictogramele) de pe etichetele reactivilor si informatiile furnizate la sfarsitul instructiunilor de utilizare. Fisa tehnica de siguranta este disponibila pe site-ul Bio-Rad: www.bio-rad.com



10 – BIBLIOGRAFIE

1. S.B. PRUSINER (1991) Molecular biology of prion diseases - Science 252:1515-1522.
2. J.B. KATZ, J.G. PEDERSEN, A.L. JENNY and W.D. TAYLOR (1992) Assessment of Western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE) - Journal of Veterinary Diagnostic Investigations, 4, 447-449.
3. G.A.H. WELLS, Y.I. SPENCER and M. HARITANI (1994) Configuration and topographic distribution of PrP in the central nervous system in bovine spongiform encephalopathy: an immunohistochemical study. In: Slow Infections of the Central Nervous System, J. BJORNSSON, R.I. CARP, A. LOVE and M. WISNIEWSKI - Eds The New York Academy of Sciences, pp 350-352.
4. J.P. DESLYS, E. COMOY, S. HAWKINS, S. SIMON, H. SCHIMMEL, G. WELLS, J. GRASSI and J. MOYNAGH (2001) Screening slaughtered cattle for BSE - Nature: 409; 476-477
5. S. BENESTAD, P. SARRADIN, B. THU, J. SCHÖNHEIT, M. TRANULIS and B. BRATBERG (2003)
Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of new type, Nor98. Veterinary Record 153, 202-208.
6. A. BUSCHMANN, G. LÜHKEN, J. SCHULTZ, G. ERHARDT and M.-H. GROSCHUP (2004)
Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie resistant genotype (PrPARR/ARR). Journal of General Virology 85, 2727-2733.
7. L. ORGE, A.GALO, C.MACHADO, C. LIMA, C. OCHOA, J. SILVA, M. RAMOS and J.-P. SIMAS (2004)
Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. Journal of General Virology 85, 3487-3491.
8. A. BUSCHMANN, A.-G. BIACABE, U. ZIEGLER, A. BENCSIK, J.-Y. MADEC, G. ERHARDT, G. LÜHKEN, T. BARON and M.-H. GROSCHUP (2004) Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. Journal of Virological Methods 117, 27-36.
9. H. DE BOSSCHERE, S. ROELS, S. BENESTAD, E. VANOPDENBOSCH (2004).



Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Veterinary Record* 155(22): 707-708.

10. H. ONNASCH, H.M. GUNN, B.J. BRADSHAW, S. BENESTAD, H.F. BASSETT (2004). Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Veterinary Record* 155, 636-637.
11. S. BENESTAD, P. SARRADIN, J.-M. BILHEUDE, J. GRASSI, H. LAUDE, O. ANDREOLETTI, T. MOLDAL and B. BRATBERG. Are there gold standard methods for the diagnosis of TSE? Nor98 scrapie cases: atypical cases and their challenging diagnosis. Second International Chronic Wasting Disease Symposium, Madison, Wisconsin, USA
12. BIANCABE, A.-G., LAPLANCHE, J.-L., RYDER, S. AND BARON, T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases, *EMBO Reports* 5, 110-114.
13. CASALONE, C., ZANUSSO, G., ACUTIS, P., FERRARI, S., CAPUCCI, I., TAGLIAVINI, F., MONACO, S. AND CARAMELLI, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *PNAS* 101, 3065-70.
14. BUSCHMANN A.; GRETZSCHEL A; BIANCABE A-G; SCHIEBEL K; CORONA C; HOFFMAN C; EIDEN M; BARON T; CASALONE C; GROSCHUP M H (2006).
15. ARSAC, J.-N., ANDREOLETTI, O., BILHEUDE, J.-M., LACROUX, C., BENESTAD, S. L., AND BARON, T. (2007). Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerging Infectious Diseases* 13(1), 58-65.
16. E. URO-COSTE, H. CASSARD, S. SIMON, S. LUGAN, J. – M. BILHEUDE, A. PERRETLIAUDET, J.-W. IRONSIDE, S. HAIK, C. BASSET-LEOBON, C. LACROUX, K. PEOCH, N. STREICHENBERGER, J. LANGEVELD, M.-W. HEAD, J. GRASSI, J.-J. HAUW, F. SCHELCHER, M.-B. DELISLE, O. ANDREOLETTI (2008) Beyond PrP^{res} Type 1/Type 2 Dichotomy in Creutzfeldt-Jakob disease. *Plos Pathogens* volume 4, issue 2, e1000029.

TeSeE™ WESTERN BLOT

REF 3551169

REACTIVI PENTRU CONFIRMAREA IN VITRO A PROBELOR SUSPECTE EST
POZITIVE

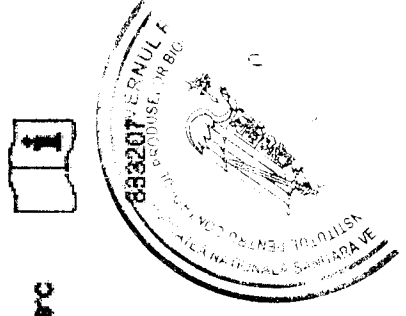
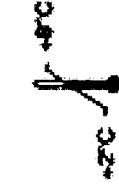
32

IN VITRO TEST

	Grinding tubes	Tubos de troycoc	Probocrocheten	Tuburi de omogenizare
A	1 x 20 ml Denaturing solution	Solution de denaturare	Densaturungsbuffer	SOLUTIE DE DENATURARE
B	1 x 20 ml Clarifying solution	Solution clarifianta	Färlösungsmittel	SOLUTIE DE CLARIFICARE
PK	1 x 0.5 ml Proteinase K	Proteinase K	Protease K	PROTEINAZA K
Ab I	1 x 8 ml Anti-PPV MAAb (10x)	AcM Anti-PPV (10x)	Anti-PPV MAAb (10x)	Anticorp monoclonal primar Anti-PPV (10x)
Ab II	1 x 10 ml Sheep Anti-Mouse IgG de-mouton anti-souris	IgG de-mouton anti-souris	Schaf Anti-Maus IgG-HRP (10x)	Anticorp IgG oale anti-soarece marcati cu peroxidaza HRP(10x)
BI	1 x 10 ml Blocking solution (10x)	Solution de saturation (10x)	Blockierungskolera (10x)	SOLUTIE DE BLOCARE

PERICULOS

- H228 - H318 - H315 - H334 - H412
- P210 - P201 - P280
- P306+P351+P338
- P302+P352 - P273 - P501



Consultati site-ul BioRad pentru mai multe informatii privind fisa tehnica de siguranta ale produsului

TeSeE™ WESTERN BLOT **Ab II**
 10 ml

Conjugat (10x)
 Conjugat (10x)
 Conjugat (10x)
 Conjugat (10x)

IN VITRO TEST
 +2°C / +8°C

BIO RAD Bb Rad
 CNA Marne la Poenale - FRANCE

LOT 1H0010 2022-09-10
 SBA11H0010091022

81218

TeSeE™ Kit de purificare

LOT 1H0010
 2022-09-10

H1289000001

81218

TeSeE™ Kit de purificare

LOT 1H0010
 2022-09-10

H1289000002

81218

TeSeE™ WESTERN BLOT **PK**
 0.5 ml

Proteaza K

IN VITRO TEST
 +2°C / +8°C

BIO RAD Bb Rad
 CNA Marne la Poenale - FRANCE

LOT 1H0010 2022-09-10
 SBA11H0010091022

81218

TeSeE™ WESTERN BLOT **Ab I**
 8 ml

Anti-PrP MAb (10x)
 AcM anti-PrP (10x)
 Anti-PrP MAK (10x)
 AcM anti-PrP (10x)
 AcM anti-PrP (10x)

IN VITRO TEST
 +2°C / +8°C

BIO RAD Bb Rad
 CNA Marne la Poenale - FRANCE

LOT 1H0010 2022-09-10
 SBA11H0010091022

81218

TeSeE™ WESTERN BLOT **Ab I**
 8 ml

Anti-PrP MAb (10x)
 AcM anti-PrP (10x)
 Anti-PrP MAK (10x)
 AcM anti-PrP (10x)
 AcM anti-PrP (10x)

IN VITRO TEST
 +2°C / +8°C

BIO RAD Bb Rad
 CNA Marne la Poenale - FRANCE

LOT 1H0010 2022-09-10
 SBA11H0010091022

81218

