2 – PRINCIPIUL DE TESTARE

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

Procedeul de testare incepe cu digestia proteinei prionice celulare (PrP^{c}), urmata de purificarea si concentrarea PrP^{res} specifica de boala. Detectia PrP^{res} se efectueaza prin migrare electroforetica urmata de imunoblotare, folosind un anticorp monoclonal cu specificitate inalta pentru PrP^{res}.

Procedeul de testare se compune din urmatoarele etape:
- Omogenizarea probelor,
- Digestia PrP^{c} cu proteinaza K,
- Purificarea si concentrarea PrP^{res},
- Electroforeza si transferul pe o membrana,
- Imunoblotarea.

BIROUL DE REPREZENTARE BIO-RAD BUCUREȘTI · ROMÂNIA

3 – COMPOZITIA TRUSEI

Etichetare	Tipul reactivului	Prezentare	Conditii de stocare
Grinding Tubes	Eprubete de omogenizare ce contin sfere ceramice in solutie tamponata[1]. Conservant:Proclin 300 (0,1%).	1 punga (35 eprubete)	+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
Bl	Solutie de blocare[1]	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 cu testul rapid Bio-Rad ELISA (TeSeE™ SAP, TeSeE™ oaie/capra) .

La bovine: purificarea PrP^{res} se efectueaza din probe de SNC. Deoarece distributia PrP^{res} este eterogena in sistemul nervos central, pentru detectia optima este preferabila prelevarea din aria obex a trunchiului cerebral. Seringa de prelevare (cod 355 1175) permite esantionarea rapida si usoara a probelor de obex intr-o maniera sigura si lipsita de risc. Consultati protocolul de prelevare furnizat impreuna cu seringile de prelevare.

La rumegatoare mici: purificarea PrP^{res} se efectueaza din probe de tesut SNC sau tesuturi periferice (ganglioni limfatici). Probele se taie si se cantaresc individual.

La cervide: purificarea PrP^{res} se efectueaza din probe de tesut 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), eprubete de polipropilena de 2 ml (Eppendorf) cu capac, PARAFILM®M.

Purificarea probelor		
Tampon Laemmli pentru probe	30 ml	Bio-Rad, cod 161-0737
2-Mercaptoethanol	25 ml	Bio-Rad, cod 161-0710
SDS	100 g	Bio-Rad, cod 161-0301
Seringi de calibrare	200	Bio-Rad, cod 51174

Electroforeza in gel		
Acrilamida 40% 29:1	500 ml	Bio-Rad, cod 161-0146
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	1 L	Bio-Rad, cod 161-0799
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	1 L	Bio-Rad, cod 161-0798
Albastru de Bromfenol	10 g	Bio-Rad, cod 161-0404
Sucroza	1 kg	Bio-Rad, cod 161-0720
Persulfat de Amoniu	10 g	Bio-Rad, cod 161-0700
TEMED	5 ml	Bio-Rad, cod 161-0800
Tris/Glicina/SDS (tampon de migrare) (10x)	1 L	Bio-Rad, cod 161-0732
Kaleidoscope prestained standards	500 µl	Bio-Rad, cod 161-0324
MagicMark™ XP Western Standard (Standard de Masa Moleculara)	250 µl	Invitrogen, cod LC5602

Imunoblotare		
Etanol (Normapur)	1L	VWR, cod 2821-296
Tris/CAPS (tampon de transfer) (10x)	1L	Bio-Rad, cod 161-0778
Hartie de filtru (hartie de transfer pt geluri turnate manual Mini Blot™)	50 bucati	Bio-Rad, cod 170-3932
Membrana PVDF (0.2 µm)	10 bucati	Bio-Rad, cod 162-0175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, cod 170-6531
TFS (tampon de spalare) (10x)	1 L	Bio-Rad, cod 161-0780
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 developare Kodak LX24	pt 20 L	VWR sau Kodak

BIROUL DE REPREZENTARE BIO-RAD BUCUREȘTI - ROMANIA

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 developare filme.

Purificarea probelor	
TeSeE Precess 48™	Bio-Rad, cod 90200
TeSeE Precess 24™	Bio-Rad, cod 91070
SAU	
Ribolyser	Bio-Rad, cod 89158
Heating block (baie uscata)	Bio-Rad, cod 89046
Adaptoare de 20 locuri pt Heating block	Bio-Rad, cod 89199
Centrifuga - 220/240 V	Bio-Rad, cod 89190
Drum rotor (rotor vertical)	Bio-Rad, cod 89189
Adaptoare pt rotor (x6)	Bio-Rad, cod 89191
Electroforeza geluri	
Mini-PROTEAN® Tetra Cell, modul electroforeza	Bio-Rad, cod 165-8002
5 placi spatiatoare	Bio-Rad, cod 165-3312
Sursa de tensiune PowerPac HC 220/240 V	Bio-Rad, cod 164-5052
Transfer	
Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, cod 170-3946
Imunoblotare	
Western Processor baza	Bio-Rad, cod 90098
Western Processor Mini Blot™ kit	Bio-Rad, cod 170-3988

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, verificand ca SDS s-a 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 (stacking, 3% acrilamida, pH 6.8).

<u>Gelul de separare (1 gel)</u>

- 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

BIROUL DE REPREZENTARE BIO-RAD BUCUREȘTI - ROMÂNIA

Turnati 7 ml de solutie de gel intre placi si pastrati solutia ramasa pentru controlul polimerizarii. Acoperiti usor pana la partea superioara cu 1 ml tampon Tris-HCl 0,3 M pH 8,8 /SDS (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 µl persulfat de amoniu 10% (3)
- 6 µl 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 si 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 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.
Conditiile de pastrare sunt precizate in prospectul MagicMark™ XP.

• Tamponul de migrare Mini Blot™

Solutia Tris-Glycine-SDS (1x).
Preparati o dilutie de 1/10.

Pentru 1 tanc 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.

BIROUL DE REPREZENTARE BIO-RAD BUCUREȘTI - ROMÂNIA

5.2.3 – TRANSFERUL PROTEINELOR

• **Tampon de transfer**

Solutia de Tris/CAPS-Etanol 15%. **Pentru 1 tanc 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 membrana 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 membrana 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 Bl 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 eprubetei.

• **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 g solutie de spalare 1
- 1,5 ml Anticorpi primary (10x)

Omogenizati prin rasturnarea tubului.

- **Anticorpi secundari diluati (conjugat)**

Chiar inainte 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 developare**
  - 800 ml apa distilata
  - 200 ml produs de developare

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

TeSeE™ WESTERN BLOT se poate efectua direct din omogenatul de proba (tub de omogenizare) preparat cu ocazia testului rapid TeSeE Bio-Rad de screening.

Prelevarea probelor

Pentru tesuturi periferice (ganglioni limfatici) introduceti 1 sfera medie (Cod: 51171) in tubul de omogenizare, inainte de a adauga proba de tesut.

Cantariti o cantitate de 350 mg ± 40 mg de tesut nervos (de preferat din aria obexului) sau 200 ± 20 mg de tesut periferic. Introduceti proba in eprubeta de omogenizare (grinding tube) , inchideti bine si treceti la etapa de omogenizare folosind omogenizatoarele tip Ribolyser®, TeSeE Precess 48™ sau TeSeE Precess 24™.

Omogenizarea probelor

Introduceti tuburile in locasurile din omogenizator.

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

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

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

(1) (2) Asteptati 5 minute intre 2 cicluri de agitare.

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 in cate o eprubeta Eppendorf de 2 ml.

Nota: In aceasta etapa, atat tuburile de omogenizare dupa procesul de omogenizare cat si eprubetele cu proba calibrata se pot pastra inchise:

- 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 dupa ce s-au dezghetat complet.

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 termostatata (heating block) timp 10 minute.

Precipitarea PrP^{res} cu reactiv B

Scoateti tuburile din termobloc. Deschideti-le si pipetati cate 500 µl de reactiv B in fiecare. 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 5.2.1) in fiecare eprubeta.
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 baia uscata termostatata (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-o noua eprubeta Eppendorf. 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.

BIROUL DE REPREZENTARE BOLD BUCUREȘTI - ROMÂNIA

5.4 – ELECTROFOREZA

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

Pregatirea gelului
Introduceti gelurile de acrilamida in tancul 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 4 minute la 100 °C ± 5°C chiar inainte de incarcarea a 15 µl/godeu. Incarcati cate 15 µl din fiecare proba in godeurile atribuite conform schemei. 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 (godeuri cu alte numere) pentru identificarea usoara ulterioara a gelurilor.

Migrarea diferentiala a probelor
Migrati gelul la temperatura camerei (+18°C/+30°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 o penseta de plastic. Nu atingeti membrana cu mana. Imersati membrana 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 sandvisului cu gel
Inmuiati hartia de filtru si tampoanele fibroase pentru transfer in tampon de transfer. Deschideti caseta de transfer, mentinand catre stanga latura transparenta. 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 bulele de aer la fiecare strat adaugat folosind o pipeta de sticla sau o rola adecvata.
Nota: In caz ca prelucrati mai multe membrane odata, marcati corespunzator fiecare membrane 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 developare. Imersati rapid membrana in Solutie de spalare 2 (a se vedea paragraful 5.2.4), apoi plasati-o in etanol 10 secunde, apoi clatiti-o 5 minute in apa distilata.

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 suficienti pentru 1 membrana.** Nota: din aceasta etapa si pana la etapa g), se poate folosi Bio-Rad Western Processor pentru toate 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 primary diluati.**

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

BIROUL DE REPREZENTARE BUCUREȘTI - ROMÂNIA

e) Eliminati solutia de spalare 1 si incubati membrana 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 apoi, 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, cu agitare usoara.

h) Scurgeti membrana pe hartie absorbanta fara a o presa si introduceti-o in mapa de plastic.

i) Adaugati reactivul ECL (paragraf 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, regland perioada 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 la aer.

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), eprubete conice (50 ml), eprubete Eppendorf de polipropilena de 2 ml cu capac.
Film de tip PARAFILM®M.

Purificarea probelor

Laemmli sample buffer	30 ml	Bio-Rad, cod 161-0737
2-Mercaptoetanol	25 ml	Bio-Rad, cod 161-0710
SDS	100 g	Bio-Rad, cod 161-0301
Seringi de calibrare	200	Bio-Rad, cod 51174

Electroforeza gel

Criterion™ XT 12 % Bis-Tris	1 gel/18 godeuri	Bio-Rad, cod 50118
XT-MOPS (tampon migrare) (20 x)	500 ml	Bio-Rad, cod 161-0788
Standard Kaleidoscope precolorat	500 µl	Bio-Rad, cod 161-0324
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 161-0778
Hartie de Filtru (hartie de transfer Criterion™ XT pt gel gata turnat)	50 bucati	Bio-Rad, cod 170-4085
Membrana PVDF (0.2 µm)	10 bucati	Bio-Rad, cod 162-0175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, cod 170-6531
TFS (tampon de spalare) (10x)	1 L	Bio-Rad, cod 161-0780
ECL (substrat pt conjugat)	125 ml	Amersham, cod RPN2109
ECL Hyperfilms (18 x 24 cm)	25 films	Amersham, cod RPN2103K
Development folders	30 bbucati	Applied Biosystems, cod T2258
Developing solution LX24	pt 20 L	VWR sau Kodak
Fixative solution AL4	pt 20 L	VWR sau Kodak

6.1.2 – ECHIPAMENT

Pipete reglabile (10, 40, 200, 1000 µl).
Cilindri gradati (1L si 2L).
Pensa de plastic, Tavite, Vortex®.
Caseta de expunere si camera obscura pentru developare.

Purificare probe	
TeSeE Precess 48™	Bio-Rad, cod 90200
TeSeE Precess 24™	Bio-Rad, cod 91070
SAU	
Ribolyser	Bio-Rad, cod 89158
Heating block	Bio-Rad, cod 89046
Adaptoare pt Heating block de 20 locuri	Bio-Rad, cod 89199
Centrifuga - 220/240 V	Bio-Rad, cod 89190
Rotor vertical (Drum rotor)	Bio-Rad, cod 89189
Adaptoare Rotor (x6)	Bio-Rad, cod 89191
Electroforeza in gel	
Criterion™ XT Cell	Bio-Rad, cod 165-6001
PowerPac HC power supply 220/240 V	Bio-Rad, cod 164-5052
Transfer	
Criterion™ XT blotter	Bio-Rad, cod 170-4070
Imunoblotare	
Western Processor baza	Bio-Rad, cod 90098
Western Processor Criterion™ XT kit	Bio-Rad, cod 170-3985

6.2 – PREPARAREA REACTIVILOR

6.2.1 – PURIFICAREA PROBELOR

• Proteinaza K

Solutie de proteinaza K diluatae in reactiv A :

- 1 ml Buffer A
- 20 µl Proteinase K

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

• Solutia Laemmli

Solutie de DS + 2-Mercaptoetanol + Laemmli:

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

Amestecati prin rasturnare.

- 28,5 ml tampon Laemmli pur 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 completa 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 Laemmli, de exemplu 10 µl de standard Kaleidoscope + 110 µl de solutie Laemmli. Consultati prospectul de utilizare al markerului 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.

BIROUL DE REPREZENTARE BUCUREȘTI · ROMÂNIA

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 membrana 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/+8°C.

• **Solutia de spalare 2**

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

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

Solutia se poate pastra peste noapte la +18°C/+30°C.

• **Solutia de blocare**

Solutia de blocare Bl se dilueaza 1/10 cu Solutie de spalare 1 in timpul etapei de transfer. **Pentru prelucrarea completa a 1 membrana 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 BI (10x)

Omogenizati prin rasturnarea tubului.

• **Anticorpi primari diluati**

Preparati solutia chiar inainte de utilizare prin diluare 1/10 in Solutia de spalare 1. **Pentru 1 membrana sunt necesati 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 prin diluare 1/10 in Solutia de spalare 1. **Pentru 1 membrana sunt necesati 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 developare**
  - 800 ml apa distilata
  - 200 ml produs de developare

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

- **Solutie fixatoare**
  - 800 ml apa distilata
  - 200 ml produs Fixativ

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

6.3 – PURIFICAREA PROBELOR

TeSeE™ WESTERN BLOT se poate efectua direct din omogenatul de proba (tub de omogenizare) preparat cu ocazia testului rapid TeSeE™ Bio-Rad de screening.

Prelevarea probelor

Pentru tesuturi periferice (ganglioni limfatici) introduceti 1 sfera medie (Ref.: 51171) in tubul de omogenizare, inainte de adaugarea probei.
Cantariti 350 mg ± 40 mg de tesut nervos (de preferat din obex) sau 200 mg ± 20 mg de tesut periferic. Introduceti proba in tubul de omogenizare, inchideti capacul bine si treceti la etapa de omogenizare (Ribolyser® sau TeSeE Precess 48™ sau TeSeE Precess 24™).

Omogenizarea probelor

Introduceti tuburile in locasurile din omogenizator.
Efectuati un ciclu de agitare cu urmatorii parametri programati pe instrument.

	Ribolyser®		TeSeE Precess 48™	
	Tesut nervos	Tesut periferic	Tesut nervos	Tesut periferic
Time (Timp de omogenizare)	45	2 x 45 (1)	-	-
Speed (Viteza de vibratie)	6.5	6.5	-	-
Program	-	-	Program 1	Program 2

Daca omogenizarea nu este satisfacatoare, se pot repeta ciclurile de omogenizare, de 1-2 ori (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-o eprubeta Eppendorf de 2 ml.

Nota: In aceasta etapa, atat tuburile de omogenizare dupa procesul de omogenizare cat si eprubetele cu proba calibrata se pot pastra inchise:
- La temperatura camerei (+18°C/+30°C) timp de 15 ore.
- La +2°C/+8°C (in gheata sau in frigider) 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 de 10 ori dupa ce s-au dezghetat complet.

Tratarea cu Proteinaza K
Distribuiti cate 500 µl de solutie de Proteinaza K de lucru (a se vedea paragraful 6.2.1) in fiecare eprubeta de testare.
Omogenizati tuburile inchise prin rasturnare de 10 ori si incubati la 37°C ± 2°C intr-o baie uscata termostatata (heating block) timp 10 minute.

Precipitarea PrP^{res} cu reactiv B
Scoateti tuburile din termobloc. Deschideti-le si pipetati cate 500 µl de reactiv B in fiecare. 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 eprubeta.
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 baia uscata termostatata.
Scoateti tuburile de la incubare, omogenizati prin vortexare.
Centrifugati tuburile timp de 15 minute la 15000 x g la 20°C.
Transferati supernatantul intr-o noua eprubeta Eppendorf. 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.

6.4 – ELECTROFOREZA

Testul TeSeE™ WESTERN BLOT se poate utiliza atat pentru confirmarea probelor suspectate ca positive EST cat si pentru tipizarea susei EST.
Procedeul 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
Indepartati banda de plastic de la partea inferioara a placii de plastic si introduceti gelurile de acrilamida (paragraful 6.2.2) in tancul de migrare. Turnati tamponul de migrare (paragraful 6.2.2) in tancul de electroforeza de fiecare parte a gelurilor pana la partea superioara a godeurilor. Scoateti pieptenii cu atentie si clatiti fiecare godeu cu tampon de migrare, folosind o pipeta.

Incarcarea probelor
Incalziti probele 4 minute la 100 °C ± 5°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 (paragraful 6.2.2).
Nota: In caz ca migrati mai multe geluri in acelasi timp, asigurati-va ca plasati controalele in godeuri/linii diferite, pentru a le putea identifica ulterior.

Migrarea diferentiala a probelor
Migrati gelul la temperatura camerei (+18°C la +30°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 o penseta de plastic la manipularea membranei de blotare.
Imersati membrana in etanol pur timp de 15 secunde, clatiti cu apa distilata 5 minute, apoi 10 minute cu tampon de transfer.
Scoateti cu grija gelul din caseta de plastic si echilibrati-l 10 minute in tampon de transfer.

Prepararea sandvisului cu gel

Inmuiati hartie de filtru si tampoanele fibroase de blotare in tampon de transfer. Deschideti caseta de transfer, cu latura rosie catre stanga. Asezati pe rand pe latura rosie un tampon fibros inmuiat, o hartie de filtru, membrana* si apoi gelul*. Completati cu o alta hartie de filtru, apoi al 2-lea 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 prelabil (pinguin), inainte de a umple complet tancul.

*Indepartati bulele de aer la adaugarea fiecarui strat.

Nota: In caz ca prelucrati mai multe membrane odata, marcati-le pe fiecare 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 developarii. Scufundati-o rapid in Solutia de spalare 2, apoi in etanol timp de 10 secunde, apoi in apa distilata 5 minute. Nota: in aceasta etapa membrana poate fi pastrata peste noapte in apa distilata, la +2°C/+8°C.

b) Eliminati excesul de apa distilata si incubati membrana 30 minute in solutie de blocare (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 agitare cat si pentru etapele de spalare (a se consulta manualul acestuia pentru setarea parametrilor).

c) Eliminati solutia de blocare si incubati membrana in anticorpi primari diluati (paragraful 6.2.4) timp de 30 minute la temperatura camerei (+18°C la +30°C) cu agitare medie. **Pentru 1 membrana sunt necesari 30 ml de anticorpi primari diluati.**

d) Eliminati excesul de anticorpi primari si clatiti rapid membrana cu Solutie de spalare 1, apoi spalati-o de 2x, odata 5 minute si a doua oara 10 minute, cu agitare rapida. **Pe fiecare ciclu de spalare a 1 membrana sunt necesari cate 100 ml de solutie de spalare 1.**

e) Eliminati excesul de solutie de spalare 1 si incubati membrana 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 excesul de anticorpi secundari si folosind Solutie de spalare 1, clatiti rapid cu agitare rapida timp de 5, 10 si 10 minute respectiv. **Pentru**

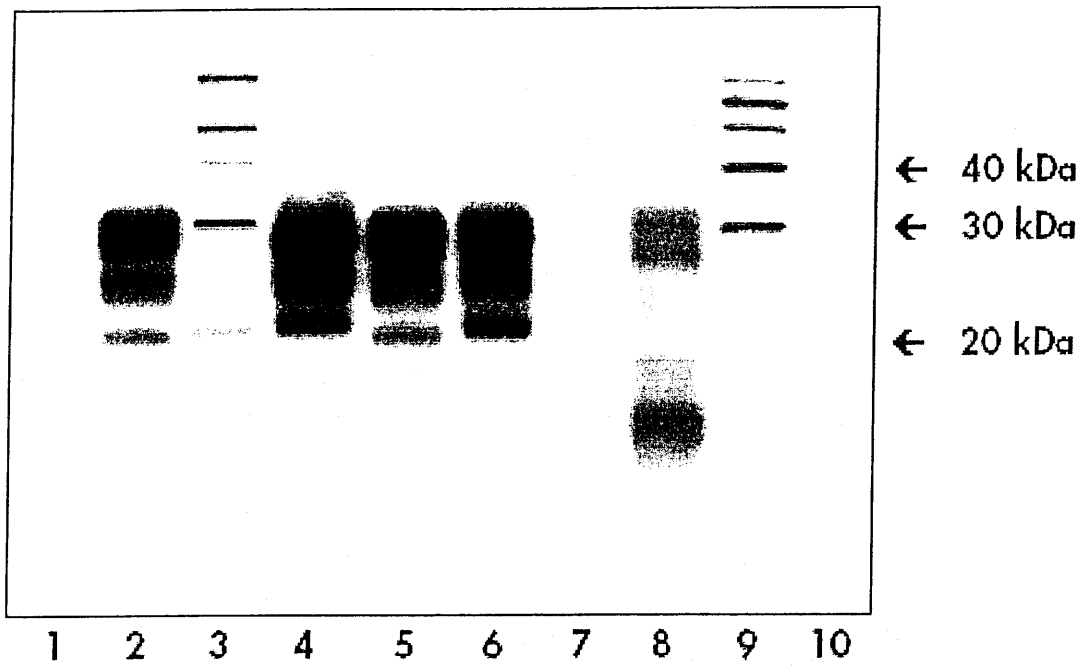
BIROUL DE REPREZENTARE BIO-RAD BUCUREȘTI ROMÂNIA

fiecare ciclu de clatire a 1 membrana sunt necesari 100 ml de solutie de spalare 1.

g) Introduceti membrana in 100 ml de Solutie de spalare 2 cu agitare moderata.
h) Scurgeti membrana fara a o apasa pe hartie absorbanta, si introduceti-o intr-o 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) In camera obscura, acoperiti mapa cu un film si expuneti timp de 15 minute. Filmul se poate expune mai mult sau mai putin, atat cat se apreciaza ca asigura un semnal optim.
k) Imersati filmul in solutie de developare 45 secunde (paragraful 6.2.4). Clatiti cu apa distilata. Imersati filmul in solutia fixatoare pana cand acesta devine complet transparent. Spalati cu apa si lasati filmul la uscat.
l) Spsalati filmul cu apa distilata si lasati-l 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 tratate cu proteinaza K.

Proba de bovina pozitiva ESB (pozitia2), **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 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 avea posibilitatea de a decide daca este scrapie sau ESB. Pentru aceasta folositi Testul Bio-Rad Discriminatory kit.

Proba de ovina afectata de scrapie atipica, de ex. Nor98 (pozitia 8) se prezinta cu profil atipic de glicozilare. Este vizibila o banda joasa la aproximativ 12 kDa, in timp ce benzile 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 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 aderarea la si respectarea urmatoarelor reguli ale Bunelor Practici de Laborator:

- Reactivii trebuie pastrati la temperatura adecvata (consultati indicatiile furnizorilor).
- Nu lucrati cu reactivi expirati.
- Nu mai 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 cu numere diferite de lot.
- Permiteti reactivilor sa ajunga la temperatura camerei (+18°C/+30°C) cu 30 minute inainte de utilizare.
- Reconstituiti cu multa grija reactivii, avand grija sa nu-i contaminati.
- Nu efectuati testarea in prezenta vaporilor reactivi (acizi, baze, alcali, aldehide) sau praf, deoarece acestia altereaza 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 sticlarie 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 la colorarea finala cu reactivul ECL.

9 – INSTRUCTIUNI DE IGIENA/PROTECTIA MUNCII

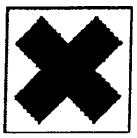
In general conditiile de igiena, biosecuritate si bunele practice de laborator trebuie sa respecte recomandarile autoritatii legale nationale.

- 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 sticlariei.
- 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 20000 ppm (clor menajer). Daca lichidul de contaminare este 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 de infecte.
- 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/+30°C),
  - fie prin inmuiere in solutie de hipoclorit de sodiu 20000 ppm minim 1 ora la temperatura camerei (+18°C/+30°C),
  - fie prin autoclavare la 134°C minim 18 minute, la presiune de 3 bari.

Nota: nu autoclavati niciodata solutii ce contin clor sau hipoclorit sau reactiv B.

- Toate operatiile implicate de testarea de triere pentru Encefalopatia Spongiforma Transmisibila (EST) se supun reglementarilor adecvate si trebuie efectuate in laboratoare cu acces limitat controlat dedicate in mod exclusiv acestei activitati. Protectia operatorului trebuie asigurata prin purtarea halatului de laborator, a manusilor de protectie si a mastii cu vizor sau a ochelarilor de protectie.
- Operatorii trebuie sa fie instruiti in mod adecvat asupra riscului la care sunt expusi la lucrul cu agenti EST sau prioni si cu modalitatile specifice de decontaminare a agentilor infectiosi neconventionali. Masurile de biosecuritate trebuie sa fie conforme recomandarilor autoritatii 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.

- Reactivul B este o substanta periculoasa clasificata ca nociva (> 25% alcool) in conformitate cu legislatia europeana.
- Reactivii care contin 0,1% ProClin® 300 sunt classificati ca preparate iritante in conformitate cu legislatia europeana.



Xn
(Alcool > 25%)
(0,1% ProClin® 300)

R : 10-22-37/38-41-67 Inflamabil. Nociv daca este inghitit. Iritant pentru sistemul respirator si piele. Risc de afectare oculara serioasa. Poate cauza sensibilizare la contact cutanat. Inhalarea vaporilor poate cauza somnolenta si ameteala.
S : 7/9-13-26-37/39-46 Pastrati containerul bine inchis si plasati-l intr-un loc bine ventilat. Pastrati departe de alimente, bautura, hrana pentru animale. In caz de contact cu ochii, clatiti imediat cu multa apa si consultati medicul. In caz de contact cu pielea clatiti imediat cu multa apa. Purtati echipament de protectie adecvat, manusi si masca sau ochelari de protectie. In caz de inghitire, contactati imediat medical si aratati-ii containerul sau eticheta acestuia.

TeSeE WESTERN BLOT PK

Proteinază K 0.5 ml

TEST *IN VITRO* 5169M

+8°C

+2°C

BIO-RAD

LOT 0L0010

2010-11-15

TeSeE WESTERN BLOT B

Soluție de clarificare 20 ml

2010-11-15

TEST *IN VITRO* 5169B

-25°C

+2°C

Xn

BIO-RAD

LOT 0L0010

TeSeE WESTERN BLOT Ab I

Anti-PrP Mab (10x) 8 ml

2010-11-15

TEST *IN VITRO* 5169C

-8°C

+2°C

Xi

BIO-RAD

LOT 0L0010

TeSeE WESTERN BLOT Ab II

Conjugat (10x) 10 ml

2010-11-15

TEST *IN VITRO* 5169D

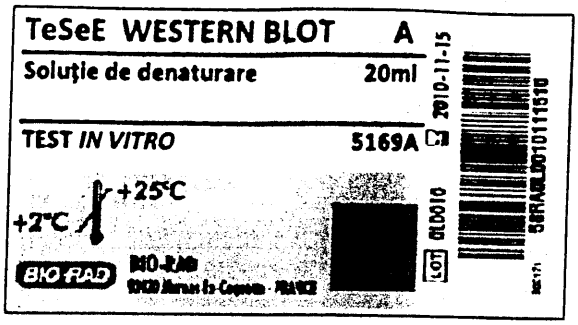
+8°C

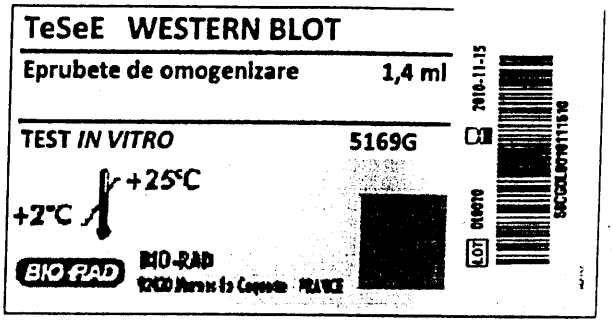
+2°C

BIO-RAD

LOT 0L0010

BIROUL DE REPREZENTANȚĂ BIO-RAD BUCUREȘTI ROMÂNIA





TeSeE WESTERN BLOT 355 1169

KIT PENTRU CONFIRMAREA PROBELOR SUSPECTATE POZITIVE EST

TEST

IN VITRO **32 TESTE**

1 X 35		Eprubeta de omogenizare
1 x 20 ml	A	Solutie de denaturare
1 x 20 ml	B	Solutie de clarificare
1 x 0,5 ml	PK	Proteinaza K
1 x 8 ml	Ab I	Anti-PrP Mab (10x)
1 x 10 ml	Ab II	Conjugat (10x)
1 x 10 ml	BI	Solutie de blocare (10x)

Xn
R : 10-22-37/38-41-43-67
S : 7/8-13-26-28-37/39-46
Alcohol > 25%
0.1% ProClin™ 300

+2°C +8°C

862143

TeSeE WESTERN BLOT **355 1169**

LOT OL0010 2010-11-15

A: OL0010	Ab I: OL0010	G. Tube: OL0010
B: OL0010	Ab II: OL0010	
BI: OL0010	PK: OL0010	

P51169NTOL0010

TeSeE WESTERN BLOT **BI**

Soluţie de blocare (10x) 10ml

TEST *IN VITRO* 5169E

IN VITRO TEST 5169E

+8°C

+2°C

BIO-RAD BIO-RAD

2010-11-15

LOT OL0010

S8BL0L0010111510

TeSeE KIT DE PURIFICARE

LOT OL0010

2010-11-15

G0283000025

BIROUL DE REPREZENTARE BIO-RAD BUCUREŞTI - ROMÂNIA