

TeSeE™ WESTERN BLOT


▽ 32

REF 3551169

RÉACTIFS POUR LA CONFIRMATION *IN VITRO* DES
ÉCHANTILLONS SUSPECTÉS POSITIFS EST



Validé et certifié par l'OIE comme étant apte aux emplois prévus dans
cette notice. Numéro d'enregistrement: 20090105.

 16005959 - 2018/06

BIO-RAD

SOMMAIRE

- 1 - INFORMATIONS GÉNÉRALES
- 2 - PRINCIPE DU TEST
- 3 - COMPOSITION DE LA TROUSSE
- 4 - ÉCHANTILLONS
- 5 - MODE OPÉRATOIRE AVEC LE GEL MINI BLOT™
 - 5.1 Réactifs et matériels supplémentaires
 - 5.2 Préparation des réactifs
 - 5.3 Purification des échantillons
 - 5.4 Électrophorèse
 - 5.5 Transfert des protéines
 - 5.6 Immunoblotting
- 6 - MODE OPÉRATOIRE AVEC LE GEL CRITERION™ XT
 - 6.1 Réactifs et matériels supplémentaires
 - 6.2 Préparation des réactifs
 - 6.3 Purification des échantillons
 - 6.4 Électrophorèse
 - 6.5 Transfert des protéines
 - 6.6 Immunoblotting
- 7 - INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS
- 8 - PRÉCAUTIONS
- 9 - MESURES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ
- 10 - BIBLIOGRAPHIE

1 - INFORMATIONS GÉNÉRALES

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) ont été décrites pour la première fois au dix-huitième siècle, chez les moutons (tremblante) et, plus récemment, chez les cervidés comme le cerf et l'élan (maladie du dépérissement chronique) et les bovins (encéphalopathie spongiforme bovine, ESB). L'homme est également sensible à certaines formes d'EST comme le kuru, la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) ou le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGS). L'émergence d'une nouvelle forme de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, dite variante, (MCJv) chez l'homme a été fortement liée à la consommation alimentaire de viandes ou de produits carnés infectés par l'agent de l'ESB. L'une des principales caractéristiques de l'encéphalopathie spongiforme transmissible (EST) est une accumulation progressive, dans le système nerveux central, d'une isoforme anormale de la protéine prion naturelle ou cellulaire (PrP^c), dite PrP^{res}. Cette protéine PrP^{res} spécifique de la maladie se caractérise par une plus grande résistance aux protéases. Le test TeSeE™ WESTERN BLOT permet l'identification qualitative de la protéine PrP^{res}, après un traitement protéolytique aboutissant à un fragment de poids moléculaire réduit suite à la coupure de l'extrémité N-terminale.

Des programmes de surveillance active/passive ont été lancés dans le monde entier pour détecter les animaux infectés par l'ESB, la tremblante ou par la maladie du dépérissement chronique (CWD). Ces programmes ont permis d'identifier un nombre croissant de cas positifs dans les laboratoires de dépistage. Ces échantillons positifs (animaux suspects) sont alors systématiquement confirmés comme "infectés par une EST" par une histopathologie montrant des altérations spongiformes caractéristiques, ou par la détection de la PrP anormale par immunohistochimie (IHC) ou encore par la détection de Fibrilles Associées à la Tremblante (Examen SAF) par microscopie électronique. Ces méthodes de confirmation requièrent une grande expertise pour l'interprétation des résultats et sont souvent longues et coûteuses. La technique western blot peut également être utilisée comme une méthode alternative pour la confirmation des échantillons soupçonnés d'être porteurs d'EST.

Les données de validation de ce kit ont été certifiées par l'OIE, sur la base d'un examen d'experts, comme étant conformes à l'usage qui leur est assigné à savoir la détection post mortem des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) chez les bovins (encéphalopathie spongiforme bovine, ESB), chez les ovins et les caprins (ESB et tremblante) et chez les cervidés (cachexie chronique) pour les emplois suivants:

1. Confirmer une suspicion d'EST sur des prélèvements positifs détectés dans des laboratoires de dépistage de pays appliquant des programmes de surveillance active/passive. Tout prélèvement donnant un résultat négatif selon les critères d'interprétation du TeSeE™ WESTERN BLOT, après un résultat positif à un test rapide, doit être soumis à l'une des autres épreuves de confirmation certifiées par l'OIE, l'immunohistochimie ou l'Immunoblot-SAF ;
2. Confirmer la prévalence de l'infection par l'une des maladies associées aux EST (ESB, tremblante, cachexie chronique) dans le cadre d'une étude épidémiologique menée dans un pays à faible prévalence ;
3. Estimer la prévalence de l'infection pour faciliter l'analyse de risque (par ex. pour des enquêtes ou pour la mise en place de mesures de prophylaxie) et contribuer à démontrer l'efficacité des politiques d'éradication.

Le test TeSeE™ WESTERN BLOT utilise le même principe de dosage que les tests rapides Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat), notamment la purification préliminaire et l'étape de concentration de la PrP^{res} suivies d'une détection très sensible par immunoblot. Ce test constitue donc un outil efficace pour la confirmation du diagnostic d'échantillons soupçonnés d'être porteurs d'une EST, ainsi que pour le typage des souches d'EST chez les moutons.

2 - PRINCIPE DU TEST

Le test TeSeE™ WESTERN BLOT permet la détection de la PrP^{res} dans des échantillons de tissu nerveux (bovins, ovins, caprins, cervidés...) ou périphériques (cervidés) prélevés chez des animaux infectés.

Le mode opératoire commence par la digestion de la protéine prion cellulaire (PrP^c), suivie par la purification et la concentration de la protéine prion PrP^{res} spécifique de la maladie. La détection de la PrP^{res} est réalisée par électrophorèse puis par une technique d'immunoblotting utilisant un anticorps monoclonal hautement spécifique de la PrP^{res}.

Le mode opératoire comprend les étapes suivantes :

- Homogénéisation de l'échantillon,
- Digestion de la PrP^c par la protéinase K,
- Purification et concentration de la PrP^{res},
- Électrophorèse et transfert sur une membrane,
- Immunoblotting.

3 - COMPOSITION DE LA TROUSSE

Désignation	Type de réactifs	Présentation	Conservation
 Tubes de broyage	Tubes de broyage contenant des billes de céramique dans une solution tampon ⁽¹⁾	1 sachet (35 tubes)	+2°C à +25°C
A	Solution dénaturante Prête à l'emploi	1 flacon (20 ml)	+2°C à +25°C
B	Solution clarifiante Colorant : bleu de bromophénol Prête à l'emploi	1 flacon (20 ml)	+2°C à +25°C
PK	Protéinase K Colorant : rouge phénol	1 flacon (0,5 ml)	+2°C à +25°C
Ab I	Anticorps primaire ⁽¹⁾ : Anticorps monoclonal anti-PrP (10x)	1 flacon (8 ml)	+2°C à +25°C
Ab II	Anticorps secondaire ⁽¹⁾ : IgG de mouton anti-souris (H+L)-HRP (10x)	1 flacon (10 ml)	+2°C à +25°C
BI	Solution de saturation ⁽¹⁾ (10x)	1 flacon (10 ml)	+2°C à +25°C

⁽¹⁾ Ces réactifs contiennent 0.1% de ProClin™ 300 (conservateur).

4 - ÉCHANTILLONS

Le test TeSeE™ WESTERN BLOT peut être utilisé pour la détection des EST chez les bovins (Encéphalopathie Spongiforme Bovine, ESB), chez les ovins et caprins (ESB et tremblante), et chez les cervidés (Maladie du Dépérissement Chronique).

Il peut être réalisé directement à partir de l'échantillon homogénéisé (tube de broyage) préparé pour les tests rapides Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/ goat).

Bovins: la purification de la PrP^{res} est effectuée sur des échantillons de Système Nerveux Central (CNS). Comme la distribution de la PrP est hétérogène dans le système nerveux central, les prélèvements doivent être faits préférentiellement dans l'obex du tronc cérébral pour une détection optimale.

La seringue de prélèvement (Réf. : 3551175) permet un prélèvement rapide et facile de l'obex, de manière sûre. Veuillez consulter le protocole de prélèvement pour une utilisation détaillée.

Petits ruminants: la purification de la PrP^{res} est effectuée sur des échantillons de Système Nerveux Central (CNS).

Les échantillons sont coupés et pesés individuellement.

Cervidés: la purification de la PrP^{res} est effectuée sur des échantillons de Système Nerveux Central (CNS) ou de tissus périphériques (ganglions lymphatiques). Les échantillons sont coupés et pesés individuellement.

5 - PROCÉDURE AVEC LE GEL MINI BLOT™

5.1 - RÉACTIFS ET MATÉRIELS SUPPLÉMENTAIRES

5.1.1 - RÉACTIFS ET CONSOMMABLES

Pipettes graduées (5, 10, 25 ml), tubes coniques (50 ml), micro-tubes (2 ml) en polypropylène avec bouchon.

Film protecteur PARAFILM® M.

Purification des échantillons

Tampon Laemmli	30 ml	Bio-Rad, Réf. 1610737
2-Mercaptoethanol	25 ml	Bio-Rad, Réf. 1610710
SDS	100 g	Bio-Rad, Réf. 1610301
Seringues de calibration	200	Bio-Rad, Réf. 3551174

Électrophorèse

Acrylamide 40% 29:1	500 ml	Bio-Rad, Réf. 1610146
Tris-HCl 0,5 M, pH 6.8	1 L	Bio-Rad, Réf. 1610799
Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8	1 L	Bio-Rad, Réf. 1610798
Bleu de Bromophénol	10 g	Bio-Rad, Réf. 1610404
Saccharose	1 kg	Bio-Rad, Interrompu
Persulfate d'ammonium	10 g	Bio-Rad, Réf. 1610700
TEMED	5 ml	Bio-Rad, Réf. 1610800
Tris/Glycine/SDS (Tampon d'électrophorèse) (10x)	1 L	Bio-Rad, Réf. 1610732
Marqueur précoloré Kaleidoscope™	500 µl	Bio-Rad, Réf. 1610375
MagicMark™ XP Western Standard (marqueur de poids moléculaire)	250 µl	Invitrogen, Réf. LC5602

Immunoblotting

Éthanol (Normapur)	1L	VWR, Réf. 20821-296
Tris/CAPS (tampon de transfert) (10x)	1L	Bio-Rad, Réf. 1610778
Papier filtre (papier de transfert pour gels Mini Blot)	50 feuilles	Bio-Rad, Réf. 1703932
Membrane PVDF (0,2 µm)	10 feuilles	Bio-Rad, Réf. 1620175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, Réf. 1706531
PBS (tampon de lavage) (10x)	1 L	Bio-Rad, Réf. 1610780
ECL (substrat pour conjugué)	125 ml	Amersham, Réf. RPN2109
Hyperfilms pour ECL (18 x 24 cm)	25 films	Amersham, Réf. RPN2103K
Chemises de développement	30 chemises	Applied Biosystems, cat Nr. T2258
Solution de développement Kodak LX24	qsp 20 L	VWR ou Kodak
Kodak Solution de fixateur Kodak AL4	qsp 20 L	VWR ou Kodak

5.1.2 - MATÉRIEL

Pipettes réglables (10, 40, 200, 1000 µl),

Éprouvette graduée (1 L et 2 L), pince en plastique, cuves, vortex.

Cassette d'exposition et ampoule rouge pour le développement des films.

Purification des échantillons

TeSeE™ Precess 48™	Bio-Rad, Réf. 3590200
TeSeE™ Precess 24™	Bio-Rad, Réf. 3591070
Bloc chauffant (3 blocs)	Bio-Rad, Réf. 3589057
Adaptateur pour bloc chauffant – 20 tubes	Bio-Rad, Réf. 3589072
Centrifugeuse - 220/240 V	Bio-Rad, Réf. 3591396
Rotor tambour	Bio-Rad, Réf. 3589189
Adaptateurs pour rotor - (x6)	Bio-Rad, Réf. 3589191

Électrophorèse

Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Module électrophorèse	Bio-Rad, Réf. 1658007
5 spacer plates	Bio-Rad, Réf. 1653312
Générateur PowerPac™ HC: 100/120 V - 220/240 V	Bio-Rad, Réf. 1645052

Transfer

Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, Réf. 1703946
------------------	-----------------------

Immunoblotting

Western Processor base
Cuves Western Processor pour gels Mini Blot

Bio-Rad, Interrompu
Bio-Rad, Interrompu

5.2 - PRÉPARATION DES RÉACTIFS

5.2.1 - PURIFICATION DES ÉCHANTILLONS

• Protéinase K

Solution de protéinase K diluée dans le réactif A :

- ▶ 1 ml de réactif A
- ▶ 20 µl de protéinase K

Bien mélanger en retournant jusqu'à obtenir une solution homogène. Après la reconstitution, la solution diluée de protéinase K est stable 10 heures à température ambiante (+18°C à +30°C).

• Solution de Laemmli

Solution de SDS + 2-Mercaptoéthanol + Laemmli sample buffer :

- ▶ 0,6 g de SDS
- ▶ 1,5 ml de 2-Mercaptoéthanol

Mélanger par retournement.

- ▶ 28,5 ml de Laemmli sample buffer

La solution est répartie en aliquotes de 4 ml et conservée à -20°C.

Les aliquotes décongelées peuvent être recongelées.

Remarque: Il est conseillé de préparer la solution de Laemmli une heure avant utilisation pour permettre une dissolution complète du SDS.

5.2.2 - ÉLECTROPHORÈSE

• Gel discontinu d'acrylamide, coulé manuellement

Le gel doit avoir 1,5 mm d'épaisseur.

Au moyen du module de coulage Mini Blot™ (casting module), couler en premier le gel inférieur (acrylamide 13,5%, pH 8,8) ; une fois que le gel inférieur est polymérisé, couler le gel supérieur (acrylamide 3%, pH 6,8).

Gel inférieur (1 gel)

- ▶ 2,8 ml d'Acrylamide 40%, 29:1
- ▶ 1,7 ml de tampon Tris-HCl, 1,5 M, pH 8,8 / SDS (1)
- ▶ 1,3 ml e solution de saccharose à 50% (2)
- ▶ 2,5 ml d'eau distillé

Mélanger en retournant.

- ▶ 43 µl de persulfate d'ammonium 10% (3)
- ▶ 9 µl de TEMED

Verser 7 ml de la solution entre les plaques et garder le reste de la solution comme témoin de polymérisation. Recouvrir délicatement jusqu'en haut avec 1 ml du tampon Tris-HCl 0,3 M pH 8,8 / SDS (4) de sorte que la surface du gel ne sèche pas.

Laisser le gel polymériser pendant 15-20 minutes à température ambiante (+18°C à +30°C). Vérifier que le reste de solution est polymérisé. Retourner le système pour éliminer l'excès de tampon.

Gel supérieur (1 gel)

- ▶ 4 ml d'acrylamide 3% (7)
- ▶ 28 µl de persulfate d'ammonium 10% (3)
- ▶ 6 µl de TEMED

Mélanger en retournant.

Verser doucement le gel inférieur sur le gel supérieur et garder le reste de solution comme témoin de polymérisation. Positionner le peigne, en veillant à ne pas piéger de bulle d'air dans les positions des puits. Laisser le gel se polymériser pendant 5-10 minutes à température ambiante (+18°C à +30°C). Vérifier que le reste de solution est polymérisé.

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

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

La solution peut être conservée de +2°C à +8°C pendant 2 semaines.

(2) Solution de saccharose 50%

- ▶ 25 g de saccharose
- ▶ qsp 50 ml d'eau distillée

La solution de saccharose peut être conservée de +2°C à +8°C, pendant 2 semaines.

(3) Solution de persulfate d'ammonium 10%

- ▶ 5 g de persulfate d'ammonium
- ▶ qsp 50 ml d'eau distillée

La solution de persulfate d'ammonium est répartie en aliquotes et conservée à -20°C. La solution décongelée peut être conservée de +2°C à +8°C, pendant 2 semaines.

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

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

La solution peut être conservée de +2°C à +8°C, pendant 2 semaines.

(6) Solution de bleu de bromophénol 1%

- ▶ 0,5 g de bleu de bromophénol
- ▶ 50 ml d'eau distillée

La solution de bleu de bromophénol peut être conservée à température ambiante (+18°C à +30°C), pendant 6 mois.

(7) Solution d'acrylamide 3%

- ▶ 3,8 ml d'acrylamide 40%, 29:1
- ▶ 10 ml de tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 / SDS (5)
- ▶ 6 ml de saccharose 50% (2)
- ▶ 500 µl de bleu de bromophénol 1% (6)
- ▶ qsp 50 ml d'eau distillée

La solution peut être conservée de +2°C à +8°C, pendant 2 semaines.

• Marqueur Kaleidoscope™

Le marqueur Kaleidoscope™ est préparé pendant la dénaturation des échantillons avant le dépôt sur le gel d'acrylamide.

Préparer une dilution au 1/12e dans la solution de Laemmli (par exemple 10 µl de marqueur Kaleidoscope™ + 110 µl de solution de Laemmli).

Consulter la notice du marqueur Kaleidoscope™ pour les conditions de conservation.

• Marqueur de poids moléculaire MagicMark™ XP

Le marqueur de poids moléculaire MagicMark™ XP est préparé pendant la dénaturation de l'échantillon, avant le dépôt sur le gel d'acrylamide.

Préparer une dilution au 1/12e dans la solution de Laemmli, par exemple 10 µl de MagicMark™ XP + 110 µl de la solution de Laemmli.

Consulter la notice du MagicMark™ XP pour les conditions de conservation.

• Tampon de migration Mini Blot™

Solution de Tris-Glycine-SDS (1x).

Préparer une dilution au 1/10e. **1 L de tampon dilué est nécessaire pour 1 cuve :**

- ▶ 100 ml de tampon Tris-Glycine-SDS (10x)
- ▶ 900 ml d'eau distillée

Homogénéiser. Cette solution ne peut être conservée.

5.2.3 - TRANSFERT DES PROTÉINES

• Tampon de transfert

Solution de Tris/CAPS-éthanol 15%. **2,5 L sont nécessaires pour 1 cuve**

de transfert.

- ▶ 750 ml d'eau distillée
- ▶ 150 ml d'éthanol pur
- ▶ 100 ml de Tris/CAPS (10x)

Homogénéiser. Cette solution ne peut être conservée.

5.2.4 - IMMUNOBLOTTING

• Solution de lavage 1

Solution de PBS (1x) + 0,1% Tween® 20. **Environ 500 ml sont nécessaires pour le traitement complet d'une membrane.**

- ▶ 900 ml d'eau distillée
- ▶ 100 ml de PBS (10x)
- ▶ 1 ml de Tween® 20

Bien homogénéiser. La solution peut être conservée une nuit de +2°C à +8°C.

• Solution de lavage 2

Solution de PBS (1x). **Environ 100 ml sont nécessaires pour le traitement complet d'une membrane.**

- ▶ 900 ml d'eau distillée
- ▶ 100 ml de PBS (10x)

La solution peut être conservée une nuit à température ambiante (+18°C à +30°C).

• Solution de saturation

Pendant l'étape de transfert, diluer la solution de saturation (BI) au 1/10e dans la solution de lavage 1. **20 ml de solution de saturation diluée (1x) sont nécessaires pour 1 membrane.**

- ▶ 18 ml de solution de lavage 1
- ▶ 2 ml de solution de saturation (10x)

Homogénéiser en retournant le tube.

• Anticorps primaire dilué

Juste avant usage, diluer l'anticorps primaire au 1/10e dans la solution de lavage 1. **15 ml de l'anticorps dilué sont nécessaires pour 1 membrane.**

- ▶ 13,5 ml de solution de lavage 1
- ▶ 1,5 ml d'anticorps primaire (10x)

Homogénéiser en retournant le tube.

• Anticorps secondaire dilué (conjugué)

Juste avant usage, diluer l'anticorps secondaire au 1/10e dans la solution de lavage 1. **20 ml de conjugué dilué sont nécessaires pour 1 membrane.**

- ▶ 18 ml de solution de lavage 1
- ▶ 2 ml d'anticorps secondaires (10x)

Homogénéiser en retournant le tube.

• ECL

Le substrat (ECL) doit être préparé juste avant usage. **1 ml de substrat est nécessaire pour 1 membrane.**

- ▶ 0,5 ml de réactif 1
- ▶ 0,5 ml de réactif 2

Homogénéiser la solution.

• Solution de développement

- ▶ 800 ml d'eau distillée
- ▶ 200 ml de produit de développement

La solution peut être conservée à température ambiante (+18°C à +30°C), en chambre noire, pendant 15 jours maximum.

• Solution de fixation

- ▶ 800 ml d'eau distillée
- ▶ 200 ml de produit fixateur

La solution peut être conservée à température ambiante (+18°C à +30°C), en chambre noire, pendant 15 jours maximum.

5.3 - PURIFICATION DES ÉCHANTILLONS

Le test TeSeE™ WESTERN BLOT peut être réalisé directement à partir de l'échantillon homogénéisé (tube de broyage) préparé pour les tests rapides Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat).

Prélèvement

Pour l'analyse des tissus périphériques (ganglions lymphatiques) introduire une bille de taille moyenne ("Medium bead", Réf. 3551171) dans le tube de broyage avant d'y ajouter l'échantillon.

Prélever une masse de 350 mg ± 40 mg de tissu nerveux (de préférence au niveau de l'obex) ou 200 mg ± 20 mg de tissu périphérique. Déposer l'échantillon dans un tube de broyage, fermer hermétiquement et procéder au broyage dans l'homogénéiseur (Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 48™ ou TeSeE™ PRECESS 24™).

Broyage de l'échantillon

Placer les tubes dans la couronne de l'homogénéiseur.

Effectuer un cycle d'agitation avec les paramètres suivants:

	Ribolyser®		TeSeE™ PRECESS 48™ ou TeSeE™ PRECESS 24™	
	Tissus nerveux	Tissus périphériques	Tissus nerveux	Tissus périphériques
Temps (sec.)	45	2 x 45 ⁽¹⁾	-	-
Vitesse	6,5	6,5	-	-
Programme	-	-	Programme 1	Programme 2

Si le broyage est insuffisant, 1 ou 2 autres cycles d'agitation peuvent être effectués⁽²⁾.

⁽¹⁾⁽²⁾ Une pause de 5 minutes est nécessaire entre 2 cycles d'agitation.

Calibration de l'échantillon

Retirer les tubes de broyage de l'homogénéiseur, remettre en suspension l'homogénat en retournant avant d'ouvrir les tubes et aspirer 500 µl avec la seringue de calibration, en veillant à plonger l'aiguille au-dessous du niveau des billes en céramique pour éviter de prélever des fragments de tissus.

Transférer chaque échantillon de 500 µl dans un micro-tube Eppendorf de 2 ml. Remarque: à ce stade, les tubes de broyage après homogénéisation

et les micro-tubes après calibration de l'échantillon peuvent être conservés, fermés :

- A température ambiante (+18°C à +30°C) pendant 15 heures.
- De +2°C à +8°C pendant 72 heures.
- A -20°C pendant 1 an. Les échantillons congelés doivent être décongelés à température ambiante (+18°C à +30°C).

Les échantillons peuvent être soumis à un maximum de 3 cycles de congélation/ décongélation. Les échantillons doivent toujours être homogénéisés par retournement avant usage.

Traitement par la protéinase K

Distribuer 500 µl de solution de protéinase K reconstituée (voir paragraphe 5.2.1) dans chaque micro-tube.

Homogénéiser les tubes fermés en les retournant (10 fois) et incubé à 37°C ± 2°C dans un bloc chauffant pendant 10 minutes.

Précipitation de la PrP^{res} avec le réactif B

Sortir les tubes de l'incubateur. Les ouvrir et distribuer 500 µl de réactif B dans chaque tube. Homogénéiser en retournant les tubes jusqu'à obtenir une couleur homogène.

Concentration de la PrP^{res} par centrifugation

Centrifuger les tubes pendant 7 minutes à 15 000 g à 20°C.

Clarification de l'échantillon

Jeter le surnageant dans un récipient pour déchets. Sécher ensuite les tubes en les retournant sur du papier absorbant pendant 5 minutes.

Distribuer 100 µl de solution de Laemmli (voir paragraphe 5.2.1) dans chaque micro-tube.

Incuber pendant 5 minutes à température ambiante (+18°C à +30°C). Resolubiliser complètement le culot par aspiration/rejet avec une pipette.

Incuber pendant 5 minutes à 100°C ± 5°C dans un bloc chauffant.

Sortir les tubes de l'incubateur, homogénéiser au vortex.

Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à 15000 g à 20°C.

Transférer le surnageant dans un nouveau micro-tube. Jeter le tube contenant le culot.

À ce stade, le surnageant peut être conservé congelé à -20°C pendant 24 heures ; les échantillons doivent être décongelés à température ambiante (+18°C à +30°C) avant usage.

5.4 - ÉLECTROPHORÈSE

Le test TeSeE™ WESTERN BLOT peut être à la fois utilisé pour confirmer un échantillon suspecté infecté d'EST et pour le typage de souches chez le mouton. La procédure suivante est destinée à une analyse de confirmation d'échantillons suspectés infectés d'EST.

Pour toute information sur le protocole à suivre pour le typage des souches, merci de prendre contact avec votre représentant Bio-Rad.

Préparation du gel

Placer les gels d'acrylamide (voir paragraphe 5.2.2) dans la cuve de migration. Verser le tampon de migration (voir paragraphe 5.2.2) dans la cuve d'électrophorèse de chaque côté des gels, jusqu'en haut des puits. Retirer délicatement les peignes et rincer chaque puits avec du tampon de migration, à l'aide d'une pipette.

Dépôt des échantillons

Chauffer les échantillons pendant 4 minutes à $100\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ juste avant de déposer 15 µl/puits.

Déposer 15 µl du marqueur Kaleidoscope™ dilué et 15 µl du marqueur MagicMark™ XP dilué (voir paragraphe 5.2.2).

Remarque: au cas où plusieurs gels seraient traités en même temps, déposer les marqueurs dans différents puits pour faciliter l'identification.

Migration différentielle des échantillons

Lancer la migration à température ambiante ($+18\text{ °C}$ à $+30\text{ °C}$) pendant 90 minutes à 150 V. Le front de migration doit être sorti du gel.

5.5 - TRANSFERT DES PROTÉINES

Le tampon de transfert doit être préparé avant la fin de la migration des échantillons (voir paragraphe 5.2.3).

Préparation du transfert des protéines

Découper la membrane aux dimensions du gel. La membrane doit toujours être manipulée avec des pinces.

Plonger la membrane dans l'éthanol pur pendant 15 secondes, rincer dans l'eau distillée pendant 5 minutes, puis dans le tampon de transfert pendant 10 minutes. Retirer délicatement le gel des plaques de verre et le laisser s'équilibrer pendant 10 minutes dans le tampon de transfert.

Préparation du sandwich

Tremper les papiers filtre et les coussins de fibres dans le tampon de transfert. Ouvrir la cassette de transfert, côté transparent à gauche. Placer sur le côté transparent, dans l'ordre, un coussin de fibres, un papier filtre, la membrane* et le gel*. Compléter avec un papier filtre puis un coussin de fibres et fermer la cassette.

Plonger la cassette dans la cuve de transfert, préalablement remplie jusqu'à la limite indiquée avec du tampon de transfert.

*Éliminer les éventuelles bulles d'air formées.

Remarque: Au cas où plusieurs membranes seraient traitées en même temps, identifier chaque membrane dans un coin.

Transfert sur la membrane PVDF

Transférer pendant 60 minutes à 115 V, sans agitation (barreau magnétique).

5.6 - IMMUNOBLOTTING

a) Au terme du transfert des protéines, ouvrir la cassette et retirer la membrane pour la révéler. Plonger rapidement la membrane dans la solution de lavage 2 (voir paragraphe 5.2.4), puis la mettre dans l'éthanol pendant 10 secondes avant de rincer pendant 5 minutes dans l'eau distillée.

Note: A ce stade, la membrane peut être conservée pendant une nuit dans de l'eau distillée de +2°C à +8°C.

Laisser revenir à température ambiante (+18°C à +30°C) avant de commencer l'immunoblotting.

b) Éliminer l'eau distillée et incuber la membrane pendant 30 minutes dans la solution de saturation (voir paragraphe 5.2.4). Incuber sous agitation modérée.

20 ml suffisent pour 1 membrane.

Remarque: à partir de cette étape jusqu'à l'étape g), le Western Processor Bio-Rad peut être utilisé pour les étapes d'agitation et de lavage (voir le manuel pour les paramètres).

c) Éliminer la solution de saturation et incuber la membrane dans **l'anticorps primaire** dilué (voir paragraphe 5.2.4) pendant 30 minutes à température ambiante (+18°C à +30°C) sous agitation modérée.

15 ml d'anticorps primaire dilué sont nécessaires pour 1 membrane.

d) Eliminer la solution d'anticorps primaire et avec la solution de lavage 1, rincer rapidement la membrane, puis laver deux fois respectivement pendant 5 et 10 minutes sous agitation rapide.

50 ml de solution de lavage 1 sont nécessaires pour chaque cycle et pour 1 membrane.

e) Eliminer la solution de lavage 1 et incuber la membrane pendant 20 minutes dans l'anticorps secondaire dilué (voir paragraphe 5.2.4) à température ambiante (+18°C à +30°C) sous agitation modérée.

20 ml d'anticorps secondaire dilué sont nécessaires pour 1 membrane.

f) Eliminer la solution d'anticorps secondaire et avec la solution de lavage 1, rincer rapidement, puis laver respectivement pendant 5, 10 et 10 minutes, sous agitation rapide.

50 ml de solution de lavage 1 sont nécessaires pour chaque cycle et pour 1 membrane.

g) Placer la membrane dans 50 ml de la solution de lavage 2 sous agitation lente.

h) Laisser s'égoutter la membrane au-dessus du papier absorbant, en évitant tout contact direct, et la placer dans la chemise en plastique.

i) Ajouter le réactif ECL (voir paragraphe 5.2.4). Eliminer l'excès de réactif et les bulles d'air à l'aide de papier absorbant. Mettre dans la cassette d'exposition.

j) Dans une chambre noire, recouvrir la chemise d'un film et exposer pendant 15 minutes. Le film peut être exposé plus ou moins longtemps, pour un signal optimal.

k) Plonger le film dans la solution de développement pendant 45 secondes (voir paragraphe 5.2.4). Rincer dans l'eau distillée. Plonger le film dans le fixateur jusqu'à ce que le film devienne totalement transparent.

l) Laver à l'eau distillée et laisser sécher le film.

6 - PROCEDURE AVEC LE GEL CRITERION™ XT

6.1 - RÉACTIFS ET MATÉRIELS NÉCESSAIRES

6.1.1 - RÉACTIFS ET CONSOMMABLES

Pipettes graduées (5, 10, 25 ml), tubes coniques (50 ml), micro-tubes (2 ml) en polypropylène avec bouchon.

Film de protection PARAFILM® M.

Purification des échantillons

Tampon Laemmli	30 ml	Bio-Rad, Réf. 1610737
2-Mercaptoéthanol	25 ml	Bio-Rad, Réf. 1610710
SDS	100 g	Bio-Rad, Réf. 1610301
Seringues de calibration	200	Bio-Rad, Réf. 3551174

Électrophorèse

Criterion™ XT 12 % Bis-Tris 1 gel - 18 puits		Bio-Rad, Réf. 3450118
XT-MOPS (tampon d'électrophorèse) (20 x)	500 ml	Bio-Rad, Réf. 1610788
Marqueur précoloré Kaleidoscope™	500 µl	Bio-Rad, Réf. 1610375
MagicMark™ XP Western Standard (marqueur de poids moléculaire)	250 µl	Invitrogen, Réf. LC5602

Immunoblotting

Ethanol (Normapur)	1L	VWR, Réf. 20821-296
Tris/CAPS (tampon de transfert) (10x)	1L	Bio-Rad, Réf. 1610778
Papier filtre (papier de transfert pour gels Criterion™ XT)	50 feuilles	Bio-Rad, Réf. 1704085
Membrane PVDF (0,2 µm)	10 feuilles	Bio-Rad, Réf. 1620175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, Réf. 1706531
PBS (tampon de lavage) (10x)	1 L	Bio-Rad, Réf. 1610780
ECL (substrate pour conjugué)	125 ml	Amersham, Réf. RPN2109
Hyperfilms pour ECL (18 x 24 cm)	25 films	Amersham, Réf. RPN2103K
Chemises de développement	30 chemises	Applied Biosystems, Réf. T2258
Solution de développement Kodak LX24	qsp 20 L	VWR or Kodak
Solution de fixateur Kodak AL4	qsp 20 L	VWR or Kodak

6.1.2 - MATÉRIEL

Pipettes réglables (10, 40, 200, 1000 µl).

Éprouvette graduée (1L et 2L), pince en plastique, cuves, vortex.

Cassette d'exposition et ampoule rouge pour le développement des films.

Purification des échantillons

TeSeE™ Precess 48™,	Bio-Rad, Réf. 3590200
TeSeE™ Precess 24™,	Bio-Rad, Réf. 3591070
Bloc chauffant	Bio-Rad, Réf. 3589057
Adaptateur pour bloc chauffant - 20 tubes	Bio-Rad, Réf. 3589072
Centrifugeuse - 220/240 V	Bio-Rad, Réf. 3591396
Rotor tambour	Bio-Rad, Réf. 3589189
Adaptateurs pour rotor - (x6)	Bio-Rad, Réf. 3589191

Électrophorèse

Cuve Criterion™ XT	Bio-Rad, Réf. 1656001
Générateur PowerPac™ HC : 100/120 V - 220/240 V	Bio-Rad, Réf. 1645052

Transfert

Criterion™ XT blotter	Bio-Rad, Réf. 1704070
-----------------------	-----------------------

Immunoblotting

Western Processor base	Bio-Rad, Interrompu
Cuves Western Processor pour gels Criterion™ XT	Bio-Rad, Interrompu

6.2 - PRÉPARATION DES RÉACTIFS

6.2.1 - PURIFICATION DES ÉCHANTILLONS

- Protéinase K

Solution de protéinase K diluée dans le réactif A :

- ▶ 1 ml de réactif A
- ▶ 20 µl de protéinase K

Bien mélanger en retournant jusqu'à obtenir une solution homogène. Après reconstitution, la solution diluée de protéinase K est stable pendant 10 heures à température ambiante (+18°C à +30°C).

- **Solution de Laemmli**

Solution de SDS + 2-Mercaptoéthanol + Laemmli sample buffer :

- ▶ 0,6 g de SDS
- ▶ 1,5 ml de 2-Mercaptoéthanol

Mélanger en retournant.

- ▶ 28,5 ml de Laemmli sample buffer

La solution est répartie en aliquotes de 4 ml et conservée à -20°C. Les aliquotes décongelées peuvent être recongelées.

Remarque: Il est conseillé de préparer la solution de Laemmli 1 heure avant usage, pour permettre une bonne dissolution du SDS.

6.2.2 - ÉLECTROPHORÈSE

- **Marqueur Kaleidoscope™**

Le marqueur Kaleidoscope™ est préparé pendant la dénaturation des échantillons avant le dépôt sur le gel d'acrylamide.

Préparer une dilution au 1/12e dans la solution de Laemmli (par exemple 10 µl de marqueur Kaleidoscope™ + 110 µl de solution de Laemmli).

Consulter la notice du marqueur Kaleidoscope™ pour les conditions de conservation.

- **Marqueur MagicMark™ XP**

Le marqueur de poids moléculaire MagicMark™ XP est préparé pendant la dénaturation de l'échantillon, avant le dépôt sur le gel d'acrylamide.

Préparer une dilution au 1/12e dans la solution de Laemmli, par exemple 10 µl de MagicMark™ XP + 110 µl de la solution de Laemmli.

Voir la notice du MagicMark™ XP pour les conditions de conservation.

• Tampon de migration Criterion™ XT

Solution de MOPS (1x).

Préparer une dilution au 1/20e. **1 L de tampon dilué est nécessaire pour 1 cuve :**

- ▶ 950 ml d'eau distillée
- ▶ 50 ml de tampon MOPS (20x)

Homogénéiser. Cette solution ne peut être conservée.

6.2.3 - TRANSFERT DES PROTÉINES

• Tampon de transfert

Solution de Tris/CAPS-Éthanol 15%. **Environ 2 L sont nécessaires pour 1 cuve de transfert.**

- ▶ 750 ml d'eau distillée
- ▶ 150 ml d'éthanol pur
- ▶ 100 ml de Tris/CAPS (10x)

Homogénéiser. Cette solution ne peut être conservée.

6.2.4 - IMMUNOBLOTTING

• Solution de lavage 1

Solution de PBS (1x) + 0,1% Tween® 20. **Environ 1 L est nécessaire pour le traitement complet d'une membrane.**

- ▶ 900 ml d'eau distillée
- ▶ 100 ml de PBS (10x)
- ▶ 1 ml de Tween® 20

Bien homogénéiser. La solution peut être conservée une nuit de +2°C à +8°C.

• Solution de lavage 2

Solution de PBS (1x). **Environ 200 ml sont nécessaires pour le traitement complet d'une membrane.**

- ▶ 900 ml d'eau distillée
- ▶ 100 ml de PBS (10x)

La solution peut être conservée une nuit à température ambiante (+18°C à +30°C).

• Solution de saturation

Pendant l'étape de transfert, diluer la solution de saturation (BI) au 1/10e dans la solution de lavage 1. **40 ml de solution de saturation (1x) sont nécessaires pour 1 membrane.**

- ▶ 36 ml de solution de lavage 1
- ▶ 4 ml de solution de saturation (10x)

Homogénéiser en retournant le tube.

• Anticorps primaire dilué

Juste avant usage, diluer l'anticorps primaire au 1/10e dans la solution de lavage 1. **30 ml d'anticorps primaire dilué sont nécessaires pour 1 membrane.**

- ▶ 27 ml de solution de lavage 1
- ▶ 3 ml d'anticorps primaire (10x)

Homogénéiser en retournant le tube.

• Anticorps secondaire dilué (conjugué)

Juste avant usage, diluer l'anticorps secondaire au 1/10e dans la solution de lavage 1. **40 ml de conjugué dilué sont nécessaires pour 1 membrane.**

- ▶ 36 ml de solution de lavage 1
- ▶ 4 ml d'anticorps secondaire (10x)

Homogénéiser en retournant le tube.

• ECL

Le substrat (ECL) doit être préparé juste avant usage. **2 ml de substrat sont nécessaires pour 1 membrane.**

- ▶ 1 ml de réactif 1
- ▶ 1 ml de réactif 2

Homogénéiser la solution.

• Solution de développement

- ▶ 800 ml d'eau distillée
- ▶ 200 ml de produit de développement

La solution peut être conservée à température ambiante (+18°C à +30°C), en chambre noire, pendant 15 jours maximum.

• Solution de fixation

- ▶ 800 ml d'eau distillée
- ▶ 200 ml de produit fixateur

La solution peut être conservée à température ambiante (+18°C à +30°C), en chambre noire, pendant 15 jours maximum.

6.3 - PURIFICATION DES ÉCHANTILLONS

Le test TeSeE™ WESTERN BLOT peut être réalisé directement à partir de l'échantillon homogénéisé (tube de broyage) préparé pour les tests rapides Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat).

Prélèvement

Pour l'analyse des tissus périphériques (ganglions lymphatiques) introduire une bille de taille moyenne ("Medium bead", Réf. 3551171) dans le tube de broyage avant d'y ajouter l'échantillon.

Prélever une masse de 350 mg ± 40 mg de tissu nerveux (de préférence au niveau de l'obex) ou 200 mg ± 20 mg de tissu périphérique. Déposer l'échantillon dans un tube de broyage, fermer hermétiquement et procéder au broyage dans l'homogénéiseur (Ribolyser, TeSeE™ PRECESS 48™ ou TeSeE™ PRECESS 24™).

Broyage de l'échantillon

Placer les tubes dans la couronne de l'homogénéiseur.

Effectuer un cycle d'agitation avec les paramètres suivants:

	Ribolyser®		TeSeE™ PRECESS 48™ ou TeSeE™ PRECESS 24™	
	Tissus nerveux	Tissus périphériques	Tissus nerveux	Tissus périphériques
Temps (sec.)	45	2 x 45 ⁽¹⁾	-	-
Vitesse	6,5	6,5	-	-
Programme	-	-	Programme 1	Programme 2

Si le broyage est insuffisant, 1 ou 2 autres cycles d'agitation peuvent être effectués⁽²⁾.

⁽¹⁾/⁽²⁾ Une pause de 5 minutes est nécessaire entre 2 cycles d'agitation.

Calibration de l'échantillon

Retirer les tubes de broyage de l'homogénéiseur, remettre en suspension l'homogénat en retournant avant d'ouvrir les tubes et aspirer 500 µl avec la seringue de calibration, en veillant à plonger l'aiguille au-dessous du niveau des billes en céramique pour éviter de prélever des fragments de tissus. Transférer chaque échantillon de 500 µl dans un micro-tube Eppendorf de 2 ml.

Remarque: à ce stade, les tubes de broyage après homogénéisation et les micro-tubes après calibration de l'échantillon peuvent être conservés, fermés:

- A température ambiante (+18°C à +30°C) pendant 15 heures.
- De +2°C à +8°C pendant 72 heures.
- A -20°C pendant 1 an.

Les échantillons congelés doivent être décongelés à température ambiante (+18°C à +30°C).

Les échantillons peuvent être soumis à un maximum de 3 cycles de congélation/ décongélation. Les échantillons doivent toujours être homogénéisés par retournement avant usage.

Traitement par la protéinase K

Distribuer 500 µl de solution de protéinase K reconstituée (voir paragraphe 6.2.1) dans chaque micro-tube.

Homogénéiser les tubes fermés en les retournant (10 fois) et incubé à 37°C ± 2°C dans un bloc chauffant pendant 10 minutes.

Précipitation de la PrP^{res} avec le réactif B

Sortir les tubes de l'incubateur. Les ouvrir et distribuer 500 µl de réactif B dans chaque tube. Homogénéiser en retournant jusqu'à obtenir une couleur homogène.

Concentration de la PrP^{res} par centrifugation

Centrifuger les tubes pendant 7 minutes à 15000 g à 20°C.

Clarification de l'échantillon

Jeter le surnageant dans un récipient pour déchets. Sécher ensuite les tubes en les retournant sur du papier absorbant pendant 5 minutes.

Distribuer 100 µl de solution de Laemmli (voir paragraphe 6.2.1) dans chaque micro-tube.

Incuber pendant 5 minutes à température ambiante (+18°C à +30°C). Resolubiliser complètement le culot par aspiration/rejet avec une pipette.

Incuber pendant 5 minutes à 100°C ± 5°C dans un bloc chauffant.

Sortir les tubes de l'incubateur, homogénéiser au vortex.

Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à 15000 g à 20°C.

Transférer le surnageant dans un nouveau micro-tube. Jeter le tube contenant le culot.

À ce stade, le surnageant peut être conservé congelé à -20°C pendant 24 heures; les échantillons doivent être décongelés à température ambiante (+18°C à +30°C) avant usage.

6.4 - ÉLECTROPHORÈSE

Le test TeSeE™ WESTERN BLOT peut être à la fois utilisé pour confirmer un échantillon suspecté infecté d'EST et pour le typage de souches chez le mouton.

La procédure suivante est destinée à une analyse de confirmation d'échantillons suspectés infectés d'EST.

Pour toute information sur le protocole à suivre pour le typage des souches, merci de prendre contact avec votre représentant Bio-Rad.

Préparation du gel

Retirer la bande plastique en bas de la plaque en plastique et mettre les gels d'acrylamide (voir paragraphe 6.2.2) dans la cuve de migration. Verser le tampon de migration (voir paragraphe 6.2.2) de chaque côté des gels, jusqu'en haut des puits et dans la cuve de migration. Retirer délicatement les peignes et rincer chaque puits du tampon de migration, à l'aide d'une pipette.

Dépôt des échantillons

Chauffer les échantillons pendant 4 minutes à 100 °C ± 5°C juste avant de déposer 15 µl/puits.

Déposer 15 µl du marqueur Kaleidoscope™ dilué et 15 µl de marqueur MagicMark™ XP dilué (voir paragraphe 6.2.2).

Remarque: au cas où plusieurs gels seraient traités en même temps, déposer les marqueurs dans différents puits pour faciliter l'identification.

Migration différentielle des échantillons

Lancer la migration à température ambiante (+18°C à +30°C) pendant 50 minutes à 200 V. Le front de migration doit être sorti du gel.

6.5 - TRANSFERT DES PROTÉINES

Le tampon de transfert doit être préparé avant la fin de la migration des échantillons (voir paragraphe 6.2.3).

Préparation du transfert des protéines

Découper la membrane aux dimensions du gel. La membrane doit toujours être manipulée avec des pinces.

Plonger la membrane dans l'éthanol pur pendant 15 secondes, rincer dans l'eau distillée pendant 5 minutes, puis dans le tampon de transfert pendant 10 minutes.

Retirer délicatement le gel des plaques en plastique et le laisser s'équilibrer pendant 10 minutes dans le tampon de transfert.

Préparation du sandwich

Tremper les papiers filtre et les coussins de fibres dans le tampon de transfert. Ouvrir la cassette de transfert, côté rouge à gauche. Placer sur le côté rouge, dans l'ordre, un coussin en fibres, un papier filtre, la membrane* et le gel*. Compléter avec un papier filtre puis un coussin de fibres et fermer la cassette.

Plonger la cassette dans la cuve de transfert, préalablement remplie jusqu'à la limite indiquée avec du tampon de transfert. Un pack de glace est ajouté avant de remplir la cuve.

* Eliminer les éventuelles bulles d'air formées.

Remarque : au cas où plusieurs membranes seraient traitées en même temps, identifier chaque membrane dans un coin.

Transfert sur la membrane PDVF

Transférer pendant 60 minutes à 115 V, sous agitation (barreau magnétique).

6.6 - IMMUNOBLOTTING

a) Au terme du transfert des protéines, ouvrir la cassette et retirer la membrane pour la révéler. Plonger rapidement la membrane dans la solution de lavage 2 (voir paragraphe 6.2.4), puis la mettre dans l'éthanol pendant 10 secondes avant de rincer pendant 5 minutes dans l'eau distillée.

Note: A ce stade, la membrane peut être conservée pendant une nuit dans de l'eau distillée de +2°C à +8°C.

Laisser revenir à température ambiante (+18°C à +30°C) avant de commencer l'immunoblotting.

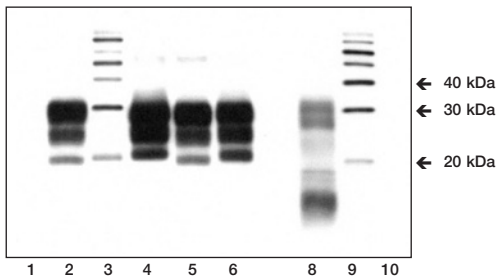
- b) Eliminer l'eau distillée et incuber la membrane pendant 30 minutes dans la solution de saturation (voir paragraphe 6.2.4). Incuber sous agitation modérée. **40 ml suffisent pour 1 membrane.**
Remarque: de cette étape jusqu'à l'étape g), le Western Processor Bio-Rad peut être utilisé pour les étapes d'agitation et de lavage (voir le manuel pour les paramètres).
- c) Eliminer la solution de saturation et incuber la membrane dans **l'anticorps primaire** dilué (voir paragraphe 6.2.4) pendant 30 minutes à température ambiante (+18°C à +30°C) sous agitation modérée.
30 ml d'anticorps primaire dilué sont nécessaires pour 1 membrane.
- d) Eliminer la solution d'anticorps primaire et avec la solution de lavage 1, rincer rapidement la membrane, puis laver deux fois respectivement pendant 5 et 10 minutes, sous agitation rapide.
100 ml de solution de lavage 1 sont nécessaires pour chaque cycle et pour 1 membrane.
- e) Eliminer la solution de lavage 1 et incuber la membrane pendant 20 minutes dans **l'anticorps secondaire** dilué (voir paragraphe 6.2.4) à température ambiante (+18°C à +30°C) sous agitation modérée.
40 ml d'anticorps secondaire dilué sont nécessaires pour 1 membrane.
- f) Eliminer la solution d'anticorps secondaire et avec la solution de lavage 1, rincer rapidement, puis laver respectivement pendant 5, 10 et 10 minutes, sous agitation rapide.
100 ml de solution de lavage 1 sont nécessaires pour chaque cycle et pour 1 membrane.
- g) Placer la membrane dans 100 ml de la solution de lavage 2 sous agitation lente.
- h) Laisser s'égoutter la membrane au-dessus du papier absorbant, en évitant tout contact direct, et la placer dans la chemise en plastique.
- i) Ajouter le réactif ECL (voir paragraphe 6.2.4). Eliminer l'excès de réactif et les bulles d'air à l'aide de papier absorbant. Mettre dans la cassette d'exposition.

- j) Dans une chambre noire, recouvrir la chemise d'un film et exposer pendant 15 minutes. Le film peut être exposé plus ou moins longtemps, pour un signal optimal.
- k) Plonger le film dans la solution de développement pendant 45 secondes (voir paragraphe 6.2.4). Rincer dans l'eau distillée. Plonger le film dans le fixateur jusqu'à ce que le film devienne totalement transparent.
- l) Laver à l'eau distillée et laisser sécher le film.

7 - INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La figure 1 montre les profils de bandes attendus pour un échantillon négatif, des échantillons de diverses espèces animales positifs pour une EST et pour les marqueurs de poids moléculaire (positions 3 et 9).

Figure 1



Les échantillons négatifs (positions 1 et 10) ont été traités avec la protéinase K. Ils ne montrent aucun signal, étant donné que la PrP^c a été digérée dans son intégralité.

Les échantillons positifs ont également été traités avec la protéinase K.

L'échantillon bovin positif pour l'ESB (position 2), **l'échantillon positif pour la tremblante classique** (position 6) **et l'échantillon positif pour le CWD** (position 4) montrent un profil de 3 bandes caractéristique illustrant la digestion de la PrP^c et la transformation de la protéine

prion spécifique de la maladie en un fragment principal résistant à la protéinase ayant un poids moléculaire réduit suite à la coupure de la partie N-terminale de la protéine. Les deux bandes supérieures correspondent aux formes mono- et di-glycosylées (27-30 kDa), tandis que la bande inférieure correspond à la forme non-glycosylée.

L'échantillon ovine infecté expérimentalement par l'ESB (position 5) présente un signal plus fort sur la bande di-glycosylée que sur la bande monoglycosylée. Néanmoins, ce glyco-profil ne peut être considéré comme étant une preuve suffisante d'une infection par l'ESB de l'animal. Conformément aux recommandations du Laboratoire Communautaire de Référence (LCR), un test de différenciation doit être pratiqué sur ce type de prélèvement afin de trancher entre une infection par l'ESB ou une infection par la tremblante. Contacter Bio-Rad pour plus de renseignements sur le test de Discrimination Bio-Rad.

L'échantillon infecté par une souche de tremblante atypique (ex. Nor98) (position 8) présente un glyco-profil atypique. Une bande inférieure est visible à approximativement 12 kDa, tandis que les autres bandes supérieures ne sont pas situées aux mêmes positions que dans les cas de tremblante "classique". Le signal est également plus fort sur la bande inférieure que sur la bande supérieure.

La lecture du gel devra être effectuée avec précaution, étant donné qu'un échantillon fortement positif détecté par le test TeSeE™ WESTERN BLOT peut en réalité cacher un échantillon proche négatif ou faiblement positif.

Limites du test:

Un résultat négatif signifie que l'échantillon testé ne contient pas de quantité mesurable de PrP^{res} par la méthode TeSeE™ WESTERN BLOT. Toutefois, comme la présence de très faibles quantités de PrP^{res} ne peut être détectée, un tel résultat n'exclut pas la possibilité d'une infection.

Tout échantillon interprété négativement d'après les critères d'interprétation du test TeSeE™ WESTERN BLOT, et qui a été précédemment interprété positif répétable par un test de détection rapide, devra être testé avec l'une des autres méthodes de confirmation certifiée par l'OIE telle que l'Immuno-Histo Chimie (IHC) ou la méthode SAF-Immunoblot.

Tout échantillon donnant un résultat positif reproductible selon les critères d'interprétation du test doit être vérifié, conformément aux dispositions légales en vigueur.

8 - PRÉCAUTIONS

La qualité des données obtenues dépend du respect des règles de bonnes pratiques de laboratoire suivantes :

- Les réactifs doivent être conservés à la température appropriée (voir les indications des fournisseurs).
- Ne pas utiliser de réactifs au-delà de la date de péremption.
- La solution de protéinase K reconstituée et conservée à température ambiante (+18°C à +30°C) doit être utilisée dans les 10 heures.
- Ne pas mélanger ou associer pendant la même manipulation, des réactifs provenant de différents lots de kits TeSeE™ WESTERN BLOT, à l'exception des tubes de broyage, du réactif A, du réactif B et de la protéinase K.
- Laisser les réactifs et les tampons revenir à température ambiante (+18°C à +30°C) pendant 30 minutes avant usage.
- Reconstituer soigneusement les réactifs, en évitant toute contamination.
- Ne pas effectuer le test en présence de vapeurs réactives (acides, bases, aldéhydes) ou de poussière, car cela pourrait altérer l'activité enzymatique du conjugué.
- La réaction enzymatique est très sensible à tous les métaux ou ions métalliques. En conséquence, aucun élément métallique ne doit entrer en contact avec le conjugué.
- Utiliser uniquement des tubes en polypropylène.
- Utiliser une verrerie parfaitement propre, rincée à l'eau distillée, ou de préférence du matériel à usage unique.
- Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon.
- Au début de l'électrophorèse et du transfert, vérifier que les 2 électrodes sont en contact avec le tampon.
- Tous les temps de rinçage doivent être scrupuleusement respectés pour éviter un bruit de fond excessif pendant la coloration finale avec le réactif ECL.

9 - MESURES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ

De façon générale, les conditions d'hygiène, les mesures de sécurité biologique et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être conformes aux recommandations des autorités réglementaires nationales.

- Tous les réactifs de la trousse sont exclusivement destinés au diagnostic "in vitro".
- Porter des gants à usage unique pour manipuler les réactifs et les échantillons et se laver soigneusement les mains après manipulation.

- Ne jamais pipetter avec la bouche.
- Utiliser des récipients en polypropylène pour éviter les bris de verre.
- Tout le matériel directement en contact avec des échantillons et des solutions de lavage doit être considéré comme contaminé.
- Eviter d'éclabousser les échantillons ou les solutions contenant les échantillons.
- Les surfaces contaminées doivent être nettoyées avec une solution à 20 000 p.p.m. d'hypochlorite de sodium (eau de Javel). Lorsque le liquide contaminant est un acide, les surfaces contaminées doivent d'abord être neutralisées avec de l'hydroxyde de sodium (soude) avant d'utiliser l'eau de Javel. Les surfaces doivent être rincées à l'eau distillée, séchées avec de l'éthanol et essuyées avec du papier absorbant. Le matériel utilisé pour le nettoyage doit être jeté dans un récipient spécial pour déchets contaminés.
- Les échantillons, le matériel et les produits contaminés doivent être éliminés après décontamination :
 - soit par trempage dans une solution d'hydroxyde de sodium 1 M (concentration finale) pendant au moins 1 heure à température ambiante (+18°C à +30°C),
 - soit par trempage dans une solution à 20 000 p.p.m. d'hypochlorite de sodium pendant au moins 1 heure à température ambiante (+18°C à +30°C),
 - soit par autoclavage à 134°C minimum pendant au moins 18 minutes, sous une pression de 3 bars.

Remarque: ne jamais autoclaver les solutions contenant de l'eau de Javel et le réactif B.

- Toutes les opérations relative à la réalisation des tests de dépistage d'une encéphalopathie spongiforme transmissible (EST) font l'objet d'une réglementation et doivent être conduites dans un laboratoire isolé, réservé exclusivement à cette usage et dont l'accès est limité et contrôlé. L'opérateur doit porter une combinaison, des surbottes, des gants et un masque à visière ou un masque simple avec lunettes de sécurité.
- Les opérateurs doivent recevoir une formation spécifique concernant les risques liés aux agents des EST ou prions et aux modes de décontamination validés pour les agents infectieux "non conventionnels". Les mesures de sécurité biologique doivent être conformes aux recommandations des autorités réglementaires nationales.
- Avant élimination, neutraliser et/ou autoclaver toutes les solutions

de lavage ou eaux usées de lavage ou tout liquide contenant des échantillons biologiques.

- Pour connaître les recommandations liées aux risques et les précautions relatives à certains produits chimiques contenus dans ce kit, consulter le(s) pictogramme(s) figurant sur les étiquettes et les informations fournies à la fin des instructions d'utilisation. La fiche technique de sécurité est disponible sur www.bio-rad.com.

10 - BIBLIOGRAPHIE

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. GROSCHEP (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, 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. BIACABE, 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; BIACABE A-G; SCHIEBEL K; CORONA C; HOFFMANN C; EIDEN M; BARON T; CASALONE C; GROSCHUP M H (2006).
Atypical BSE in Germany-proof of transmissibility and biochemical characterization. *Veterinary microbiology* 2006;117(2-4):103-16.
15. ARSAC, J.-N., ANDREOLETTI, O., BILHEUDE, J.-M., LACROUX, C., BENESTAD, S. L., AND BAARON, 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.

- (BG)** • Този продукт съдържа човешки или животински компоненти. Бъдете внимателни при работа с него.
- (CN)** • 本产品包含人/动物成分，请小心处理。
- (CN) Traditional** • 本产品包含人/动物成分，请小心处理。
- (CZ)** • Tento výrobek obsahuje lidské nebo zvířecí komponenty. Zacházejte s ním opatrně.
- (DE)** • Dieses Produkt enthält Bestandteile menschlichen oder tierischen Ursprungs. Vorsichtig handhaben.
- (DK)** • Dette produkt indeholder humane og animalske komponenter. Skal behandles med forsigtighed.
- (EE)** • Käesolev toode sisaldab inim-või loomseid komponente. Käsitse teavaatlikult.
- (EN)** • This product contains human or animal components. Handle with care.
- (ES)** • Este producto contiene componentes humanos o animales. Manejar con cuidado.
- (FI)** • Tässä tuotteessa on ihmisestä tai eläimistä peräisin olevia osia. Käsittele varovasti.
- (FR)** • Ce produit contient des composants d'origine humaine ou animale. Manipuler avec précaution.
- (GR)** • Αυτό το προϊόν περιέχει ανθρώπινα ή ζωικά στοιχεία. Χειριστείτε το με προσοχή.
- (HR)** • Ovaj proizvod sadrži ljudske ili životinjske sastojke. Pažljivo rukovati.
- (HU)** • A készítmény emberi vagy állati eredetű összetevőket tartalmaz. Óvatosan kezelendő.
- (IT)** • Questo prodotto contiene componenti umane o animali. Maneggiare con cura.
- (JP)** • 本製品にはヒトまたは動物由来の構成成分が含まれます。取り扱いにご注意下さい。
- (KR)** • 본 제품은 사람 또는 동물유래의 성분이 포함되어 있습니다. 취급에 주의하시기 바랍니다.
- (LT)** • Šiame produkte yra žmogiškosios arba gyvūninės kilmės sudėtinųjų dalių. Elgtis atsargiai.
- (MT)** • Dan il-prodott fih komponenti umani jew tal-animali. Uża b'attenzjoni.
- (NL)** • Dit product bevat menselijke of dierlijke bestanddelen. Breekbaar.
- (NO)** • Dette produktet inneholder humane eller animalske komponenter. Håndteres med forsiktighet.
- (PL)** • Niniejszy produkt zawiera składniki pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego. Należy obchodzić się z nim ostrożnie.
- (PT)** • Este medicamento contém componentes de origem humana ou animal. Manuseie com cuidado.
- (RO)** • Acest produs conține materiale de origine umană sau animală. Manevați-l cu grijă.
- (SE)** • Denna produkt innehåller beståndsdelar från människa eller djur. Hantera produkten varsamt.
- (SI)** • Izdelek vsebuje človeške ali živalske sestavine. Rokujte previdno.
- (SK)** • Tento výrobok obsahuje ľudské alebo zvieracie zložky. Narábajte s ním opatrne.



H226 - H318 - H315 - H334 - H412
P210 - P261 - P280
P305+P351+P338
P302+P352 - P273 - P501

(BG)

опасно

Запалими течност и пари. Предизвиква сериозно увреждане на очите. Предизвиква дразнене на кожата. Може да причини алергични или астматични симптоми или затруднения в дишането при вдишване. Вреден за водните организми, с дълготраен ефект.

Да се пази от топлина. Тютюнопушенето е забранено. Избягвайте вдишване на прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължавайте да промивате. ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно със сапун и вода. Да се избягва изпускане в околната среда. Изхвърлете съдържанието/контейнера в съответствие с местните/регионалните/националните/международните разпоредби.

(CN)

危险

易燃液体和蒸气。引起严重的眼睛损伤。

引起皮肤刺激。

吸入可能引起过敏或哮喘症状或呼吸困难。对水生生物有害并且有长期持续影响。远离热源/火花/明火/热表面。- 禁止吸烟。- 避免吸入粉尘/烟/气体/烟雾/蒸气/喷雾。- 戴防护手套/穿防护服/戴防护眼罩/戴防护面具。- 如进入眼睛：用水小心冲洗几分钟。如戴隐形眼镜并可方便地取出，取出隐形眼镜。继续冲洗。如皮肤沾染：用大量肥皂和水清洗。- 避免释放到环境中。- 按照本地/地区/国家/国际惯例处理内含物/容器。

(CN) Traditional

危險

易燃液體和蒸氣。引起嚴重的眼睛損傷。

引起皮膚刺激。吸入可能引起過敏或哮喘症狀或呼吸困難。對水生生物有害並且有長期持續影響。遠離熱源/火花/明火/熱表面。- 禁止吸煙。- 避免吸入粉塵/煙/氣體/煙霧。- 戴防護手套/穿防護服/戴防護眼罩/戴防護面具。- 如進入眼睛：用水小心沖洗幾分鐘。如戴隱形眼鏡並可方便地取出，取出

隱形眼鏡。繼續沖洗。如皮膚沾染：用大量肥皂和水清洗。- 避免釋放到環境中。- 按照本地/地區/國家/國際規例處理內含物/容器。

(CZ)

Nebezpečí

Hořlavá kapalina a páry. Způsobuje vážné poškození očí. Dráždí kůži. Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže. Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.

Chraňte před teplem/jiskrami/otevřeným plamenem/horkými povrchy. Zákaz kouření. Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů. Použijte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla. Zabraňte uvolnění do životního prostředí. Obsah/nádobu likvidujte v souladu s místními/regionálními/národními/mezinárodními předpisy.

(DE)

Gefahr

Flüchtigkeit und Dampf entzündbar. Verursacht schwere Augenschäden. Verursacht Hautreizungen. Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Entsorgung des Inhalts / des Behälters gemäß den örtlichen / regionalen / nationalen / internationalen Vorschriften.

(DK)

Fare

Brandfarlig væske og damp. Forårsager alvorlig øjenskade. Forårsager hudirritation. Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding. Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger. Holdes væk fra varme/gnister/åben ild/varme overflader. Rygning forbudt. Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenskyttelse/ansigtsskyttelse VED KONTAKT MED ØJENENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylling. VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt sæbe og vand. Undgå udledning til miljøet. Bortskaffelse af indholdet/beholderen i henhold til de lokale/regionale/nationale/internationale forskrifter.

(EE)

Ettevaatus

Tuleohhtlik vedelik ja aur. Põhjustab raskeid silmakahjustusi. Põhjustab nahaärritust. Sissehingamisel võib põhjustada allergia- või astma sümptomeid või hingamisraskusi. Ohtlik veorganismidele, pikaajaline toime.

Hoida eemal soojusallikast/sädemetest/leekidest/kuumadest pindadest. Mitte suitsetada. Vältida tolmu/suitsu/gaasi/udu/auru/pihustatud aine sissehingamist. Kanda kaitsekindaid/kaitseõivastust/kaitseprille/kaitsemaski. SILMA SATTUMISE KORRAL: loputada mitme minuti jooksul ettevaatlikult veega. Eemaldada kontaktläätsed, kui neid kasutatakse ja kui neid on kerge eemaldada. Loputada veel kord. NAHALE SATTUMISE KORRAL: pesta rohke vee ja seebiga. Vältida sattumist keskkonda. Sisu/konteineri käitus vastavuses kohalike/regionaalsete/rahvuslike/rahvusvaheliste nõuetega.

(EN)

Danger

Flammable liquid and vapour. Causes serious eye damage. Causes skin irritation. May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled. Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. No smoking. Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. Avoid release to the environment. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

(ES)

Peligro

Líquidos y vapores inflamables. Provoca lesiones oculares graves. Provoca irritación cutánea. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Mantener alejado de fuentes de calor/chispas/llama abierta/superficies calientes. No fumar. Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. Llevar guantes que aislen del frío/gafas/máscara. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. Evitar su liberación al medio ambiente. Eliminar el contenido o el recipiente conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional.

(FI)

Vaara

Syttynyt neste ja höyry. Vaurioittaa vakavasti silmiä. Ärsyttää ihoa. Voi aiheuttaa hengitettynä allergiatai astmaoireita tai hengitysvaikeuksia. Haitallista vesielioille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia. Suojaa lämmöltä/kipinöiltä/avotulelta/kuumilta pinoilta. Tupakointi kielletty. Vältä pölyn/savun/kaasun/sunun/höyryn/suihkeen hengittämistä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvosuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhdo huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, _edical voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista. JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE: Pese runsaalla vedellä ja saippualla. Vältettävä päästämistä ympäristöön. Säilytä säiliö(t) noudattaen paikallisia/alueellisia/kansallisia/kansainvälisiä määräyksiä.

(FR)

Danger

Liquide et vapeurs inflammables. Provoque des lésions oculaires graves. Provoque une irritation cutanée. Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. Ne pas fumer. Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon. Éviter le rejet dans l'environnement. Éliminer le contenu/récipient conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

(GR)

Κίνδυνος

Υγρό και ατμού εύφλεκτα. Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής. Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις. Μακριά από θερμότητα/σπινθήρες/γυμνές φλόγες/θερμές επιφάνειες. Μην καπνίζετε. Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνευρώματα. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για ταμάτι/πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό και σαπούνι. Να αποφεύγετε τη λευθέρωση στο περιβάλλον. Απορρίψτε τα περιεχόμενα/δοχείο σύμφωνα με τους τοπικούς/εθνικούς/διεθνείς κανονισμούς.

(HR)**Opasnost**

Zapaljiva tekućina i para. Uzrokuje teške ozljede oka. Nadražuje kožu. Ako se udiše može izazvati simptome alergije ili astme ili poteškoće s disanjem. Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. Čuvati odvojeno od topline/iskrre/otvorenog plamena/vrućih površina. – Ne pušiti. Izbjegavati udisanje prašine/dima/plina/magle/pare/aerosola. Nositi zaštitne rukavice/zaštitnu odjele/zaštitu za oči/zaštitu za lice. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ukoliko ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. U SLUČAJU DODIRA S KOŽOM: oprati velikom količinom sapuna i vode. Izbjegavati ispuštanje u okoliš. Odložite sadržaje /spremnike u skladu s lokalnim/regionalnim/nacionalnim/međunarodnim odredbama.

(HU)**Veszély**

Tűzveszélyes folyadék és gőz. Súlyos szemkárosodást okoz. Bőrirritáló hatással. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Ártalmas a vízi élővilágra, hosszán tartó károsodást okoz. Hőtől/szikkadtól/nyílt lángtól/forró felületektől távol tartandó. Tilos a dohányzás. Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő szappanos vízzel. Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását. Az edény tartalmát / a tartályt a helyi/regionális/nemzeti/nemzetközi szabályozásoknak megfelelően kell hulladékként elhelyezni.

(IT)**Pericolo**

Liquido e vapori infiammabili. Provoca gravi lesioni oculari. Provoca irritazione cutanea. Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Tenere lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici riscaldate. Non fumare. Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone. Non disperdere nell'ambiente. Smaltire il prodotto/recipiente in conformità con le disposizioni locali / regionali / nazionali / internazionali.

(JP)**危険**

引火性液体及び蒸気。重篤な眼の損傷。皮膚刺激。吸入するとアレルギー、ぜん（喘）息又は呼吸困難を起こすおそれ。長期継続の影響によって水生生物に有害。熱 / 火花 / 裸火 / 高温のもののような着火源から遠ざけること。-禁煙。粉じん/煙/ガス/ミスト/蒸気/スプレアの吸入を避けること。保護手袋/保護衣/保護眼鏡/顔保護面の着用。眼に入った場合：水で数分間注意深く洗うこと。次にコンタクトレンズを着用していて容易に外せる場合は外すこと。その後も洗浄を続けること。皮膚に付着した場合：多量の水と石けん（鹸）で洗うこと。環境への放出を避けること。現地/地域/国/国際規定に従い内容物・容器の露出。

(KR)**위험**

인화성 액체 및 증기. 눈에 심한 손상을 일으킴. 피부에 자극을 일으킴. 흡입시 알레르기성 반응, 천식 또는 호흡 곤란을 일으킬 수 있음. 장기적인 영향에 의해 수생생물에 유해함. 열·스파크·화염·고열로부터 멀리하십시오 - 금연. (분진·흙·가스·미스트·증기·스프레이)의 흡입을 피하십시오. (보호장갑·보호의·보안경·안면보호구)를(을) 착용하십시오. 눈에 물이면 몇 분간 물로 조심해서 씻으십시오. 가능하면 콘택트렌즈를 제거하십시오. 계속 씻으십시오. 피부에 묻으면 다량의 비누와 물로 씻으십시오. 환경으로 배출하지 마십시오. 현지/지역/국가/국제규정에 따라서 내용물/용기 노출.

(LT)**Pavojinga**

Degūs skystis ir garai. Smarkiai pažeidžia akis. Dirgina odą. Įkvėpus gali sukelti alerginę reakciją, astmos simptomus arba apsunskinti kvėpavimą. Kenksminga vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus. Laikyti atokiau nuo šilumos šaltinių/žiežirbų/atviros liepsnos/karštų paviršių. Nerūkyti. Stengtis neįkvėpti dulkių/dūmų/dujų/rūko/garų/aerozolio. Mūvėti apsaugines pirštines/dėvėti apsauginius drabužius/naudoti akių (veido) apsaugos priemones. PATEKUS Į AKIS: Kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. PATEKUS ANT ODOS: Nuplauti dideliu kiekiu muilo ir vandens. Saugoti, kad nepatektų į aplinką. Turinį/talpa išplinti (išmesti) - šalinti pagal vietines / regionines / nacionalines / tarptautines taisykles.

(NL)**Gevaar**

Ontvlambare vloeistof en damp. Veroorzaakt ernstig oogletsel. Veroorzaakt huidirritatie. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Schadelijk voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen. Verwijderd houden van warmte/vonken/open vuur/hete oppervlakken. Niet roken. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitsnevel vermijden. Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming

dragen. BIJ CONTACT MET DE OGEN: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen. BIJ CONTACT MET DE HUID: met veel water en zeep wassen. Voorkom lozing in het milieu. De inhoud en de verpakking verwerken volgens de plaatselijke/regionale/nationale/internationale voorschriften.

(NO)

Fare

Brandbar væske og damp. Forårsaker alvorlige øyeskader. Irriterer huden. Kan forårsake allergi, astmalignende symptomer eller pusteproblemer ved innånding. Skadelig for vannlevende organismer, langtidsvirkning. Holdes adskilt fra varme. Ikke røyk. Unngå innånding av støv/røyk/gass/sprayetåke/damp/aerosol. Bruk vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. VED KONTAKT MED ØYNE: Skyll forsiktig med vann i opptil flere minutter. Fjern evt. kontaktlinser såfremt dette er lett mulig. Fortsett skyllingen. VED HUDKONTAKT: Vask med store mengder vann og såpe. Unngå utslipp til miljøet. Innholdet / emballasjen skal avhendes i henhold til de lokale / regionale / nasjonale / internasjonale forskrifter.

(PL)

Niebezpieczeństwo

Łatwopalna ciecz i pary. Powoduje poważne uszkodzenie oczu. Działa drażniąco na skórę. Moze powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. Przechowywać z dala od źródeł ciepła/iskrzenia/otwartego ognia/gorących powierzchni. Palenie wzbronione. Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody z mydłem. Unikać uwolnienia do środowiska. Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z przepisami miejscowymi / regionalnymi / narodowymi / międzynarodowymi.

(PT)

Perigo

Líquido e vapor inflamáveis. Provoca lesões oculares graves. Provoca irritação cutânea. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. Manter afastado do calor/da fiação/da chama aberta/das superfícies quentes. Não fumar. Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.

SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. Evitar a libertação para o ambiente. Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com a legislação local/regional/nacional/internacional.

(RO)

Pericol

Lichid și vapori inflamabili. Provoacă leziuni oculare grave. Provoacă iritarea pielii. Poate provoca simptome de alergie sau astm sau dificultăți de respirație în caz de inhalare. Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung. A se păstra departe de surse de căldură/scântei/flăcări deschise/suprafețe încinse. Fumatul interzis. Evitați să inspirați în praful/fumul/gazul/cea a/vaporii/spray-ul. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/ chipament de protecție a feței. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCII: clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA: spălați cu multă apă și săpun. Evitați dispersarea în mediu. Aruncați conținutul/containerul în acord cu regulamentele locale/regionale/naționale/internationale.

(SE)

Fara

Brandfarlig vätska och ånga. Orsakar allvarliga ögonskador. Irriterar huden. Kan orsaka allergi eller astmasymtom eller andningssvårigheter vid inandning. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Får inte utsättas för värme/gnistor/öppen låga/heta ytor. Rökning förbjuden. Undvik att inandas damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten. Undvik utsläpp till miljön. Innehållet / behållaren avfallshanteras enligt lokala / regionala / nationella / internationella föreskrifter.

(SI)

Nevarno

Vnetljiva tekočina in hlapl. Povzročča hude poškodbe oči. Povzročča draženje kože. Lahko povzroči simptome alergije ali astme ali težave z dihanjem pri vdihavanju. Škodljivo za vodne organizme, z dolgotrajnimi učinki. Hraniti ločeno od vročine/isker/odprtega ognja/vročih površin. Kajenje prepovedano. Ne vdihavati prahu/dima/plina/meglíce/hlapov/razpršila. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščitno za oči/zaščitno za obraz. PRI STIKU Z OČMI: previdno izpirajte z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem. PRI STIKU S KOŽO: umiti z veliko mila in vode. Preprečiti sproščanje v okolje. Vsebinovsebnik odstranite v skladu z lokalnimi/regionalnimi/narodnimi/mednarodnimi predpisi.

(SK)

Nebezpečenstvo

Horľavá kvapalina a pary. Spôsobuje vážne poškodenie očí. Dráždi kožu. Pri vdýchnutí môže vyvolať alergiu alebo príznaky astmy, alebo dýchacie ťažkosti. Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami. Uchovávať mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite. Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov. Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. PO ZASIAHNUTÍ

OČI: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: Umyte veľkým množstvom vody a mydla. Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia. Zneškodnenie obsahu/obalu v súlade s miestnymi/oblastnými/národnými/medzinárodnými nariadeniami.

Purchase of Criterion XT Bis-Tris gels and XT MOPS running buffer is accompanied by a limited license under U.S. Patent Numbers 6,143,154; 6,096,182; 6,059,948; 5,578,180; 5,922,185; 6,162,338; and 6,783,651, and corresponding foreign patents.

ECL is a trademark of GE Healthcare. Eppendorf is a trademark of Eppendorf AG. Kodak is a trademark of Eastman Kodak Company.

Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France

Tel.: +33 (0)1 47 95 60 00

Fax: +33 (0)1 47 41 91 33

www.bio-rad.com



2018/06
16005959