ANTICORPS SECONDAIRES

Fragments Fab anti IgG (H+L) humaine conjugués à la peroxydase

CODE : BI 3415

pour la recherche uniquement

Immunogène : Immunoglobuline entière humaine hautement purifiée
Espèce productrice : chèvre
Quantité : 1ml
Conditionnement : TBS Glycérol 50%
Conservation : +4 C ou -20 C pour de longues conservations. Les produits glycérinés ne congèlent pas, il n'est pas nécessaire de les répartir en aliquotes. Ne pas stocker en flacons plastiques (exemple : eppendorf) pour éviter une perte d'activité.
Utilisation : Les Fab et F(ab')2 sont des fragments d'immunoglobulines respectivement mono et bivalents, c'est à dire comprenant un ou deux sites de fixation de l'antigène. Ils sont préparés par digestion enzymatique (papaïne ou pepsine). Comme les autres anticorps P.A.R.I.S., ils sont purifiés par chromatographie d'affinité et sont donc particulièrement spécifiques.
Les fragments Fab et F(ab')2 présentent certains avantages vis à vis des anticorps entiers pour les essais en immunohistochimie, immunocytologie et en cytométrie de flux.
D'une part leur spécificité est accrue puisqu'ils ne peuvent plus être fixés de manière non spécifique, comme le sont les Ig entières, par leur partie Fc.
D'autre part leur utilisation accroît également la sensibilité des techniques. En effet leur petite taille améliore leur pénétration dans les tissus et les cellules et leur disponibilité pour les antigènes (ceci est particulièrement vrai pour les Fab).
Enfin les Fab conjugués ont un rapport marqueur/site antigénique double par rapport aux anticorps (à l'exception des conjugués fluorescents).
Marquage : Les marquages à la peroxydase ont l'avantage d'être sensibles et permanents. Ses substrats sont nombreux et variés : précipitants pour immunohistochimie ou immunoblot (DAB, AEC, 4CN, TMB), solubles pour ELISA (TMB, OPD, ABTS), chimiluminescents (luminol).
Les marquages à la peroxydase ont certains inconvénients:
- La peroxydase est inactivée par l'oxygène, l'acide hypochlorique et l'azide de sodium. Il est donc conseiller d'utiliser une eau très pure.
- La présence de peroxydase endogène dans certains tissus (macrophages, globules rouges, cellules de la moelle osseuse, plantes) peut augmenter le bruit de fond.
Préparation des solutions substrats :
ELISA : OPD (orthophénylène diamine) : 0,4mg/ml dans un tampon citrate phosphate 0,1M pH5 + H2O2 (eau oxygénée 30%) 0,4µl/ml. Incubation 10 minutes à l'obscurité. Arrêt de la réaction avec un volume V/2 de H2SO4 1M. Lecture à 492nm.
Immunocytochimie : DAB (diaminobenzidine) : 0,5mg/ml dans un tampon TRIS / HCl 0,1M pH7,4 + H2O2 (eau oxygénée 30%) 5µl/ml. Incubation 10 minutes à l'obscurité.
Immunoblot : 4CN (4-chloro-1naphtol) : 25 mg dans 49,5 ml de PBS 0,1M pH7,4 + 0,5ml d'éthanol à 100%. Filtrer sur papier wattman. Ajouter 25µl de H2O2 30%. Incuber 10 mn à température ambiante.
Dilutions d'utilisation conseillées : Les dilutions optimales doivent être déterminées en fonction du protocole et du matériel utilisé. Nous indiquons ici les dilutions moyennes d'utilisation.
ELISA : 1/500 à 1/5000
Immunocytochimie/Immunohistologie : 1/20 à 1/100
Immunoblot : 1/100 à 1/1000

Version janv 07

P.A.R.I.S – Production d'Anticorps, Réactifs Immunologiques & Services - **www.paris-biotech.com**
21, quai du Clos des Roses - 60200 Compiègne France - tel +33 (0)3 44 20 61 30 - fax +33 (0)3 44 20 62 55
S.A. SCOP à capital variable - SIRET 428 829 550 00014 - RCS Compiègne – APE 246L - TVA FR 694 288 295 50

SECONDARY ANTIBODIES

Peroxidase labelled Fab to human IgG (H+L)

CODE : BI 3415

for research use only

Immunogen : Highly purified whole human immunoglobulin
Host : goat
Quantity : 1ml
Format : TBS Glycerol 50%
Storage : +4 C or -20 C for long storage. Products in glycerol do not freeze and can be stored liquid at -20 C. Do not store in plastic tubes (i.e. eppendorf) to avoid losing activity.
Applications : Fab and F(ab')2 are respectively mono and bivalent fragments of immunoglobulins, i.e. including one or two sites for the fixation of the antigen. They are prepared by enzymic digestion (papain or pepsin). Like the others P.A.R.I.S antibodies, they are purified by affinity chromatography and are thus particularly specific.
Fab and F(ab')2 fragments have certain advantages with respect to the entire antibodies in immunohistochemistry, immunocytology and flow cytometry tests.
On the one hand their specificity is increased since they can no longer be bound in a non-specific way by their Fc part as entire Ig's are.
On the other hand their use also increase the sensitivity of the technique. In fact, their small size enhances their penetration into tissues and cells as well as their availability for the antigens (this is so particularly for Fab).
Finally, conjugate Fab's have a label/antigenic ratio that is twice as much compared to antibodies (except fluorescent conjugates).
Conjugate properties : Peroxidase labelling has the advantage of being sensitive and permanent. Peroxidase substrates are numerous and varied – precipitating substrates for immunohistochemistry or western blot (DAB, AEC, 4CN, TMB), soluble substrates for ELISA (TMB, OPD, ABTS) and chemiluminescent substrates (luminol).
However peroxidase labelling has some disadvantages:
- Peroxidase is rendered inactivated by oxygen, hypochloric acid and sodium azide. It is therefore advisable to use highly purified water.
- The presence of endogenous peroxidase in certain tissues like macrophages, red cells, bone marrow cells and plants could increase the background.
Preparation of Substrate Solutions:
- ELISA : OPD (orthophenylene diamine): 0.4mg/ml in a 0.1M pH5 phosphate citrate buffer + 0.4µl/ml H2O2 (30% hydrogen peroxide solution). Incubation 10 minutes in darkness. Stop reaction with V/2 volume of 1M H2SO4. Reading at 492nm
- Immunocytochemistry: DAB (diamino-benzidine): 0.50mg/ml in a 0.1M pH7.4 TRIS/HCl buffer + 5µl/ml H2O2 (30% hydrogen peroxide solution). Incubation 10 minutes in darkness.
- Western Blot : 4CN (4-chloro-1naphtol): 25mg in 49.5ml of 0.1M pH 7.4 PBS + 5µl/ml 100% ethanol. Filter on "wattman paper". Add 25µl of 30% H2O2. Incubate 10 mn at room temperature.
Working dilutions :
Dilutions must be determined according to user's experience. Only general bases are indicated here.
ELISA : 1/500 - 1/5000
Immunocytology/Immunohistology : 1/20 - 1/100
Immunoblot : 1/100 - 1/1000

P.A.R.I.S – Production d'Anticorps, Réactifs Immunologiques & Services - **www.paris-biotech.com**
21, quai du Clos des Roses - 60200 Compiègne France - tel +33 (0)3 44 20 61 30 - fax +33 (0)3 44 20 62 55
S.A. SCOP à capital variable - SIRET 428 829 550 00014 - RCS Compiègne – APE 246L - TVA FR 694 288 295 50