



ANTICORPS SECONDAIRES

Fragments F(ab')₂ anti IgG (H+L) de rat
conjugués à la phosphatase alcaline

CODE : BI 4511

pour la recherche uniquement

Immunogène : Immunoglobuline entière de rat hautement purifiée

Espèce productrice : lapin

Quantité : 1ml

Conditionnement : TBS, Glycérol 50%, BSA 1%, NaN₃ 0,1%

Conservation : +4 C ou -20 C pour de longues conservations. Les produits glycinés ne congèlent pas, il n'est pas nécessaire de les répartir en aliquotes.

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 (papaine 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 : La phosphatase alcaline présente plusieurs avantages. Elle offre une très bonne sensibilité, n'est pas inactivée par certains inhibiteurs comme l'est la peroxydase et dispose également de substrats variés : précipitants (BCIP/NBT, NADP/NF), solubles (pNPP) ou luminescents (dioxetane). L'activité endogène de cette enzyme est particulièrement forte dans la placenta et l'intestin.

Préparation des solutions substrats :

ELISA : pNPP 15mM dans diéthanolamine 1M pH 9,8, MgCl₂ 0,5 mM. Incuber 15 minutes à 37 C. Arrêt de la réaction avec un volume V/5 de K₂HPO₄ 2M. Lecture à 405 nm.

Immunoblot : 34 µl de BCIP (5bromo-4chloroindolyphosphate) 50mg/ml en DMF + 44 µl de NBT (NitroBlue Tetrazolium) 75 mg/ml en DMF 70% + tampon TRIS/HCl 100mM NaCl 500mM MgCl₂ 50mM pH 9,5 qsp10ml.

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 : 1/25 à 1/100

Immunoblot : 1/100 à 1/1000



SECONDARY ANTIBODIES

Alkaline phosphatase labelled F(ab')₂
to rat IgG (H+L)

CODE : BI 4511

for research use only

Immunogen : Highly purified whole immunoglobulin from rat

Host : rabbit

Quantity : 1ml

Format : TBS, Glycerol 50%, BSA 1%, NaN₃ 0.1%

Storage : +4 C or -20 C for long storage. Products in glycerol do not freeze and can be stored liquid at -20 C.

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 : Alkaline phosphatase presents a lot of advantages. It is very sensible and cannot be inactivated by inhibitors as peroxidase can be. Moreover a lot of substrates are available: precipitating substrates like BCIP/NBT or NADP/NF, soluble substrates like pNPP or luminescent substrates like dioxetan.

Endogenous activity might be important in placental and intestinal tissues.

Substrate buffers :

ELISA : 1M diethanolamin, 0,5mM MgCl₂, 15mM pNPP, pH 9.8. Incubate for 15 minutes at 37 C. Stop the reaction with V/5 K₂HPO₄ 2M. Read at 405 nm.

Immunoblot : 34 µl of BCIP (5bromo-4chloroindolyphosphate) at 50mg/ml in DMF + 44 µl NBT (NitroBlue Tetrazolium) at 75 mg/ml in DMF 70% + 10ml substrate buffer (0.1M TRIS/HCl, 0.5M NaCl, 0.05M MgCl₂, pH 9.5).

Working dilutions :

Dilutions must be determined according to user's experience. Only general bases are indicated here.

ELISA : 1/500 - 1/5000

Immunocytology/Immunohistology : 1/25 - 1/100

Immunoblot : 1/100 - 1/1000

Version janv 07