ARTISAN®
TECHNOLOGY GROUP

Your **definitive** source for quality pre-owned equipment.

Artisan Technology Group
(217) 352-9330 | sales@artisantg.com | artisantg.com

Full-service, independent repair center
with experienced engineers and technicians on staff.

We buy your excess, underutilized, and idle equipment
along with credit for buybacks and trade-ins.

Custom engineering
so your equipment works exactly as you specify.

- Critical and expedited services
- In stock / Ready-to-ship
- Leasing / Rentals / Demos
- ITAR-certified secure asset solutions

Expert team | Trust guarantee | 100% satisfaction

All trademarks, brand names, and brands appearing herein are the property of their respective owners.

Find the *Bio-Rad Western Processor* at our website: *Click HERE*

TeSeE™ Western Blot

32 TESTS 355 1169

REAGENTS FOR *in vitro* CONFIRMATION OF SUSPECTED TSE POSITIVE SAMPLES

Fitness for purpose validated and certified by OIE
Registration number: 20090105

BIO-RAD

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

CONTENTS

1 - GENERAL INFORMATION

2 - ASSAY PRINCIPLE

3 - COMPOSITION OF THE KIT

4 - SAMPLES

5 - ASSAY PROCEDURE WITH MINI BLOT™ GEL
- 5.1 Additional reagents and material required
- 5.2 Preparation of reagents
- 5.3 Sample purification
- 5.4 Electrophoresis
- 5.5 Protein transfer
- 5.6 Immunoblotting

6 - ASSAY PROCEDURE WITH CRITERION™ XT GEL
- 6.1 Additional reagents and material required
- 6.2 Preparation of reagents
- 6.3 Sample purification
- 6.4 Electrophoresis
- 6.5 Protein transfer
- 6.6 Immunoblotting

7 - INTERPRETATION OF RESULTS

8 - PRECAUTIONS

9 - HYGIENE AND SAFETY INSTRUCTIONS

10 - REFERENCES

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

1 - GENERAL INFORMATION

Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE's) were first reported in the eighteenth century in sheep (Scrapie) and more recently in cervids such as deer and elk (Chronic Wasting disease, CWD) and cattle (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE). Humans are also susceptible to certain forms of TSE such as Kuru, Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) or Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrome (GSS). The emergence of new variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) in the human population has been strongly linked to the dietary intake of BSE-infected meat or meat products. One of the main characteristics of TSEs is a progressive accumulation in the central nervous system of an abnormal isoform of natural or cellular prion protein (PrP^c), termed PrP^{res}. This disease specific PrP^{res} is characterised by an increased resistance to proteases. The TeSeE™ WESTERN BLOT permits qualitative identification of PrP^{res} after proteolytic treatment which results in a reduced molecular weight fragment due to 'N' terminus truncation.

Active/passive surveillance programs have been conducted worldwide to detect BSE, scrapie or CWD in infected animals. Those programs have resulted in the identification of increased numbers of positive cases at the screening laboratories. Those positive samples (suspected animals) are then systematically confirmed as "TSE-infected" by the demonstration of typical spongiform changes with histopathology, or with the detection of abnormal PrP by Immunohistochemistry (IHC), or of Scrapie Associated Fibrils (SAFs) by electron microscopy. These above confirmation techniques require technical expertise for the interpretation of the results and are time consuming and expensive. Western blot technique can also be considered as an alternative method for confirmation of the TSE suspected samples.

The TeSeE™ WESTERN BLOT is using the same assay principle than the Bio-Rad rapid assays (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat) that includes the preliminary purification and concentration of the PrP^{res}, associated to a highly sensitive immunoblotting. Then, it can be used efficiently for confirmation of any TSE suspected samples and for typing of TSE strains in sheep.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

2 - ASSAY PRINCIPLE

The TeSeE™ WESTERN BLOT assay allows the detection of PrP^{res} in nervous tissues (bovine, ovine, caprine, cervids, ...) or peripheral tissues (cervids) collected from infected animals.

The assay procedure begins with the digestion of cellular PrP protein (PrP^{c}), followed by purification and concentration of disease specific PrP^{res}. Detection of PrP^{res} is carried out by electrophoretic migration then immunoblotting using a monoclonal antibody highly specific for PrP^{res}.

The assay procedure includes the following steps:

- Sample homogenization,
- Digestion of PrP^{c} with proteinase K,
- Purification and concentration of PrP^{res},
- Electrophoresis and transfer onto a membrane,
- Immunoblotting.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

3 - COMPOSITION OF THE KIT

Labelling	Type of reagents	Presentation	Storage
Grinding Tubes	Grinding tubes containing ceramic beads in a buffer solution[1]	1 bag (35 tubes)	+2°C to +25°C
A	Denaturing solution Ready to use	1 vial (20 ml)	+2°C to +25°C
B	Clarifying solution Colouring: bromophenol blue Ready to use	1 vial (20 ml)	+2°C to +25°C
PK	Proteinase K Colouring: phenol red	1 vial (0.5 ml)	+2°C to +8°C
Ab I	Primary antibody[1]: anti-PrP monoclonal antibody (10x)	1 vial (8 ml)	+2°C to +8°C
Ab II	Secondary antibody[1]: Sheep Anti-Mouse IgG-(H+L)-HRP (10x)	1 vial (10 ml)	+2°C to +8°C
Bl	Blocking solution[1] (10x)	1 vial (10 ml)	+2°C to +8°C

[1] These reagents contain 0.1 % of ProClin® 300 (preservative).

4 - SAMPLES

TeSeE™ WESTERN BLOT assay is suitable for the detection of TSEs in cattle (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE), in ovine and caprine (BSE and scrapie), and in cervids (Chronic Wasting Disease, CWD).
This test can be processed directly from the same sample homogenate (grinding tube) prepared for Bio-Rad rapid testing (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat).
Bovine: purification of PrP^{res} is performed on samples from Central Nervous System (CNS). Since distribution of PrP^{res} is heterogeneous in central nervous system, obex area from brainstem must be preferably sampled for optimal detection.
Sampling syringe (Ref.: 355 1175) allows easy and rapid sampling of obex area in a secure way. Please refer to sampling protocol provided with sample syringes for detailed instructions on good sampling procedure.
Small ruminants: purification of PrP^{res} is performed on samples from Central Nervous System (CNS).
Samples are cut and weighed individually.
Cervids: purification of PrP^{res} is performed on samples from Central Nervous System (CNS) or peripheral tissues (lymphoïd nodes).
Samples are cut and weighed individually.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

5 - ASSAY PROCEDURE WITH MINI BLOT™ GEL

5.1 - ADDITIONAL REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED

5.1.1 - REAGENTS AND DISPOSABLES

Graduated pipettes (5, 10, 25 ml), conical tubes (50 ml), 2 ml polypropylene micro-test tubes with caps.
PARAFILM®M Sealing films.

Sample purification

Laemmli sample buffer	30 ml	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0737
2-Mercaptoethanol	25 ml	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0710
SDS	100 g	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0301
Calibration syringes	200	Bio-Rad, cat. Nr. 355-1174

Gel electrophoresis

Acrylamide 40% 29:1	500 ml	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0146
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1 L	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0799
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1 L	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0798
Bromophenol blue	10 g	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0404
Sucrose	1 kg	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0720
Ammonium persulfate	10 g	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0700
TEMED	5 ml	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0800
Tris/Glycine/SDS (running buffer) (10x)	1 L	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0732
Kaleidoscope prestained standard	500 µl	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0324
MagicMark™ XP Western Standard (Molecular weight standard)	250 µl	Invitrogen, cat. Nr. LC5602

Immunoblotting

Ethanol (Normapur)	1L	VWR, cat. Nr. 20821-296
Tris/CAPS (transfer buffer) (10x)	1L	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0778
Filter paper (transfer paper for Mini Blot™ handcast gels)	50 sheets	Bio-Rad, cat. Nr. 170-3932
PVDF membrane (0.2 µm)	10 sheets	Bio-Rad, cat. Nr. 162-0175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, cat. Nr. 170-6531
PBS (washing buffer) (10x)	1 L	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0780

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

ECL (substrate for conjugate)	125 ml	Amersham, cat. Nr. RPN2109
ECL Hyperfilms (18 x 24 cm)	25 films	Amersham, cat. Nr. RPN2103K
Development folders	30 folders	Applied Biosystems, cat Nr. T2258
Kodak developing solution LX24	to 20 L	VWR or Kodak
Kodak fixative solution AL4	to 20 L	VWR or Kodak

5.1.2 - EQUIPMENT

Adjustable pipettes (10, 40, 200, 1000 µl),
Graduated cylinder (1 L and 2 L), plastic forceps, trays, Vortex®.
Exposure cassette and red light for film development.

Sample purification

TeSeE™ PRECESS 48™	Bio-Rad, cat. Nr. 359-0200
TeSeE™ PRECESS 24™	Bio-Rad, cat. Nr. 359-1070
Or Ribolyser®	Bio-Rad, cat. Nr. 358-9158
Heating block	Bio-Rad, cat. Nr. 358-9046
Heating block adaptor - 20 tubes	Bio-Rad, cat. Nr. 358-9199
Centrifuge - 220/240 V	Bio-Rad, cat. Nr. 358-9190
Drum rotor	Bio-Rad, cat. Nr. 358-9189
Rotor adaptors - (x6)	Bio-Rad, cat. Nr. 358-9191

Gel electrophoresis

Mini-PROTEAN® Tetra Cell, electrophoresis module	Bio-Rad, cat. Nr. 165-8002
5 spacers plates	Bio-Rad, cat. Nr. 165-3312
PowerPac HC power supply: 100/120 V - 220/240 V	Bio-Rad, cat. Nr. 164-5052

Transfer

Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, cat. Nr. 170-3946

Immunoblotting

Western Processor base	Bio-Rad, cat. Nr. 359-0098
Western Processor Mini Blot™ kit	Bio-Rad, cat. Nr. 170-3988

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

5.2 - PREPARATION OF REAGENTS

5.2.1 - SAMPLE PURIFICATION

• Proteinase K

Solution of proteinase K diluted in reagent A:

- 1 ml Reagent A
- 20 µl Proteinase K

Mix well by inverting until you obtain a homogeneous solution. After reconstitution, diluted proteinase K is stable 10 hours at room temperature (+18°C to +30°C).

• Laemmli solution

Solution of SDS + 2-Mercaptoethanol + Laemmli sample buffer:

- 0.6 g SDS
- 1.5 ml 2-Mercaptoethanol

Mix by inverting.

- 28.5 ml Laemmli sample buffer

Solution is aliquoted into 4 ml aliquots and stored at -20°C. Thawed aliquots can be re-frozen.

Note: It is recommended to prepare Laemmli solution one hour before use allowing SDS to be completely dissolved.

5.2.2 - ELECTROPHORESIS

• Hand cast discontinuous acrylamide gel

The gel must be 1.5 mm thickness.

Using the Mini Blot™ casting module, the resolving gel (13.5% acrylamide, pH 8.8) is cast first, once the resolving gel is polymerized the stacking gel is added (3% acrylamide, pH 6.8).

Resolving gel (1 gel)

- 2.8 ml Acrylamide 40%, 29:1
- 1.7 ml 1.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.8 / SDS (1)
- 1.3 ml 50% sucrose solution (2)
- 2.5 ml distilled water

Mix by inverting.

- 43 µl 10% Ammonium persulfate (3)
- 9 µl TEMED

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Pour 7 ml of the gel solution into the plates and retain the residual solution as a control of polymerization. Gently overlay to the top with 1 ml of 0.3 M Tris-HCl pH 8.8 / SDS buffer (4) so that the gel surface doesn't dry out.
Let the gel polymerize for 15-20 minutes at room temperature (+18°C to +30°C). Check the residual solution is polymerized.
Invert the plate assembly to eliminate excess of buffer.

Stacking gel (1 gel)

- 4 ml 3% Acrylamide solution (7)
- 28 µl 10% Ammonium persulfate (3)
- 6 µl TEMED

Mix by inverting.

Gently pour the stacking gel onto the resolving gel and retain the residual solution as a control of polymerization. Position the comb, taking care not to trap any bubble in the well positions.
Let the gel polymerize for 5-10 minutes at room temperature (+18°C to +30°C). Check the residual solution is polymerized.

(1) Solution of 1.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.8 / SDS

- 0.2 g SDS
- 50 ml 1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.8

Solution can be stored at +2°C to +8°C for 2 weeks.

(2) Solution of 50% Sucrose

- 25 g Sucrose
- to 50 ml Distilled water

Sucrose solution can be stored at +2°C to +8°C for 2 weeks.

(3) Solution of 10% Ammonium persulfate

- 5 g Ammonium persulfate
- to 50 ml Distilled water

Ammonium persulfate solution is aliquoted and stored at -20°C. Thawed solution can be stored at +2°C to +8°C for 2 weeks.

(4) Solution of 0.3 M Tris-HCl buffer, pH 8.8 / SDS

- 40 ml Distilled water
- 10 ml 1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.8 / SDS

Solution can be stored at +2°C to +8°C for 2 weeks.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

(5) Solution of 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8 / SDS

- 0.2 g SDS
- 50 ml 0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8

Solution can be stored at +2°C to +8°C for 2 weeks.

(6) Solution of 1% Bromophenol Blue

- 0.5 g Bromophenol Blue
- 50 ml Distilled water

Bromophenol Blue solution can be stored at room temperature (+18°C to +30°C) for 6 months.

(7) Solution of 3% acrylamide

- 3.8 ml Acrylamide 40%, 29:1
- 10 ml 0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8 / SDS (5)
- 6 ml Sucrose 50% (2)
- 500 µl Bromophenol Blue 1% (6)
- to 50 ml Distilled water

Solution can be stored at +2°C to +8°C for 2 weeks.

• Kaleidoscope prestained standard

The kaleidoscope prestained standard is prepared during the sample denaturation before loading on the acrylamide gel.
Prepare a 1/12 dilution in Laemmli solution (for example 10 µl of the kaleidoscope prestained standard + 110 µl of Laemmli solution).
Please refer to the kaleidoscope prestained standard insert for storage conditions.

• MagicMark™ XP Western Standard

The MagicMark™ XP molecular weight is prepared during the sample denaturation before loading on the acrylamide gel.
Prepare a 1/12 dilution in Laemmli solution (for example 10 µl of MagicMark™ XP + 110 µl of Laemmli solution).
Please refer to MagicMark™ XP insert for storage conditions.

• Mini Blot™ migration buffer

Solution of Tris-Glycine-SDS (1x).
Prepare a 1/10 dilution. **1 L of diluted buffer is required for 1 tank:**

- 900 ml Distilled water
- 100 ml Tris-Glycine-SDS buffer (10x)

Homogenize. Solution can not be stored.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

5.2.3 - PROTEIN TRANSFER

• Transfer buffer
Solution of Tris/CAPS-Ethanol 15%. **2.5 L is required for 1 transfer tank**.

- 750 ml Distilled water
- 150 ml Pure ethanol
- 100 ml Tris/CAPS (10x)

Homogenize. Solution can not be stored.

5.2.4 - IMMUNOBLOTTING

• Wash solution 1
Solution of PBS (1x) + 0.1% Tween® 20. **Approximately 500 ml is required for the complete process of 1 membrane**.

- 900 ml Distilled water
- 100 ml PBS (10x)
- 1 ml Tween® 20

Thoroughly homogenize. Solution can be stored at +2°C to +8°C, overnight.

• Wash solution 2
Solution of PBS (1x). **Approximately 100 ml is required for the complete process of 1 membrane**.

- 900 ml Distilled water
- 100 ml PBS (10x)

Solution can be stored at room temperature (+18°C to +30°C) overnight.

• Blocking solution
During the transfer step, dilute the blocking solution (Bl) 1/10 in Wash solution 1. **20 ml of diluted blocking solution (1x) is required for 1 membrane**.

- 18 ml Wash solution 1
- 2 ml Blocking solution (10x)

Homogenize by tube inverting.

• Diluted primary antibody
Just prior to use, dilute the primary antibody 1/10 in Wash solution 1. **15 ml of diluted primary antibody is required for 1 membrane**.

- 13.5 ml Wash solution 1
- 1.5 ml Primary antibody (10x)

Homogenize by tube inverting.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

• **Diluted secondary antibody (conjugate)**
Just before use, dilute the secondary antibody 1/10 in Wash solution 1. **20 ml of diluted conjugate is required for 1 membrane**.

- 18 ml Wash solution 1
- 2 ml Secondary antibody (10x)

Homogenize by tube inverting.

• **ECL**
Substrate (ECL) must be prepared just before use. **1 ml of substrate is required for 1 membrane.**

- 0.5 ml Reagent 1
- 0.5 ml Reagent 2

Homogenize the solution.

• **Development solution**

- 800 ml Distilled water
- 200 ml Development product

Solution can be stored at room temperature (+18°C to +30°C), in a darkroom for 15 days maximum.

• **Fixative solution**

- 800 ml Distilled water
- 200 ml Fixative product

Solution can be stored at room temperature (+18°C to +30°C), in a darkroom for 15 days maximum.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

5.3 - SAMPLE PURIFICATION

TeSeE™ WESTERN BLOT can be processed directly from the same sample homogenate (grinding tube) prepared for Bio-Rad rapid tests (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat).

Sampling

For peripheral tissues (lymph nodes) insert one medium bead (Ref.: 355 1171) in the grinding tube, before to add the sample.

Take a mass of 350 mg ± 40 mg of nervous tissue (preferably in the obex area) or 200 mg ± 20 mg of peripheral tissue.

Deposit the sample in grinding tube, close firmly and proceed to the grinding step in the homogenizer (Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 48™ or TeSeE™ PRECESS 24™ - system).

Sample grinding

Place the tubes in the crown of the homogenizer.

Perform one agitation cycle with the following instrument parameters.

	Ribolyser®		TeSeE™ PRECESS 48™ or TeSeE™ PRECESS 24™	
	Nervous tissues	Peripheral tissues	Nervous tissues	Peripheral tissues
Time (sec.)	45	2 x 45[1]	–	–
Speed	6.5	6.5	–	–
Program	–	–	Program 1	Program 2

When grinding is insufficient, another 1 or 2 agitation cycles can be performed[2].

[1] [2] Wait a 5 minutes pause between the 2 agitation cycles.

Sample calibration

Remove the grinding tubes from the homogenizer, resuspend the homogenate by inverting before opening the tubes and aspirate 500 µl with the calibration syringe taking care to immerse the needle below the level of ceramic beads to avoid sampling tissue fragments.

Transfer each 500 µl sample into a 2 ml Eppendorf micro test-tube.

Note: At this stage, both grinding tubes after homogenisation and micro test-tubes after sample calibration can be stored, closed:

- At room temperature (+18°C to +30°C) for 15 hours.
- At +2°C to +8°C for 72 hours.
- At -20°C for 1 year. Frozen samples must be thawed at room temperature (+18°C to +30°C).

Samples can be submitted to a maximum of 3 freezing/thawing cycles. Samples must always be homogenized by inverting before use.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Proteinase K treatment
Distribute 500 µl of reconstituted proteinase K solution (see paragraph 5.2.1) into each micro test-tube.
Homogenize the sealed tubes by inverting (10 times) and incubate at 37°C ± 2°C in a heating block incubator for 10 minutes.

Precipitation of PrP^{res} with reagent B
Remove the tubes from the incubator. Open them and distribute 500 µl of reagent B into each tube. Homogenize by inverting until a homogeneous colour is obtained.

Concentration of the PrP^{res} by centrifugation
Centrifuge the tubes for 7 minutes at 15000 g at 20°C.

Sample clarifying
Discard the supernatant by inverting over a waste container. Then dry the tubes by inverting onto absorbent paper for 5 minutes.
Distribute 100 µl of the Laemmli solution (see paragraph 5.2.1) into each micro test-tube.
Incubate for 5 minutes at room temperature (+18°C to +30°C).
Completely resolubilize the pellet by aspiration/dispensing with a pipette.
Incubate for 5 minutes at 100°C ± 5°C in a heating block incubator.
Remove the tubes from the incubator, homogenize by vortexing.
Centrifuge the tubes for 15 minutes at 15000 g at 20°C.
Transfer the supernatant to a new micro test-tube. Discard the tube containing the pellet.
At this stage, the supernatant can be stored frozen at -20°C for 24 hours; the samples must be thawed at room temperature (+18°C to +30°C) prior to use.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

5.4 - ELECTROPHORESIS

The TeSeE™ WESTERN BLOT assay can be used for both confirmation of TSE suspected samples or for strain typing in sheep.
The following procedure is applicable for confirmation of TSE suspected samples.
Please contact your Bio-rad representative for instruction protocol in case of strain typing application.

Gel preparation
Place the acrylamide gels (see paragraph 5.2.2) in the migration tank. Pour the migration buffer (see paragraph 5.2.2) into the electrophoresis tank on each side of the gels, up to the top of the wells. Carefully remove the combs and rinse each well with migration buffer, using a pipette.

Sample loading
Heat the samples for 4 minutes at 100 °C ± 5°C just prior to loading 15 µl/well.
Load 15 µl of the diluted kaleidoscope prestained standard and 15 µl of the diluted MagicMark™ XP (see paragraph 5.2.2).
Note: In case several gels are run at the same time, make sure that you stagger the loading of controls into different lanes for easy identification.

Differential migration of the samples
Run the gel at room temperature (+18°C to +30°C) for 90 minutes at 150 V.
The blue line must be out of the gel.

5.5 - PROTEIN TRANSFER

The transfer buffer must be prepared before the end of the sample migration (see paragraph 5.2.3).

Protein transfer preparation
Cut the membrane to the gel dimensions. Always use forceps when handling the membrane.
Immerse the membrane in pure ethanol for 15 seconds, rinse in distilled water for 5 minutes, then for 10 minutes in the transfer buffer.
Carefully remove the gel from the glass plates and let it equilibrate for 10 minutes in the transfer buffer.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Gel sandwich preparation
Soak filter paper and fibre pads in the transfer buffer.
Open the transfer cassette, with transparent side on the left. Respectively place on the transparent side a fibre pad, a filter paper, the membrane* and the gel*. Complete with a filter paper then a fibre pad and close the cassette.
Immerse it in the transfer tank previously filled to the indicated limit with transfer buffer.
*Remove any air bubbles which may have formed.
Note: In case several membranes are processed at the same time, label each membrane in the corner.

Transfer onto the PVDF membrane
Agitate during the transfer by using a magnetic stirring bar and run for 60 minutes at 115 V.

5.6 - IMMUNOBLOTTING

a) Upon completion of the protein transfer, open the blotting assembly and remove the membrane for development. Quickly immerse the membrane in Wash solution 2 (see paragraph 5.2.4), then place it in ethanol for 10 seconds before rinsing for 5 minutes in distilled water.
Note: At this step, the membrane can be stored overnight in distilled water at +2°C to +8°C.
Let the membrane adjust to room temperature (+18°C to +30°C) before to start the immunoblotting.

b) Eliminate distilled water and incubate the membrane for 30 minutes in blocking solution (see paragraph 5.2.4). Incubate under medium agitation.
20 ml is sufficient for 1 membrane.
Note: from this step until the step g), the Bio-Rad Western Processor can be used for agitation and washing steps (refer to instruction manual for settings).

c) Eliminate the blocking solution and incubate the membrane in diluted **primary antibody** (see paragraph 5.2.4) for 30 minutes at room temperature (+18°C to +30°C) under medium agitation.
15 ml of diluted primary antibody is required for 1 membrane.

d) Eliminate the primary antibody solution and using Wash solution 1, briefly rinse the membrane, then wash twice for respectively 5 and 10 minutes, under fast agitation.
50 ml of Wash solution 1 is required for each cycle and for 1 membrane.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

e) Eliminate Wash solution 1 and incubate the membrane for 20 minutes in diluted **secondary antibody** (see paragraph 5.2.4) at room temperature (+18°C to +30°C) under medium agitation.
20 ml of diluted secondary antibody is required for 1 membrane.

f) Eliminate the secondary antibody solution and using Wash solution 1, briefly rinse, then wash for respectively 5, 10 and 10 minutes under fast agitation.
50 ml of Wash solution 1 is required for each cycle and for 1 membrane.

g) Place the membrane in 50 ml of Wash solution 2 under slow agitation.

h) Drain the membrane on absorbent paper without blotting and place it in the plastic folder.

i) Add the ECL reagent (see paragraph 5.2.4). Eliminate the excess of reagent and air bubbles with absorbent paper. Place into the exposure cassette.

j) In a darkroom, cover the folder with a film and expose for 15 minutes. Film can be exposed longer or shorter time for optimal signal.

k) Immerse the film in developing solution for 45 seconds (see paragraph 5.2.4). Rinse in distilled water. Immerse the film in fixative solution until the film becomes completely transparent.

l) Wash with distilled water and let the film dry.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

6 - ASSAY PROCEDURE WITH CRITERION™ XT GEL

6.1 - ADDITIONAL REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED

6.1.1 - REAGENTS AND DISPOSABLES

Graduated pipettes (5, 10, 25 ml), conical tubes (50 ml), 2 ml polypropylene micro-test tubes with caps.
PARAFILM®M Sealing films.

Sample purification

Laemmli sample buffer	30 ml	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0737
2-Mercaptoethanol	25 ml	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0710
SDS	100 g	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0301
Calibration syringes	200	Bio-Rad, cat. Nr. 355-1174

Gel electrophoresis

Criterion™ XT 12 % Bis-Tris	1 gel - 18 wells	Bio-Rad, cat. Nr. 345-0118
XT-MOPS (running buffer) (20 x)	500 ml	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0788
Kaleidoscope prestained standard	500 µl	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0324
MagicMark™ XP Western Standard (Molecular weight standard)	250 µl	Invitrogen, cat. Nr. LC5602

Immunobloting

Ethanol (Normapur)	1L	VWR, cat. Nr. 20821-296
Tris/CAPS (transfer buffer) (10x)	1L	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0778
Filter paper (transfer paper for Criterion™ XT precast gels)	50 sheets	Bio-Rad, cat. Nr. 170-4085
PVDF membrane (0.2 µm)	10 sheets	Bio-Rad, cat. Nr. 162-0175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, cat. Nr. 170-6531
PBS (washing buffer) (10x)	1 L	Bio-Rad, cat. Nr. 161-0780
ECL (substrate for conjugate)	125 ml	Amersham, cat. Nr. RPN2109
ECL Hyperfilms (18 x 24 cm)	25 films	Amersham, cat. Nr. RPN2103K
Development folders	30 folders	Applied Biosystems, cat. Nr. T2258
Kodak developing solution LX24	to 20 L	VWR or Kodak
Kodak fixative solution AL4	to 20 L	VWR or Kodak

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

6.1.2 - EQUIPMENT

Adjustable pipettes (10, 40, 200, 1000 µl).
Graduated cylinder (1L and 2L).
Plastic forceps, Trays, Vortex®.
Exposure cassette and red light for film development.

Sample purification	
TeSeE™ PRECESS 48™,	Bio-Rad, cat. Nr. 359-0200
TeSeE™ PRECESS 24™,	Bio-Rad, cat. Nr. 359-1070
Or Ribolyser®	Bio-Rad, cat. Nr. 358-9158
Heating block	Bio-Rad, cat. Nr. 358-9046
Heating block adaptor - 20 tubes	Bio-Rad, cat. Nr. 358-9199
Centrifuge - 220/240 V	Bio-Rad, cat. Nr. 358-9190
Drum rotor	Bio-Rad, cat. Nr. 358-9189
Rotor adaptors - (x6)	Bio-Rad, cat. Nr. 358-9191
Gel electrophoresis	
Criterion™ XT Cell	Bio-Rad, cat. Nr. 165-6001
PowerPac HC power supply: 100/120 V - 220/240 V	Bio-Rad, cat. Nr. 164-5052
Transfer	
Criterion™ XT blotter	Bio-Rad, cat. Nr. 170-4070
Immunoblotting	
Western Processor base	Bio-Rad, cat. Nr. 359-0098
Western Processor Criterion™ XT kit	Bio-Rad, cat. Nr. 170-3985

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

6.2 - PREPARATION OF REAGENTS

6.2.1 - SAMPLE PURIFICATION

• Proteinase K

Solution of proteinase K diluted in reagent A:

- 1 ml Reagent A
- 20 µl Proteinase K

Mix well by inverting until you obtain a homogeneous solution. After reconstitution, diluted proteinase K is stable 10 hours at room temperature (+18°C to +30°C).

• Laemmli solution

Solution of SDS + 2-Mercaptoethanol + Laemmli sample buffer:

- 0.6 g SDS
- 1.5 ml 2-Mercaptoethanol

Mix by inverting.

- 28.5 ml Laemmli sample buffer

Solution is aliquoted into 4 ml aliquots and stored at -20°C. Thawed aliquots can be re-frozen.

Note: It is recommended to prepare Laemmli solution one hour before use allowing SDS to be correctly dissolved.

6.2.2 - ELECTROPHORESIS

• Kaleidoscope prestained standard

The kaleidoscope prestained standard is prepared during the sample denaturation before loading on the acrylamide gel.

Prepare a 1/12 dilution in Laemmli solution, for example 10 µl of the kaleidoscope prestained standard + 110 µl of Laemmli solution.

Please refer to the kaleidoscope prestained standard insert for storage conditions.

• MagicMark™ XP Western Standard

The MagicMark™ XP molecular weight is prepared during the sample denaturation before loading on the acrylamide gel.

Prepare a 1/12 dilution in Laemmli solution, for example 10 µl of MagicMark™ XP + 110 µl of Laemmli solution.

Please refer to MagicMark™ XP insert for storage conditions.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

• Criterion™ XT migration buffer
Solution of MOPS (1x).
Prepare a 1/20 dilution. **1 L of diluted buffer is required for 1 tank:**

- 950 ml Distilled water
- 50 ml MOPS buffer (20x)

Homogenize. Solution can not be stored.

6.2.3 - PROTEIN TRANSFER

• Transfer buffer
Solution of Tris/CAPS-Ethanol 15%. **Approximately 2 L is required for 1 migration tank**.

- 750 ml Distilled water
- 150 ml Pure ethanol
- 100 ml Tris/CAPS (10x)

Homogenize. Solution can not be stored.

6.2.4 - IMMUNOBLOTTING

• Wash solution 1
Solution of PBS (1x) + 0.1% Tween® 20. **Approximately 1 L is required for the complete process of 1 membrane.**

- 900 ml Distilled water
- 100 ml PBS (10x)
- 1 ml Tween® 20

Thorougly homogenize. Solution is stored at +2°C to +8°C, overnight.

• Wash solution 2
Solution of PBS (1x). **Approximately 200 ml is required for the complete process of 1 membrane.**

- 900 ml Distilled water
- 100 ml PBS (10x)

Solution is stored at room temperature (+18°C to +30°C) overnight.

• Blocking solution
During the transfer step, dilute the blocking solution (Bl) 1/10 in Wash solution 1. **40 ml of diluted blocking solution is required for 1 membrane**.

- 36 ml Wash solution 1
- 4 ml Blocking solution (10x)

Homogenize by tube inverting.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

• **Diluted primary antibody**

Just prior to use, dilute the primary antibody 1/10 in Wash solution 1.
30 ml of diluted antibody is required for 1 membrane.

- 27 ml Wash solution 1
- 3 ml Primary antibody (10x)

Homogenize by inverting.

• **Diluted secondary antibody (conjugate)**

Just prior to use, dilute the secondary antibody 1/10 in Wash solution 1.
40 ml of diluted conjugate is required for 1 membrane.

- 36 ml Wash solution 1
- 4 ml Secondary antibody (10x)

Homogenize by tube inverting.

• **ECL**

Substrate (ECL) must be prepared just prior to use. **2 ml of substrate is required for 1 membrane.**

- 1 ml Reagent 1
- 1 ml Reagent 2

Homogenize.

• **Development solution**

- 800 ml Distilled water
- 200 ml Development product

Solution is stored at room temperature (+18°C to +30°C), in a darkroom for 15 days maximum.

• **Fixative solution**

- 800 ml Distilled water
- 200 ml Fixative product

Solution is stored at room temperature (+18°C to +30°C), in a darkroom for 15 days maximum.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

6.3 - SAMPLE PURIFICATION

TeSeE™ WESTERN BLOT can be processed directly from the same sample homogenate (grinding tube) prepared for Bio-Rad rapid tests (TeSeE™SAP, TeSeE™ sheep/goat).

Sampling

For peripheral tissues (lymph nodes) insert one medium bead (Ref.: 355 1171) in the grinding tube, before to add the sample.

Take a mass of 350 mg ± 40 mg of nervous tissue (preferably in the obex area) or 200 mg ± 20 mg of peripheral tissue.

Deposit the sample in grinding tube, close firmly and proceed to the grinding step in the homogenizer (Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 48™ or TeSeE™ PRECESS 24™ - system).

Sample grinding

Place the tubes in the crown of the homogenizer.

Perform one agitation cycle with the following instrument parameters.

	Ribolyser®		TeSeE™ PRECESS 48™ or TeSeE™ PRECESS 24™	
	Nervous tissues	Peripheral tissues	Nervous tissues	Peripheral tissues
Time (sec.)	45	2 x 45[1]	–	–
Speed	6.5	6.5	–	–
Program	–	–	Program 1	Program 2

When grinding is insufficient, another 1 or 2 agitation cycles can be performed[2].

[1] [2] Wait a 5 minutes pause between the 2 agitation cycles.

Sample calibration

Remove the grinding tubes from the homogenizer, resuspend the homogenate by inverting before opening the tubes and aspirate 500 µl with the calibration syringe taking care to immerse the needle below the level of ceramic beads to avoid sampling tissue fragments.

Transfert each 500 µl sample into 2 ml Eppendorf micro test-tube.

Note: at this stage, both grinding tubes after homogenisation and micro test-tubes after sample calibration can be stored, closed:

- At room temperature (+18°C to +30°C) for 15 hours.
- At +2°C to +8°C for 72 hours.
- At -20°C for 1 year. Frozen samples must be thawed at room temperature (+18°C to +30°C).

Samples can be submitted to a maximum of 3 freezing/thawing cycles. Samples must always be homogenized by inverting before use.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Proteinase K Treatment
Distribute 500 µl of reconstituted proteinase K solution (see paragraph 6.2.1) into each micro test-tube.
Homogenize the sealed tubes by inverting (10 times) and incubate at 37°C ± 2°C in a heating block incubator for 10 minutes.

Precipitation of PrP^{res} with reagent B
Remove the tubes from the incubator. Open and distribute 500 µl of reagent B into each tube. Homogenize by inverting until a homogeneous colour is obtained.

Concentration of the PrP^{res} by centrifugation
Centrifuge the tubes for 7 minutes at 15000 g at 20°C.

Sample clarifying
Discard the supernatant by inverting over a waste container. Then dry the tubes by inverting onto absorbent paper for 5 minutes.
Distribute 100 µl of the Laemmli solution (see paragraph 6.2.1) into each micro test-tube.
Incubate for 5 minutes at room temperature (+18°C to +30°C).
Completely resolubilise the pellet by aspiration/dispensing with a pipette.
Incubate for 5 minutes at 100°C ± 5°C in a heating block incubator.
Remove the tubes from the incubator, homogenize by vortexing.
Centrifuge the tubes for 15 minutes at 15000 g at 20°C.
Transfer the supernatant to a new micro test-tube. Discard the tube containing the pellet.
At this stage, the supernatant can be stored frozen at -20°C for 24 hours; the samples must be thawed at room temperature (+18°C to +30°C) prior to use.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

6.4 - ELECTROPHORESIS

The TeSeE™ WESTERN BLOT assay can be used for both confirmation of TSE suspected samples or for strain typing in sheep.
The following procedure is applicable for confirmation of TSE suspected samples.
Please contact your Bio-rad representative for instruction protocol in case of strain typing application.

Gel preparation
Remove the plastic band on the bottom of the plastic plate and place the acrylamide gels (see paragraph 6.2.2) in the migration tank. Pour the migration buffer (see paragraph 6.2.2) on each side of the gel up to the top of the wells and into the electrophoresis tank. Carefully remove the combs and rinse each well with migration buffer, using a pipette.

Sample loading
Heat the samples for 4 minutes at 100 °C ± 5°C just prior to loading 15 µl/well.
Load 15 µl of the diluted kaleidoscope prestained standard and 15 µl of the diluted MagicMark™ XP (see paragraph 6.2.2).
Note: In case several gels are run at the same time, make sure that you stagger the loading of controls into different lanes for easy identification.

Differential migration of the samples
Run the gel at room temperature (+18°C to +30°C) for 50 minutes at 200 V.

6.5 - PROTEIN TRANSFER

The transfer buffer must be prepared before the end of the sample migration (see paragraph 6.2.3).

Protein transfer preparation
Cut the membrane to the gel dimensions. Always use forceps when handling the membrane.
Immerse the membrane in pure ethanol for 15 seconds, rinse in distilled water for 5 minutes, then for 10 minutes in the transfer buffer.
Carefully remove the gel from the plastic plates and let it equilibrate for 10 minutes in the transfer buffer.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Gel sandwich preparation
Soak filter paper and fibre pads in the transfer buffer.
Open the transfer cassette, with red side on the left. Respectively place on the red side a fibre pad, a filter paper, the membrane* and the gel*.
Complete with a filter paper then a fibre pad and close the cassette.
Immerse it in the transfer tank, previously filled to the indicated limit with transfer buffer. A frozen ice pack is added prior to fill the tank.
*Remove any air bubbles which may have formed.
Note: In case several membranes are processed at the same time, label each membrane in the corner.

Transfer onto the PVDF membrane
Agitate during the transfer by using a magnetic stirring bar and run for 60 minutes at 115 V.

6.6 - IMMUNOBLOTTING

a) Upon completion of the protein transfer, open the blotting assembly and remove the membrane for development. Quickly immerse the membrane in Wash solution 2 (see paragraph 6.2.4), then place it in ethanol for 10 seconds before rinsing for 5 minutes in distilled water.
Note: At this step, the membrane can be stored overnight in distilled water at +2°C to +8°C.
Let the membrane adjust to room temperature (+18°C to +30°C) before to start the immunoblotting.

b) Eliminate distilled water and incubate the membrane for 30 minutes in blocking solution (see paragraph 6.2.4). Incubate under medium agitation.
40 ml is required for 1 membrane.
Note: from this step until step g), the Bio-Rad Western Processor can be used for agitation and washing steps (refer to instruction manual for settings).

c) Eliminate the blocking solution and incubate the membrane in diluted **primary antibody** (see paragraph 6.2.4) for 30 minutes at room temperature (+18°C to +30°C) under medium agitation.
30 ml of diluted primary antibody is required for 1 membrane.

d) Eliminate the primary antibody solution and using Wash solution 1, briefly rinse the membrane, then wash twice for respectively 5 and 10 minutes, under fast agitation.
100 ml of Wash solution 1 is required for each cycle and for 1 membrane.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

e) Eliminate the Wash solution 1 and incubate the membrane for 20 minutes in diluted **secondary antibody** (see paragraph 6.2.4) at room temperature (+18°C to +30°C) under medium agitation.
40 ml of diluted secondary antibody is required for 1 membrane.

f) Eliminate the secondary antibody solution and using Wash solution 1, briefly rinse for respectively 5, 10 and 10 minutes under fast agitation.
100 ml of Wash solution 1 is required for each cycle and for 1 membrane.

g) Place the membrane in 100 ml of Wash solution 2 under slow agitation.

h) Drain the membrane on absorbent paper without blotting and place it in the plastic folder.

i) Add the ECL reagent (see paragraph 6.2.4). Eliminate the excess of reagent and air bubbles with absorbent paper. Place into the exposure cassette.

j) In a darkroom, cover the folder with a film and expose for 15 minutes. Film can be exposed longer or shorter time for optimal signal.

k) Immerse the film in developing solution for 45 seconds (see paragraph 6.2.4). Rinse in distilled water. Immerse the film in fixative solution until the film becomes completely transparent.

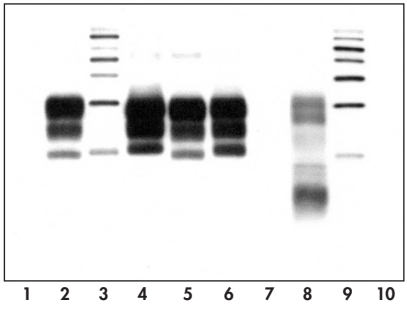
l) Wash with distilled water and let the film dry.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

7 - INTERPRETATION OF RESULTS

Figure 1 shows the expected band patterns for TSE negative samples, TSE positive samples in various animal species and molecular weight controls (positions 3 and 9).

Figure 1



Negative samples (positions 1 and 10) were treated with proteinase K. They do not show any signal, since PrP^c was fully digested.

Positive samples were also all treated with proteinase K.

BSE positive bovine sample (position 2), **classical scrapie positive sample** (position 6), and **CWD positive sample** (position 4) show a typical 3 band pattern, demonstrating digestion of PrP^c and transformation of the disease specific prion protein into a proteinase resistant core fragment with reduced molecular mass following removal of the N-terminus part of the protein. The two higher bands correspond to mono and di-glycosylated forms (27-30 kDa) while the lower band corresponds to the non glycosylated form.

Ovine sample experimentally infected with BSE (position 5) is presenting a higher signal on the di-glycosylated than on the mono-glycosylated band. Nevertheless, this typical glycoprofile can not be considered as a sufficient proof of the infection of the animal with BSE. According to the Community Reference Laboratory (CRL) recommendations, a differentiation assay must be performed on this type of sample to conclude between scrapie and BSE. Please contact Bio-Rad for more information on the Bio-Rad Discriminatory test.

Atypical scrapie (e.g. Nor98) affected ovine sample (position 8) is presenting an atypical glycoprofile. A lower band is visible at approximately 12 kDa, while other upper bands are not located at the same positions compare to "typical" scrapie cases. Signal is also stronger on the lowest band than on the upper band.

Gel reading must be considered cautiously since a strong positive sample detected with the TeSeE™ Western Blot may hide the nearest negative or low positive sample.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Limits of the test:

A negative result means that the test sample does not contain detectable PrP^{res} by TeSeE™ WESTERN BLOT assay. However, as very low levels of PrP^{res} may not be detected, such a result does not exclude the possibility of infection.

Any sample with a negative result according to the TeSeE™ WESTERN BLOT assay interpretation criteria, following a positive rapid test result, should be tested with one of the other OIE certified confirmatory methods, Immunohistochemistry (IHC) or SAF-Immunoblot.

Any sample with a reproducible positive result according to the test interpretation critera must be verified in accordance with current legal regulation.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

8 - PRECAUTIONS

The quality of the data obtained depends on compliance with the following good laboratory practices:

- Reagents must be stored at the appropiate temperature (refer to supplier's indications).
- Do not use reagents whose shelf-life has expired.
- Do not use reconstituted proteinase K after 10 hours storage at room temperature (+18°C to +30°C).
- Do not mix or combine reagents derived from different batches of the TeSeE™ Western Blot during the same manipulation, with the exception of grinding tubes, reagent A, reagent B and proteinase K.
- Allow the reagents and buffers to adjust to room temperature (+18°C to +30°C) for 30 minutes before use.
- Thoroughly reconstitute reagents, avoiding any contamination.
- Do not perform the test in the presence of reactive vapors (acids, alkalines, aldehydes) or dust, which could alter the enzymatic activity of the conjugate.
- The enzymatic reaction is very sensitive to all metals or metallic ions. Consequently, no metallic element must be in contact with the conjugate.
- Only use polypropylene tubes.
- Use clean glassware, rinsed in distilled water, or preferably disposable material.
- Use a new pipette tip for each sample.
- When starting electrophoresis and transfer, check that the 2 electrodes are in contact with buffer.
- All the rinsing times must be respected to avoid any excess background noise during final staining with ECL reagent.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

9 - HYGIENE AND SAFETY INSTRUCTIONS

Generally, hygiene conditions, biosafety measures and good laboratory practices must be in agreement with the recommendations of national regulatory authorities.

- All reagents of the kit are intended for use in *"in vitro"* diagnosis.
- Wear disposable gloves when handling reagents and samples and wash your hands thoroughly after handling them.
- Do not pipette by mouth.
- Use polypropylene containers to avoid broken glass.
- All the materials directly in contact with the samples and the wash solutions must be considered as contaminated.
- Avoid splashing samples or solutions containing samples.
- Contaminated surfaces must be cleaned with 20 000 ppm sodium hypochlorite solution (bleach). When the contaminating liquid is an acid, contaminated surfaces must be first neutralized with sodium hydroxide before using bleach. Surfaces must be rinsed with distilled water, dried with ethanol and wiped with absorbent paper. The material used for cleaning must be discarded in a specific container for contaminated waste.
- Samples, material and contaminated products must be eliminated after decontamination:
  - either by soaking in 1 M sodium hydroxide (final concentration) for at least 1 hour at room temperature (+18°C to +30°C),
  - or by soaking in 20 000 ppm sodium hypochlorite solution for at least 1 hour at room temperature (+18°C to +30°C),
  - or by autoclaving at 134°C minimum for at least 18 minutes, under 3 bars of pressure.

Note: never autoclave solutions containing bleach or reagent B.

- All operations involved in Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) screening tests are subject to regulations and must be performed in an isolated, limited and controlled access laboratory devoted exclusively to this activity. A laboratory coat, overshoes, gloves, mask with visor or simple mask with safety glasses are required to ensure the operator's safety.
- Operators must receive specific training concerning the risks related to TSEs agents or prions and the validated modes of decontamination for

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

unconventional agents. Biosafety measures must be in agreement with recommendations of regular authorities of the country.

- Neutralize and/or autoclave all wash solutions or wash wastes or any liquid containing biological samples prior to their elimination.
- Reagent B is a dangerous substance classified as nocive (> 25% alcohol) according to European legislation.
- Reagents containing 0.1% ProClin® 300 are classified as irritating preparations according to European legislation.



Xn
(Alcohol > 25%)
(0.1% ProClin® 300)

R : 10-22-37/38-41-43-67 Flammable. Harmful if swallowed. Irritating to respiratory system and skin. Risk of serious damage to eyes. May cause sensitisation by skin contact. Inhalation of vapour may cause drowsiness and dizziness.

S : 7/9-13-26-28-37/39-46 Keep container tightly closed and in a well ventilated place. Keep away from food, drink and animal feed. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. After contact with skin wash immediately with plenty of water. Wear suitable protecting clothings, gloves and eye/face protection. If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

10 - REFERENCES

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 immonohistochemical stydy. 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 ($PrP^{ARR/ARR}$). *Journal of General Virology 85, 2727-2733*.

7. L. ORGE, A.GALO, C.MACHADO, C. LIMA, C. OCHOA, J. SILVA, M. RAMOS and J.-P. SIMAS (2004)
   Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *Journal of General Virology 85, 3487-3491*.

8. A. BUSCHMANN, A.-G. BIACABE, U. ZIEGLER, A. BENCSIK, J.-Y. MADEC, G. ERHARDT, G. LÜHKEN, T. BARON and M.-H. GROSCHUP (2004)
   Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *Journal of Virological Methods 117, 27-36*.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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. PERRET-LIAUDET, 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

TeSeE™ Western Blot

32 TESTS 355 1169

RÉACTIFS POUR LA CONFIRMATION *in vitro* DES ÉCHANTILLONS SUSPECTÉS POSITIFS EST

Fitness for purpose validated and certified by OIE
Registration number: 20090105

BIO-RAD

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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.

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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 tranfert sur une membrane,
- Immunoblotting.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

3 - COMPOSITION DE LA TROUSSE

Désignation	Types 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 +8°C
Ac I	Anticorps primaire[1] : Anticorps monoclonal anti-PrP (10x)	1 flacon (8 ml)	+2°C à +8°C
Ac II	Anticorps secondaire[1] : IgG de mouton anti-souris (H+L)-HRP (10x)	1 flacon (10 ml)	+2°C à +8°C
BI	Solution de saturation[1] (10x)	1 flacon (10 ml)	+2°C à +8°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^{res} 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. : 355 1175) 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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. 161-0737
2-Mercaptoethanol	25 ml	Bio-Rad, Réf. 161-0710
SDS	100 g	Bio-Rad, Réf. 161-0301
Seringues de calibration	200	Bio-Rad, Réf. 355-1174

Électrophorèse

Acrylamide 40% 29:1	500 ml	Bio-Rad, Réf. 161-0146
Tris-HCl 0,5 M, pH 6.8	1 L	Bio-Rad, Réf. 161-0799
Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8	1 L	Bio-Rad, Réf. 161-0798
Bleu de bromophénol	10 g	Bio-Rad, Réf. 161-0404
Saccharose	1 kg	Bio-Rad, Réf. 161-0720
Persulfate d'ammonium	10 g	Bio-Rad, Réf. 161-0700
TEMED	5 ml	Bio-Rad, Réf. 161-0800
Tris/Glycine/SDS (Tampon d'électrophorèse) (10x)	1 L	Bio-Rad, Réf. 161-0732
Marqueur précoloré kaléidoscope	500 µl	Bio-Rad, Réf. 161-0324
MagicMark™ XP Western Standard (marqueur de poids moléculaire)	250 µl	Invitrogen, Réf. LC5602

Immunoblotting

Éthanol (Normapur)	1L	VWR, Réf. 2821-296
Tris/CAPS (tampon de transfert) (10x)	1L	Bio-Rad, Réf. 161-0778
Papier filtre (papier de transfert pour gels Mini Blot™)	50 feuilles	Bio-Rad, Réf. 170-3932
Membrane PVDF (0,2 µm)	10 feuilles	Bio-Rad, Réf. 162-0175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, Réf. 170-6531

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

PBS (tampon de lavage) (10x)	1 L	Bio-Rad, Réf. 161-0780
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, Réf. T2258
Solution de développement Kodak LX24	qsp 20 L	VWR ou 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. 359-0200
TeSeE™ PRECESS 24™	Bio-Rad, Réf. 359-1070
ou Ribolyser®	Bio-Rad, Réf. 358-9158
Bloc chauffant	Bio-Rad, Réf. 358-9046
Adaptateur pour bloc chauffant - 20 tubes	Bio-Rad, Réf. 358-9199
Centrifugeuse - 220/240 V	Bio-Rad, Réf. 358-9190
Rotor tambour	Bio-Rad, Réf. 358-9189
Adaptateurs pour rotor - (x6)	Bio-Rad, Réf. 358-9191

Électrophorèse

Mini-PROTEAN® Tetra Cell, electrophoresis module	Bio-Rad, Réf. 165-8002
5 spacers plates	Bio-Rad, Réf. 165-3312
Générateur PowerPac HC : 100/120 V - 220/240 V	Bio-Rad, Réf. 164-5052

Transfert

Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, Réf. 170-3946

Immunoblotting

Western Processor (base)	Bio-Rad, Réf. 359-0098
Cuves Western Processor pour gels Mini Blot™	Bio-Rad, Réf. 170-3988

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 de solution de saccharose à 50% (2)
- 2,5 ml d'eau distillée

Mélanger en retournant.

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

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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.

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

- 40 ml d'eau distillée
- 10 ml de tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8 / SDS

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

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

(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 Kaléidoscope**

Le marqueur Kaléidoscope 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 Kaléidoscope + 110 µl de solution de Laemmli).
Consulter la notice du marqueur Kaléidoscope 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 tranfert, diluer la solution de saturation (Bl) 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

• **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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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. 355 1171) 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 incuber 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 °C ± 5°C juste avant de déposer 15 µl/puits.
Déposer 15 µl du marqueur Kaléidoscope 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°C à +30°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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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.
*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 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) Eliminer 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) Eliminer 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 polypropylene avec bouchon.
Film de protection PARAFILM®M.

Purification des échantillons		
Tampon Laemmli	30 ml	Bio-Rad, Réf. 161-0737
2-Mercaptoéthanol	25 ml	Bio-Rad, Réf. 161-0710
SDS	100 g	Bio-Rad, Réf. 161-0301
Seringues de calibration	200	Bio-Rad, Réf. 355-1174

Electrophorèse		
Criterion™ XT 12 % Bis-Tris	1 gel - 18 puits	Bio-Rad, Réf. 345-0118
XT-MOPS (20 x) (tampon d'électrophorèse)	500 ml	Bio-Rad, Réf. 161-0788
Marqueur précoloré Kaleidoscope	500 µl	Bio-Rad, Réf. 161-0324
MagicMark™ XP Western Standard (marqueur de poids moléculaire)	250 µl	Invitrogen, Réf. LC5602

Immunobloting		
Ethanol (Normapur)	1L	VWR, Réf. 20821-296
Tris/CAPS (tampon de transfert) (10x)	1L	Bio-Rad, Réf. 161-0778
Papier filtre (papier de transfert pour gels Criterion™ XT)	50 feuilles	Bio-Rad, Réf. 170-4085
Membrane PVDF (0,2 µm)	10 feuilles	Bio-Rad, Réf. 162-0175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, Réf. 170-6531
PBS (tampon de lavage) (10x)	1 L	Bio-Rad, Réf. 161-0780
ECL (substrat pour conjugué)	125 ml	Amersham, Réf. RPN2109
Hyperfilms pour ECL (18 x 24 cm)	25 films	Amersham, Réf. RPN2103K

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Chemises de développement	30 chemises	Applied Biosystems, Réf. T2258
Solution de développement Kodak LX24	qsp 20 L	VWR ou Kodak
Solution de fixateur Kodak AL4	qsp 20 L	VWR ou Kodak

6.1.2 - MATÉRIEL

Pipettes réglables (10, 40, 200, 1000 µl).
Eprouvette 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. 359-0200
TeSeE™ PRECESS 24™	Bio-Rad, Réf. 359-1070
ou Ribolyser®	Bio-Rad, Réf. 358-9158
Bloc chauffant	Bio-Rad, Réf. 358-9046
Adaptateur pour bloc chauffant - 20 tubes	Bio-Rad, Réf. 358-9199
Centrifugeuse - 220/240 V	Bio-Rad, Réf. 358-9190
Rotor à tambour	Bio-Rad, Réf. 358-9189
Adaptateurs pour rotor - (x6)	Bio-Rad, Réf. 358-9191

Électrophorèse

Cuve Criterion™ XT	Bio-Rad, Réf. 165-6001
Générateur PowerPac HC : 100/120 V - 220/240 V	Bio-Rad, Réf. 164-5052

Transfert

Criterion™ XT blotter	Bio-Rad, Réf. 170-4070

Immunoblotting

Western Processor (base)	Bio-Rad, Réf. 359-0098
Cuves Western Processor pour gels Criterion™ XT	Bio-Rad, Réf. 170-3985

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 - ELECTROPHORÈSE

• **Marqueur Kaléidoscope**
Le marqueur Kaléidoscope 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 Kaléidoscope + 110 µl de solution de Laemmli).
Consulter la notice du marqueur Kaléidoscope 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 distilée
- 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 tranfert, diluer la solution de saturation (Bl) 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

• **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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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. 355 1171) 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 incuber 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

6.4 - ELECTROPHORÈSE

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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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).

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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.

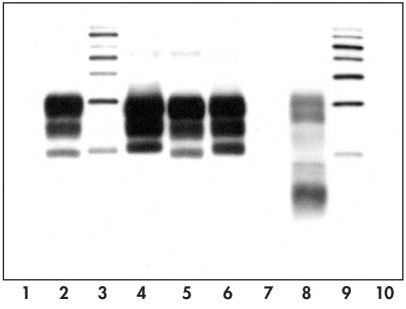
l) Laver à l'eau distillée et laisser sécher le film.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 ovin infecté expérimentalement par l'ESB (position 5) présente un signal plus fort sur la bande di-glycosylée que sur la bande mono-glycosylée. Néanmoins, ce glyco-profil ne peut être considéré comme étant une preuve suffisante d'une infection par l'ESB de l'animal. Conformément aux

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 précedement 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 proteinase 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 reactives (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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

- 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.
- Le réactif B est une substance dangereuse classée comme nocive (> 25% alcool), au sens de la réglementation européenne.
- Les réactifs contenant 0,1% de ProClin® 300 sont classés comme préparations irritantes, au sens de la réglementation européenne.



Xn
(Alcool > 25%)
(0,1 % ProClin® 300)

R : 10-22-37/38-41-43-67 Inflammable. Nocif en cas d'ingestion. Irritant pour le système respiratoire et la peau. Risque de sérieuses lésions en cas de contact avec les yeux. Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau. L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges.
S : 7/9-13-26-28-37/39-46 Conserver le récipient bien fermé et dans un endroit bien ventilé. Conserver à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour animaux. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau, consulter un spécialiste. Après contact avec la peau se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau. Porter des gants appropriés et un appareil de protection des yeux/du visage. En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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 immonohistochemical stydy. 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 ($PrP^{ARR/ARR}$). *Journal of General Virology 85, 2727-2733*.

7. L. ORGE, A.GALO, C.MACHADO, C. LIMA, C. OCHOA, J. SILVA, M. RAMOS and J.-P. SIMAS (2004)
   Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *Journal of General Virology 85, 3487-3491*.

8. A. BUSCHMANN, A.-G. BIACABE, U. ZIEGLER, A. BENCSIK, J.-Y. MADEC, G. ERHARDT, G. LÜHKEN, T. BARON and M.-H. GROSCHUP (2004)
   Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *Journal of Virological Methods 117, 27-36*.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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. PERRET-LIAUDET, 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

TeSeE™ Western Blot

32 PRUEBAS 355 1169

REACTIVOS PARA LA CONFIRMACIÓN *in vitro* DE LAS MUESTRAS SOSPECHOSAS POSITIVAS EET

Fitness for purpose validated and certified by OIE
Registration number: 20090105

BIO-RAD

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

ÍNDICE

1 - INFORMACIÓN GENERAL

2 - PRINCIPIO DE LA PRUEBA

3 - COMPOSICIÓN DEL KIT

4 - MUESTRAS

5 - PROCEDIMIENTO CON EL GEL MINI BLOT™
- 5.1 Reactivos y material suplementario
- 5.2 Preparación de los reactivos
- 5.3 Purificación de las muestras
- 5.4 Electroforesis
- 5.5 Transferencia de proteínas
- 5.6 Inmunoblotting

6 - PROCEDIMIENTO CON EL GEL CRITERION™ XT
- 6.1 Reactivos y material suplementario
- 6.2 Preparación de los reactivos
- 6.3 Purificación de las muestras
- 6.4 Electroforesis
- 6.5 Transferencia de proteínas
- 6.6 Inmunoblotting

7 - INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

8 - PRECAUCIONES

9 - RECOMENDACIONES DE HIGIENE Y SEGURIDAD

10 -BIBLIOGRAFÍA

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

1 - INFORMACIÓN GENERAL

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) se describieron por primera vez en el siglo XVIII en el cordero (tembladera) y, más recientemente,en los cérvidos como el ciervo y el alce (enfermedad debilitante crónica, EDC) y en los bovinos (encefalopatía espongiforme bovina, EEB). El hombre también es sensible a ciertas formas de EETs como el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJv) o el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS). En el caso del hombre, la aparición de una nueva forma de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, llamada variante (vCJD), se debe en gran medida al consumoalimentario de carne o productos cárnicos infectados por el agente de la EEB.
Una de las características principales de la encefalopatía espongiforme transmisible (EETs) es la acumulación progresiva, en el sistema nervioso central, de una isoforma anormal de la proteína prión natural o celular (PrP^{c}), denominada PrP^{res}. Esta proteína PrP^{res} específica de la enfermedad se caracteriza por una mayor resistencia a las proteasas. TeSeE™ Western Blot permite la identificación cualitativa de la proteína PrP^{res}, tras un tratamiento proteolítico con el que se obtiene un fragmento de reducido peso molecular tras la ruptura en el extremo N-terminal.

Programas de control activo/passivo se han realizado en el mundo entero para la detección de la EEB, tembladera o EDC in los animales infectados. Estos programas han tenido como resultado la identificación de un mayor número de casos de EET positivos en los laboratorios de detección. Las muestras positivas (animales sospechosos) identificadas durante estos programas de control son sistemáticamente confirmadas como "infectadas por EET" mediante la demostración de cambios espongiformes típicos por histopatología o mediante la detecciónde la PrP anormal mediante inmunohistoquímica (ICH) o de fibrillas asociadas al scrapie (SAF) por microscopía electrónica. Estas técnicas de confirmación requieren experiencia técnica para la interpretación de los resultados, requieren mucho tiempo y son costosas. La técnica western blot (inmunotransferencia) también se puede considerar como un método alternativo para la confirmación de muestras sospechosas de EET.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

El test TeSeE™ WESTERN BLOT utiliza el mismo principio de ensayo que el test rápido de Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat), que incluye la etapa de purificación preliminar y concentración de la PrP^{res}, seguida de inmunotransferencia. Este test se puede utilizar de manera eficaz para la confirmación de la EET en animales sospechosos y para la tipificación de la cepa de EET en las ovejas.

2 - PRINCIPIO DE LA PRUEBA

TeSeE™ WESTERN BLOT permite la detección de la PrP^{res} en las muestras de tejidos nerviosos (bóvidos, ovejas, cabras, cérvidos...) y periféricos (cérvidos) obtenidos de animales infectadas.

El procedimiento se inicia con la digestión de la proteína prión celular (PrP^{c}), seguida de la purificación y concentración de la proteína prión PrP^{res} específica de la enfermedad. La detección de la PrP^{res} se realiza por electroforesis seguida de una técnica de inmunoblotting en la que se utiliza un anticuerpo monoclonale altamente específico de la PrP^{res}.

El procedimiento incluye las siguientes etapas:

- Homogeneización de la muestra
- Digestión de la PrP^{c} con la proteinasa K
- Purificación y concentración de la PrP^{res}
- Electroforesis y transferencia sobre la membrana
- Inmunoblotting

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

3 - COMPOSICIÓN DEL KIT

Denominación	Tipos de reactivos	Presentación	Conservación
Tubos de trituración	Tubos de trituración que contienen bolas de cerámica en una solución tampón[1]	1 sobre (35 tubos)	+2°C a +25°C
A	Solución desnaturalizante Lista para usar	1 frasco (20 ml)	+2°C a +25°C
B	Solución clarificante Colorante: azul de bromofenol Lista para usar	1 frasco (20 ml)	+2°C a +25°C
PK	Proteinasa K Colorante: rojo fenol	1 frasco (0,5 ml)	+2°C a +8°C
Ac I	Anticuerpo primario[1]: Anticuerpo monoclonale anti-PrP (10x)	1 frasco (8 ml)	+2°C a +8°C
Ac II	Anticuerpo secundario[1]: IgG de oveja anti-ratón (H+L)-HRP (10x)	1 frasco (10 ml)	+2°C a +8°C
Bl	Solución de saturación[1] (10 x)	1 frasco (10 ml)	+2°C a +8°C

[1] Estos reactivos contienen 0,1% de ProClin® 300 (conservante).

4 - MUESTRAS

El test TeSeE™ WESTERN BLOT conviene para la detección del EET en los bovinos (Encefalopatía Espongiforme Bovina, EEB), en las ovejas y caprinos (EEB y tembladera), y en los cervidos (Enfermedad Debilitante Crónica, EDC).
Puede utilizarse directamente a partir de la misma muestra homogenizada (tubo de trituración) para las pruebas rápidas Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat).
Bovinos: la purificación de la PrP^{res} se realiza en muestras del Sistema Nervioso Central (SNC). Como la distribución de la PrP^{res} en el sistema nervioso central es heterogénea, se debe tomar preferentemente una muestra en el área del obex del tronco cerebral para una detección óptima.
La jeringa de toma de muestras (Ref.: *355 1175*) permite un muestreo fácil, rápido y seguro en el área del obex. Es necesario, revisar el protocolo de toma de muestras para obtener instrucciones detalladas sobre el procedimiento de toma de muestras.
Pequeños ruminantes: la purificación de la PrP^{res} se realiza en muestras del Sistema Nervioso Central (SNC).
Las muestras se cortan y se pesan individualmente.
Cérvidos: la purificación de la PrP^{res} se realiza en muestras del Sistema Nervioso Central (SNC) o tejidos periféricos (nódulos linfáticos).
Las muestras se cortan y se pesan individualmente.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

5 - PROCEDIMIENTO CON EL GEL MINI BLOT™

5.1 - REACTIVOS Y MATERIAL SUPLEMENTARIO

5.1.1 - REACTIVO Y CONSUMIBLES

Pipetas graduadas (5, 10, 25 ml), tubos cónicos (50 ml), microtubos (2 ml) de polipropileno con tapón.
Película protectora PARAFILM®M.

Purificación de las muestras

Tampón Laemmli	30 ml	Bio-Rad, Ref. 161-0737
2-Mercaptoetanol	25 ml	Bio-Rad, Ref. 161-0710
SDS	100 g	Bio-Rad, Ref. 161-0301
Jeringas de calibración	200	Bio-Rad, Ref. 355-1174

Electroforesis

Acrilamida 40% 29:1	500 ml	Bio-Rad, Ref. 161-0146
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	1 L	Bio-Rad, Ref. 161-0799
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	1 L	Bio-Rad, Ref. 161-0798
Azul de bromofenol	10 g	Bio-Rad, Ref. 161-0404
Sacarosa	1 kg	Bio-Rad, Ref. 161-0720
Persulfato de amonio	10 g	Bio-Rad, Ref. 161-0700
TEMED	5 ml	Bio-Rad, Ref. 161-0800
Tris/Glicina/SDS (Tampón de electroforesis) (10x)	1 L	Bio-Rad, Ref. 161-0732
Marcador preteñido Caleidoscopio	500 µl	Bio-Rad, Ref. 161-0324
MagicMark™ XP Western Standard (marcador de peso molecular)	250 µl	Invitrogen, Ref. LC5602

Inmunoblotting

Etanol (Normapur)	1L	VWR, Ref. 20821-296
Tris/CAPS (tampón de transferencia) (10x)	1L	Bio-Rad, Ref. 161-0778
Papel de filtro (papel de transferencia para geles Mini Blot™)	50 hojas	Bio-Rad, Ref. 170-3932
Membrana PVDF (0,2 µm)	10 hojas	Bio-Rad, Ref. 162-0175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, Ref. 170-6531
PBS (tampón de lavado) (10x)	1 L	Bio-Rad, Ref. 161-0780

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

ECL (sustrato para conjugado)	125 ml	Amersham, Ref. RPN2109
Hyperfilms ECL (18 x 24 cm)	25 películas	Amersham, Ref. RPN2103K
Sobres de revelado	30 sobres	Applied Biosystems, Ref. T2258
Solución de revelado Kodak LX24	csp 20 L	VWR o Kodak
Solución de fijador Kodak AL4	csp 20 L	VWR o Kodak

5.1.2 - MATERIAL

Pipetas regulables (10, 40, 200, 1000 µl),
Probetas graduadas (1 L y 2 L), pinzas de plástico, cubetas, Vortex®.
Cassette de exposición con luz roja para el revelado de las películas.

Purificación de las muestras

TeSeE™ PRECESS 48™	Bio-Rad, Ref. 359-0200
TeSeE™ PRECESS 24™	Bio-Rad, Ref. 359-1070
o Ribolyser®	Bio-Rad, Ref. 358-9158
Estufa	Bio-Rad, Ref. 358-9046
Adaptador para estufa - 20 tubos	Bio-Rad, Ref. 358-9199
Centrifuga - 220/240 V	Bio-Rad, Ref. 358-9190
Rotor tambor	Bio-Rad, Ref. 358-9189
Adaptadores para rotor - (x6)	Bio-Rad, Ref. 358-9191

Electroforesis

Mini-PROTEAN® Tetra Cell, electrophoresis module	Bio-Rad, Ref. 165-8002
5 spacers plates	Bio-Rad, Ref. 165-3312
Generador PowerPac HC: 100/120 V - 220/240 V	Bio-Rad, Ref. 164-5052

Transferencia

Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, Ref. 170-3946

Inmunoblotting

Western Processor (base)	Bio-Rad, Ref. 359-0098
Cubetas Western Processor para geles Mini Blot™	Bio-Rad, Ref. 170-3988

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

5.2 - PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

5.2.1 - PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

• Proteinasa K

Solución de proteinasa K diluida en reactivo A:

- 1 ml de reactivo A
- 20 µl de proteinasa K

Mezclar bien por inversión del tubo hasta obtener una solución homogénea. Tras la reconstitución, la solución diluida de proteinasa K es estable 10 horas si se conserva a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

• Solución de Laemmli

Solución de SDS + 2-Mercaptoetanol + Laemmli sample buffer:

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

Mezclar por inversión del tubo.

- 28,5 ml de Laemmli sample buffer

La solución se reparte en alícuotas de 4 ml y se conserva a -20°C. Las alícuotas descongeladas pueden volverse a congelar.
Nota: Se recomienda preparar la solución de Laemmli una hora antes de su uso para que el SDS se disuelva completamente.

5.2.2 - ELECTROFORESIS

• Gel discontinuo de acrilamida, vertido manualmente

El gel tendrá un espesor de 1,5 mm.
Con el módulo de vaciado Mini Blot™ (casting module), echar en primer lugar el gel inferior (acrilamida 13,5%, pH 8,8); cuando el gel inferior haya polimerizado, añadir el gel superior (acrilamida 3%, pH 6,8).

Gel inferior (1 gel)

- 2,8 ml de acrilamida 40%, 29:1
- 1,7 ml de tampón Tris-HCl, 1,5 M, pH 8,8 / SDS (1)
- 1,3 ml de solución de sacarosa al 50% (2)
- 2,5 ml de agua destilada

Mezclar por inversión del tubo.

- 43 µl de persulfato de amonio 10% (3)
- 9 µl de TEMED

Verter 7 ml de la solución en las placas y guardar el resto de solución como

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

control de polimerización. Añadir con cuidado 1 ml de tampón Tris-HCl 0,3 M pH 8,8 / SDS (4) hasta arriba para que la superficie del gel no se seque. Dejar que el gel polimerice durante 15-20 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C). Comprobar que el resto de solución ha polimerizado. Dar la vuelta al sistema para eliminar el exceso de tampón.

Gel superior (1 gel)

- 4 ml de acrilamida 3% (7)
- 28 µl de persulfato de amonio al 10% (3)
- 6 µl de TEMED

Mezclar por inversión del tubo.

Añadir suavemente el gel inferior sobre el gel superior y guardar el resto de solución como control de polimerización. Colocar el peine, evitando la formación de burbujas en las posiciones de los pocillos. Dejar que el gel polimerice durante 5-10 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C). Comprobar que el resto de solución ha polimerizado.

(1) Solución de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 / SDS

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

La solución se puede conservar de +2°C a +8°C durante 2 semanas.

(2) Solución de sacarosa 50%

- 25 g de sacarosa
- csp 50 ml de agua destilada

La solución de sacarosa se puede conservar de +2°C a +8°C, durante 2 semanas.

(3) Solución de persulfato de amonio al 10%

- 5 g de persulfato de amonio
- csp 50 ml de agua destilada

La solución de persulfato de amonio se reparte en alícuotas y se conserva a -20°C. La solución descongelada se puede conservar de +2°C a +8°C, durante 2 semanas.

(4) Solución de tampón Tris-HCl 0,3 M, pH 8,8 / SDS

- 40 ml de agua destilada
- 10 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8 / SDS

La solución se conserva de +2°C a +8°C, durante 2 semanas.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

(5) Solución de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 / SDS

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

La solución se conserva de +2°C a +8°C, durante 2 semanas.

(6) Solución de azul de bromofenol al 1%

- 0,5 g de azul de bromofenol
- 50 ml de agua destilada

La solución de azul de bromofenol se conserva a temperatura ambiente (+18°C a +30°C), durante 6 meses.

(7) Solución de acrilamida al 3%

- 3,8 ml de acrilamida al 40%, 29:1
- 10 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 / SDS (5)
- 6 ml de sacarosa 50% (2)
- 500 µl de azul de bromofenol 1% (6)
- csp 50 ml de agua destilada

La solución se conserva de +2°C a +8°C, durante 2 semanas.

• **Marcador caleidoscopio**

El marcador caleidoscopio se prepara durante la desnaturalización de la muestra antes de la carga en el gel de acrilamida.
Preparar una dilución 1/12 en solución de Laemmli, por ejemplo 10 µl del marcador caleidoscopio + 110 µl de solución de Laemmli.
Consultar en el prospecto del marcador caleidoscopio las condiciones de conservación.

• **Marcador MagicMark™ XP**

El marcador de peso molecular MagicMark™ XP se prepara durante la desnaturalización de la muestra, antes de depositarla sobre el gel de acrilamida. Preparar una dilución 1/12 en solución de Laemmli, por ejemplo, 10 µl de MagicMark™ XP + 110 µl de solución de Laemmli. Consultar el manual de instrucciones del MagicMark™ XP sobre las condiciones de conservación.

• **Tampón de migración Mini Blot™**

Solución de Tris-Glicina-SDS (1x).
Preparar una dilución 1/10. **Para 1 cubeta se necesita 1 L de tampón diluido:**

- 100 ml de tampón Tris-Glicina-SDS (10x)
- 900 ml de agua destilada

Homogeneizar. Esta solución no se puede guardar.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

5.2.3 - TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

• Tampón de transferencia
Solución de Tris/CAPS-etanol 15%. **Para 1 cubeta de transferencia se necesitan 2,5 L**.

- 750 ml de agua destilada
- 150 ml de etanol puro
- 100 ml de Tris/CAPS (10x)

Homogeneizar. Esta solución no se puede guardar.

5.2.4 - INMUNOBLOTTING

• Solución de lavado 1
Solución de PBS (1x) + 0,1% Tween® 20. **Para el tratamiento completo de una membrana se necesitan unos 500 ml**.

- 900 ml de agua destilada
- 100 ml de PBS (10x)
- 1 ml de Tween® 20

Homogeneizar bien. La solución se puede conservar una noche de +2°C a +8°C.

• Solución de lavado 2
Solución de PBS (1x). **Para el tratamiento completo de una membrana se necesitan unos 100 ml**.

- 900 ml de agua destilada
- 100 ml de PBS (10x)

La solución se puede conservar una noche a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

• Solución de saturación
Durante la etapa de transferencia, diluir la solución de saturación (Bl) 1/10 en la solución de lavado 1. **Se necesitan 20 ml de solución de saturación diluida (1x) para 1 membrana**.

- 18 ml de solución de lavado 1
- 2 ml de solución de saturación (10x)

Homogeneizar por inversión del tubo.

• Anticuerpo primario diluido
Justo antes de usar, diluir la mezcla de anticuerpo primario a 1/10 en la solución de lavado 1. **Para 1 membrana se necesitan 15 ml de anticuerpo diluido**.

- 13,5 ml de solución de lavado 1
- 1,5 ml de anticuerpo primario (10x)

Homogeneizar por inversión del tubo.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

• **Anticuerpo secundario diluido (conjugado)**
Justo antes de usar, diluir el anticuerpo secundario a 1/10 en solución de lavado 1. **Para 1 membrana se necesitan 20 ml de conjugado diluido**.

- 18 ml de solución de lavado 1
- 2 ml de anticuerpo secundario (10x)

Homogeneizar por inversión del tubo.

• **ECL**
El sustrato (ECL) se debe preparar justo antes de usar. **Para 1 membrana se necesita 1 ml de sustrato**.

- 0,5 ml de reactivo 1
- 0,5 ml de reactivo 2

Homogeneizar la solución.

• **Solución de revelado**

- 800 ml de agua destilada
- 200 ml de producto de revelado

La solución se puede conservar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C), en cámara oscura, durante un máximo de 15 días.

• **Solución de fijación**

- 800 ml de agua destilada
- 200 ml de producto fijador

La solución se puede conservar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C), en cámara oscura, durante un máximo de 15 días.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

5.3 - PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

El test TeSeE™ WESTERN BLOT se puede utilizar directamente a partir de la misma muestra homogenizada (tubo de trituración) para las pruebas rápidas Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat).

Obtención
Para tejidos periféricos (ganglios linfáticos) inserte una bolita media (Medium Bead, ref.: 355 1171) en el tubo de trituración antes de añadir la muestra.
Coja una masa de 350 mg ± 40 mg de tejido nervioso (preferiblemente del área del obex) o 200 mg ± 20 mg de tejido periférico. Depositar la muestra en un tubo de trituración, cerrar herméticamente y realizar la trituración en el homogeneizador (Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 48™ o TeSeE™ PRECESS 24™).

Trituración de la muestra
Colocar los tubos en el homogeneizador.
Efectuar un ciclo de agitación con los siguientes parámetros:

	Ribolyser®		TeSeE™ PRECESS 48™ o TeSeE™ PRECESS 24™	
	Tejidos nerviosos	Tejidos periféricos	Tejidos nerviosos	Tejidos periféricos
Tiempo (seg.)	45	2 x 45[1]	–	–
Velocidad	6.5	6.5	–	–
Programa	–	–	Programa 1	Programa 2

Si la trituración es insuficiente, se pueden efectuar 1 o 2 ciclos de agitación más[2].
[1] [2] Esperar durante 5 minutos entre 2 ciclos de trituración.

Calibración de la muestra
Retirar los tubos de trituración del homogeneizador, resuspender el homogeneizado por inversión antes de abrirlos y aspirar 500 µl con la jeringa de calibración, teniendo cuidado de introducir la aguja por debajo del nivel de las bolas de cerámica para evitar coger fragmentos de tejido.
Transferir cada muestra de 500 µl a un microtubo Eppendorf de 2 ml.

Nota: En esta etapa, los tubos de trituración tras la homogeneización y los microtubos tras la calibración de la muestra se pueden conservar cerrados:
- A temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 15 horas.
- De +2°C a +8°C durante 72 horas.
- A -20°C durante 1 año. Las muestras congeladas deben descongelarse a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

Las muestras pueden someterse a un máximo de 3 ciclos de congelación/descongelación. Las muestras siempre deben homogeneizarse por inversión antes de usar.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Tratamiento con la proteinasa K
Distribuir 500 µl de solución de proteinasa K reconstituida (ver apartado 5.2.1) en cada microtubo.
Homogeneizar los tubos cerrados por inversión (10 veces) e incubar a 37°C ± 2°C en una estufa durante 10 minutos.

Precipitación de la PrP^{res} con el reactivo B
Sacar los tubos del incubador. Abrirlos y distribuir 500 µl de reactivo B en cada tubo. Homogeneizar por inversión hasta obtener un color homogéneo.

Concentración de la PrP^{res} por centrifugación
Centrifugar los tubos durante 7 minutos a 15.000 g a 20°C.

Aclaración de la muestra
Desechar el sobrenadante en un recipiente para residuos. A continuación, secar los tubos dándoles la vuelta sobre papel absorbente durante 5 minutos.
Distribuir 100 µl de solución de Laemmli (ver apartado 5.2.1) en cada microtubo.
Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).
Volver a solubilizar completamente el precipitado por aspiración/dispensación con una pipeta.
Incubar durante 5 minutos a 100°C ± 5°C en una estufa.
Sacar los tubos del incubador, homogeneizar con el vórtex.
Centrifugar los tubos durante 15 minutos a 15000 g a 20°C.
Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo. Desechar el tubo que contiene el precipitado.
En esta etapa, el sobrenadante se puede conservar congelado a -20°C durante 24 horas; las muestras se deben descongelar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) antes de usar.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

5.4 - ELECTROFORESIS

El test TeSeE™ WESTERN BLOT se puede utilizar tanto para la confirmación de muestras sospechosas de infección por EET como para el tipificado de la cepa en las ovejas.
El siguiente procedimiento es aplicable para la confirmación de muestras sospechosas de infección por EET.
En el caso de la aplicación del tipificado, póngase en contacto con su representante de Bio-rad para solicitar el protocolo de instrucciones.

Preparación del gel
Colocar los geles de acrilamida (ver apartado 5.2.2) en la cubeta de migración. Añadir el tampón de migración (ver apartado 5.2.2) en las cubetas a cada lado de los geles hasta por encima de los pocillos y en la cubeta de electroforesis. Retirar con cuidado los peines y aclarar cada pocillo con tampón de migración utilizando una pipeta.

Depósito de las muestras
Calentar las muestras durante 4 minutos a 100 °C ± 5°C justo antes de depositar 15 µl/pocillo.
Depositar 15 µl del marcador Caleidoscopio diluido y 15 µl de MagicMark™ XP diluido (ver apartado 5.2.2).
Nota: en el caso en el que se traten varios geles a la vez, depositar los marcadores en diferentes pocillos para facilitar la identificación.

Migración diferencial de las muestras
Realizar la migración a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 90 minutos a 150 V. La línea azul debe estar fuera del gel.

5.5 - TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS

El tampón de transferencia debe prepararse antes de que finalice la migración de las muestras (ver apartado 5.2.3).

Preparación de la transferencia de las proteínas
Cortar la membrana con las mismas dimensiones del gel. La membrana siempre se debe manipular con pinzas.
Sumergir la membrana en etanol puro durante 15 segundos, aclarar en agua destilada durante 5 minutos y posteriormente en el tampón de transferencia durante 10 minutos.
Separar con cuidado el gel de las placas de vidrio y dejar que se equilibre durante 10 minutos en el tampón de transferencia.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Preparación del sandwich
Empapar los papeles de filtro y las almohadillas de fibras en el tampón de transferencia. Abrir el cassette de transferencia, con el lado transparente a la izquierda. Colocar sobre el lado transparente, siguiendo este orden, una almohadilla de fibras, un papel de filtro, la membrana* y el gel*. Completar con un papel de filtro y una almohadilla de fibras y cerrar el cassette.
Sumergir el cassette en la cubeta de transferencia, previamente llena con el tampón de transferencia hasta el límite indicado.
*Eliminar las posibles burbujas de aire que se hayan formado.
Nota: en el caso de que se traten varias membranas a la vez, identificar cada membrana marcando en una esquina.

Transferencia sobre la membrana PVDF
Transferir durante 60 minutos a 115 V, sobre agitación (barra magnética).

5.6 - INMUNOBLOTTING

a) Al finalizar la transferencia de las proteínas, abrir el cassette y sacar la membrana para revelarla. Sumergir rápidamente la membrana en la solución de lavado 2 (ver apartado 5.2.4) y posteriormente ponerla en etanol durante 10 segundos antes de aclarar durante 5 minutos en agua destilada.
Nota: En este paso, la membrana se puede conservar durante la noche en agua destilada en +2°C a +8°C. Deje la membrana ajustar a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) antes de comenzar inmunoblotting.

b) Eliminar el agua destilada e incubar la membrana durante 30 minutos en la solución de saturación (ver apartado 5.2.4). Incubar con agitación moderada.
Para 1 membrana se necesitan 20 ml de solución de saturación.
Nota: desde esta etapa hasta la etapa g), en las etapas de agitación y de lavado se puede utilizar el Western Processor Bio-Rad (ver el manual para los parámetros).

c) Eliminar la solución de saturación e incubar la membrana en el **anticuerpo primario** diluido (ver apartado 5.2.4) durante 30 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) con agitación moderada.
Para 1 membrana se necesitan 15 ml de anticuerpo primario diluido.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

d) Eliminar la solución de anticuerpo primario y aclarar rápidamente la membrana con la solución de lavado 1 y a continuación lavar dos veces durante 5 y 10 minutos respectivamente con agitación rápida.
Para cada ciclo y para 1 membrana se necesitan 50 ml de solución de lavado 1.

e) Eliminar la solución de lavado 1 e incubar la membrana durante 20 minutos en el **anticuerpo secundario** diluido (ver apartado 5.2.4) a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) con agitación moderada.
Para 1 membrana se necesitan 20 ml de anticuerpo secundario diluido.

f) Eliminar la solución de anticuerpo secundario y aclarar rápidamente con la solución de lavado 1 y a continuación lavar durante 5, 10 y 10 minutos respectivamente con agitación rápida.
Para cada ciclo y para 1 membrana se necesitan 50 ml de solución de lavado 1.

g) Colocar la membrana en 50 ml de la solución de lavado 2 con agitación lenta.

h) Dejar escurrir la membrana sosteniéndola encima del papel absorbente y evitando el contacto directo y colocar la membrana en el sobre de plástico.

i) Añadir el reactivo ECL (ver apartado 5.2.4). Eliminar el exceso de reactivo y las burbujas de aire utilizando papel absorbente. Colocar en el cassette de exposición.

j) En una cámara oscura, cubrir el sobre con una película y exponer durante 15 minutos. Este tiempo de exposición de la película se puede variar para obtener una señal óptima.

k) Sumergir la película en la solución de revelado durante 45 segundos (ver apartado 5.2.4). Aclarar en agua destilada. Sumergir la película en el fijador hasta que la película se vuelva totalmente transparente.

l) Lavar con agua destilada y dejar secar la película.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

6 - PROCEDIMIENTO CON EL GEL CRITERION™ XT

6.1 - REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIO

6.1.1 - REACTIVOS Y CONSUMIBLES

Pipetas graduadas (5, 10, 25 ml), tubos cónicos (50 ml), microtubos (2 ml) de polipropileno con tapón.
Película protectora PARAFILM®M.

Purificación de las muestras		
Tampón Laemmli	30 ml	Bio-Rad, Ref. 161-0737
2-Mercaptoetanol	25 ml	Bio-Rad, Ref. 161-0710
SDS	100 g	Bio-Rad, Ref. 161-0301
Jeringas de calibración	200	Bio-Rad, Ref. 355-1174

Electroforesis		
Criterion™ XT 12 % Bis-Tris	1 gel - 18 pocillos	Bio-Rad, Ref. 345-0118
XT-MOPS (20 x) (tampón de electroforesis)	500 ml	Bio-Rad, Ref. 161-0788
Marcador preteñido Caleidoscopio	500 µl	Bio-Rad, Ref. 161-0324
MagicMark™ XP Western Standard (marcador de peso molecular)	250 µl	Invitrogen, Ref. LC5602

Inmunobloting		
Ethanol (Normapur)	1L	VWR, Ref. 20821-296
Tris/CAPS (tampón de transferencia) (10x)	1L	Bio-Rad, Ref. 161-0778
Papel de filtro (papel de transferencia para geles Criterion™ XT)	50 hojas	Bio-Rad, Ref. 170-4085
Membrana PVDF (0,2 µm)	10 hojas	Bio-Rad, Ref. 162-0175
Tween® 20	100 ml	Bio-Rad, Ref. 170-6531
PBS (tampón de lavado) (10x)	1 L	Bio-Rad, Ref. 161-0780
ECL (sustrato para conjugado)	125 ml	Amersham, Ref. RPN2109
Hyperfilms ECL (18 x 24 cm)	25 películas	Amersham, Ref. RPN2103K

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Sobres de revelado	30 sobres	Applied Biosystems, Ref. T2258
Solución de revelado Kodak LX24	csp 20 L	VWR o Kodak
Solución de fijador Kodak AL4	csp 20 L	VWR o Kodak

6.1.2 - MATERIAL

Pipetas regulables (10, 40, 200, 1000 µl),
Probetas graduadas (1 L y 2 L), pinzas de plástico, cubetas, Vortex®.
Cassette de exposición con luz roja para el revelado de las películas.

Purificación de las muestras

TeSeE™ PRECESS 48™	Bio-Rad, Ref. 359-0200
TeSeE™ PRECESS 24™	Bio-Rad, Ref. 359-1070
o Ribolyser®	Bio-Rad, Ref. 358-9158
Estufa	Bio-Rad, Ref. 358-9046
Adaptador para estufa - 20 tubos	Bio-Rad, Ref. 358-9199
Centrifuga - 220/240 V	Bio-Rad, Ref. 358-9190
Rotor tambor	Bio-Rad, Ref. 358-9189
Adaptadores para rotor - (x6)	Bio-Rad, Ref. 358-9191

Electroforesis

Cubeta Criterion™ XT	Bio-Rad, Ref. 165-6001
Generator PowerPac HC : 100/120 V - 220/240 V	Bio-Rad, Ref. 164-5052

Transferencia

Criterion™ XT blotter	Bio-Rad, Ref. 170-4070

Inmunoblotting

Western Processor (base)	Bio-Rad, Ref. 359-0098
Cuvetas Western Processor para geles Criterion™ XT	Bio-Rad, Ref. 170-3985

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

6.2 - PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

6.2.1 - PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

• **Proteinasa K**
Solución de proteinasa K diluida en reactivo A:
- 1 ml de reactivo A
- 20 µl de proteinasa K

Mezclar bien por inversión del tubo hasta obtener una solución homogénea. Tras la reconstitución, la solución diluida de proteinasa K es estable 10 horas si se conserva a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

• **Solución de Laemmli**
Solución de SDS + 2-Mercaptoetanol + Laemmli sample buffer:
- 0,6 g de SDS
- 1,5 ml de 2-Mercaptoetanol

Mezclar por inversión del tubo.
- 28,5 ml de Laemmli sample buffer

La solución se reparte en alícuotas de 4 ml y se conserva a -20°C. Las alícuotas descongeladas pueden volverse a congelar.
Nota: Se recomienda preparar la solución de Laemmli una hora antes de su uso para que el SDS se disuelva completamente.

6.2.2 - ELECTROFORESIS

• **Marcador caleidoscopio**
El marcador caleidoscopio se prepara durante la desnaturalización de la muestra antes de la carga en el gel de acrilamida.
Preparar una dilución 1/12 en solución de Laemmli, por ejemplo 10 µl del marcador caleidoscopio + 110 µl de solución de Laemmli.
Consultar en el prospecto del marcador caleidoscopio las condiciones de conservación.

• **Marcador MagicMark™ XP**
El marcador de peso molecular MagicMark™ XP se prepara durante la desnaturalización de la muestra, antes de depositarla sobre el gel de acrilamida.
Preparar una dilución 1/12 en solución de Laemmli, por ejemplo, 10 µl de MagicMark™ XP + 110 µl de solución de Laemmli.
Consultar el manual de instruciones del MagicMark™ XP sobre las condiciones de conservación.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

• Tampón de migración Criterion™ XT
Solución de MOPS (1x).
Preparar una dilución 1/20. **Para 1 cubeta se necesita 1 L de tampón diluido**:

- 950 ml de agua destilada
- 50 ml de tampón MOPS (20x)

Homogeneizar. Esta solución no se puede guardar.

6.2.3 - TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

• Tampón de transferencia
Solución de Tris/CAPS-Etanol 15%. **Para 1 cubeta de transferencia se necesitan unos 2 L**.

- 750 ml de agua destilada
- 150 ml de etanol puro
- 100 ml de Tris/CAPS (10x)

Homogeneizar. Esta solución no se puede guardar.

6.2.4 - INMUNOBLOTTING

• Solución de lavado 1
Solución de PBS (1x) + 0,1% Tween® 20. **Para el tratamiento completo de una membrana se necesitan unos 1 L**.

- 900 ml de agua destilada
- 100 ml de PBS (10x)
- 1 ml de Tween® 20

Homogeneizar bien. La solución se puede conservar una noche de +2°C a +8°C.

• Solución de lavado 2
Solución de PBS (1x). **Para el tratamiento completo de una membrana se necesitan unos 200 ml**.

- 900 ml de agua destilada
- 100 ml de PBS (10x)

La solución se puede conservar una noche a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

• Solución de saturación
Durante la etapa de transferencia, diluir la solución de saturación (Bl) 1/10 en la solución de lavado 1. **Se necesitan 40 ml de solución de saturación diluida (1x) para 1 membrana**.

- 36 ml de solución de lavado 1
- 4 ml de solución de saturación (10x)

Homogeneizar por inversión del tubo.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

• **Anticuerpo primario diluido**

Justo antes de usar, diluir el anticuerpo primario a 1/10 en la solución de lavado 1.

Para 1 membrana se necesitan 30 ml de anticuerpo primario diluido.

- 27 ml de la solución de lavado 1
- 3 ml de anticuerpo primario (10x)

Homogeneizar por inversión del tubo.

• **Anticuerpo secundario diluido (conjugado)**

Justo antes de usar, diluir el anticuerpo secundario a 1/10 en la solución de lavado 1.

Para 1 membrana se necesitan 40 ml de conjugado diluido.

- 36 ml de la solución de lavado 1
- 4 ml de anticuerpo secundario (10x)

Homogeneizar por inversión del tubo.

• **ECL**

El sustrato (ECL) se debe preparar justo antes de usar. **Para 1 membrana se necesitan 2 ml de sustrato**.

- 1 ml de reactivo 1
- 1 ml de reactivo 2

Homogeneizar la solución.

• **Solución de revelado**

- 800 ml de agua destilada
- 200 ml de producto de revelado

La solución se puede conservar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C), en cámara oscura, durante un máximo de 15 días.

• **Solución de fijación**

- 800 ml de agua destilada
- 200 ml de producto fijador

La solución se puede conservar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C), en cámara oscura, durante un máximo de 15 días.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

6.3 - PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

El test TeSeE™ WESTERN BLOT se puede utilizar directamente a partir de la misma muestra homogenizada (tubo de trituración) para las pruebas rápidas Bio-Rad (TeSeE™ SAP, TeSeE™ sheep/goat).

Obtención
Para tejidos periféricos (ganglios linfáticos) inserte una bolita media (Medium Bead, ref.: 355 1171) en el tubo de trituración antes de añadir la muestra.
Coja una masa de 350 mg ± 40 mg de tejido nervioso (preferiblemente del área del obex) o 200 mg ± 20 mg de tejido periférico. Depositar la muestra en un tubo de trituración, cerrar herméticamente y realizar la trituración en el homogeneizador (Ribolyser®, TeSeE™ PRECESS 48™ o TeSeE™ PRECESS 24™).

Trituración de la muestra
Colocar los tubos en el homogeneizador.
Efectuar un ciclo de agitación con los siguientes parámetros:

	Ribolyser®		TeSeE™ PRECESS 48™ o TeSeE™ PRECESS 24™	
	Tejidos nerviosos	Tejidos periféricos	Tejidos nerviosos	Tejidos periféricos
Tiempo (seg.)	45	2 x 45[1]	–	–
Velocidad	6.5	6.5	–	–
Programa	–	–	Programa 1	Programa 2

Si la trituración es insuficiente, se pueden efectuar 1 o 2 ciclos de agitación más[2].
[1] [2] Esperar durante 5 minutos entre 2 ciclos de trituración.

Calibración de la muestra
Retirar los tubos de trituración del homogeneizador, resuspender el homogeneizado por inversión antes de abrirlos y aspirar 500 µl con la jeringa de calibración, teniendo cuidado de introducir la aguja por debajo del nivel de las bolas de cerámica para evitar coger fragmentos de tejido.
Transferir cada muestra de 500 µl a un microtubo Eppendorf de 2 ml.

Nota: En esta etapa, los tubos de trituración tras la homogeneización y los microtubos tras la calibración de la muestra se pueden conservar cerrados:
- A temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 15 horas.
- De +2°C a +8°C durante 72 horas.
- A -20°C durante 1 año. Las muestras congeladas deben descongelarse a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).

Las muestras pueden someterse a un máximo de 3 ciclos de congelación/descongelación. Las muestras siempre deben homogeneizarse por inversión antes de usar.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Tratamiento con la proteinasa K
Distribuir 500 µl de solución de proteinasa K reconstituida (ver apartado 6.2.1) en cada microtubo.
Homogeneizar los tubos cerrados por inversión (10 veces) e incubar a 37°C ± 2°C en una estufa durante 10 minutos.

Precipitación de la PrP^{res} con el reactivo B
Sacar los tubos del incubador. Abrirlos y distribuir 500 µl de reactivo B en cada tubo. Homogeneizar por inversión hasta obtener un color homogéneo.

Concentración de la PrP^{res} por centrifugación
Centrifugar los tubos durante 7 minutos a 15.000 g a 20°C.

Aclaración de la muestra
Desechar el sobrenadante en un recipiente para residuos. A continuación, secar los tubos dándoles la vuelta sobre papel absorbente durante 5 minutos.
Distribuir 100 µl de solución de Laemmli (ver apartado 6.2.1) en cada microtubo.
Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).
Volver a solubilizar completamente el precipitado por aspiración/dispensación con una pipeta.
Incubar durante 5 minutos a 100°C ± 5°C en una estufa.
Sacar los tubos del incubador, homogeneizar con el vórtex.
Centrifugar los tubos durante 15 minutos a 15000 g a 20°C.
Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo. Desechar el tubo que contiene el precipitado.
En esta etapa, el sobrenadante se puede conservar congelado a -20°C durante 24 horas; las muestras se deben descongelar a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) antes de usar.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

6.4 - ELECTROFORESIS

El test TeSeE™ WESTERN BLOT se puede utilizar tanto para la confirmación de muestras sospechosas de infección por EET como para el tipificado de la cepa en las ovejas.
El siguiente procedimiento es aplicable para la confirmación de muestras sospechosas de infección por EET.
En el caso de la aplicación del tipificado, póngase en contacto con su representante de Bio-rad para solicitar el protocolo de instrucciones.

Preparación del gel
Retirar la tira de plástico de la parte inferior de la placa de plástico e introducir los geles de acrilamida (ver apartado 6.2.2) en la cubeta de migración. Añadir el tampón de migración (ver apartado 6.2.2) en las cubetas a cada lado de los geles hasta por encima de los pocillos y en la cubeta de electroforesis. Retirar con cuidado los peines y aclarar cada pocillo con tampón de migración utilizando una pipeta.

Depósito de las muestras
Calentar las muestras durante 4 minutos a 100 °C ± 5°C justo antes de depositar 15 µl/pocillo.
Depositar 15 µl del marcador Caleidoscopio diluido y 15 µl de MagicMark™ XP diluido (ver apartado 6.2.2).
Nota: en el caso en el que se traten varios geles a la vez, depositar los marcadores en diferentes pocillos para facilitar la identificación.

Migración diferencial de las muestras
Realizar la migración a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) durante 50 minutos a 200 V.

6.5 - TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS

El tampón de transferencia debe prepararse antes de que finalice la migración de las muestras (ver apartado 6.2.3).

Preparación de la transferencia de las proteínas
Cortar la membrana con las mismas dimensiones del gel. La membrana siempre se debe manipular con pinzas.
Sumergir la membrana en etanol puro durante 15 segundos, aclarar en agua destilada durante 5 minutos, y posteriormente en el tampón de transferencia durante 10 minutos.
Separar con cuidado el gel de las placas de plástico y dejar que se equilibre durante 10 minutos en el tampón de transferencia.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Preparación del sandwich
Empapar los papeles de filtro y las almohadillas de fibras en el tampón de transferencia. Abrir el cassette de transferencia, con el lado rojo a la izquierda. Colocar sobre el lado rojo, siguiendo este orden, una almohadilla de fibras, un papel de filtro, la membrana* y el gel*.
Completar con un papel de filtro y una almohadilla de fibras y cerrar el cassette.
Sumergir el cassette en la cubeta de transferencia, previamente llena con el tampón de transferencia hasta el límite indicado. Añadir hielo antes de llenar la cubeta.
*Eliminar las posibles burbujas de aire que se hayan formado.
Nota: en el caso de que se traten varias membranas a la vez, identificar cada membrana marcando en una esquina.

Transferencia sobre la membrana PVDF
Transferir durante 60 minutos a 115 V, sobre agitación (barra magnética).

6.6 - INMUNOBLOTTING

a) Al finalizar la transferencia de las proteínas, abrir el cassette y sacar la membrana para revelarla. Sumergir rápidamente la membrana en la solución de lavado 2 (ver apartado 6.2.4) y posteriormente ponerla en etanol durante 10 segundos antes de aclarar durante 5 minutos en agua destilada.
Nota: En este paso, la membrana se puede conservar durante la noche en agua destilada en +2°C a +8°C. Deje la membrana ajustar a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) antes de comenzar inmunoblotting.

b) Eliminar el agua destilada e incubar la membrana durante 30 minutos en la solución de saturación (ver apartado 6.2.4). Incubar con agitación moderada.
Para 1 membrana se necesitan 40 ml de solución de saturación.
Nota: desde esta etapa hasta la etapa g), en las etapas de agitación y de lavado se puede utilizar el Western Processor Bio-Rad (ver el manual para los parámetros).

c) Eliminar la solución de saturación e incubar la membrana en el **anticuerpo primario** diluido (ver apartado 6.2.4) durante 30 minutos a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) con agitación moderada.
Para 1 membrana se necesitan 30 ml de anticuerpo primario diluido.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

d) Eliminar la solución de anticuerpo primario y aclarar rápidamente la membrana con la solución de lavado 1 y a continuación lavar dos veces durante 5 y 10 minutos respectivamente con agitación rápida.
Para cada ciclo y para 1 membrana se necesitan 100 ml de solución de lavado 1.

e) Eliminar la solución de lavado 1 e incubar la membrana durante 20 minutos en el **anticuerpo secundario** diluido (ver apartado 6.2.4) a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) con agitación moderada.
Para 1 membrana se necesitan 40 ml de anticuerpo secundario diluido.

f) Eliminar la solución de anticuerpo secundario y aclarar rápidamente con la solución de lavado 1 y a continuación lavar durante 5, 10 y 10 minutos respectivamente con agitación rápida.
Para cada ciclo y para 1 membrana se necesitan 100 ml de solución de lavado 1.

g) Colocar la membrana en 100 ml de la solución de lavado 2 con agitación lenta.

h) Dejar escurrir la membrana sosteniéndola encima del papel absorbente y evitando el contacto directo y colocar la membrana en el sobre de plástico.

i) Añadir el reactivo ECL (ver apartado 6.2.4). Eliminar el exceso de reactivo y las burbujas de aire utilizando papel absorbente. Colocar en el cassette de exposición.

j) En una cámara oscura, cubrir el sobre con una película y exponer durante 15 minutos. Este tiempo de exposición de la película se puede variar para obtener una señal óptima.

k) Sumergir la película en la solución de revelado durante 45 segundos (ver apartado 6.2.4). Aclarar en agua destilada. Sumergir la película en el fijador hasta que la película se vuelva totalmente transparente.

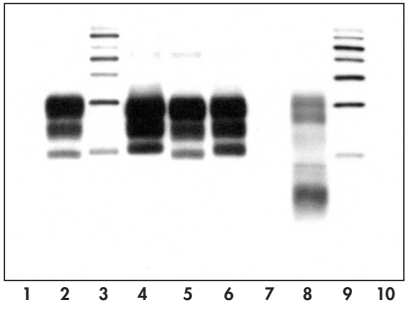
l) Lavar con agua destilada y dejar secar la película.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

7 - INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La Figura 1 muestra los patrones de banda esperados para la muestra negativa, muestras positivas para EET, en varias especies animales y control de peso molecular (posiciones 3 y 9).

Figure 1



Las muestras negativas (posiciones 1 y 10) se trataron con proteinasa K. Éstas no mostraron ninguna señal puesto que la PrP^c había sido digerida totalmente.

Las muestras positivas también se trataron con proteinasa K.

La muestra bovina positiva para la EEB (posición 2), **la muestra positiva para el scrapie clásica** (posición 6) y **la muestra positiva para el EDC** (posición 4) mostraron el patrón típico de 3 bandas, lo que demuestra la digestión de la PrP^c y la transformación de la proteína priónica específica de la enfermedad en un fragmento central resistente a la proteinasa con una menor masa molecular tras la eliminación de la parte N terminal de la proteína. Las dos bandas superiores corresponden a las formas mono y diglicosiladas (27-30 kDa), mientras que la banda inferior corresponde a la forma no glicosilada.

La muestra de ovino infectado experimentalmente con EEB (posición 5) presenta una señal superior en la banda diglicosilada que en la banda monoglicosilada. No obstante, este perfil de glicosilación típico no se puede considerar como prueba suficiente de la infección del animal con EEB. Conforme a las recomendaciones del Laboratorio de Referencia de

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

la Comunidad Europea (CRL), en este tipo de muestra deberá realizarse un ensayo de diferenciación para discernir entre scrapie y EEB. Para más informaciones sobre el test de diferenciación puede contactar Bio-Rad.

La muestra infectado por scrapie atípico (ex. Nor98) (posición 8) presenta un perfil de glicosilación atípico. A aproximadamente 12 kDa se observa una banda más baja, mientras que las otras bandas superiores no están localizadas en las mismas posiciones equivalentes a las de los casos "típicos" de scrapie. La señal también es más fuerte en la banda más inferior que en la banda superior.

La lectura del gel deberá interpretarse con cautela puesto que una muestra fuertemente positiva detectada con el test TeSeE™ WESTERN BLOT puede ocultar la muestra negativa más próxima o una muestra positiva baja.

Límites de la prueba:
Un resultado negativo implica que la muestra ensayada no contiene una cantidad medible de PrP^{res} con el método TeSeE™ WESTERN BLOT. No obstante, como no puede detectarse la presencia de muy bajas cantidades de PrP^{res}, un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección.
Cualquier muestra interpretada negativamente según de los criterios d' interpretación de la prueba TeSeE™ WESTERN BLOT, y que se volvió anteriormente positivo répétable por una prueba de detección rápida, tendrà que ser probado con uno de los otros métodos de confirmación certificada por l' OIE como la Immuno-Histo Química (IHC) o el método SAF-Immunoblot.
Todas las muestras con un resultado positivo reproductible según los criterios de interpretación de la prueba deben verificarse en conformidad con las disposiciones legales en vigor.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

8 - PRECAUCIONES

La calidad de los resultados depende del cumplimiento de las siguientes buenas prácticas de laboratorio:

- Conservar los reactivos a la temperatura adecuada (ver las indicaciones de los fabricantes).
- No utilizar reactivos después de la fecha de caducidad.
- La solución de proteinasa K reconstituida y conservada a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) debe utilizarse en un plazo de 10 horas.
- No mezclar ni combinar reactivos procedentes de diferentes lotes de TeSeE™ Western Blot durante el proceso, con la excepción de tubos de trituración, reactivo A, reactivo B y proteinasa K.
- Antes de la utilización, esperar 30 minutos para que los reactivos y los tampones se estabilicen a temperatura ambiente (+18°C a +30°C).
- Reconstituir cuidadosamente los reactivos evitando toda contaminación.
- No realizar la prueba en presencia de reactivos que produzcan vapores (ácidos, alcalinos, aldehídos) o polvos que puedan alterar la actividad enzimática del conjugado.
- La reacción enzimática es muy sensible a todos los metales o iones metálicos. Por tanto, ningún elemento metálico debe entrar en contacto con el conjugado.
- Utilizar únicamente tubos de polipropileno.
- Utilizar preferentemente material de uso único. En su defecto, utilizar una cristalería perfectamente lavada y enjuagada con agua destilada.
- Utilizar una punta de pipeta desechable para cada muestra.
- Antes de empezar la electroforesis y la transferencia, comprobar que los 2 electrodos están en contacto con el tampón.
- Deben respetarse escrupulosamente todos los tiempos de aclarado para evitar un ruido de fondo excesivo durante la tinción final con el reactivo ECL.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

9 - RECOMENDACIONES DE HIGIENE Y SEGURIDAD

De manera general, las condiciones de higiene, las medidas de seguridad biológica y las buenas prácticas de laboratorio deben cumplir las recomendaciones de las autoridades reglamentarias nacionales.

- Todos los reactivos del kit están destinados para uso exclusivo de diagnóstico "*in vitro*".
- Utilizar guantes de un solo uso durante la manipulación de los reactivos y de las muestras y lavar cuidadosamente las manos tras la manipulación.
- No pipetear con la boca.
- Utilizar recipientes de polipropileno para evitar vidrios rotos.
- Considerar el material directamente en contacto con las muestras y las soluciones de lavado, como productos contaminados.
- Evitar las salpicaduras de muestras o de soluciones que las contengan.
- Limpiar las superficies manchadas con una solución de 20.000 p.p.m. de hipoclorito de sodio (lejía). Si el líquido contaminante es un ácido, neutralizar previamente las superficies manchadas con hidróxido de sodio (sosa), y después limpiar con lejía. Las superficies deben aclarase con agua destilada, secarse con etanol y papel absorbente. El material utilizado para la limpieza deberá ser desechado en un contenedor especial para residuos contaminados.
- Eliminar las muestras así como el material y los productos contaminados después de su descontaminación:
  - ya sea sumergiéndolos en una solución de hidróxido de sodio 1 M (concentración final) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente (+18°C a +30°C),
  - ya sea sumergiéndolos en una solución de 20.000 p.p.m. de hipoclorito de sodio durante al menos 1 hora a temperatura ambiente (+18°C a +30°C),
  - o bien por calentamiento en autoclave a 134°C mínimo durante al menos 18 minutos, con una presión de 3 bares.

Atención: no introducir en el autoclave soluciones que contengan lejía o el reactivo B.

- Todas las operaciones referentes a la realización de los tests de despistaje de una encefalopatía espongiforme transmisible (EST) son objeto de una reglamentación y deben efectuarse en un laboratorio aislado, reservado exclusivamente a este fin y, por tanto, con un acceso limitado y controlado.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

El operador debe utilizar una bata cerrada, protector de calzado, guantes y una mascara con visera o una mascarilla simple con gafas de seguridad.

- Los operadores deben recibir una formación específica sobre los riesgos que conllevan los agentes de las EETs o priones y sobre los modos de descontaminación validados para los agentes infecciosos "no convencionales".

  Las medidas de seguridad biológica deben estar en conformidad con las recomendaciones de las autoridades reglamentarias nacionales.
- Antes de su eliminación, neutralizar y/o autoclavar todas las soluciones de lavado, el agua de lavado y cualquier líquido que contenga muestras biológicas.
- El reactivo B está una sustancia peligrosa clasificada como nociva (> 25% alcohol) en la reglamentación europea.
- Los reactivos que contengan 0.1% del ProClin® 300 son clasificados como preparaciones irritantes en la reglamentación europea.



Xn
(Alcohol > 25%)
(0,1% ProClin® 300)

R : 10-22-37/38-41-43-67 Inflamable. Nocivo en caso de ingestión. Irritante para el sistema respiratorio y la piel. Riesgo de serias lesiones en caso de contacto con los ojos. Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel. La inhalación de vapores puede provocar somnolencia y vértigos.
S : 7/9-13-26-28-37/39-46 Conservar el recipiente bien cerrado y en un lugar bien ventilado. Conservar apartado de alimentos y bebidas, incluyendo los destinados a animales. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con abundante agua y consultar a un especialista. En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua. Utilizar guantes apropiados y un sistema de protección de ojos/cara. En caso de ingestión, consultar inmediatamente con un médico y enseñarle el envase o la etiqueta.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

10 - BIBLIOGRAFÍA

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 immonohistochemical stydy. 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 ($PrP^{ARR/ARR}$). *Journal of General Virology 85, 2727-2733*.

7. L. ORGE, A.GALO, C.MACHADO, C. LIMA, C. OCHOA, J. SILVA, M. RAMOS and J.-P. SIMAS (2004)
   Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *Journal of General Virology 85, 3487-3491*.

8. A. BUSCHMANN, A.-G. BIACABE, U. ZIEGLER, A. BENCSIK, J.-Y. MADEC, G. ERHARDT, G. LÜHKEN, T. BARON and M.-H. GROSCHUP (2004)
   Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *Journal of Virological Methods 117, 27-36*.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

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. PERRET-LIAUDET, 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.

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 MARNES-LA-COQUETTE - FRANCE
Tel.: +33 1 47 95 60 00
Fax.: +33 1 47 41 91 33

Rev. E - 05/2009
Code : 862192

chnology Group - Quality Instrumentation ... Guaranteed | (888) 88-SOURCE | www.

Artisan Technology Group is an independent supplier of quality pre-owned equipment

Gold-standard solutions

Extend the life of your critical industrial, commercial, and military systems with our superior service and support.

We buy equipment

Planning to upgrade your current equipment? Have surplus equipment taking up shelf space? We'll give it a new home.

Learn more!

Visit us at **artisantg.com** for more info on price quotes, drivers, technical specifications, manuals, and documentation.

Artisan Scientific Corporation dba Artisan Technology Group is not an affiliate, representative, or authorized distributor for any manufacturer listed herein.

We're here to make your life easier. How can we help you today?

(217) 352-9330 | sales@artisantg.com | artisantg.com

ARTISAN® TECHNOLOGY GROUP