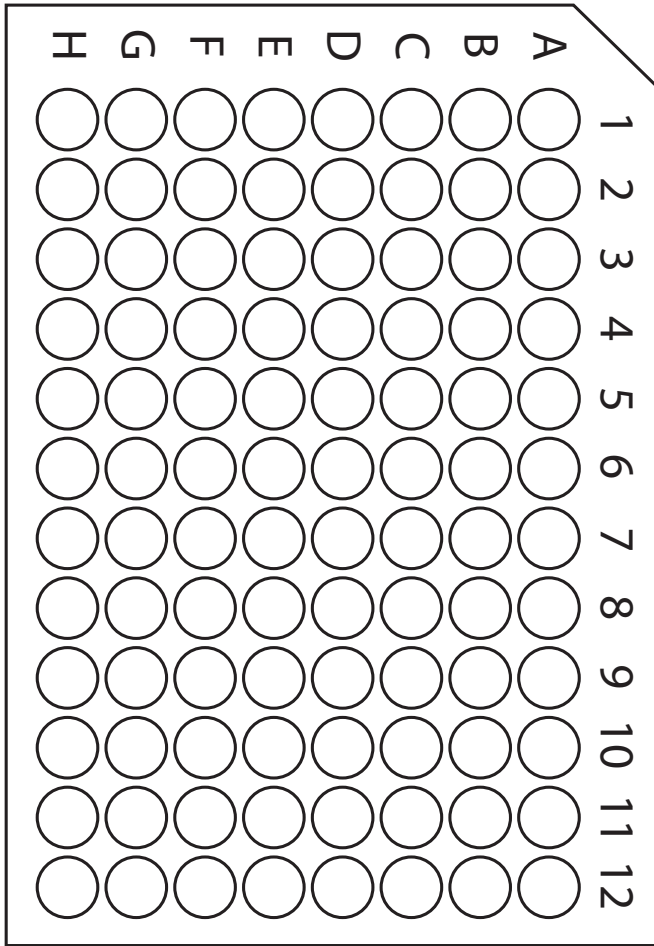


DIAGRAMME DE L'ESSAI



Protocole général pour LE KIT SERVANT A L'ESSAI IMMUNOEN- ZYMATIQUE

(Plage: 0-25 ng/ml)

USA
Phoenix Pharmaceuticals, Inc.
330 Beach Rd.
Burlingame, California 94010
Tél: 650-558-8898, 1-800-988-1205
Fax: 650-558-1686
info@phoenixpeptide.com
www.phoenixpeptide.com

EC REP Europe
Phoenix Europe GmbH
Viktoriastrasse 3-5
D-76133 Karlsruhe, Germany
Tél: +49 (721) 12 08 150
Fax: +49 (721) 12 08 15 15
europe@phoenixpeptide.eu



PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC.

TABLE DES MATIERES

1. Contenu du Kit.....	2
2. Matériel supplémentaire, non inclus.....	2
3. Stockage.....	3
4. Consignes de sécurité.....	3
5. Élimination des réactifs.....	3
6. Introduction.....	4
7. Le principe général de l'essai immunoenzymatique.....	4
8. Résumé du protocole de l'essai.....	5
9. Protocole d'essai.....	6
A. Réhydratation des peptides et des anticorps.....	6
B. Dilutions peptidiques standard.....	7
C. Chargement des plaques de microtitrage.....	8
D. Incubation des plaques de microtitrage.....	8
10. Recommandations supplémentaires.....	10
11. Évaluation des résultats.....	11
12. Méthode suggérée pour l'extraction peptidique.....	12
A. Prélèvement de sang et collecte de plasma.....	12
B. Préparation générale des tissus.....	13
C. Extraction des peptides à partir d'échantillons.....	13
13. Références.....	14

ATTENTION :

Appareil d'investigation. Limité à l'usage expérimental conformément à la loi. Utilisation à des fins de recherche uniquement. Ne pas utiliser lors de procédures de diagnostic.

- Faites évaporer l'éluant jusqu'à dessiccation complète dans un concentrateur centrifuge ou bien par le biais d'une méthode similaire adaptée.

Remarque: La combinaison d'un concentrateur centrifuge (par ex. Speedvac) et d'un lyophilisateur produit les meilleurs résultats. Tout d'abord, utilisez un concentrateur centrifuge pour sécher l'échantillon pendant environ 15 minutes pour enlever la couche organique. Procédez au refroidissement ultra rapide de l'échantillon restant et lyophilisez-le pendant la nuit en utilisant un appareil à lyophiliser. Si vous ne disposez pas d'un concentrateur centrifuge, la lyophilisation pendant la nuit en utilisant un lyophilisateur sera suffisante.

- Conservez l'extrait sec à -20°C et effectuez l'essai dès que possible. Utilisez le tampon d'essai (1x) pour reconstituer l'extrait sec à la concentration souhaitée. Si la valeur peptidique ne se situe pas dans la plage de détection, diluez ou concentrez l'échantillon en fonction des besoins.

Remarque: Par exemple, si 1ml de plasma a été extrait, séché, puis reconstitué dans 250 µl de tampon d'essai (1x), cela signifie que l'échantillon original aura subi une quadruple concentration maintenant.

REFERENCES

- Porstmann, T. and Kiessig, S.T., Enzyme Immunoassay Techniques, An Overview, *Journal of Immunological Methods*, 150: 5-21 (1992).
- Avrameas, S., Amplification Systems in Immunochemical Techniques, *Journal of Immunological Methods*, 150: 23-32 (1992).
- Hofbauer KH, Jensen BL, Kurtz A, Sandner P. Tissue hypoxigenation activates the adrenomedullin system in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Feb;278(2):R513-9.

Préparation générale des tissus:

1. Faites bouillir les tissus dans 75% HoAc (acide acétique) pendant 20 minutes à 100°C.
2. Homogénéisez les tissus dans un tampon de lyse, généralement avec un faible pH.
3. Centrifugez l'homogénat tissulaire à 12 000 tr/min pendant 20 à 30 minutes à 4°C.
4. Pour l'extraction peptidique à partir d'un échantillon, prélevez 1ml du surnageant et combinez-le avec 1ml du tampon A (réf. catalogue RK-BA-1) pour acidifier l'échantillon. Centrifugez avec 6 000 à 17 000 x g pendant 20 minutes et recueillez le surnageant. Ce mélange sera versé dans la COLONNE DE SEP A C18. La centrifugation sur de la glace contribue à l'inhibition des peptidases.

Remarque: Si un autre essai protéique est nécessaire, désignez et retirez une partie aliquote avant l'ajout au tampon A. Ce tampon contient des matières susceptibles d'interférer avec l'analyse protéique.

Extraction des peptides à partir d'échantillons:

1. Équilibrez une COLONNE DE SEP contenant 200mg de C18 (réf. catalogue RK-SEPCOL-1). Rincez avec 1ml du tampon B (réf. catalogue RK-BB-1) une seule fois, et ensuite avec 3 ml du tampon A trois (3) fois.
2. Versez la solution d'échantillon acidifié (plasma, sérum, tissus, etc.) dans la COLONNE DE SEP A C-18 pré-équilibrée.
3. Rincez lentement la colonne avec 3 ml du tampon A deux fois et éliminez la solution de rinçage.
4. Éluez le peptide lentement avec 3 ml du tampon B une fois et recueillez l'éluant dans un tube en polystyrène.

Remarque: Assurez-vous qu'il y ait un flux constant de toutes les solutions au cours de la procédure d'extraction. Pour garantir un processus et une récupération de l'échantillon de manière optimale, ne laissez pas les bulles d'air pénétrer dans la matrice C-18.

CONTENU DU KIT

1. Tampon concentré pour essais EIA (50ml, 20x) réf. catalogue: **EK-BUF**
2. Plaque IE pré-enduite (96 cupules, 1 plaque)..... réf. catalogue: **EK-PLATE**
3. Scellant pour plaques en acétate (APS) (3 pièces)..... réf. catalogue: **EK-APS**
4. Anticorps primaire (1 flacon, sous forme lyophilisée)
5. Peptide standard (1 flacon, sous forme lyophilisée)
6. Peptide biotinylé (1 flacon, sous forme lyophilisée)
7. Streptavidine-peroxydase de raifort (SA-HRP) (30µl)..... réf. catalogue: **EK-SA-HRP**
8. Témoin positif (2 flacons, sous forme lyophilisée)
9. Solution de substrat (TMB) (12ml, prêt à l'emploi)..... réf. catalogue: **EK-SS**
10. 2N HCL (15ml, prêt à l'emploi)..... réf. catalogue: **EK-HCL**
11. Protocole général (1 livret)

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE, NON INCLUS

1. Lecteur de plaques de microtitrage (450nm) (indispensable)
2. Micropipette avec embouts de pipette jetables (indispensable)
3. Matériau absorbant pour le séchage (indispensable)
4. Vortex (indispensable)
5. Logiciel à ajustement de courbe capable de logistiques de 4 paramètres (recommandé)
6. Agitateur orbital de plaques (300-400tr/min) (recommandé)
7. Nettoyeur pour les plaques de microtitrage (recommandé)
8. Pipettes multi-canaux (50-100µl) (recommandé)
9. Réservoir de solution (recommandé)
10. Centrifugeuse (en option)
11. Tube à prélèvement de sang vacutainer de couleur bleu lavande EDTA (en option)..... réf. catalogue: **VT-6450**
12. Aprotinine (30 TIU) (en option) réf. catalogue: **RK-APRO**
13. COLONNE DE SEP A C18 (en option) réf. catalogue: **RK-SEPCOL-1**
14. Tampon A (en option) réf. catalogue: **RK-BA-1**
15. Tampon B (en option) réf. catalogue: **RK-BB-1**

STOCKAGE

1. Dès réception, stocker le kit à 4°C. Ne pas congeler. Les kits de test non ouverts resteront stables jusqu'à la date d'expiration, à condition qu'ils aient été stockés comme décrit précédemment.
2. L'utilisation de toutes les solutions dans les meilleurs délais après la reconstitution est vivement conseillée. Les solutions réhydratées du peptide biotinylé standard ou les anticorps primaires doivent être utilisés dans les 5 jours (4°C). Les dilutions standards doivent être préparées immédiatement avant de procéder à l'essai.
3. Toutes les bandes/colonnes non utilisées peuvent être retirées de la plaque de microtitrage pré-endoite. Veuillez replacer les bandes dans le sachet métallique original à fermeture éclair avec un dessiccant et le conserver à une température de 4°C. Ne laissez pas l'humidité s'accumuler dans les cupules.
4. Si nécessaire, stockez le tampon d'essai (1x), les solutions reconstituées du peptide biotinylé standard, les anticorps et la solution SA-HRP à 4°C.

CONSIGNES DE SÉCURITÉ

1. Le kit contient du 2N HCL et un agent conservateur qui peut provoquer des irritations. Portez des gants au travail et lors de la manipulation de ces réactifs.
2. Afin de minimiser le risque de contamination microbienne, des lunettes de sécurité et/ou des gants doivent être portés en permanence.

ÉLIMINATION DES REACTIFS

Éliminez les réactifs conformément aux prescriptions locales.

Phoenix Pharmaceuticals, Inc. garantit que ses produits sont conformes aux informations contenues dans cette publication. L'acheteur doit déterminer l'adéquation du produit à ses besoins particuliers et établir les concentrations d'échantillons optimales.

METHODE SUGGEREE POUR L'EXTRACTION PEPTIDIQUE

Remarque: Pour la plupart des échantillons, une extraction des peptides est recommandée. Elle aidera à éliminer toutes les interférences moléculaires présentes dans les fluides biologiques et permettra la dilution ou la concentration de l'échantillon.

Généralités concernant le prélèvement de sang et la collecte de plasma:

1. Prélevez des échantillons de sang dans des tubes Vacutainer de couleur bleu lavande (réf. catalogue VT-6450), qui contiennent un adjuvant EDTA et peuvent accueillir jusqu'à 7 ml de sang.
2. Agitez doucement les tubes Vacutainer de couleur bleu lavande plusieurs fois immédiatement après le prélèvement de sang pour éviter la coagulation.
3. Transférez le sang dans les tubes de centrifugation contenant de l'aprotinine (réf. catalogue RK-APRO), et agitez-les plusieurs fois avec précaution pour inhiber l'activité des protéases.

Remarque: Une quantité de 0,6 TIU, ou 100 µl, d'aprotinine pour 1ml de sang collecté est recommandée. Si les tubes Vacutainer de couleur bleu lavande sont résistants à la centrifugation, l'aprotinine y peut être déposé directement.

4. Centrifugez le sang à 1 600 x g pendant 15 minutes à 4° C et recueillez le plasma.

Remarque: Le plasma peut être conservé à -70°C et restera stable jusqu'à un mois.

5. Pour l'extraction peptidique de l'échantillon, acidifiez le plasma avec une quantité égale du tampon A (réf. catalogue RK-BA-1). Mélangez et centrifugez de 6 000 à 17 000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Le mélange sera alors versé dans la COLONNE DE SEPA C-18.

Remarque: Une quantité d'au moins 1 ml de plasma est recommandée pour l'extraction peptidique. On peut éventuellement effectuer l'extraction en utilisant des volumes réduits tant que les volumes des tampons de reconstitution et d'élution soient ajustés en conséquence.

CALCUL DES RESULTATS

1. Désignez l'axe des X (échelle logarithmique) pour la concentration des standards #5 à #1 (0,04 à 25 ng/ml).
2. Désignez l'axe des Y (échelle linéaire) pour la capacité d'absorption (O.D.) à 450 nm.
3. Faites la moyenne de tous les relevés dupliqués (standards, contrôle positif, échantillons) et soustrayez la moyenne des contrôles à blanc O.D.
4. Tracez l'O.D. de chaque concentration peptidique standard directement au-dessus de sa coordonnée sur l'axe X.
5. Tracez la courbe la mieux ajustée aux points de données. Elle doit mettre en évidence une relation inverse entre concentration peptidique et capacité d'absorption. Au fur et à mesure que la concentration peptidique standard augmente, la couleur jaune diminue, réduisant ainsi la capacité d'absorption (O.D.).

Remarque: L'usage d'un logiciel d'ajustement de courbe avec fonction 4PL ou log-logit est fortement conseillé.

6. Pour déterminer la concentration peptidique dans tout échantillon inconnu, recherchez d'abord sa capacité d'absorption (O.D.) sur l'axe des Y. Tracez une ligne horizontale sur le graphique à partir de ce point de capacité d'absorption jusqu'à l'intersection avec la courbe des standards. La coordonnée sur l'axe X à ce point d'intersection correspondra à la concentration peptidique (ng/ml) présente dans l'échantillon dosé.

Remarque: Multipliez la concentration peptidique mesurée par tout facteur de dilution(s) utilisé lors de la préparation de l'échantillon original.

7. Reportez-vous à la Feuille de données QC relative aux valeurs admissibles des témoins positifs. Si les valeurs des témoins positifs ne se situent pas dans la plage spécifiée sur la Fiche de Données QC, l'essai n'est pas considéré comme valide.

INTRODUCTION

Ce kit est conçu pour mesurer la concentration d'un peptide spécifique et de ses peptides connexes, fondée sur le principe d'un essai immunoenzymatique par «compétition». Ce kit est utilisé pour soutenir la détection de divers antigènes dans les échantillons humains.

LE PRINCIPE GENERAL DE L'ESSAI IMMUNOENZYMATIQUE

La plaque de microtitrage contenue dans ce kit est pré-enduite d'un anticorps secondaire, dont les sites non-spécifiques de liaison sont bloqués. L'anticorps secondaire peut se lier au fragment Fc de l'anticorps primaire. Le fragment Fab de cet anticorps primaire sera alors lié par compétition par à la fois le peptide biotinylé et le peptide ciblé soit dans la solution de peptide standard soit dans un échantillon inconnu. Le peptide biotinylé interagit avec la streptavidine-peroxydase de raifort (SA-HRP) qui catalyse la solution de substrat. L'ajout de la solution d'arrêt provoque un changement de couleur dans chaque cupule, passant du bleu au jaune. L'intensité de la couleur jaune est directement proportionnelle à la quantité du complexe peptide biotinylé-SA-HRP, mais inversement proportionnelle à la quantité du peptide ciblé (que ce soit dans la solution peptidique standard ou dans l'échantillon inconnu). Ce phénomène est dû à la compétition entre le peptide biotinylé et le peptide ciblé pour arriver à la liaison avec l'anticorps primaire. Une courbe standard peut être établie en retraçant l'O.D. mesurée en fonction des diverses concentrations peptidiques standards connues. La concentration peptidique inconnue peut alors être déterminée par extrapolation en se basant sur cette courbe standard.

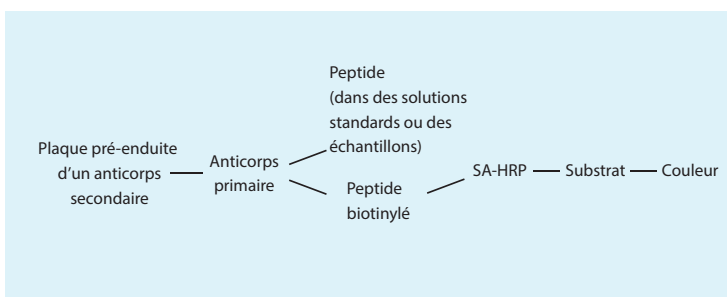


Illustration 1. Diagramme des interactions moléculaires utilisées dans ce kit

RESUME DU PROTOCOLE D'ESSAI

Ajoutez 50µl/cupule de solution standard, échantillon, ou témoin positif, 25µl de l'anticorps primaire, et 25µl du peptide biotinylé **sauf les cupules de contrôle à blanc**

Laissez incuber à température ambiante (20-23°C) pendant 2 heures

Rincez la plaque de microtitrage 4 fois avec 350µl/cupule de tampon d'essai (1x)

Ajoutez 100µl/cupule de solution SA-HRP

Laissez incuber à température ambiante (20-23°C) pendant 1 heure

Rincez la plaque de microtitrage 4 fois avec 350µl/cupule de tampon d'essai (1x)

Ajoutez 100µl/cupule de solution de substrat TMB

Laissez incuber à température ambiante (20-23°C) pendant 1 heure

Terminez la réaction avec 100µl/cupule de 2N HCL

Surveillez l'absorption O.D. à 450nm et calculez les résultats

RECOMMANDATIONS SUPPLEMENTAIRES

1. Les réactifs provenant de lots avec des numéros différents ne doivent jamais être mélangés.
2. Les substances telles que le plasma, le sérum, les milieux de culture, l'homogénat de tissus, le liquide cébrospinal (CSK), l'urine ou tout fluide biologique peuvent faire l'objet d'un essai tant que les échantillons soient préparés de manière appropriée et que le niveau peptidique de l'échantillon soit suffisamment élevé pour la sensibilité de ce kit spécifique.
3. Des taux importants de protéines interférentes peuvent entraîner des variations en ce qui concerne les résultats de l'échantillon. Par conséquent, il est impératif de sélectionner la procédure de préparation de l'échantillon appropriée pour obtenir des résultats optimaux. Veuillez consulter la documentation relative à la méthodologie spécifique.
4. Lors de la manipulation de la plaque, évitez de toucher le fond. Toute trace de doigts ou tache peut affecter la lecture de l'O.D.
5. Le rinçage manuel peut provoquer de grandes variations dans les coefficients de duplication. Afin de réduire ce facteur, le liquide provenant de la plaque devrait être retiré en inversant la plaque et en la faisant sécher sur un matériau absorbant.
6. Chaque fois qu'un nouvel embout est utilisé, assurez-vous qu'il soit intact et libre de bulles d'air. Pour une meilleure variation au sein d'une même série d'essais, aspirez et expulsez plusieurs fois un réactif ou un échantillon dans son conteneur pour mouiller les parois de la pipette avant de la remplir.
7. Évitez de plonger tout l'embout de la pipette dans les réactifs et les échantillons. Des gouttelettes peuvent s'accumuler à l'extrémité de l'embout. Il y a risque qu'un excès de solution va s'accumuler dans la cupule et affecte les résultats de l'essai.
8. Si cette procédure est effectuée en dehors de la plage de température ambiante recommandée (20-23°C) les résultats de l'essai peuvent s'en trouver affectés.
9. Toutes les modifications apportées au protocole existant (c'est-à-dire dilutions standards, technique de pipetage, technique de rinçage, temps d'incubation ou température, conditions de stockage et date d'expiration du kit) peuvent affecter la sensibilité, la spécificité et les résultats de l'essai.

16. Retirez le scellant APS de la plaque de microtitrage et jetez le contenu des cupules. Rincez chaque cupule avec 350 µl de tampon d'essai (1x), jetez le tampon, inversez la plaque de microtitrage et faites-la sécher en tamponnant. Répétez l'opération 4 fois.

17. Versez 100 µl de la solution SA-HRP dans chaque cupule.

18. Scellez de nouveau la plaque de microtitrage avec le scellant APS. Laissez incubé pendant 1 heure à température ambiante (20-23°C).

Remarque: Une agitation orbitale à 300-400 tr/min pendant toute la durée des incubations est conseillée.

19. Retirez le scellant l'APS de la plaque de microtitrage et jetez le contenu des cupules. Rincez chaque cupule avec 350 µl de tampon d'essai (1x), jetez le tampon, inversez la plaque de microtitrage et faites-la sécher en tamponnant. Répétez l'opération 4 fois.

20. Versez 100 µl de la solution de substrat TMB dans chaque cupule.

Remarque: Le TMB est sensible à la lumière. Après l'ajout de la solution de substrat TMB, il est fortement recommandé de couvrir la plaque de microtitrage pour la protéger de la lumière.

21. Scellez de nouveau la plaque de microtitrage avec le scellant APS. Laissez incubé pendant 1 heure à température ambiante (20-23°C).

Remarque: Une agitation orbitale à 300-400 tr/min pendant toute la durée des incubations est conseillée.

22. Retirez le scellant APS de la plaque de microtitrage. Ne PAS rincer la plaque de microtitrage ni jeter le contenu des cupules.

23. Versez 100 µl de 2N HCL dans chaque cupule pour couper la réaction. La couleur dans les cupules doit passer du bleu au jaune. Tapotez la plaque en douceur pour assurer un bon mélange.

Remarque: Passez à l'étape suivante dans les 20 minutes.

24. Introduisez la plaque de microtitrage dans un lecteur de plaques de microtitrage et mesurez la capacité d'absorption O.D. à 450 nm.

Remarque: Veuillez lire ce protocole dans son intégralité avant de commencer l'essai. Chaque kit contient suffisamment de réactifs pour 96 cupules; 40 échantillons dupliqués peuvent être passés à l'essai.

PROTOCOLE D'ESSAI

Remarque: Avant l'ouverture des flacons et le démarrage de l'essai, il faut porter le kit et tous ses composants à température ambiante (20-23°C). Avant d'ouvrir les microtubes à centrifuger pour la reconstitution, centrifuger brièvement à ~3 000 tr/min pendant 5 secondes pour s'assurer que toute la matière lyophilisée soit bien au fond du tube.

1. Diluez le concentré de tampon d'essai EIA (20x) avec 950 ml d'eau distillée. Mélangez soigneusement avant utilisation. Le mélange constituera la solution de tampon d'essai (1x) à utiliser pour diluer ou reconstituer tous les autres échantillons et réactifs pendant l'essai.

Remarque: Si des cristaux se forment dans le tampon d'essai (20x), le flacon peut être placé dans un bain d'eau chaude pendant environ 30 minutes ou bien jusqu'à ce que les cristaux aient disparu.

2. Reconstituez le peptide standard dans 1ml du tampon d'essai (1x) et mélangez soigneusement avec le vortex. Laissez reposer la solution pendant au moins 10 minutes à température ambiante (20-23°C) pour une dissolution complète. C'est la solution étalon standard. Passez-la au vortex juste avant de l'utiliser.

3. Reconstituez l'anticorps primaire dans 5ml du tampon d'essai (1x) et mélangez soigneusement avec le vortex. Laissez reposer la solution pendant au moins 5 minutes à température ambiante pour une dissolution complète. Passez-la de nouveau au vortex avant utilisation.

4. Reconstituez le peptide biotinylé dans 5ml du tampon d'essai (1x) et mélangez soigneusement avec le vortex. Laissez reposer la solution pendant au moins 5 minutes à température ambiante pour une dissolution complète. Passez-la de nouveau au vortex avant utilisation.

5. Reconstituez le témoin positif dans 200µl du tampon d'essai (1x) et mélangez soigneusement avec le vortex. Laissez reposer la solution pendant au moins 5 minutes à température ambiante pour une dissolution complète. Passez-la de nouveau au vortex avant utilisation.

Préparez la solution peptidique standard comme suit:

Standard ID / Numéro	Volume tampon d'essai (1x)	Volume peptidique standard	Concentration
Étalon	1000µl	(poudre)	1000ng/ml
#1	975µl	25µl de solution	25ng/ml
#2	800µl	200µl of #1	5ng/ml
#3	800µl	200µl of #2	1ng/ml
#4	800µl	200µl of #3	0.2ng/ml
#5	800µl	200µl of #4	0.04ng/ml

Illustration 2. Tableau des dilutions standards

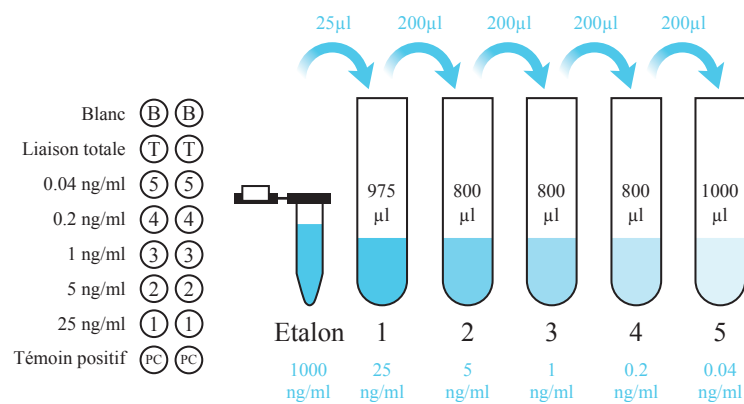


Illustration 4. Guide visuel des dilutions standards

Illustration 3. Carte de chargement de la plaque de microtitrage

- Préparez les dilutions standards à partir du peptide standard réhydraté selon les illustrations 2 et 4 de la page précédente. Mélangez chaque tube soigneusement au vortex après chaque dilution sérielle.
- Sur la plaque de microtitrage, laissez les cupules A1 et A2 vides. Elles serviront de cupules de contrôle à blanc.
- Versez 50 µl de tampon d'essai (1x) dans les cupules B1 et B2. Celles-ci représenteront la liaison globale.
- Versez 50 µl de la solution peptidique la moins concentrée (# 5) aux cupules C1 et C2. Ensuite, ajoutez le peptide standard #4 dans les cupules D1 et D2, et ainsi de suite, en continuant dans l'ordre inverse de la dilution standard.
- Versez 50 µl du témoin positif réhydraté dans les cupules H1 et H2.
- Versez 50 µl de n'importe quel échantillon inconnu/préparé dans les cupules correspondantes, de nouveau en double.

Remarque: Les peptides standards doivent toujours être testés en double.

Remarque: Les témoins positifs doivent toujours être testés en double.

Remarque: Chaque laboratoire doit déterminer les facteurs de dilution et la préparation de ses échantillons pour s'assurer que les niveaux peptidiques sont détectables et se trouvent dans la gamme linéaire de la courbe standard.

- Versez 25 µl d'anticorps primaire réhydraté dans chaque cupule, **sauf dans les cupules de contrôle à blanc** (A1 et A2).
- Versez 25 µl du peptide biotinylé réhydraté dans chaque cupule, **sauf dans les cupules de contrôle à blanc** (A1 et A2).
- Scellez la plaque de microtitrage avec le scellant d'acétate (APS). Laissez incuber les plaques de microtitrage pendant 2 heures à température ambiante (20-23°C).
- Centrifugez le flacon avec la solution SA-HRP (3 000 à 5000 tr/min) pendant 5 secondes. Versez 12µl de la solution SA-HRP dans 12ml de tampon d'essai (1x) à l'aide de la pipette et mélangez soigneusement la solution au vortex.

*Remarque: L'utilisation d'une pipette multi-canaux pour charger l'anticorps primaire est **DECONSEILLÉE**.*

*Remarque: L'utilisation d'une pipette multi-canaux pour charger le peptide biotinylé est **DECONSEILLÉE**.*

Remarque: Une agitation orbitale à 300-400 tr/min pendant toute la durée des incubations est conseillée.