

Immunologie

Kits

Immunology

Kits

Réf :
106 235

Français – p 1

English – p 5

Version : 8110

Kit Ouchterlony de simulation
Ouchterlony simulation kit

1. Description

Le but du test d'immunodiffusion sur gel d'Ouchterlony est la mise en évidence de la liaison antigène-anticorps et de sa spécificité.

Pour cela, le test réel utilise du sérum d'un petit Mammifère (un lapin par exemple) préalablement immunisé par injection d'un antigène connu (en général de l'albumine sérique de bœuf BSA) et diverses solutions d'antigènes dont celui injecté.

La présence dans le sérum d'anticorps dirigés contre l'antigène injecté préalablement et leur spécificité sont testés par la méthode dite de double diffusion ou d'Ouchterlony qui repose sur deux principes :

- la diffusion dans le gel des anticorps du sérum à partir d'un puits central, où est effectué le dépôt, et celle des divers antigènes à partir de puits périphériques, permettant ainsi la rencontre antigènes-anticorps.
- la reconnaissance et fixation des anticorps sur les antigènes vis à vis desquels ils possèdent une spécificité. Cette étape se traduisant par la formation de complexes immuns (complexes antigènes-anticorps) trop gros pour poursuivre leur diffusions et visibles à l'œil nu sous forme d'un arc blanchâtre.

Cette version de simulation reproduit le principe de la double diffusion.

Les résultats observés sont similaires à ceux du test réel. La rencontre dans le gel entre la solution de NaOH (simulant le sérum contenant les anticorps) et la solution de sulfate de zinc (simulant l'antigène spécifique) se traduit par la formation d'un précipité de couleur blanche simulant la formation des complexes immuns.

Avantages de la version de simulation :

L'utilisation de produits de substitution présente divers avantages :

- La diffusion de ces produits dans le gel étant plus rapide, les résultats apparaissent au bout de 40 minutes environ au lieu des 24 heures nécessaires pour le test réel. Ceci peut permettre la réalisation du test et l'interprétation des résultats au cours d'une même séance.
- Aucun produit d'origine animale n'est manipulé par les élèves.
- La conservation se fait à température ambiante.

2. Composition

Ce kit permet de faire manipuler jusqu'à 15 tests, 1 boîte = 1 test.

1 sachet

- 15 boîtes de pétri de 55 mm de diamètre.

1 sachet de réactif

- 1 tube étiqueté A contenant 0,85 g d'agar-agar en poudre,
- 1 microtube 1 mL d'une solution de soude (Solution B),
- 1 microtube 1 mL d'une solution de sulfate de zinc (Solution C),
- 4 microtubes étiquetés D à G,

1 sachet de petit matériel

- 1 lot de 5 mires réutilisables pour le repérage des puits,
- 5 emporte-pièces avec poire d'aspiration, réutilisables.

3. Matériel complémentaire nécessaire

Pour la préparation de la manipulation :

- 1 micro-ondes ou bain-marie,
- 1 bécher de 250 mL,
- 1 agitateur en verre ou une spatule,
- 1 pipette de 5 mL (ou plus) avec pipeteur,
- 1 gant anti-chaueur,
- eau distillée (90 mL).

Pour la manipulation :

- 6 pipettes Pasteur en polyéthylène de 1mL (ou 3 mL) pour le dépôt des gouttes,
- Feutres permanents (1 par binôme),
- 1 portoir pour microtubes.

4. Application expérimentale – Mode opératoire

4.1 Préparation de la manipulation

Prévoir 1h30 pour cette étape qui peut être réalisée quelques jours à l'avance.

4.1.1 Préparation du gel d'agar-agar

- Transvaser dans un bécher de 250 mL le contenu du tube A (0.85 g d'agar-agar).
- Ajouter 200 mL d'eau distillée tout en remuant pour dissoudre l'agar.
- Chauffer le mélange soit au micro-ondes soit dans un bain-marie proche de l'ébullition.

Au micro-ondes chauffer progressivement en interrompant régulièrement pour remuer la préparation. Arrêter de chauffer quand le mélange devient parfaitement limpide, c'est-à-dire au tout début de l'ébullition.

Au bain-marie chauffer le mélange en remuant jusqu'à ce qu'il devienne parfaitement limpide et arrêter au tout début de l'ébullition (20 minutes environ).

- Retirer avec précaution (utiliser un gant anti-chaueur) le bécher et attendre une minute.

4.1.2 Coulage des boîtes avec le gel chaud

- Pipeter avec la pipette de 5 mL le gel d'agar chaud et fluide et couler 4 mL (pas moins) dans chacune des boîtes.
- Aussitôt agiter légèrement la boîte pour égaliser le niveau et supprimer les bulles éventuelles. Mettre le couvercle sur la boîte.
- Laisser refroidir les boîtes sur une surface plane sans y toucher pendant les 5 premières minutes nécessaire à la prise du gel d'agar. Le refroidissement complet prend environ 30 minutes.

Attention : Le gel commence à se solidifier assez rapidement, il ne faut donc pas trop attendre pour couler les boîtes. Si le gel n'est plus assez fluide, il suffit de le refaire chauffer jusqu'à ce qu'il soit à nouveau parfaitement translucide.

Remarque : Les boîtes obtenues sont utilisables dès la solidification du gel et peuvent être conservées 4 à 5 jours au réfrigérateur (4°C) dans une enceinte humide pour éviter la déshydratation du gel.

4.1.3 Préparation des réactifs

- Aucune préparation n'est à prévoir pour les tubes B et C qui sont prêts à l'emploi. Ils peuvent cependant être ré-étiquetés « sérum testé » pour le tube B et « BSA » pour le tube C afin de dissimuler aux élèves leur composition réelle.
- Remplir les 4 cryotubes d'eau distillée afin de simuler les autres solutions d'antigènes. Ces tubes peuvent également être renommés ovalbumine, lactalbumine, sérum de chèvre, de mouton, de lapin...
- Marquer au feutre les 6 pipettes Pasteur d'une lettre de B à G afin que chaque tube ait sa pipette dédiée.

4.2 Manipulation

Pour chaque test, il faut 1 boîte, d'une mire pour le repérage des puits, d'un emporte-pièce et d'un feutre permanent

4.2.1 Réalisation des puits dans le gel

- Poser la boîte (couvercle vers le haut) sur la mire qui sert de modèle et l'ouvrir.
- Tout en pinçant fermement la poire de l'emporte-pièce percer la gélose jusqu'au fond de la boîte au niveau d'un repère de la mire puis relâcher la poire et retirer l'emporte-pièce. Le disque de gel formé reste dans l'emporte-pièce et un puits apparaît dans la boîte.
- En suivant la même méthode, réaliser les 5 autres puits.

Remarque : Si le disque de gel ne s'enlève pas lorsque l'emporte-pièce est retiré, il peut être facilement éliminé à l'aide d'un cure-dent ou d'une épingle.

Attention : il est important de ne pas fendre le gel lors de la réalisation des puits et de respecter le modèle pour leur disposition. Une augmentation de la distance entre le puits central et les puits périphériques nuit à la lisibilité des résultats.

4.2.2 Dépôts des réactifs (« sérums »)

- Avant tout dépôt, marquer au feutre sous la boîte et au niveau de chaque puits la lettre correspondant au réactif déposé afin de se souvenir de la disposition des produits. Le puits central sera toujours marqué B. Les puits périphériques seront marqués C à G.
- Déposer dans le puits central une goutte de la solution B « sérum testé » à l'aide de la pipette B dédiée sans faire de bulle.
- Déposer dans les puits périphériques selon le même mode opératoire une goutte des tubes C à G (« antigènes ») à l'aide de leur pipette attitrée.

Attention : Il est important que les puits soient **entièrement** remplis sans aucune bulle. Si la solution déborde sur le gel, on doit pomper immédiatement l'excédent à l'aide d'un petit morceau de papier absorbant et éventuellement compléter le puits.

4.2.3 Obtention des résultats

Laisser reposer les boîtes à plat avec leur couvercle pendant 40 minutes environ. Les puits vont progressivement s'assécher, signe que la diffusion a lieu, et les résultats vont apparaître. Les résultats resteront visibles quelques jours si on évite le dessèchement du gel en stockant les boîtes dans une enceinte humide au frais.

Suggestion : Il est possible d'obtenir des résultats plus rapidement encore en réduisant la distance entre le puits central et les puits périphériques. Une distance d'1 cm entre les centres respectifs des puits permet d'obtenir des résultats très satisfaisants.

Lecture et interprétation des résultats

Lecture : Un arc blanc apparaît dans le gel entre le puits central ayant contenu la solution du tube B (« sérum testé ») et le puits périphérique ayant contenu la solution du tube C (« BSA »). Pour mieux observer cet arc on peut regarder la boîte par transparence ou sur un fond noir.

Interprétation : Le sérum testé et les anticorps qu'il peut contenir ont diffusé en auréole autour du puits central. Il en est de même pour les différentes solutions d'antigènes autour des puits périphériques. L'arc blanc de précipitation indique qu'à la rencontre entre le sérum testé et la BSA il s'est formé des complexes immuns (complexes antigènes-anticorps). Il y a donc dans le sérum testé des anticorps capables de reconnaître et de se fixer sur l'albumine sérique de bœuf (BSA). L'absence d'arc de précipitation entre le sérum testé et les autres albumines indique que les anticorps n'ont pas pu s'y fixer. Les anticorps sont donc spécifiques d'un antigène, ici la BSA.

La présence d'anticorps anti BSA dans le sérum indique que l'animal auquel on avait injecté de la BSA a produit des anticorps pour se défendre et que ces derniers sont spécifiques de l'antigène auquel l'organisme est confronté.

Conservation, tri et récupération

Le kit se conserve à température ambiante à l'abri de la lumière solaire directe.

Les gels contenus dans les boîtes peuvent être jetés à la poubelle après une éventuelle décontamination à l'eau de javel si des colonies de bactéries ou de moisissures sont apparues.

Les emporte-pièces et les boîtes sont réutilisables après lavage.

5. Pistes pédagogiques

Le test d'Ouchterlony peut s'intégrer dans diverses démarches pédagogiques concernant l'étude des réactions immunitaires.

- Les élèves sachant que le sérum contient des anticorps dirigés contre la BSA, le test permet de « mettre en évidence la liaison antigène-anticorps » et la « spécificité des anticorps ».
- Les élèves sachant que l'arc blanchâtre correspond à une liaison antigène-anticorps et que le lapin avait reçu une injection de BSA, on peut « mettre en évidence la synthèse d'anticorps par l'organisme suite à un contact avec un antigène » ainsi que « la spécificité de ces anticorps vis-à-vis de l'antigène reçu ».
- Dans une démarche d'évaluation, il permet la recherche d'anticorps et/ou de leur spécificité dans un sérum.

En outre les deux boîtes par binôme permettent la réalisation de deux tests différents comme par exemple le test d'un sérum immun (solution B) et d'un sérum non immun (mimé par un tube d'eau distillée).

6. Service après-vente

La garantie est de 2 ans.

Pour tous réglages, contacter le **Support Technique** au **0 825 563 563**.

Le matériel doit être retourné dans nos ateliers et pour toutes les réparations ou pièces détachées, veuillez contacter :

JEULIN – S.A.V.
468 rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France

0 825 563 563*

** 0,15 € TTC/min. à partir un téléphone fixe*

1. Description

The purpose of the Ouchterlony gel immuno-diffusion test is to demonstrate the antigen-antibody bond and its specific nature.

The actual test uses serum from a small mammal (e.g. a rabbit), previously immunised by injection of a known antigen (generally, BSA beef serum albumin) and various antigen solutions including the one injected. The presence in the serum of antibodies directed against the previously injected antigen and their specific nature are tested using the so-called double diffusion or Ouchterlony method, which is based on two principles:

- diffusion in the gel of serum antibodies from a central well, where the deposit is made, and that of other antigens from peripheral wells, to allow the antigens-antibodies to meet.
- the recognition and fixing of the antibodies on the antigens specific to them. This stage is manifested by the formation of immune complexes (antigen-antibody complexes) which are too large for further diffusion and are visible to the naked eye in the form of a whitish arc.

This type of simulation reproduces the principle of double diffusion.

The results observed are similar to those of the actual test. The meeting in the gel of the NaOH solution (stimulating the serum containing the antibodies) and the solution of zinc sulphate (simulating the specific antigen) is manifested by the formation of a white precipitate simulating the formation of immune complexes.

Advantages of the simulation version:

The use of substitutes has several advantages:

- Since diffusion of the products in the gel is quicker, the results appear after approximately 40 minutes, compared with 24 hours for the actual test. This means the test and analysis of the results is possible during the same session.
- The students do not handle any product of animal origin.
- Preservation is at room temperature.

2. Composition

The kit allows handling up to 20 pairs with 2 sets per pair.

- 15 Petri dishes, diameter 55 mm,
- 1 tube labelled A containing 0.85 g of agar-agar powder,
- 1 tube labelled B containing 1 mL of soda solution,
- 1 tube labelled C containing 1 mL of zinc sulphate solution,
- 4 cryotubes labelled D to G,

A bag of small equipment:

- 1 set of 5 reusable patterns for locating wells,
- 5 punches with suction bulb, reusable.

3. Additional equipment required

To prepare for the operation:

- a microwave oven or bain-marie,
- a beaker, 250 mL,
- a glass agitator or spatula,
- a pipette 5 mL (or more) with pipeteur
- a heatproof glove,
- distilled water (90 mL).

For the operation:

- 6 polyethylene Pasteur pipettes, 1mL (or 3 mL) for depositing the drops,
- permanent felt tip markers (1 per pair),
- a test tube holder.

4. Experiment Application - procedure

4.1 Preparation for the operation

Allow 1h30 for this stage which can be completed a few days in advance.

4.1.1 Preparation of the agar-agar gel

- Pour the contents of tube A (0.85 g of agar-agar) into a 250 mL beaker.
- Add 90 mL of distilled water while shaking the beaker to dissolve the agar-agar.
- Heat the mixture almost to boiling point, in the microwave or bain-marie.

Heat gradually in the microwave, stopping regularly to shake the mixture. Stop heating when the mixture is totally clear, that is at the very start of boiling.

In the bain-marie heat the mixture while stirring until it becomes totally clear and stop at the very start of boiling (approximately 20 minutes).

4.1.2 Filling the dishes with the warm gel

- With the pipette take 5 mL of warm fluid agar gel and place 4 mL (no less) in each dish.
- Immediately shake the dish gently to level the gel and remove any bubbles. Place the cover on the dish.
- Leave the dishes to cool on a flat surface without touching them for the first five minutes necessary for the agar gel to set. Full cooling takes approximately thirty minutes.

Caution: The gel begins to solidify fairly quickly, so do not wait too long before filling the dishes. If the gel is not sufficiently fluid, simply reheat until it is again totally translucent.

Remark: The dishes obtained can be used from the time of solidifying of the gel and can be stored for four to five days in the refrigerator (4 °C) in a damp container to avoid dehydration of the gel.

4.1.3 Preparing the reagents

- No preparation is necessary for tubes B and C which are ready to use. However, they can be relabelled 'tested serum' for tube B and 'BSA' for tube C to hide their true composition from the students.
- Fill the four cryotubes with distilled water, to simulate the other antigen solution. These tubes can also be renamed ovalbumin, lactalbumin, goat, sheep or rabbit serum.
- Using a felt tip pen mark the six Pasteur pipettes with the letters B to G so each tube has its dedicated pipette.

4.2 Handling by pairs

Each pair has two dishes of gel, a sight for marking the wells, a punch and a permanent felt tip marker.

4.2.1 Making wells in the gel

- Place the dish (cover upwards) on the sight which is used as a model and open.
- While firmly gripping the balloon of the punch, pierce the gel to the base of the dish using the sight mark then release the balloon and remove the punch. The disk of gel formed remains in the punch and a well appears in the dish
- Follow the same method for the five other wells.

Remark: If the gel disk does not lift up when the punch is removed, it can easily be removed using a toothpick or a pin.

Caution: It is important to avoid any slits in the gel when making the wells and to comply with the model in terms of the arrangement. An increase in the distance between the central well and the peripheral wells will adversely affect the legibility of the results.

4.2.2 Deposit of reagents (“serums”)

- Before making any deposit, use the felt tip to mark under the dish and at each well, the letter corresponding to the reagent deposited to remember the arrangement of the products. The central well will always be marked B. The peripheral wells will be marked C to G.
- In the central well deposit a drop of solution B ‘tested serum’ using dedicated pipette B without making any bubbles.
- Using the same method, deposit in the peripheral wells a drop from tubes C to G (‘antigens’) using their dedicated pipettes.

Caution: It is important that the wells should be **totally** filled without any bubbles. If the solution runs over onto the gel, it must be removed immediately using a small piece of absorbent paper and if necessary, fill up the well.

4.2.3 Obtaining the results

Leave the dishes flat with their covers on for approximately forty minutes. The wells will gradually dry up, a sign diffusion is occurring, and the results will appear. The results will remain visible for a few days if drying out of the gel is avoided by storing the dishes in a cool damp container.

Suggestion: It is possible to obtain more rapid results by reducing the distance between the central well and the peripheral wells. A distance of one cm between the respective centres of the wells will provide very satisfactory results.

Reading and analysing the results

Reading: A white arc appears in the gel between the central well which contained the tube B solution (‘tested serum’) and the peripheral well which contained the tube C solution (‘BSA’). For improved observation of this arc look at the dish using a transparent or against a black background.

Analysis: The tested serum and the antibodies it may contain are diffused in an aureole around the central well. The same applies to the various antigen solutions around the peripheral wells. The white precipitation arc indicates that at the meeting point between the tested serum and the BSA, a new complex is formed (antigen-antibody complexes). Hence, in the tested serum there are antibodies capable of recognising and fixing themselves on the beef serum albumen (BSA). The absence of the arc of precipitation between the tested serum and the other albumens indicates the antibodies were not able to fix on it. The antibodies are thus specific to one antigen only, that is BSA.

The presence of anti-BSA antibodies in the serum indicates the animal in which the BSA had been injected had produced antibodies to defend itself and the latter are specific to the antigen attacking the animal.

Preservation, sorting and recovery

The kit can be stored at an ambient temperature protected from direct sunlight.
The gel in the dishes can be thrown in the dustbin after possible decontamination with bleach if colonies of bacteria or mould have appeared.
The punches and dishes can be reused after washing.

5. Teaching hints

The Ouchterlony test can be incorporated in various teaching initiatives concerning the study of immune reactions.

- The students know the serum contains antibodies directed against BSA and the test allows demonstrating 'the antigen-antibody bond' and the specific nature of the antibody.
- Since the students know the white arc corresponds to an antigen-antibody bond and that the rabbit had been injected with BSA, the 'synthesis of antibodies by the body following contact with an antigen can be demonstrated' as well as 'the specific nature of antibodies vis-à-vis the antigen received.
- For evaluation purposes, it allows detecting antibodies and/or their specific nature in the serum.

In addition, the two dishes per pair allow performing two different tests such as for example, a test on an immune serum (solution B) and a non-immune serum (mimicked by the tube of distilled water).

6. After-sales service

The device is under a 2-year guarantee, it must be sent back to our workshops.
For any repairs, adjustments or spare parts please contact:

JEULIN – TECHNICAL SUPPORT
468 rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX FRANCE

+33 (0)2 32 29 40 50



Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition
du lundi au vendredi
de 8h30 à 17h30

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge
immédiatement votre appel
pour vous apporter une réponse
adaptée à votre domaine
d'expérimentation :
Sciences de la Vie et de la Terre,
Physique, Chimie, Technologie.

Service gratuit*

0 825 563 563 choix n°3**

* Hors coût d'appel. 0,15 € TTC/min à partir d'un poste fixe.

** Numéro valable uniquement pour la France métropolitaine et la Corse. Pour les DOM-TOM et les EFE, composez le +33 2 32 29 40 50.

Aide en ligne
FAQ.jeulin.fr



Direct connection for technical support

A team of experts
at your disposal
from Monday to Friday
(opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request
immediatly to provide you
with the right answers regarding
your activity field : Biology, Physics,
Chemistry, Technology.

Free service*

+33 2 32 29 40 50**

* Call cost not included.

** Only for call from foreign countries.



468, rue Jacques-Monod, CS 21900, 27019 Evreux cedex, France

Métropole • Tél : 02 32 29 40 00 - Fax : 02 32 29 43 99 - www.jeulin.fr - support@jeulin.fr

International • Tél : +33 2 32 29 40 23 - Fax : +33 2 32 29 43 24 - www.jeulin.com - export@jeulin.fr

SAS au capital de 1 000 000 € - TVA intracommunautaire FR47 344 652 490 - Siren 344 652 490 RCS Evreux