

Protocole séquentiel ou simultané pour un multi-marquage

Protocole en simultané

2 primaires d'espèce identique ou différente

2 primaires d'espèce différente et 2 secondaires de même espèce

incubation avec un **mélange** des 2 anticorps primaires de lapin et de souris ou lapin/lapin conjugués ciblant les protéines A et B humaines

blocage au sérum normal (de l'espèce source du secondaire - ici de chèvre)

incubation avec un **mélange** des 2 anticorps primaires de lapin et de souris non conjugués ciblant les protéines A et B humaines

incubation avec un **mélange** des secondaires de chèvre anti-souris et anti-lapin conjugués à des fluorophores différents (idéalement cross-adsorbés contre respectivement humain, lapin et humain, souris)

Protocole en séquentiel

2 primaires d'espèce différente et 2 secondaires d'espèce différente

2 primaires de même espèce et de sous-type différent et 2 secondaires de même espèce

2 primaires de même espèce et 2 secondaires de même espèce
1) **Sérum**
2) **Fab**

blocage au sérum normal (de l'espèce source du premier secondaire - ici de chèvre)

incubation avec l'anticorps **primaire de lapin** non conjugué ciblant la protéine A humaine

incubation avec un **secondaire de chèvre** lapin conjugué à un fluorophore (idéalement cross-adsorbés contre l'humain)

blocage au sérum normal (de l'espèce source du deuxième secondaire - ici de l'âne)

incubation avec l'anticorps **primaire de souris** non conjugué ciblant la protéine B humaine

incubation avec un **secondaire d'âne** anti-souris conjugués à un second fluorophore (idéalement cross-adsorbés contre l'humain)

blocage au sérum normal (de l'espèce source du secondaire - ici de chèvre)

incubation avec l'anticorps primaire de souris de sous type IgG1 non conjugué ciblant la protéine A humaine

incubation avec un secondaire de chèvre anti-IgG1 de souris conjugués à un fluorophore (idéalement cross-adsorbés contre l'humain)

blocage au sérum normal (de l'espèce source du secondaire - ici de chèvre)(optionnel)

incubation avec l'anticorps primaire de souris de sous type IgG2a non conjugué ciblant la protéine B humaine

incubation avec un secondaire de chèvre anti-IgG2a de souris conjugués à un second fluorophore (idéalement cross-adsorbés contre l'humain)

blocage au sérum normal (de l'espèce source des secondaires - ici de chèvre)

incubation avec l'anticorps primaire de lapin non conjugué ciblant la protéine A humaine

incubation avec un **secondaire** de chèvre anti-lapin conjugué à un fluorophore (idéalement cross-adsorbés contre l'humain)

blocage au sérum normal de l'espèce source des 2 primaires (ici lapin) pour **saturer le second site de fixation du secondaire**

incubation avec l'anticorps primaire de lapin non conjugué ciblant la protéine B humaine

incubation avec un **secondaire de chèvre IgG(H+L)** anti-souris conjugués à un second fluorophore (idéalement cross-adsorbés contre l'humain)

blocage au sérum normal (de l'espèce source des secondaires - ici de chèvre)

incubation avec l'anticorps primaire de lapin non conjugué ciblant la protéine A humaine

incubation avec un **secondaire Fab** de chèvre anti-lapin conjugué à un fluorophore (idéalement cross-adsorbés contre l'humain)

blocage au sérum normal (de l'espèce source du secondaire - ici de chèvre)(optionnel)

incubation avec l'anticorps primaire de lapin non conjugué ciblant la protéine B humaine

incubation avec un **secondaire de chèvre IgG(H+L)** anti-souris conjugués à un second fluorophore (idéalement cross-adsorbés contre l'humain)