TP 13
Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.

Recherche du seuil de sensibilité d'un test Elisa

Les objectifs de cette séance :

Réaliser une technique ELISA.

Déterminer le seuil de sensibilité d'une analyse.

Manipuler des produits sanguins d'origine humaine.

Les analyses à réaliser :

Le dosage de l'anticorps primaire.

La technique ELISA.

Le travail à rendre :

Les fiches résultats pour les deux analyses.

I Rappel sur la technique ELISA.

Le test ELISA (acronyme de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique.

Dans le test présenté ici, on recherche dans un sérum de lapin un anticorps dirigé contre la sérum-albumine bovine (BSA).. La BSA permet la capture spécifique des anticorps anti-BSA éventuellement présents dans les sérums testés. Les anticorps anti-BSA sont ensuite révélés par un anticorps traceur anti-immunoglobuline de lapin conjugué à la peroxydase. La réaction de l'enzyme avec la tétraméthylbenzidine donne un dérivé bleu dont la concentration est proportionnelle à celle des anticorps détectés.

Rappel :

Il existe 4 techniques ELISA :

Dosage d'un antigène par méthode ELISA type direct

Dosage d'un antigène par méthode ELISA de type sandwich

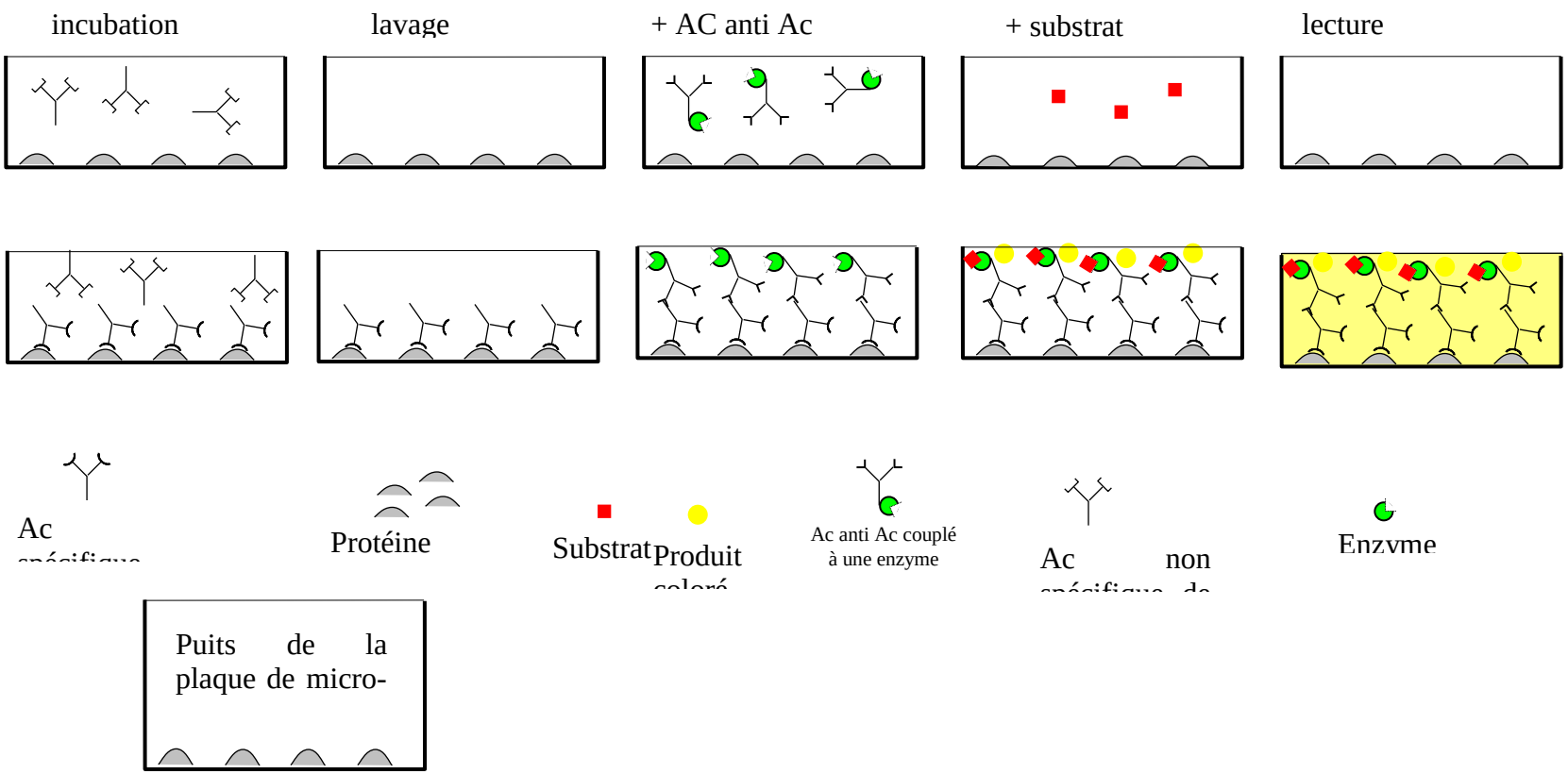
Dosage d'un antigène par méthode ELISA de type compétitif

Dosage d'un antigène par méthode ELISA de type indirect

L'étudiant doit déterminer la méthode utiliser.

Principe de la technique.

Principe du test Elisa pour ce TP.
Haut= témoin ; bas= séropositif



II L'analyse.

Le travail se déroule en **deux séquences** :

Déterminer la concentration en protéine de l'anticorps primaire par la méthode colorimétrique de Bradford.

Réaliser le test ELISA à différentes concentrations en anticorps primaire pour déterminer la quantité en anticorps primaire décelable. (Le seuil de détection)

Séquence 1

Préparer une série de 11 échantillons protéiques à base de Sérum Albumine Bovine (SAB) de 0 à 100 µg mL^{-1} de protéine. Faire les dilutions dans l'eau distillée.
(Voir l'enseignant pour explication).

Pour cela préparer une solution mère de SAB de 50mL à 100 µg mL^{-1} et faire une dilution pour obtenir une gamme de 0 à 100 µg mL^{-1} pour des volumes de 1 mL.

- Dosage colorimétrique :

La fixation de ce colorant peut se faire si la molécule à doser comporte des groupements fonctionnels basiques et/ou aromatiques.

Prendre 100 µL de chaque tube de la gamme protéique (SAB) et rajouter 2mL de réactif de BRADFORD. => Gamme étalon.

Prendre 100µL d'anticorps primaire (Présent dans le test ELISA) et faire le dosage par la méthode de BRADFORD. => Échantillon à tester.

Laisser 20 minutes précises et lire l'absorbance à 595 nm.

-Tracer la courbe A en fonction de la concentration en SAB en µg mL^{-1} .

Après lecture du graphe, <u>donner la concentration protéique de l'anticorps primaire en µg ml^{-1}</u>.

Séquence 2

***Préparation d'une gamme de dilution de l'anticorps primaire (Anticorps à doser par le test ELISA)**

A partir de la solution d'anticorps primaire, réaliser une gamme de dilution en série au 1/2 **selon les indications de l'enseignant**.

(On peut envisager de diluer 10 fois l'anticorps)

Calculer les concentrations en anticorps primaire pour chaque dilution.

(C1 est la solution d'anticorps du kit)

***Recherche du seuil de sensibilité pour le test ELISA**

Prendre 1 microplaque.

Etape 1

Ajouter 50 µL d'antigène purifié dans les puits de la bande de micro plaque.

Laisser incuber 5 minutes à température ambiante, ce qui permet à l'antigène de se lier aux puits.

Rincer les puits avec une solution de lavage PBS-tween (Wash buffer, frigo) pour bloquer les sites liant les protéines non occupés dans les puits.

Vider la bande sur un papier absorbant très propre

Etape 2

Ajouter 50 µL d'anticorps primaire C1 à tester dans 2 puits en commençant au puits 3 de la plaque. Les 2 premiers seront les puits négatifs

Faire la même chose pour C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 et C10 dans 2 puits.

Laisser 5 minutes à température ambiante

Vider les puits par retournement et rincer une fois en remplissant les puits avec le tampon PBS-tween et en les vidant par retournement

Etape 3 :

Ajouter dans chaque puits 50 µL de péroxydase de raifort liée à l'anticorps secondaire. Cet anticorps secondaire va se lier à l'anticorps primaire.

Laisser 5 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement et rincer deux fois en remplissant les puits avec le tampon PBS-tween et en les vidant par retournement

Etape 4 :

Ajouter 50µL de substrat enzymatique.

Attendre 5 minutes précises et relever les tests positifs.

Noter vos résultats de coloration et déterminer à quelle concentration l'anticorps primaire n'est plus détectée par le test ELISA.

Etape 5

Ajouter 80 µL d'acide chlorhydrique à 1 mol.L^{-1} dans chaque puits, la réaction enzymatique est stoppée et la coloration vire au jaune ce qui permet, le cas échéant, de quantifier la réaction par colorimétrie à 450 nm.

Mettre en route le lecteur de micro plaque

Suivre le protocole de l'appareil pour une lecture rapide de la plaque

Choisir la longueur d'onde : 450 nm

Imprimer vos résultats.

Vérifier que votre détermination visuelle précédente corresponde avec les résultats obtenus par le lecteur de plaque.

Conclure sur l'étude

Fiche résultats

Pour la séquence 1

Tracer la courbe étalonnage du dosage de Bradford
Déterminer la concentration en anticorps primaire.

Pour la séquence 2

Tracer une courbe de l'absorbance en fonction de la concentration en anticorps primaire à la suite de la lecture par le lecteur de plaque ELISA.

Déterminer le seuil de sensibilité du test c'est-à-dire à quelle concentration le test ELISA est positif.
Il faudra donner la concentration en anticorps primaire qui peut-être détecter en µg/ml correspondant au seuil du test.