


Vérification d'une immunisation par le test ELISA

Objectifs	Niveau possible
<p>- On cherche à mettre en évidence une réaction antigène-anticorps grâce à une technique immunologique, ELISA (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)</p> <p>- Cette technique permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.</p>	<p>Niveau : Terminale S</p> <p>Thème du BO</p> <p>- le maintien de l'intégrité de l'organisme : quelques aspects de la réaction immunitaire</p>
Matériel et solutions	Sécurité et Hygiène
<p>Avant TP: Matériels et solutions pour la préparation du TP:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Eau distillée - Eau stérile - 1 tube propre de 50mL - 1 éprouvette de 125 mL ou 150mL - Papier d'aluminium - Plusieurs pipettes de 2 et de 10 mL - 2 flacons propres de 50 mL - 1 flacon noir contenant la solution TMB non diluée (<i>Tétra-Méthyl Benzidine</i>) - 1 flacon contenant la solution de PBSX10 (<i>Tampon phosphate salin</i>) - 1 flacon contenant le sérum de lapin immunisé contre la BSA (<i>Bovine Sérum Albumine</i>) - 1 flacon contenant de l'anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à la peroxydase <p>Matériels par poste de TP :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 barrette de 8 puits au fond desquels sont fixés des antigènes - 1 micropipette pour le prélèvement de 80 µL - Des cônes propres pour le prélèvement des différentes solutions - 1 pipette plastique pour le prélèvement de la solution de lavage - 1 papier filtre - 1 chronomètre - 1 paire de gants - 1 feutre effaçable <p>Solutions par poste de TP :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 gamme de 7 solutions d'anticorps anti-BSA de concentration différentes (C1 à C7) = Ac1 - 1 solution S de sérum à tester (<i>prendre une des solutions Ac1</i>) - 1 solution d'anticorps conjugués = l'anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à la peroxydase = Ac2 - 1 solution de lavage : solution tampon PBS tween - 1 solution de substrat de l'enzyme peroxydase = TMB qui se colore en bleu en présence de la peroxydase. 	<p>Fiches toxicologiques de l'INRS des produits utilisés pour la préparation et/ou manipulation :</p> <p>Se référer régulièrement à la fiche FDS de votre fournisseur pour les mises à jour.</p> <p>Précautions de manipulations :</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>Rejet des déchets et recyclages :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Les solutions TMB, PBS, PBS tween peuvent être jetées à l'évier avec un grand volume d'eau. - Les barrettes de plastique peuvent être jetées dans les bacs jaunes de récupération du plastique après rinçage. <p>Ce TP utilise un kit ELISA, s'en tenir à la notice du fournisseur concernant les conditions de stockage, d'utilisation, de conservation et de tri de ce kit.</p>
Protocole	
<p>Préparation au laboratoire :</p> <p><u>Préparation de la solution tampon PBSx1:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Faire une dilution au 1/10ème du tube noté PBSx10 : Verser le contenu du tube PBSX10 (12mL) dans une éprouvette de 125 mL. - Rincer plusieurs fois le tube PBSX10 avec de l'eau distillée - Compléter l'éprouvette jusqu'à 120mL avec de l'eau distillée <p><u>Préparation de la solution d'anticorps anti-BSA de concentration C1 :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Prendre le microtube contenant le sérum de lapin immunisé contre la BSA, y ajouter 1,5mL de tampon PBSx1 - Prélever à l'aide d'une pipette propre de 2 mL le volume et le transférer dans un tube propre noté C1 pouvant contenir 15mL. - Recommencer 4 fois les étapes d'ajout de 1,5mL de tampon PBSX1, de prélèvement et de transfert. - Ajouter 7,5mL de tampon PBSX1 dans le tube C1, on obtient 15mL de la solution de concentration C1. 	

Préparation de la gamme de solutions d'anticorps anti-BSA de concentration différentes (C1 à C7) = **Ac1** :

Nom de la solution	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Dilution		1/2	1/2	1/3	1/3	1/4	1/4
Volume de la solution	15mL	7,5mL de C1	7,5mL de C2	6mL de C3	6mL de C4	4mL de C5	4mL de C6
Volume de tampon PBSx1	0	7,5mL	7,5mL	12mL	12mL	12mL	12mL

Préparation de la solution d'anticorps conjugués = **Ac2** :

- **Prendre** le microtube contenant l'anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à la peroxydase, y **ajouter** 1,5mL de tampon PBSx1
- **Prélever** à l'aide d'une pipette propre de 2 mL le volume et le **transférer** dans un tube propre noté Ac2 pouvant contenir 30mL.
- **Recommencer** 4 fois les étapes d'ajout de 1,5mL de tampon PBSX1, les opérations de prélèvement et de transfert.
- **Ajouter** 22,5mL de tampon PBSX1 dans le tube C1, on obtient 30mL de la solution de concentration C1.

Préparation de la solution révélatrice de l'enzyme = **TMB** :

- **Entourer** d'aluminium un tube plastique propre de 50 mL, **verser** le contenu du flacon noir noté TMB (10mL)
- **Ajouter** 30ml d'eau stérile, **boucher** et bien **agiter**, on obtient 40 mL de la solution révélatrice TMB.
- **Conserver** à l'abri de la lumière à 4°C

Réalisation de l'expérience :

- * **Remarque** : Le sérum d'un individu a testé sera prise dans la gamme Ac1 afin de déterminer si il y a immunisation ou pas. Pour ce TP on choisit une concentration seuil (C5) en-dessous duquel l'individu est considéré comme non immunisé.

- **Repérer** l'encoche de la barrette et **numéroter** les puits de 1 à 8.

Numérotation des puits	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration d'Ac	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	S
Volume de la solution = Ac1	80µL de C1	80µL de C2	80µL de C3	80µL de C4	80µL de C5	80µL de C6	80µL de C7	
* Volume de sérum à tester								80µL
	- Laisser incuber 15 minutes à température ambiante							
	- Vider la barrette en prenant garde de ne pas contaminer les cupules des puits - Tamponner les puits sur du papier filtre pour éliminer l'excès de produits							
	- Laver les puits en les remplissant avec la solution de lavage PBS Tween - Vider les immédiatement - Répéter 2 fois l'opération							
Volume de la solution =Ac2	80µL	80µL	80µL	80µL	80µL	80µL	80µL	80µL
	- Laisser incuber 15 minutes à température ambiante							
	- Vider la barrette en prenant garde de ne pas contaminer les cupules des puits - Tamponner les puits sur du papier filtre pour éliminer l'excès de produits							
	- Laver les puits en les remplissant avec la solution de lavage PBS Tween - Vider les immédiatement - Répéter 2 fois l'opération							
Solution révélatrice = TMB	80µL	80µL	80µL	80µL	80µL	80µL	80µL	80µL
	- Faire une lecture de la coloration des puits dans les 5 minutes maxi - Passer les 5 minutes, les puits présenteront tous la même couleur							

- Pour le tri du matériel ainsi que l'élimination des solutions, voir «**Sécurité et Hygiène** ».

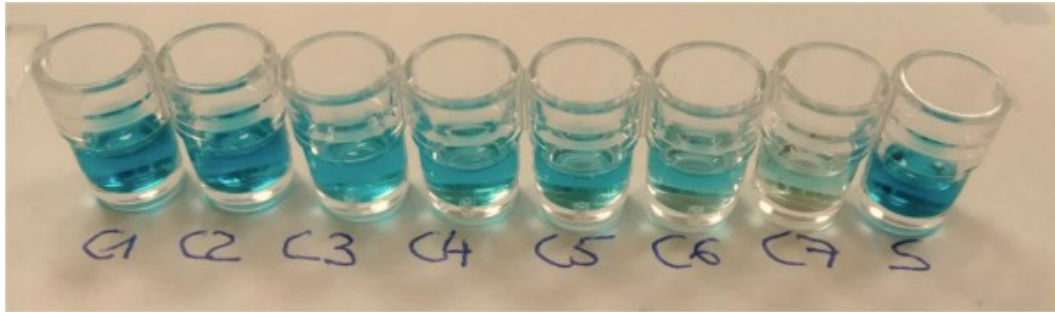
Résultats

Dans ce TP, on cherche à déterminer si un individu (*Sérum S*) doit être vacciné ou non vis à vis d'une maladie, on teste alors son immunité vis à vis de l'antigène recherché.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration d'anticorps à doser : plus la concentration d'anticorps est élevée, plus la coloration est intense.

Le seuil au-dessus duquel l'individu est considéré comme immunisé est dans l'exemple choisit, la concentration C5.

Concentration en $\mu\text{g d'Ac/mL}$	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	S
	Intensité de coloration pour le sérum à tester d'un individu immunisé				Concentration seuil	Intensité de coloration pour le sérum à tester d'un individu non immunisé		?



Photographie de la gamme de dilution des solutions d'anticorps anti-BSA et du sérum S après addition de la solution révélatrice

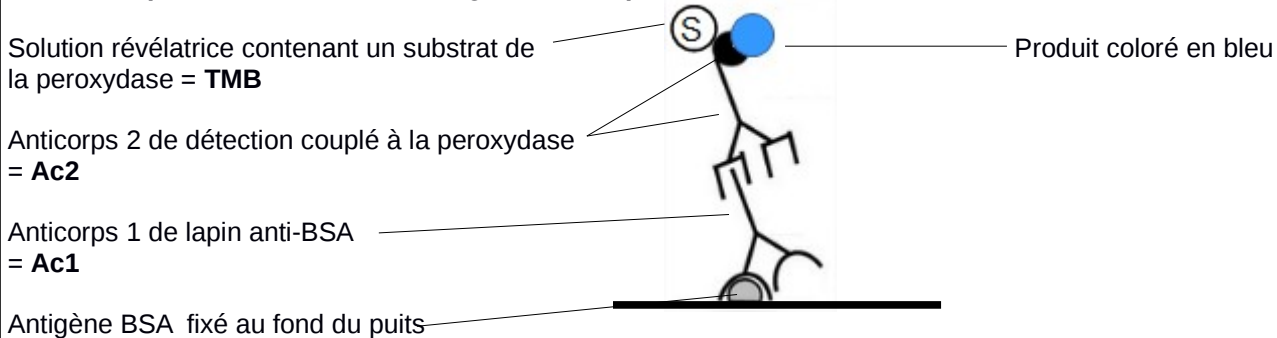
Dans notre exemple choisit, le sérum S présente une intensité de coloration proche de la solution C1.

On sait que l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en anticorps. Plus la couleur est intense, plus il y a présence d'anticorps.

La concentration seuil en-dessous duquel l'individu est considéré comme non immunisé est C5.

Donc notre individu S est bien immunisé vis à vis de la maladie étudiée et ne nécessite pas d'être vacciné à nouveau.

Schéma explicatif de la réaction antigène/anticorps :



Remarques et ressources complémentaires

Toutes les solutions doivent être préparées peu de temps avant le TP et se conservent à 4°C au frigo. Le TP peut se décliner en plusieurs versions.

-Aide pour l'utilisation de la pipette automatique.

<https://www.bioutils.ch/informations-pratiques/utilisation-des-micropipettes>

Informations

Auteur: MOUFFLE Florence, Technicienne de laboratoire au lycée Ambroise Paré de LAVAL, le 28/02/2019