

A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :
 - Ouvrir le carton
 - 📌 Placer le sachet noté AJ au congélateur à - 20°C 📌
 - 📌 Placer le sachet noté AK au réfrigérateur à + 4°C 📌

Attention : Ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation des produits du kit de 6 mois.

- Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité**

COMPOSITION (pour 32 binômes) :

- **1 sachet noté AJ** contenant 3 microtubes bouchés :
 - 1 microtube à bouchon vert contenant 25 µL d'anticorps anti-Immoglobuline de lapin couplé à la peroxydase
 - 1 microtube à bouchon jaune contenant 50 µL de sérum de lapin immunisé contre la BSA
 - 1 microtube à bouchon noir contenant 50 µL de sérum de lapin non immunisé
- **1 sachet noir** de 12 barrettes de micro-titration avec leurs supports
(👁👁 ATTENTION 👁👁 : pour une longue conservation, garder les plaques à l'abri de la lumière)
- **1 sachet noté AK** contenant :
 - 1 tube à bouchon rouge contenant 10 ml d'eau stérile
 - 1 tube noir contenant 5 ml de TMB
(👁👁 ATTENTION 👁👁 : le TMB doit être gardé à l'abri de la lumière)
 - 1 tube à fond conique de 50 ml de PBSx10
 - 1 tube vide de 10 ml
 - 1 microtube à bouchon rose contenant 250 µL de PBSTween 20

MATERIEL NECESSAIRE :

- Micropipette de 10 à 100 µL ou compte-gouttes calibré en plastique (goutte de 40 µL)
- Pipettes de 2 et de 10 ml, poire à pipeter ou Pipump
- Eau distillée
- Tubes de 50 ml
- Eprouvette de 500 ml
- Papier aluminium
- Flacon de 250 ml

MATERIEL CONSEILLE :

Pour bloquer la réaction de révélation du test Elisa :

Acide sulfurique ou chlorhydrique

Pour aller plus loin :

Spectrophotomètre pour mesurer l'absorbance et cuve ou appareil photo numérique et logiciel gratuit MESURIM

OBJECTIFS COGNITIFS

L'intérêt général de la manipulation est de montrer (en une séance de TP) que l'on peut non seulement détecter mais aussi doser une protéine (ici un anticorps) dans une solution ou un sérum (un anticorps anti-HIV dans le cas du test du SIDA) grâce à la technique ELISA.

But du test ELISA que nous proposons :

Le test consiste à doser un anticorps de lapin anti-BSA à l'aide d'un support tapissé de BSA (Bovine Serum Albumin) et d'un anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à la peroxydase.

Les anticorps sont généralement coûteux, les barrettes ou plaques de micro-titration permettent de travailler avec de petits volumes.

RAPPELS

DEFINITION ET VOCABULAIRE :

Le test E.L.I.S.A. (Enzym Linked ImmunoSorbent Assay) est un test immunologique classiquement utilisé pour la détection et le dosage protéique.

Note : Le dosage de protéines par ELISA concerne généralement les antigènes.

Pour les anticorps, étant donné l'hétérogénéité de la réponse anticorps, on parle plutôt de titrage (titre : inverse de la dernière dilution positive) => tests semi-quantitatifs.

CONTEXTE D'UTILISATION DU TEST ELISA :

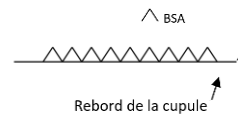
Le test ELISA est utilisé lors du test de dépistage du virus du SIDA :

Ce test de dépistage s'effectue en deux étapes dont la première est un test E.L.I.S.A. permettant de détecter les anticorps produits par l'organisme et dirigés contre le virus. Les tests ELISA HIV permettent de déterminer la présence ou l'absence de l'Ag P24 et/ou des anticorps anti HIV1/HIV2, par comparaison à une valeur seuil (résultats qualitatifs).

La deuxième étape est un test de confirmation par immuno-transfert (Western blot).

DESCRIPTION DES ETAPES DU KIT :

- La **première étape** (réalisée par nos soins) est nommée "Coating", durant cette étape la BSA va se fixer au fond des cupules (par effet électrostatique). Nous utilisons une solution très concentrée de BSA qui va tapisser le fond des cupules et occuper tous les sites de fixation protéique. Les cupules sont ensuite lavées à l'aide d'un tampon et sont alors prêtes à l'emploi.



Pour mieux comprendre le Coating :

200µL d'une solution de BSA à 20g/L ont été distribués dans chacune des cupules. Les barrettes ont ensuite été incubées à 4°C durant 24 heures puis lavées pour enlever l'excès de BSA. Cette étape permet la fixation des protéines au fond des cupules.

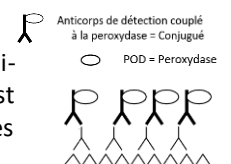
L'anticorps à doser (anti-BSA) pourra ensuite se fixer à la BSA.

La fixation de la BSA au fond des cupules est un phénomène électrostatique propre à n'importe quel type de protéine (donc également aux anticorps). Il est primordial pour réaliser un bon dosage que la cupule soit tapissée de BSA afin d'éviter que des anticorps se fixent au fond de la cupule et non à la protéine. C'est la raison pour laquelle nous utilisons une solution très concentrée de BSA.

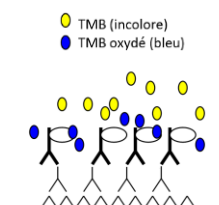
- La **deuxième étape** correspond à la fixation de l'anticorps à doser. On incube dans les cupules 80µL de la solution à doser durant 15 minutes. Puis les cupules sont lavées avec un tampon pour enlever les quelques anticorps non fixés.



- Lors de la troisième étape, l'anticorps de détection (ou conjugué) se fixe à l'anticorps anti-BSA. Il est couplé à une enzyme : la peroxydase. Une solution d'anticorps de détection est incubée dans les cupules durant 15 minutes. Puis les cupules sont lavées pour enlever les quelques anticorps non fixés.



- La **dernière étape** est la détection des anticorps fixés. On incube dans les cupules une solution révélatrice contenant un substrat de la peroxydase : le TMB (tétra-méthyl-benzidine) qui se colore en bleu en présence de l'enzyme. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité de peroxydase présente dans la cupule, donc directement proportionnelle à la concentration d'anticorps à doser.



Dans la composition de barrette proposée, nous utiliserons une gamme de concentration de l'anticorps à doser pour montrer que plus sa concentration en solution est importante, plus la coloration est visible. Nous lirons les intensités contre deux témoins.

Nous vous proposons de réaliser d'autres témoins (facultatifs) pour vérifier toutes les étapes du test et avoir une réelle démarche de laboratoire.

PREPARATION

PREPARATION DU TAMPON PBSX1 :

Diluer d'un facteur 10 le contenu du tube noté PBSx10 provenant du sachet noté AK stocké au réfrigérateur (possibilité de réaliser cette étape quelques jours à l'avance et de conserver le produit dilué à 4°C pendant 4 semaines).

- Verser le PBSx10 dans une éprouvette de 500 ml
- Rincer le tube qui a contenu le PBSx10 une première fois avec un peu d'eau déminéralisée
- Récupérer cette eau de lavage dans l'éprouvette
- Renouveler l'opération plusieurs fois en veillant à ne pas dépasser un volume total de 500 ml dans l'éprouvette
- Compléter l'éprouvette avec de l'eau distillée jusqu'à 500 ml
- Transférer dans un flacon marqué PBSx1

Conserver 50 ml pour la préparation des solutions d'anticorps, utiliser les 450 ml restants pour la préparation du PBS TWEEN.
Conserver au réfrigérateur à **+4°C** sans excéder une durée d'1 mois.

PREPARATION DU PBS TWEEN :

- A l'aide d'une micropipette prélever 500 µL de tampon PBS1 et les ajouter au microtube à bouchon rose.
- Prélever le volume du microtube à bouchon rose et l'ajouter dans les 450 ml de PBSx1.
- Renouveler l'opération plusieurs fois pour récupérer la totalité du microtube.
- Transférer dans un flacon noté PBSTween

Conserver au réfrigérateur à **+4°C** sans excéder une durée d'1 mois

PREPARATION DE LA SOLUTION D'ANTICORPS ANTI-BSA = TEMOIN POSITIF

Diluer au PBSx1 le contenu du microtube à bouchon jaune du sachet AJ stocké au congélateur (possibilité de réaliser cette étape quelques jours avant le TP et conserver 24 heures à 4°C ou 4 semaines à -20°C)

👁👁 ATTENTION 👁👁 : la dilution se fait avec le PBS x1 (dilué au point 1) et non avec le PBS tween

- Ajouter 1,5 ml de tampon PBS x1 (préparé au point 1) dans le microtube à bouchon jaune du sachet noté AJ conservé au congélateur
- Prélever grossièrement à la pipette le mélange et le placer dans un tube propre pouvant contenir au moins 10 ml (⇒ conseil : utiliser un tube de 50 ml en plastique).
- Noter ce tube témoin positif.
- Recommencer 4 fois l'opération d'ajout de 1,5 ml de PBSx1 dans le microtube et les opérations de prélèvement et de transfert dans le tube noté témoin positif.
- Ajouter 2,5 ml de tampon PBSx1 dans le tube noté témoin positif.
- On obtient 10 ml de solution de concentration témoin positif.

Si le TP a lieu dans moins de 24 heures, conserver à **4°C**.

Si le TP a lieu quelques jours plus tard, conserver à **-20°C** sans excéder 4 semaines.

PREPARATION DE LA SOLUTION D'ANTICORPS DE DETECTION :

Dilution au PBSx1 du contenu du microtube à bouchon vert du sachet noté AJ stocké au congélateur (possibilité de préparer cette solution quelques jours à l'avance et conserver à 4°C pendant 24h ou à -20°C pendant 4 semaines)

👁👁 ATTENTION 👁👁 : la dilution se fait avec le PBS x1 (dilué) et non avec le PBS tween

- Ajouter 1,5 ml de tampon PBS x1 (préparé précédemment) dans le microtube à bouchon vert du sachet noté AJ conservé au congélateur
- Prélever grossièrement à la pipette le mélange et le placer dans un tube propre pouvant contenir au moins 15 ml (⇒ conseil : utiliser un tube à fond conique en plastique propre de 50 ml).
- Noter ce tube « Ac détection ».
- Recommencer 4 fois l'opération d'ajout de 1,5 ml de PBSx1 dans le microtube et les opérations de prélèvement et de transfert dans le tube noté « Ac détection »
- Ajouter 7,5 ml de tampon PBSx1 dans le tube noté « Ac détection ». On obtient 15 ml de solution d'anticorps de détection.

Si le TP a lieu dans moins de 24 heures, conserver à **4°C**.

Si le TP a lieu quelques jours plus tard, conserver à **-20°C** sans dépasser 1 mois.

PREPARATION DE LA SOLUTION REVELATRICE TMB :

Diluer au ½ le contenu du tube noir de TMB stocké dans le sachet AK au réfrigérateur (étape à réaliser juste avant le TP sans exposer à la lumière ni à d'éventuelles traces de détergeant)

- Entourer d'aluminium le tube en plastique vide de 10 ml (fourni dans le sachet AK au réfrigérateur) de manière à protéger le contenu de la lumière
- Verser, dans ce tube le contenu du tube noir de TMB stocké dans le sachet AK placé au réfrigérateur
- Ajouter 5 ml d'eau stérile (tube à bouchon rouge dans le sachet AK stocké au réfrigérateur)
- Boucher et bien agiter

Conserver à l'abri de la lumière à **4°C** (pas plus d'une journée)

👁️ **ATTENTION** 👁️ : Pour éviter toute dégradation du TMB, il est nécessaire d'utiliser un tube neuf sans trace de détergeant : le tube en plastique de 10 ml fourni est à usage unique et parfaitement adapté pour la dilution du TMB. De plus, le TMB est très sensible à la lumière : il ne faut en aucun cas le préparer dans un tube sans protection d'aluminium.

PREPARATION DU SERUM NON-IMMUNISE ; TEMOIN NEGATIF

(Possibilité de réaliser cette étape quelques jours avant le TP et conserver 24h à 4°C ou 4 semaines à -20°C) : diluer, dans 10 ml de PBS x1, le contenu du microtube à bouchon noir stocké dans le sachet AJ au congélateur.

- Ajouter 1,5 ml de tampon PBS x1 (préparé au point 1) dans le microtube à bouchon noir du sachet noté AJ conservé au congélateur
- Prélever grossièrement à la pipette le mélange et le placer dans un tube propre pouvant contenir au moins 10 ml (⇨ **CONSEIL** ⇨ : utiliser un tube à fond conique en plastique propre de 50 ml).
- Noter ce tube témoin négatif
- Recommencer 4 fois l'opération d'ajout de 1,5 ml de PBSx1 dans le microtube et les opérations de prélèvement et de transfert dans le tube noté témoin négatif
- Ajouter 2,5 ml de tampon PBSx1 dans le tube noté témoin négatif
- On obtient 10 ml de témoin négatif.

Si le TP a lieu dans moins de 24 heures, conserver à **4°C**.

Si le TP a lieu quelques jours plus tard, conserver à **-20°C** sans dépasser 1 mois.

📄 **NOTE** 📄 :

Les quantités d'anticorps et de sérum sont faibles, pour vous assurer de récupérer la totalité du volume contenu dans les tubes fournis, nous vous conseillons de procéder comme il est préconisé dans la notice en rinçant plusieurs fois le tube au lieu de directement pipeter dans le tube.

MANIPULATION :

Les barrettes fournies ont déjà subi l'étape de « coating », c'est-à-dire qu'elles sont prêtes à l'emploi : la BSA est fixée au fond des puits. Fournir 3 cupules par binôme.

Le puits 1 sera le témoin négatif, le puits 2 sera le témoin positif, le puits 3 sera le sérum à tester.

INCUBATION DE L'ANTICORPS OU DU SERUM NON-IMMUNISE DANS LES CUPULES ET LAVAGE

REPLISSAGE DES CUPULES :

- Dans le puits 1, mettre 80 µL (ou 2 gouttes de 40µL avec un compte-gouttes calibré) du témoin négatif
- Dans le puits 2, mettre 80 µL (ou 2 gouttes de 40µL avec un compte-gouttes calibré) du témoin positif
- Dans le puits 3, mettre 80 µL (ou 2 gouttes de 40µL avec un compte-gouttes calibré) du sérum à tester (choisir entre le témoin négatif et le témoin positif pour faire le sérum à tester)

INCUBATION :

- Incuber 15 minutes à température ambiante

LAVAGE :

- Vider les cupules par retournement en prenant garde à ce que les contenus des cupules ne contaminent pas le contenu des autres cupules.
- Laver deux fois au PBS tween en remplissant à la pipette les cupules sans les faire déborder.
- Vider les cupules par retournement en prenant à nouveau garde à ne pas contaminer le contenu des autres cupules.

INCUBATION DE L'ANTICORPS CONJUGUE ET LAVAGE :

- Déposer 80µL (ou 2 gouttes de 40µL) de la solution d'anticorps de détection dans toutes les cupules
- Incuber 15 minutes à température ambiante
- Vider les cupules en prenant garde à ne pas contaminer le contenu des autres cupules.
- Laver deux fois au PBS tween en remplissant à la pipette les cupules sans les faire déborder.
- Vider les cupules par retournement en prenant à nouveau garde à ne pas contaminer le contenu des autres cupules.

REVELATION :

- Enlever l'aluminium protégeant le tube de TMB de la lumière pour vérifier que le TMB n'est pas bleu

DEPOT DE LA SOLUTION DE REVELATION :

Déposer 80 µL (ou 2 gouttes de 40µL au compte-gouttes calibré) de la solution de TMB substrat de la peroxydase.

INCUBATION :

Incuber 5 minutes à température ambiante

INTERPRETER LES RESULTATS RAPIDEMENT :

Dès le dépôt du TMB, la réaction de révélation commence : la coloration bleue apparaît.

Vous disposez d'environ 5 minutes pour observer les colorations de tous les puits.

👁️ **ATTENTION** 👁️ : Au-delà de 5 minutes, les puits présenteront tous la même intensité de bleu. En effet, la réaction enzymatique de révélation continue car le TMB est en excès. Une fois une molécule de TMB oxydée, le site actif de l'enzyme est libéré. Une nouvelle molécule de TMB se fixe à l'enzyme et est oxydée à son tour.

↔ **Conseil** ↔ pour quantifier l'intensité des différentes colorations : Vous pouvez prendre une photographie des barrettes avec un appareil numérique en veillant à ce que les colorations des puits soient bien visibles. A l'aide du logiciel MESURIM disponible gratuitement sur le site de l'Académie d'Amiens, vous pouvez mesurer les intensités lumineuses des puits.

POSSIBILITE DE STOPPER LA REACTION DE COLORATION :

(dans le cas où les résultats ne sont pas exploités tout de suite)

- Ajouter dans les puits 80 µL de 1N HCL ou 0,0625N d'acide sulfurique (l'acide bloque l'enzyme) : le TMB vire au jaune.

⇒ **CONSEILS** ⇒ pour quantifier l'intensité des différentes colorations :

- Vous pouvez lire la mesure d'absorbance en spectrophotométrie à 450 nm. Il suffit de transvaser à la pipette, dans une cuve adaptée, le contenu de puits identiques.
- Vous pouvez prendre une photographie des puits avec un appareil numérique en veillant à ce que les colorations soient bien visibles. A l'aide du logiciel MESURIM disponible gratuitement sur le site de l'Académie d'Amiens, vous pouvez mesurer les intensités lumineuses des puits.

👁️ **ATTENTION** 👁️ : Les volumes sont très petits et s'évaporent rapidement (une barrette laissée la nuit sur la pailleuse est vide le lendemain). Scotcher hermétiquement les barrettes et conserver au réfrigérateur.

FICHE SECURITE

Ne pas ingérer les produits contenus dans ce kit. En cas de contact direct avec la peau ou les yeux, rincer à l'eau claire.

A cette concentration, le TMB n'est pas un produit dangereux mais le port de gants, de lunettes et d'une blouse est recommandé. Le PBS tween et les anticorps ne requièrent pas de précautions d'utilisation particulières. Cependant nous vous recommandons de les utiliser avec des gants pour éviter tout contact direct.

FICHE CONSERVATION

Le PBSx10 se conservent à +4°C pendant 3 mois environ. La solution diluée se garde à +4°C pendant 1 mois au plus. Dès qu'un précipité blanc apparaît, le PBS 10X et dilué n'est plus valable.

Le PBSTween se conservent à +4°C pendant 1 mois au plus.

Le sachet A contenant 3 microtubes peut être conservé à -20°C pendant 6 mois :

- 1 microtube à bouchon rouge contenant 110µL de sérum de lapin immunisé contre la BSA -20°C
- 1 microtube à bouchon bleu contenant 50 µL d'anticorps anti-Immunoglobuline de lapin couplé à la peroxydase -20°C
- 1 microtube à bouchon naturel contenant 110µL de sérum de lapin non immunisé -20°C

Les solutions diluées à partir des tubes du sachet A se conservent 24 heures à 4°C ou bien 4 semaines à -20°C.

Le tube noir contenant 10 ml de TMB peut être conservé à +4°C pendant environ 6 mois. Le TMB dilué se conserve 24 heures à 4°C.

👁️ **ATTENTION** : le TMB doit être gardé à l'abri de la lumière. Dès que le TMB se colore, il n'est plus valable.

Le sachet noir de 24 barrettes de microtitration avec leurs supports peuvent être conservées à +4°C pendant 6 mois.

👁️ **ATTENTION** : pour une longue conservation, garder les plaques à l'abri de la lumière.

FICHE TRI ET RECUPERATION

Le TMB, le PBS et le PBS tween peuvent être jetés à l'évier avec une grande quantité d'eau. Les barrettes de plastique peuvent être jetées dans les bacs de récupération du plastique une fois rincées. Elles sont recyclables.