

14. ELISA

La technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (en anglais Enzyme-Linked Immuno Assay) ou ELISA est principalement utilisée en immunologie afin de détecter et/ou doser la présence de protéines, d'anticorps ou d'antigènes, dans un échantillon. Elle est notamment utilisée pour le dépistage du HIV, et permet de déterminer la concentration sérique d'anticorps dirigés contre le virus.

Il existe plusieurs types de tests ELISA mais le plus couramment utilisé et celui que nous proposons pour cette expérience est le test **ELISA indirect**.

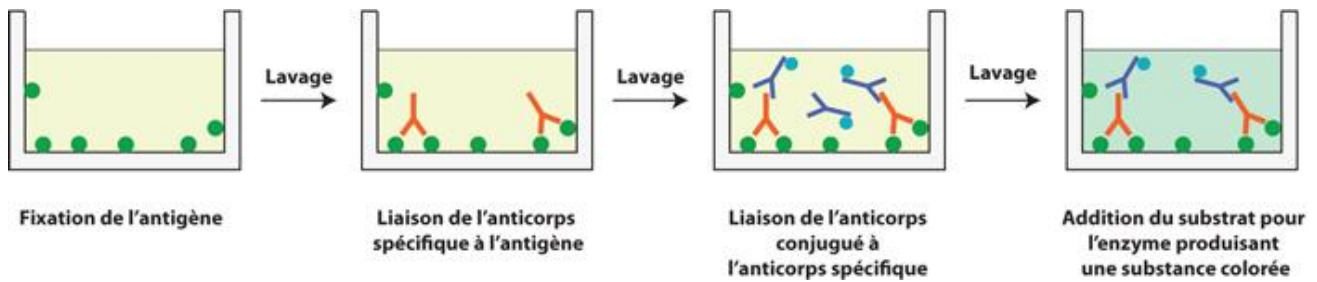
EXPERIENCE

Le principe de l'ELISA indirect consiste à détecter la présence d'un anticorps spécifique dans un échantillon. Pour cela nous avons besoin :

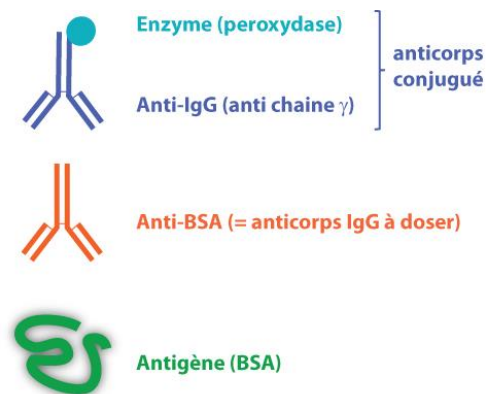
- D'un antigène connu spécifique à l'anticorps recherché
- D'un échantillon à analyser
- D'un anticorps secondaire anti IgG couplé à une peroxydase (cet anticorps va reconnaître spécifiquement les anticorps IgG)
- Du substrat spécifique à l'enzyme, ici du TMB.

Le test comporte quatre étapes principales :

- 1) **Fixation de l'antigène** : L'antigène connu, spécifique à l'anticorps recherché, est incubé sur une plaque de microtitration. L'antigène va se fixer de manière électrostatique au fond des puits. Un lavage des puits avec une solution tampon permet d'éliminer les antigènes non fixés.
- 2) **Fixation de l'anticorps à doser** : On incube notre échantillon à doser (sérum contenant l'anticorps), ainsi que nos standards (solution contenant des concentrations connues d'anticorps). Les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés.
- 3) **Fixation de l'anticorps de détection** : On incube ensuite un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. C'est un anti IgG qui va donc reconnaître l'anticorps primaire. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.
- 4) **Révélation** : On incube un substrat spécifique à l'enzyme qui, si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), va être transformé et induire une coloration bleue. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés.

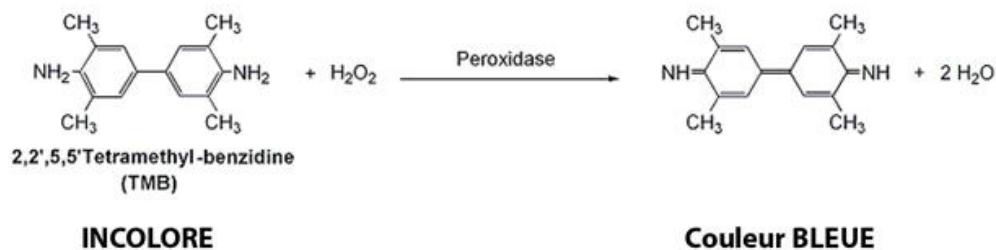


Dans cette expérience les anticorps à titrer vont être des IgG anti-BSA. L'antigène sera donc la BSA (albumine de sérum de bovin). L'enzyme conjuguée à l'anticorps secondaire est une peroxydase.



Peroxydase :

La peroxydase est une enzyme de type oxydase, permettant la dégradation des peroxydes. L'oxydation de divers substrats permet d'obtenir un composé chromogénique comme produit final.



C'est en 1810, avant même que la notion d'enzyme eut été avancée, qu'on constatait que des extraits de certaines racines de plantes avaient la propriété d'oxyder (donc de recolorer) la teinture de gaïac (incoloré à l'état réduit) en présence d'eau oxygénée. Actuellement, la source la plus commune de peroxydase est la racine de radis ou de raifort.

Thèmes: anticorps, antigènes, peroxydase,

PROTOCOLE

*Note : L'étape 1. est à effectuer la veille de l'expérience par l'enseignant ou le préparateur.
La dilution des anticorps et la préparation de la courbe de standards et de l'échantillon inconnu (étape 2) est à préparer le jour même par l'enseignant.*

1. Fixation de l'antigène

Vous recevez une solution de BSA à 5g/l ainsi qu'une plaque 96 puits détachable en colonnes de 8 tubes. Chaque binôme fera l'expérience avec une barrette de 8 tubes.

- Ajouter 100 µl dans les puits (autant de colonnes que de binômes)
- Placer un film plastique sur la plaque et incuber la nuit à 4° (réfrigérateur)
- Le lendemain détacher les colonnes de 8 et les distribuer à chaque binôme

2. Dilution des anticorps et préparation de la courbe standard

- Prendre 6 tubes 15 ml et les noter respectivement C1 à C6.
- Préparer les dilutions des standards selon le tableau ci-dessous :

Courbe standard

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Anticorps anti BSA	10 µl	2 µl	1 µl	1 µl	1 ml de C4	200 µl de C5
PBS 1x	990 µl	998 µl	1999 µl	5 ml	1 ml	1800 µl
Total par classe	1 ml	2 ml	2 ml	4 ml	2 ml	2 ml

→ Distribuer 100 µl de chaque standard par binôme (dans un tube Eppendorf)

Échantillon inconnu

Avec le surplus des standards C1 à C6, préparer pour chaque binôme un aliquot contenant 100 µl de l'une des dilutions ci-dessus. L'échantillon inconnu n'a pas besoin d'être le même pour tous les binômes.

Anticorps secondaire

- Dans un tube 15 ml, diluer 1 µl d'anticorps anti-lapin dans 10 ml de PBS 1x.
- Bien mélanger et préparer des aliquots de 1 ml par binôme.

Chaque binôme reçoit 8 tubes contenant :
- 100 µl de chacun des standard (tube C1 à C6)
- 100 µl d'eau distillée stérile (témoin négatif)
- 100 µl d'un échantillon inconnu

3. Fixation de l'anticorps anti-BSA (anticorps primaire)

Les puits 1 à 6 sont utilisés pour la courbe standard, le puits 7 est le témoin négatif et enfin le puits 8 sera pour notre échantillon à doser.

- Jeter le reste de liquide à l'évier ou dans un bécher.
- Rincer les puits avec 100 µl de PBS – 0.02% Tween. Répéter l'opération 3 fois.
- Ajouter 80 µl de chacun des 6 standards, respectivement C1 à C6 dans les puits 1 à 6.
- Ajouter 80 µl d'H₂O dans le puits 7 (témoin négatif) et 80 µl de l'échantillon inconnu dans le puits 8.
- Incuber 30 minutes à RT

4. Fixation de l'anticorps de détection (anticorps secondaire conjugué à la peroxydase)

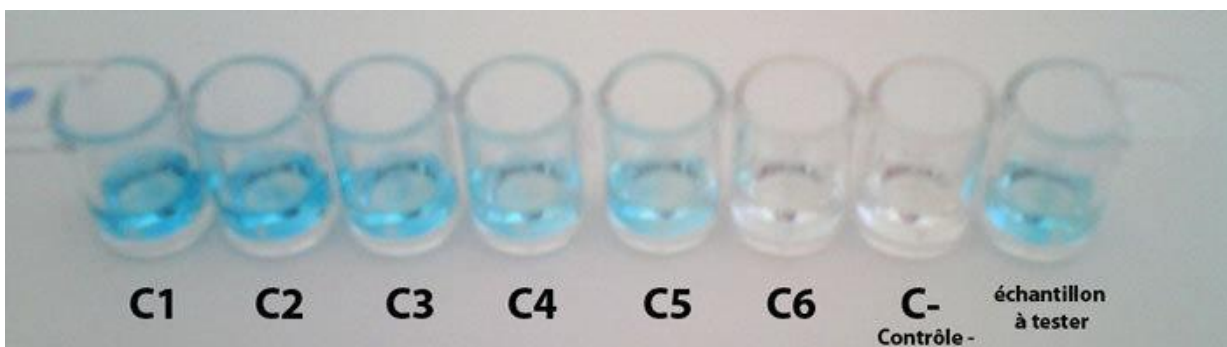
- Jeter le reste de liquide à l'évier ou dans un bêcher.
- Rincer les puits avec 100 µl de PBS – 0.02% Tween. Répéter l'opération 3 fois.
- Ajouter 80 µl de l'anticorps secondaire dans chacun des puits.
- Incuber 20 minutes à RT

5. Révélation

- Jeter le reste de liquide à l'évier ou dans un bêcher.
- Rincer les puits avec 100 µl de PBS – 0.02% Tween. (3x) puis 1 fois avec PBS.
- Ajouter 80 µl de TMB dans chacun des puits.
- Laisser incuber 5 minutes puis interpréter les résultats.

6. Analyse des résultats

D'après l'intensité de la coloration bleue déterminer le titre d'anticorps anti-BSA dans votre échantillon.



C1 = 1/100

C2 = 1/500

C3 = 1/1000

C4 = 1/5000

C5 = 1/10'000

C6 = 1/ 100'000

Note :

- Les deux tubes contenant les anticorps ainsi que la BSA doivent être stockés à -20°.
- Le TMB se garde à 4° à l'abri de la lumière.