

## 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 ce TP est le test **ELISA indirect**.

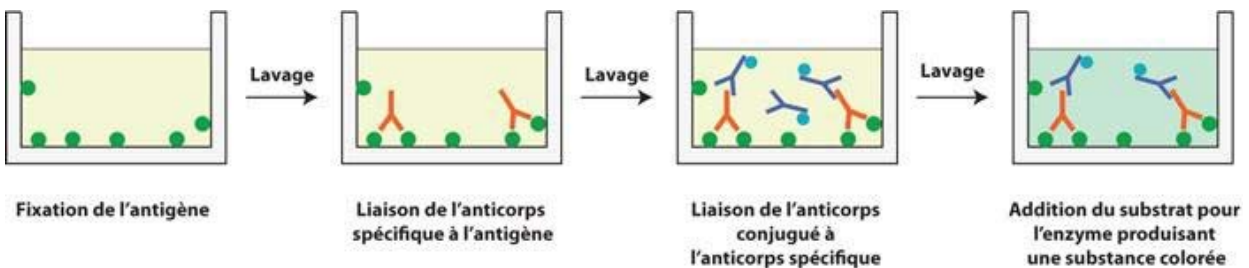
### Test ELISA

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

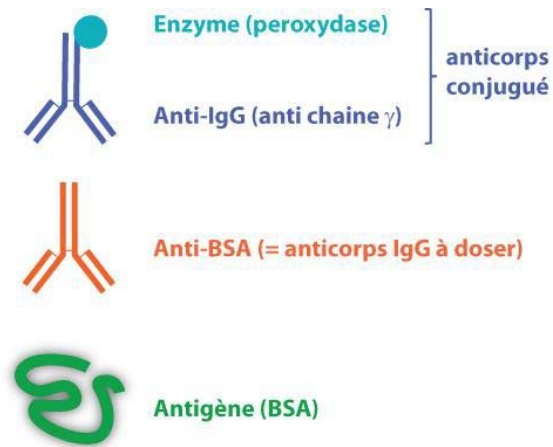
- D'un antigène connu spécifique à l'anticorps recherché
- D'un échantillon à analyser
- D'un anticorps secondaire anti IgG couplé à une peroxydase (cet anticorps va reconnaître spécifiquement les anticorps IgG)
- Du substrat spécifique à l'enzyme, ici du TMB.

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. Ils sont ensuite lavés pour enlever 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 proportionnel à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés.

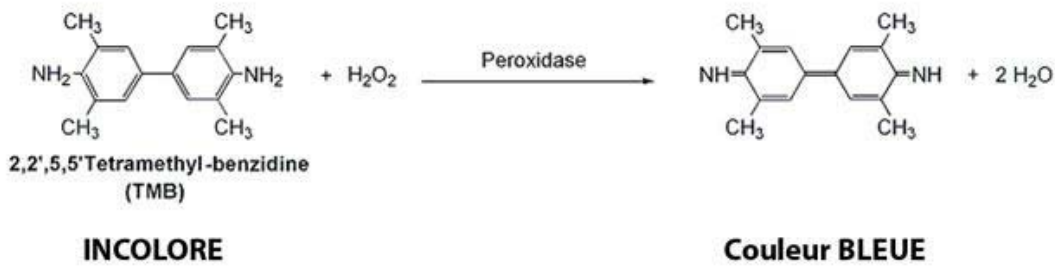


Dans cette expérience les anticorps à titrer vont être des IgG anti-BSA. L'antigène sera donc la BSA (albumine de sérum de bovin). L'enzyme conjuguée à l'anticorps secondaire est une peroxydase.



**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,

## L'EXPERIENCE

Pour une classe vous recevez une plaque de 96 puits détachable en colonne de 8 tubes.  
Chaque binôme fera l'expérience avec une barrette de 8 tubes

## PROTOCOLE

### 1) Fixation de l'antigène

A effectuer par l'enseignant ou le préparateur la veille de l'expérience

Vous recevez une solution de BSA à 5g/l

- Ajouter 100 µl dans les puits (autant de colonne 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
- Préparer les dilutions des standards et de l'anticorps secondaire selon le tableau ci-dessous :

### Dilution des anticorps

Les dilutions sont à effectuer par l'enseignant. Le volume final de chaque dilution est calculé pas classe. Il convient donc ensuite de faire des aliquots pour chaque binôme.

### 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	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

### Anticorps secondaire:

	Par classe
Anticorps anti-rabbit	1 µl
PBS	10 ml

→ Préparer des aliquots de 1 ml par binôme

2) 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'H<sub>2</sub>O dans le puits 7 (témoin négatif) et 80 µl de l'échantillon inconnu dans le puits 8.
- Incuber 30 minutes à RT

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

- 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 l'anticorps secondaire dans chacun des puits.
- Incuber 20 minutes à RT

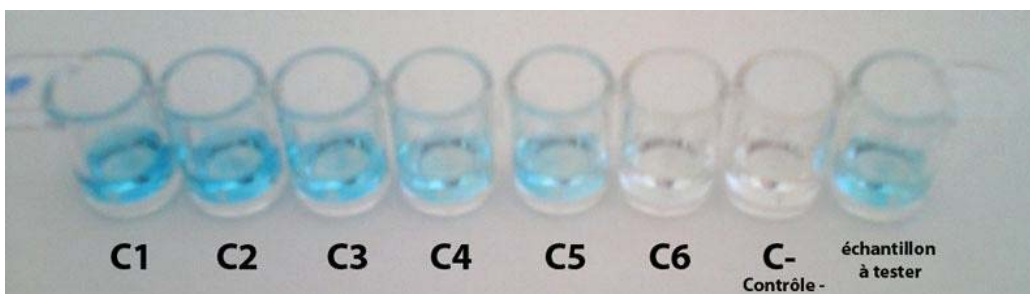
4) Révélation

- Jeter le reste de liquide à l'évier ou dans un bécher.
- 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.

5) Analyse des résultats

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

Concentration de la courbe standard:



<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>
<i>1/100</i>	<i>1/500</i>	<i>1/2000</i>	<i>1/5000</i>	<i>1/10000</i>	<i>1/100000</i>

## 6) Matériel

**Notes :** Le point 1 du protocole est à effectuer la veille du TP par l'enseignant ou le préparateur.  
Préparation des standards (C1 à C6) et la dilution de l'anticorps secondaire doivent être préparés par l'enseignant ou le préparateur.

- P200 et pointes jaunes
- Plaque de microtitration (en strip de 8)
- Solution de BSA à 5 g/l
- Anticorps primaire (anti-BSA)
- Anticorps secondaire couplé peroxydase
- Echantillon à doser
- TMB (substrat de la peroxydase)
- PBS 1x
- Tween 20
- Falcon 15 ml

### **Stockage du matériel :**

- Les anticorps sont stockés à -20°, dégelé sur glace puis remis à -20° après utilisation.
- Le TMB se garde à 4°.
- La solution de BSA se garde à -20°.