



TP 1 classe, 1 chercheur

proposé par Eric HERVOUET

Thème de l'Immunité : Les anticorps

Une journée à la fac...





TP : Réalisation d'un ELISA

(enzyme-linked immunosorbent assay)

Objectif 1 :

Montrer la relation de proportionnalité entre la quantité d'antigène contenu dans un sérum (les antigènes étudiés ici sont donc les IgGs de lapin) et la quantité d'anticorps anti-lapin mis en présence de ces antigènes (1 anticorps reconnaît un antigène)

Objectif 2 :

Retrouver le sérum de lapin parmi un mélange de 2 sérums non identifiés (lapin, veau)

Dilution des IgGs (sérum)

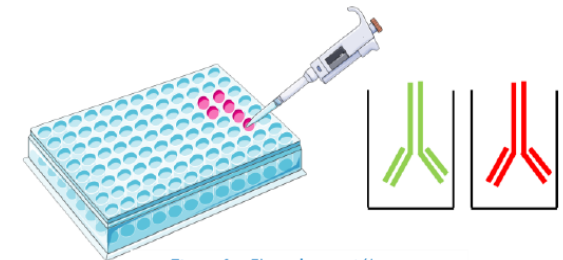
Nous avons réalisé 6 dilutions à partir du sérum d'IgG de lapins dans du tampon PBS :

Dilution n°	1	2	3	4	5	6
Diluées au...	1/2000	1/5000	1/10000	1/20000	1/50000	1/100000

Immobilisation des anticorps

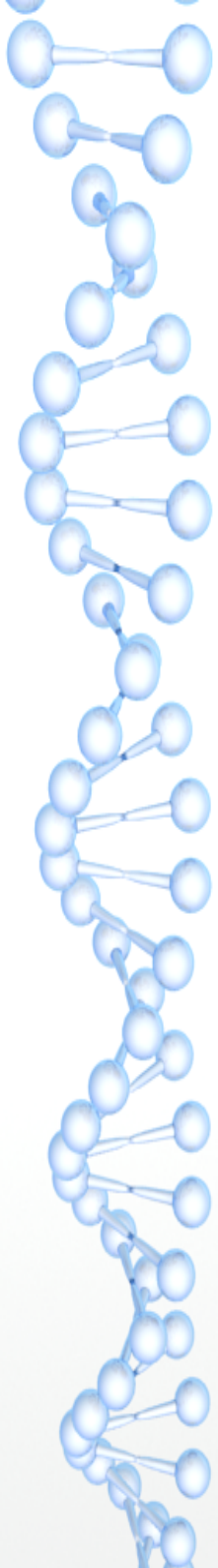
Nous avons ensuite répartis 100µL de chaque dilution dans chaque puits d'une plaque à ELISA contenant 96 puits.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5					X	Y	
B	1	2	3	4	5					X	Y	
C	1	2	3	4	5					X	Y	
D	1	2	3	4	5					X	Y	
E	1	2	3	4	5					X	Y	
F												



Etape 1 = Fixer des protéines en quantité différentes (IgG de lapin ou sérum d'une espèce non identifiée)

Incubation pendant 45min à 37°C



Saturation des puits : vider les puits et ajout de 200ul de PBS-régilait à 5%, incubation de 30min à 37°C

3 rinçages des puits au PBS-tween20 0,1% successifs

Préparation des **dilutions d'anticorps secondaires**

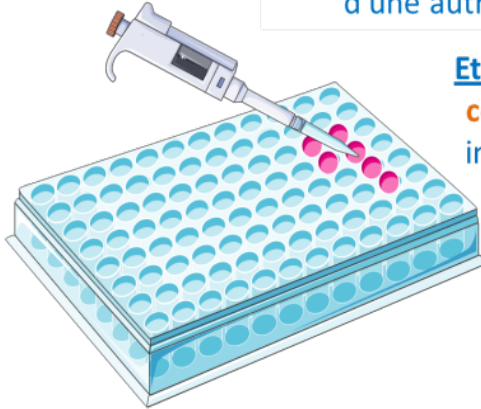
Dilution n°	A	B	C	D	E
Tp PBS (en mL)	2	5	10	50	50
Anticorps II (en uL)	1	1	1	1	0,5



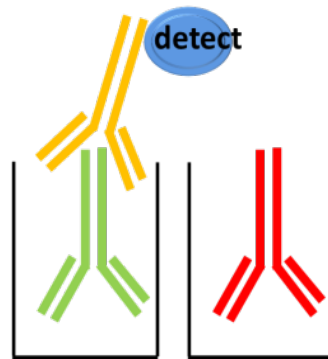
Hybridation avec l'anticorps II anti-lapin

ELISA

Principe : montrer qu'un anticorps d'une espèce reconnaît une protéine d'une autre espèce (antigène)



Etape 2 = Mettre un anticorps dirigé contre des IgG de lapin obtenu par immunisation ou contre des IgG de souris



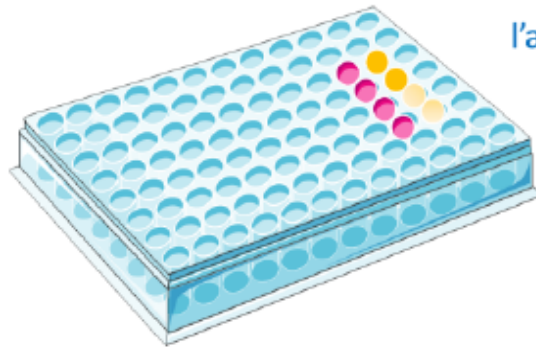
Ajout dans chaque puits de 100uL de l'anticorps II

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	A	A	A					A	A	
B	B	B	B	B	B					B	B	
C	C	C	C	C	C					C	C	
D	D	D	D	D	D					D	D	
E	E	E	E	E	E					E	E	
F												

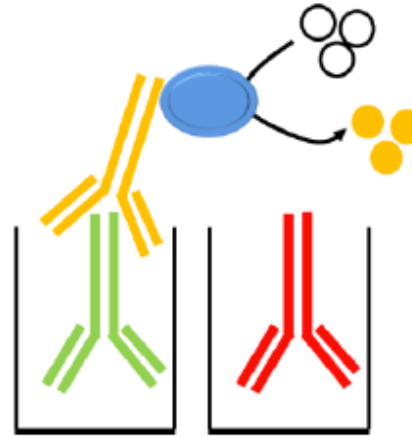
Incubation pendant 45min à 37°C

3 rinçages des puits au PBS-tween20 0,1% successifs

Révélation



Etape 3 = Révéler là où est fixé
l'anticorps qui a reconnu la protéine
(IgG) de non soi



Ajout de 100uL de solution de détection sans lumière, puis gardé à l'obscurité pendant 10min ;
Ajout de 100uL de HCl 2N

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 A	2 A	3 A	4 A	5 A					X A	Y A	
B	1 B	2 B	3 B	4 B	5 B					X B	Y B	
C	1 C	2 C	3 C	4 C	5 C					X C	Y C	
D	1 D	2 D	3 D	4 D	5 D					X D	Y D	
E	1 E	2 E	3 E	4 E	5 E					X E	Y E	
F												

Lecture de l'absorbance au lecteur de plaque



Résultats

Nous avons eu un soucis durant l'expérience : nous n'avons pas réalisé le lavage en dernier, de ce fait nos résultats d'absorbance étaient faux. Nous avons donc pris les résultats d'un autre groupe.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.148	0.168	0.170	0.139	0.137	0.043	0.050	0.067	0.148	0.181	0.055	0.049
B	1.747	1.439	0.943	0.609	0.127	0.057	0.054	0.051	0.697	0.186	0.052	0.052
C	1.206	1.285	0.592	0.350	0.139	0.047	0.052	0.044	0.483	0.200	0.051	0.053
D	0.533	0.336	0.184	0.160	0.156	0.041	0.038	0.051	0.327	0.527	0.052	0.052
E	0.409	0.323	0.250	0.140	0.153	0.049	0.052	0.054	0.201	0.226	0.053	0.051
F	0.049	0.050	0.049	0.057	0.052	0.040	0.051	0.050	0.050	0.052	0.051	0.055
G	0.051	0.051	0.056	0.051	0.054	0.052	0.053	0.051	0.051	0.051	0.052	0.049
H	0.049	0.055	0.052	0.052	0.050	0.051	0.053	0.050	0.051	0.050	0.053	0.050

Les résultats en noirs correspondent à l'absorbance des puits vides de la plaque, tandis que ceux en orange correspondent aux puits utilisés.



Interprétation

On observe que plus la quantité d'antigènes augmente plus il y a d'anticorps.

On observe que les résultats de la colonne 10 ressemblent davantage à ceux observés dans les puits contenant les substances connues. De plus, les résultats dans la colonne 11 se rapprochent des résultats en noir (puits vides), cela veut dire qu'il n'y a pas eu de réaction.

On peut donc en déduire que le sérum de lapin est le sérum X.