

I) Principe

On fixe des molécules d'Ag sur la surface des cuves d'une plaque ELISA à partir de dilutions d'une solution mère. Dans notre expérience, cette Ag est de composition inconnu.

Après avoir vidé et rincé les puits, les molécules d'Ag restent fixées sur les parois des puits.

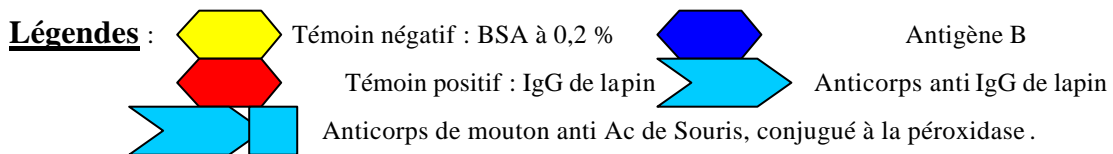
On ajoute une solution d'Ac I de cette Ag. On rince les cuves. Les Ac I non fixés sur les Ag sont donc retirés. Il reste les complexes Ag-Ac I.

On ajoute une solution d'Ac II anti Ac I. On rince les cuves. Les Ac II non fixés sur les Ac I sont donc retirés. Il reste les complexes Ag-Ac I- Ac II

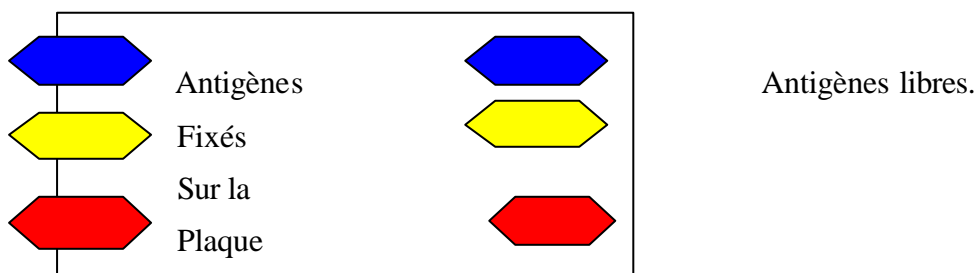
On met en évidence les Ac II fixés aux Ac I eux même fixés au Ag par le biais d'une réaction enzymatique colorée : Une Enzyme préalablement liée à Ac II réagit avec un substrat.

Cette méthode est utilisée pour mettre en évidence la présence d'un des deux réactifs : Ag ou Ac I.

Schema du principe de la réaction d' ELISA



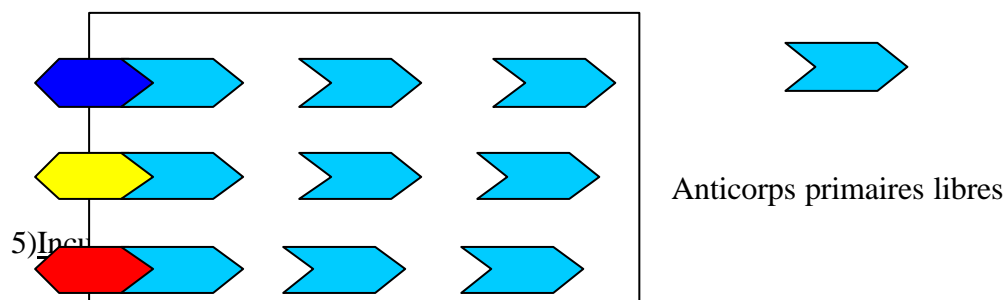
1) Sensibilisation : fixation de l'antigène



2) Incubation pendant 30mn

3) Lavage pour éliminer les antigènes libres.

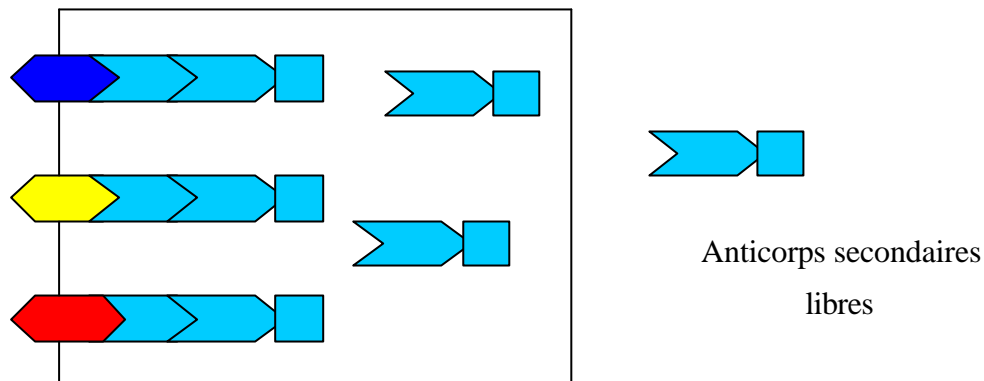
4) Ajout d'anticorps primaire : Anticorps anti IgG de lapin



5) Incu

6) Lavage pour éliminer les anticorps primaires libres

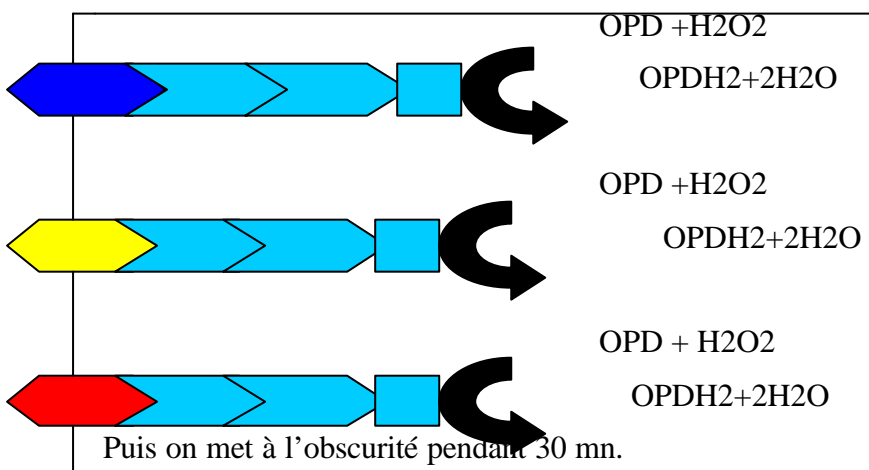
7) Ajout de l'anticorps secondaire : Anticorps de mouton anti anticorps de souris conjugué à la peroxydase



8) Incubation pendant 45 mn 37 °C

9) Lavage pour éliminer les anticorps secondaires libres

10) Ajout du substrat :



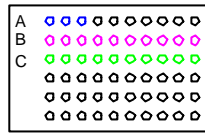
11) On arrête la réaction par addition de 50 µl de H₂SO₄ à 3M

12) Lecture de la plaque ELISA à 492 nm.

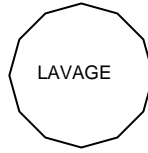
Remarque : L'antigène BSA ne réagit pas avec l'anticorps anti IgG de lapin, donc nous n'aurons pas de coloration dans la ligne A de la plaque

II) Mode opératoire

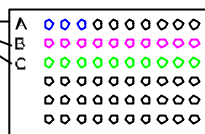
- A) Temoin (-) BSA 0.2%, concentration fixe dans les 3 puits
 B) Temoin (+) IgG de lapin dilution de 2 en 2
 C) Antigène inconnu dilution de 2 en 2



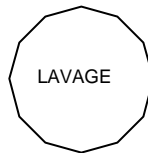
INCUBATEUR a 37 C
 Fixation de l'Ag sur les parois
 30 minutes



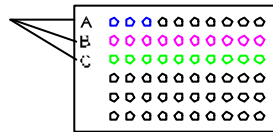
Ajout de l'Ac I



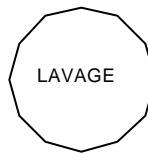
INCUBATEUR a 37 C
 Fixation de l'Ac I sur l'Ag
 45 minutes



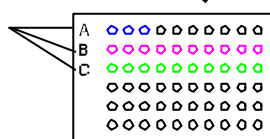
Ajout de l'Ac II avec la peroxydase liee



INCUBATEUR a 37 C
 Fixation de l'Ac II sur l'Ac I
 45 minutes

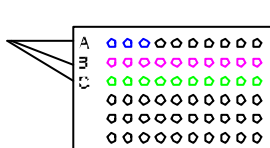


Ajout du substrat pour activer la coloration



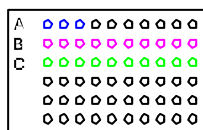
Chambre Noire
 Developpement de la coloration de l'Ac II
 30 minutes

Arret de la coloration par ajout de H2SO4



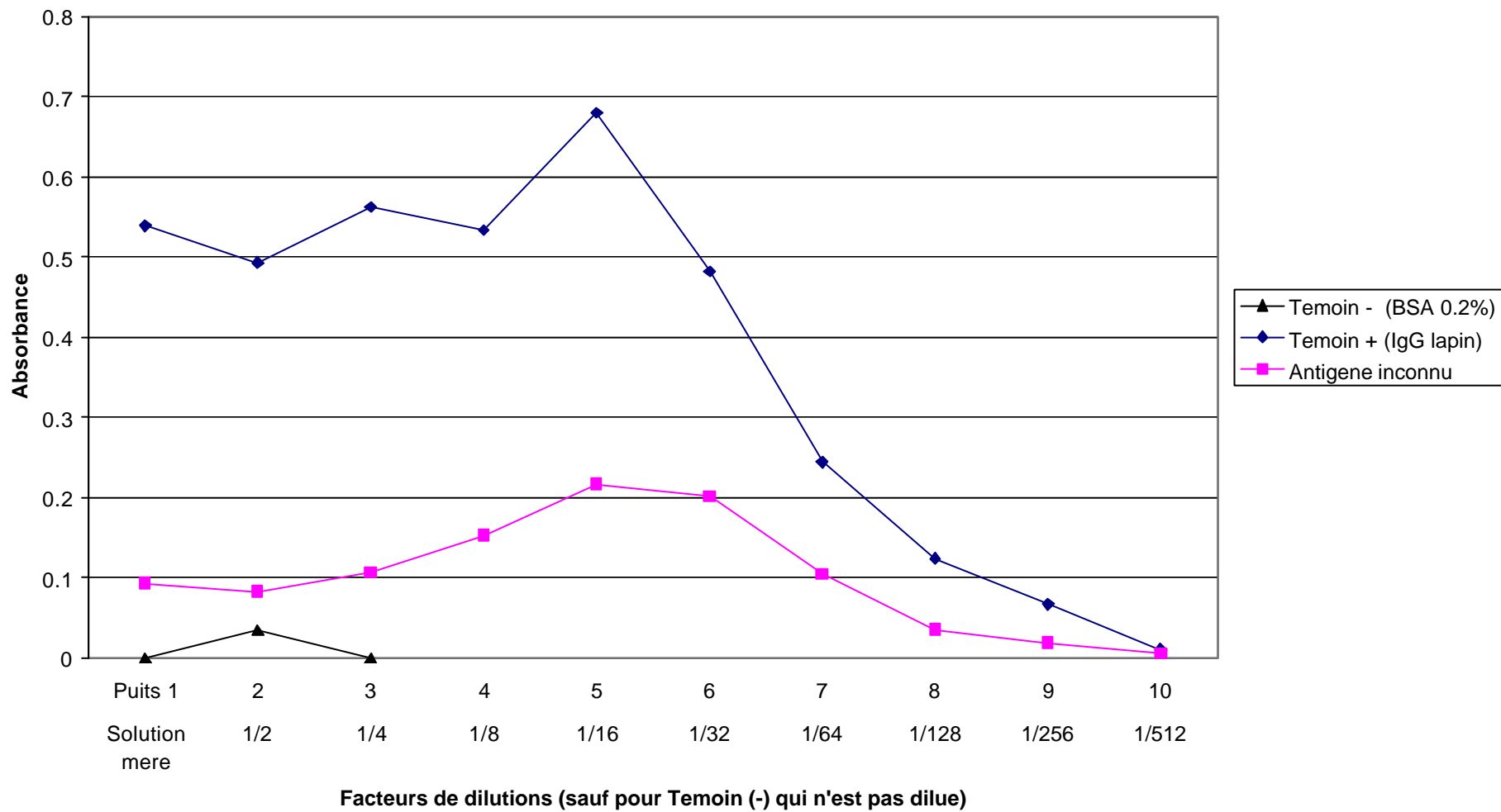
SPECTROPHOTOMETRE LECTEUR de PLAQUES ELISA

Lecture a 492nm



III) RESULTATS

Densite Optique a 492 nm



IV) Interpretation

Nous appellerons la solution Ag de composition inconnue la solution Ag X

La coloration visible dans les puits signifie qu'il y a eu une réaction immuno-enzymatique.

L'Ac II s'est fixé sur l'Ac I, lui-même s'est fixé sur l'Ag. Cette réaction est vraie pour le témoin + et pour l'Ag X

Il y a eu reconnaissance de l'Ac I par l'Ac II (Ac de mouton anti Ac de souris). L'Ac I (anti IgG de lapin) est donc forcément un Ac provenant de souris.

Egalement l'Ac I a reconnu des Ag présents dans la solution Ag X. Cela signifie que des IgG de lapin sont présents dans la solution Ag X. Cela vient de la présence de sérum de lapin dans la solution Ag X

A la lecture des courbes de DO, on remarque pour le témoin(+) et pour l'Ag X un pic d'absorbance pour une dilution au 1/16 de la solution mère.

A partir du puits 5, les courbes de DO sont décroissantes en accord avec les facteurs de dilution allant du moins dilué au plus dilué.

Par contre, pour les puits 1 à 4, la variation de DO n'est plus proportionnelle avec les concentrations. Alors que la dilution augmente, la DO a tendance à augmenter alors qu'elle devrait baisser.

Cela peut s'expliquer par le principe du test ELISA :

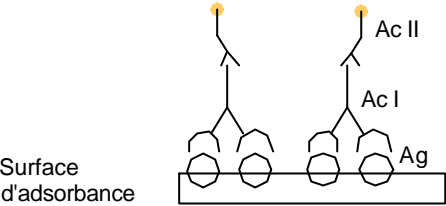
Les molécules sont adsorbées sur les parois des puits en proportion de leur concentration dans la solution présente. Cependant l'adsorption a une limite. La quantité de molécules que les parois peuvent adsorbées est limitée par la surface d'adsorption. Lorsque la paroi est saturée en molécules, elle ne peut plus en accepter d'autres si bien que augmenter la concentration des solutions n'augmente plus la quantité de molécules adsorbées sur les parois. Lorsqu'il y a saturation la relation (molécules présentes dans la solution) & (molécules adsorbées) n'est plus proportionnelle. Cela explique donc une première partie de la courbe relativement horizontale (puits 1 à 4) et une deuxième partie franchement décroissante (puits 5 à 10)

Egalement on remarque que la courbe des témoins + est au-dessus de la courbe de Ag X. Ceci s'explique par le fait que le témoin + est une solution d'IgG uniquement, donc toutes les molécules fixées sur les parois sont des IgG.

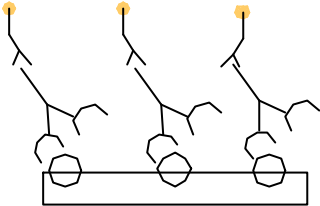
Par contre, la solution d'Ag X est un mélange multimoléculaire, elle contient des IgG mais aussi d'autres molécules. Donc, dans les puits, les IgG « partagent » la surface d'adsorption avec ces autres molécules. C'est pourquoi le pic du Témoin + est plus haut que le pic de l'Ag X.

La DO maximum pour l'Ag (217 unités d'absorbance) se lit pour une dilution au 1/16. Une DO équivalente se lit pour le témoin + (244 unités d'absorbance) avec une dilution au 1/64. C'est à dire 4 fois plus dilué.

On peut donc penser que la concentration en IgG de lapin de la solution inconnue est environ 4 fois moins grande que dans la solution de Temoin +



Trop concentré : chaque Ac I reconnaît plusieurs Ag. La coloration est moins forte.



Moins concentré : chaque Ac I reconnaît un Ag. La coloration est plus forte