

Un dosage de protéine par méthode ELISA sandwich

On se propose de mettre au point un test ELISA de dosage d'une protéine P par méthode immunoenzymatique en phase hétérogène de type ELISA sandwich. La protéine P est une protéine d'un virus de la vigne pour laquelle des anticorps ont été obtenus chez la chèvre.

On dispose, d'une part, de protéine P étalon et d'un conjugué anticorps-anti-P/phosphatase alcaline (antiP-PAL) et, d'autre part, d'anticorps anti-P utilisés pour tapisser des barrettes de microtitration. La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse du 2-nitrophénolphosphate en 2-nitrophénol coloré en jaune lu à 405 nm.

Réactifs disponibles

- anticorps anti-P à la dilution adéquate pour le « coating » (en tampon carbonate sodique 0,05 mol/L pH 9,6) : 4,3 mL.
- barrettes de microtitration pour 24 cupules sur un support.
- solution étalon de P à 200 ng.mL^{-1} : 0,5 mL (une matrice formée par un extrait de vigne saine a été chargée en protéine P purifiée).
- Échantillon à doser (extrait à partir de vigne) : 0,5 mL
- conjugué antiP-PAL à la dilution adéquate, en tampon PBS-T-BSA : 4,5 mL.
- tampon PBS : tampon phosphate sodique 10 mM, pH 7,4 + NaCl 150 mM : 50 mL.
- tampon PBS-T : tampon PBS + Tween 20 à 0,05% : pissette de 100 mL.
- tampon PBS-BSA : sérum albumine bovine à 1 % en tampon PBS : 8 mL
- tampon PBS-T-BSA : sérum albumine bovine à 1 % en tampon PBS-Tween : 3 mL.
- substrat pNPP à 1 mg/mL en tampon glycine soude pH 10,5 (7,5 g/L en glycine, 100 mg/L en MgCl_2). A préparer extemporanément et à utiliser extemporanément (cf hydrolyse spontanée en milieu alcalin) (5 mL).

Mode opératoire

Des agitateurs de microplaque 96 puits sont disponibles.

Au cours des manipulations, ne pas laisser les cupules à sec trop longtemps.

→ Des cupules de 3 barrettes de 8 puits sont sensibilisées avec les anticorps anti-P puis bloquées par la sérum albumine bovine

Identifier les barrettes.

- Tapisser avec $200 \mu\text{L}$ de solution d'anticorps anti-P toutes les cupules de la colonne 1 ainsi que les cupules A2, B2, C2 et G2 de la colonne 2 et A3, B3, C3, D3, E3, F3 et G3 de la colonne 3. Incuber 2 heures à 37°C puis rincer 1 à 2 fois au tampon PBS.
- Réaliser le blocage (saturation des sites non spécifiques) de toutes les cupules de la colonne 1 ainsi que de A2, B2, C2, G2 et H2 et de toutes les cupules de la colonne 3 avec $330 \mu\text{L}$ de solution PBS-BSA au moins 30 min à 37°C .
- Rincer alors 2 fois au tampon PBS-T.

→ On peut réaliser les séries de dilutions de l'étalon et de l'échantillon à doser

- Réaliser, dans 10 tubes « eppendorf » une gamme de concentrations décroissantes à partir de la solution étalon P à 200 ng.mL^{-1} par dilutions successives de raison 1/2. Le premier tube contiendra la première dilution au 1/2, le tampon de dilution étant le PBS Tween BSA, le volume final étant de $150 \mu\text{L}$.
- Réaliser, dans 5 tubes « eppendorf » une gamme de concentrations décroissantes à partir de la solution échantillon E par dilutions successives de raison 1/2. Le premier tube contiendra la première dilution au 1/2, le tampon de dilution étant le PBS Tween BSA, le volume final étant de $150 \mu\text{L}$.

→ On peut alors mettre en place l'étape de liaison des protéines P dans les puits

- Introduire $100 \mu\text{L}$ de la solution étalon P dans la cupule A1 et dans la cupule témoin H2. Dans les autres cupules sensibilisées de la colonne 1 et dans A2, B2 et C2, introduire $100 \mu\text{L}$ de chacune des dilutions de solution étalon P.
- Introduire $100 \mu\text{L}$ de la solution échantillon E dans la cupule A3 et dans la cupule témoin H3. Dans B3, C3, D3, E3 et F3 introduire $100 \mu\text{L}$ de chacune des dilutions de solution échantillon.
- Couvrir d'un film autocollant et incuber 45 min à 37°C .

- Lavages stringents
- Réaliser 4 lavages successifs à l'aide de tampon PBS-T.
- On peut alors mettre en place l'étape de liaison du conjugué antiP-PAL
- Ajouter dans les cupules utilisées 200 μL de conjugué.
 - Couvrir d'un film autocollant et incuber 45 min à 37°C.
 - Réaliser 5 lavages successifs à l'aide de tampon PBS-T.
- On peut alors mettre en place l'étape de révélation
- Ajouter 200 μL de solution de révélation (pNPP à 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en tampon glycine MgCl_2 pH=10,5).
 - Couvrir d'un film autocollant et incuber à température ambiante ou à 37°C (pour accélérer).
 - Lire en lecteur de microplaques lorsque la révélation paraît convenable, à 405 nm contre l'air. Noter la durée exacte de révélation avant la lecture.

Compte-rendu

- A l'aide de schémas légendés, et uniquement à l'aide de schémas, expliquer toutes les étapes du dosage en montrant les conditions nécessaires à l'obtention d'un dosage quantitatif.
- Reporter les manipulations et les résultats expérimentaux (composition exacte et rôle des témoins, absorbances mesurées contre l'air (A_m), calcul pour obtenir les absorbances (A_d) permettant le tracé de la courbe $A_d = f(\ln([P]))$. Durée et température de révélation.
- Tracer la courbe $A_d = f(\ln(\text{concentration en P en } \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}))$ et proposer un domaine de praticabilité pour le dosage de P.
- Tracer $A_d = f(\ln(\text{dilution}))$ pour l'étalon et l'essai et en déduire la concentration en protéine P de l'échantillon à doser.

Bibliographie : Adapté de Examen du BTS Biochimie 1998, sujet de l'épreuve de Travaux pratiques.

Annexe. Plan de travail en n'indiquant pas les lavages !!!

	1	2	3
A	AntiP + blocage + <u>Pétalon dil/1</u> + conjug + rével.	AntiP + blocage + <u>Pétalon dil/256</u> + conjug + rével.	AntiP + blocage + <u>Edil/1</u> + conjug + rével.
B	AntiP + blocage + <u>Pétalon dil/2</u> + conjug + rével.	AntiP + blocage + <u>Pétalon dil/512</u> + conjug + rével.	AntiP + blocage + <u>Edil/2</u> + conjug + rével.
C	AntiP + blocage + <u>Pétalon dil/4</u> + conjug + rével.	AntiP + blocage + <u>Pétalon dil/1024</u> + conjug + rével.	AntiP + blocage + <u>Edil/4</u> + conjug + rével.
D	AntiP + blocage + <u>Pétalon dil/8</u> + conjug + rével.		AntiP + blocage + <u>Edil/8</u> + conjug + rével.
E	AntiP + blocage + <u>Pétalon dil/16</u> + conjug + rével.		AntiP + blocage + <u>Edil/16</u> + conjug + rével.
F	AntiP + blocage + <u>Pétalon dil/32</u> + conjug + rével.		AntiP + blocage + <u>Edil/32</u> + conjug + rével.
G	AntiP + blocage + <u>Pétalon dil/64</u> + conjug + rével.	AntiP + blocage + conjug + rével.	AntiP + blocage + conjug + rével.
H	AntiP + blocage + <u>Pétalon dil/128</u> + conjug + rével.	Blocage + <u>Pétalon dil/1</u> + conjug + rével.	Blocage + <u>Edil/1</u> + conjug + rével.