



# Corps humain et santé

Réf :  
115 037

Français – p 1

Version : 8110

**Kit pour test E.L.I.S.A.  
Dosage immunologique**

## 1. Composition du kit et stockage

### Stocker au congélateur (-20 °C)

- Sachet A :
  - Anticorps 1<sup>aire</sup>, **[Ac1]**
  - Microtube **bleu** : Sérum de lapin anti-BSA (85 µL)
  - Anticorps 2<sup>aire</sup>, **[Ac2]**
  - Microtube **rouge** : Anti IgG de lapin couplé peroxydase (50 µL)
  - Témoin négatif
    - Tube hémolyse : Sérum de lapin (5mL)

#### Terminale S

L'immunité adaptative, prolongement de l'immunité innée (3-A-2)

- Concevoir et réaliser une expérience permettant de caractériser la spécificité des molécules intervenant dans l'immunité adaptative.
- Concevoir et réaliser des expériences permettant de mettre en évidence les immunoglobulines lors de la réaction immunitaire.

#### Terminale STL

Les anticorps peuvent être utilisés *in vitro* pour des applications en diagnostique.

### Stocker au réfrigérateur (+4 °C)

- Sachet comprenant :
  - 24 barrettes micro titration pré-coatées BSA
  - 2 supports
  - Microtube **blanc** : Tween concentré (100 µL)
- Sachet noir (anti UV) contenant
  - Flacon : TMB prêt à l'emploi (16,5 mL). **À stocker impérativement à l'abri de la lumière**
- Flacon en verre : PBS x10 (50 mL) à diluer pour réaliser : 500 mL

## 2. Conseils pour la conservation

Ce kit se conserve **2 semaines au réfrigérateur (+4 °C)**.

Pour une conservation plus longue (jusqu'à 3 mois), il est nécessaire de stocker uniquement le sachet A au congélateur (**-20 °C**), les autres éléments restant au réfrigérateur (**+4 °C**).

Éviter les congélations - décongélations multiples !

- Noter que l'anticorps secondaire (le microtube rouge **[Ac2]**) est particulièrement fragile - Penser à fractionner les différentes solutions si on envisage de travailler avec des groupes de TP n'ayant pas, tous, cours le même jour).

Le TMB est prêt à l'emploi et doit être stocké impérativement à l'abri de la lumière dans son sachet anti-UV, limiter au maximum l'exposition à la lumière lors de la manipulation.

### 3. Matériel complémentaire

Etapes	Matériel / Consommable	Professeur	Groupe de travail
PBS	Eau déminéralisée (Dilution)	✓	
PBS tween20®	Micropipettes	✓	✓
	Tubes 50mL	✓	✓
	Bécher 200mL	✓	✓
Gamme étalon	Pipette 10mL	✓	
	Becher 50mL	✓	
Fixation	HCl 1M ou appareil photo		✓
Dépôt dans les cupules	Micropipettes (+cônes) ou Pipette graduées à usage unique (1mL) pour les dépôts pour chaque groupe de travail	✓	✓
TMB	Flacon avec bouchon ou tube à hémolyse		✓
	Papier aluminium		✓

## 4. Principes généraux de la manipulation E.L.I.S.A.

### 4.1 Problématique scientifique

Dès l'introduction d'un antigène dans l'organisme, le système immunitaire produit un anticorps spécifique en réaction à ce premier contact. Dès le second contact la réponse immunitaire est plus massive et quasi immédiate, l'organisme agit comme s'il avait mis en mémoire les caractéristiques de l'antigène.

La vaccination exploite cette propriété en forçant la "mise en mémoire" d'un antigène correspondant à un agent pathogène dont on souhaite se protéger.

- Comment par un test simple peut-on déterminer le statut immunitaire d'un individu ? C'est-à-dire vérifier que la vaccination d'un individu est toujours efficace en évaluant la quantité d'anticorps spécifiques dans son sérum ?

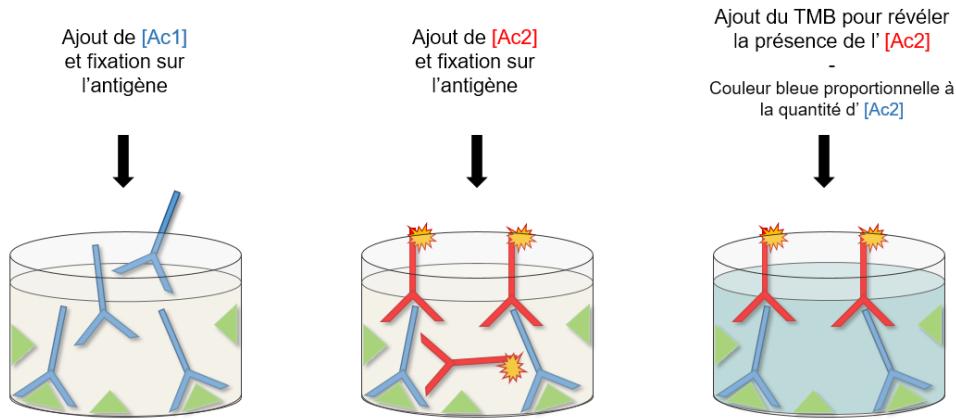
### 4.2 Description

On souhaite mettre en évidence la présence d'un anticorps spécifique dans le sérum d'un individu à tester et réaliser le dosage de cet anticorps. Pour cela, les élèves vont utiliser un test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). C'est une technique courante immuno-enzymatique de détection.

Le test ELISA permet de visualiser une réaction antigène – anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action d'une enzyme qui réagit à un substrat chromogène. Cette enzyme (ici la peroxydase) est couplée à l'anticorps traceur (anticorps secondaire) qui est capable de se lier spécifiquement à l'anticorps primaire que l'on cherche à doser. L'antigène est quant à lui fixé sur les parois des puits d'une plaque de microtitration. La réaction enzymatique produit un composé bleu, l'intensité de la coloration sera donc proportionnelle au nombre d'anticorps secondaire fixé sur l'anticorps primaire.

**Les étapes (schéma ci-dessous) :**

- 1- Dépôt du sérum contenant l'anticorps primaire **[Ac1]** recherché et spécifique de l'antigène
- 2- Lavage des cupules au PBS Tween (afin d'éliminer les excès d' **[Ac1]** non fixés)
- 3- Dépôt de l'anticorps secondaire **[Ac2]** spécifique de l'anticorps primaire **[Ac1]**
- 4- Lavage des cupules au PBS Tween (afin d'éliminer les excès d' **[Ac2]** non fixés)
- 5- Révélation par le **TMB** → provoque une coloration **bleue** en présence de l'anticorps secondaire **[Ac2]** ; la coloration est proportionnelle à la concentration d'anticorps primaire.



### 4.3 Dosage

Dans ce protocole, on se propose de doser la quantité d'anticorps anti BSA (sérum albumine bovine) dans un sérum de lapin immunisé (présence de l' **[Ac1]** anti-BSA). Ces activités sont l'occasion d'exercer les élèves à l'élaboration d'un protocole de dosage par colorimétrie appliquée à la SVT.

Le dosage colorimétrique repose sur la réalisation d'une gamme de dosage à partir d'un gradient de solutions d'anticorps à différentes concentrations connues de 17 µg à 0,13 µg d'anticorps par mL. La détermination de la concentration en anticorps de la solution inconnue est réalisée par comparaison : analyse visuelle, traitement d'image ou utilisation d'un colorimètre après blocage de la réaction chromogène par ajout d'un acide.

## 5. Avant le TP

### 5.1 Préparation des solutions de lavage

#### Tampon PBS

Il faut diluer le PBS x10 (contenu dans le flacon en verre de 50mL) dans 450mL d'eau déminéralisée → On obtient alors 500mL de PBS x1.

Quantité nécessaire pour le TP :

- 200 mL de PBS Tween (détailé par la suite)
- 67,5 mL de PBS pour la gamme de dosage de l' **[Ac1]**
- 30 mL pour l' **[Ac2]**

#### Tampon PBS tween 20®

Afin d'obtenir du PBS Tween 20® :

- Transférer 200 mL de PBS x1 dans un bécher adapté
- À l'aide d'une micropipette, prélever 500 µL de tampon PBS et les ajouter au microtube Tween (blanc)

*Conserver la même micropipette et le même cône pour la suite des étapes du PBS tween 20®.*

- Prélever ensuite le volume du microtube et le verser dans le bécher
- Rincer le cône en faisant plusieurs pipetages dans le bécher
- Répéter au moins encore 1 fois l'opération afin de bien rincer le microtube

*!! Le Tween est un détergent concentré d'où la formation de mousse !!*

- Prévoir un bécher de 25 mL avec environ 5mL de PBS tween® par groupe

## 5.2 Préparation des barrettes / cupules et antigène

- Antigène : Bovine sérum albumine (BSA)

Répartir 1 barrette par groupe de travail (24 barrettes). Les barrettes de cupules sont prêtes à l'emploi, elles possèdent un « coating » (Traitement qui consiste à fixer électrostatiquement l'antigène, BSA, au fond des cupules).

## 5.3 Préparation de la gamme de concentration de l'anticorps primaire (anti-BSA) [Ac1]

Afin de pouvoir réaliser l'activité sur une seule séance, il est préférable de fournir aux élèves des solutions d'anticorps à différentes concentrations connues. **Ces tubes préparés peuvent être conservés 1 ou 2 jours au réfrigérateur ou 1 mois à -20 °C.**

La gamme de concentration de l'anticorps primaire anti-BSA [Ac1] s'étend de 17 µg.mL<sup>-1</sup> d'anticorps pour le tube C1 à 0,13 µg.mL<sup>-1</sup> d'anticorps pour le tube C8 :

- Pour ce faire, suspendre l' [Ac1] dans 15mL de solution de PBS. Ce premier tube correspond à la concentration C1.
- En cascade, diluer de 50 % chaque solution en prélevant 7,5 mL de la solution Cn-1 et en complétant avec 7,5 mL de PBS.
- Pour obtenir C2 ((C1)/2 soit 8.5 µg.mL<sup>-1</sup> d'anticorps) : prélever 7,5 mL de C1 et ajouter 7,5 mL de PBS. Répéter ainsi de suite cette opération jusqu'à C8.

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
85µL tube bleu	7,5 mL de C1	7,5 mL de C2	7,5 mL de C3	7,5 mL de C4	7,5 mL de C5	7,5 mL de C6	7,5 mL de C7
+15mL PBS	+7,5 mL PBS	+7,5 mL PBS	+7,5 mL PBS	+7,5 mL PBS	+7,5 mL PBS	+7,5 mL PBS	+7,5 mL PBS
[17 µg.L <sup>-1</sup> ]	[8,5 µg.L <sup>-1</sup> ]	[4,25 µg.L <sup>-1</sup> ]	[2,12 µg.L <sup>-1</sup> ]	[1,06 µg.L <sup>-1</sup> ]	[0,53 µg.L <sup>-1</sup> ]	[0,27 µg.L <sup>-1</sup> ]	[0,13 µg.L <sup>-1</sup> ]

**On ne conservera que C1, C2, C4, C5, C6 et C8 pour la gamme de dosage**

**Sérum à tester (inscrire St)** : On le réalise en prenant par exemple C3 et C7 sans l'indiquer aux élèves.

**Témoin négatif**

Le sérum de lapin non immunisé (Tube à hémolyse) est livré prêt à l'emploi.

## 5.4 Préparation de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin (+ peroxydase) [Ac2] et TMB

- Reprendre dans 30 mL de PBS le contenu du microtube [Ac2].
- Mesurer précisément 30 mL de PBS, dans un bêcher.
- À l'aide d'une micropipette, prélever 500 µL de ce tampon PBS et les ajouter au microtube rouge.

*Conserver la même micropipette et le même cône pour la suite des étapes de la solution [Ac2].*

- Prélever ensuite le volume du microtube, le déverser dans le bêcher, rincer le cône en faisant plusieurs pipetages dans le bêcher.
- Répéter au moins encore 2 fois l'opération afin de bien rincer le microtube et récupérer la totalité des anticorps.

En attendant la séance de TP, **conserver les solutions au réfrigérateur, maxi 24 heures.**

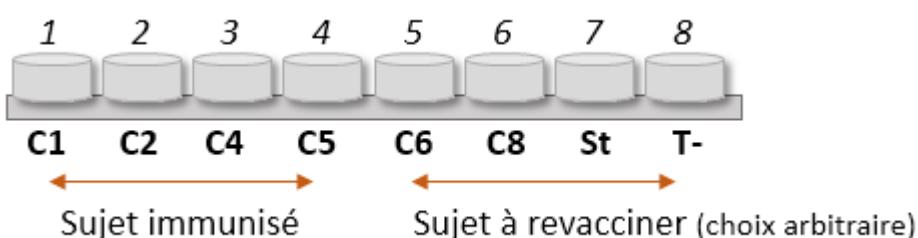
Le substrat TMB est fourni prêt à l'emploi, **veiller à le stocker à l'obscurité.**

➔ Entourer les tubes fournis aux groupes de travail, avec du papier aluminium.

## 6. Mode Opératoire

Numéroter les puits comme indiqué sur le schéma et nommer :

- **St** : sérum du sujet test = puits 7
- **T-** : Témoin négatif = puits 8



On détermine un seuil en dessous duquel le sujet est considéré comme non immunisé, par exemple ici C5 contient  $1,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$  d'anticorps.

- Déposer :
  - 80 µL de C1 dans le puits 1,
  - 80 µL de C2 dans le puits 2,
  - 80 µL de C4 dans le puits 3,
  - 80 µL de C5 dans le puits 4,
  - 80 µL de C6 dans le puits 5,
  - 80 µL de C8 dans le puits 6,
  - 80 µL du sérum S du sujet testé, de concentration inconnue (St) dans le puits 7,

- 80 µL du sérum non immunisé, témoin négatif (T-) dans le puits 8.

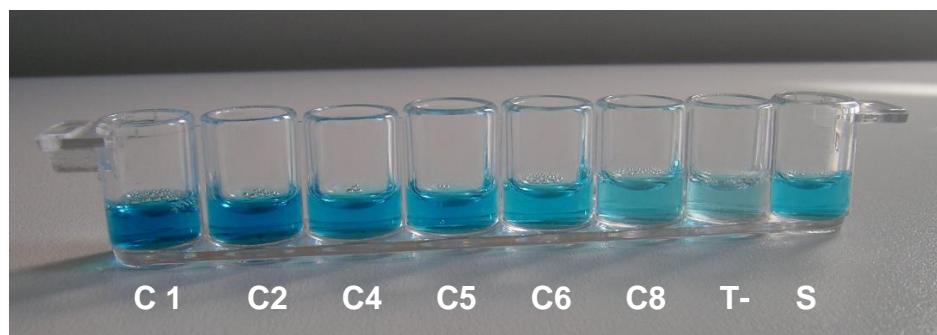
*Il est nécessaire d'être très attentif et de bien déposer une seule fois la solution dans chaque puits.*



- Laisser incuber **15 min à température ambiante**. D'un geste rapide, vider la barrette en la renversant horizontalement de manière à éviter le mélange des produits.
- Essuyer la surface des puits avec du papier filtre pour éliminer l'excès de produits et éviter la contamination, puis la remettre à l'endroit.
- Sans débordement, **remplir tous les puits avec de la solution de lavage PBS Tween®**, (2 gouttes - pipette à usage unique) et vider **immédiatement** en suivant la même procédure que précédemment.
- **Répéter 2 fois ce lavage.**
- À l'aide d'une micropipette, mettre dans les puits 80 µL de la solution d'anticorps de détection **[Ac2]** lequel est conjugué à l'enzyme peroxydase.
- Patienter **15 minutes à une température minimum de 20 °C sinon placer à l'étuve à 30 °C** - En profiter pour ranger et nettoyer la paillasse.
- Comme précédemment, vider les puits et **laver 3 fois les 8 cupules de la barrette avec du PBS Tween®**.
- Ajouter dans les puits 80 µL de **TMB** (substrat de l'enzyme peroxydase). La lecture est directe (éviter l'exposition en plein soleil) : une coloration bleue se développe immédiatement en présence d'anticorps **[Ac2]**.
- Comparer la coloration du puits 8 (**St**) correspondant au sujet testé avec l'échelle de teintes de référence. La phase de comparaison doit être réalisée assez rapidement car la réaction n'est pas stabilisée.
- La couleur évolue, ainsi le **T** apparaîtra bleu après plusieurs minutes d'exposition à la lumière.

## 7. Résultat et exploitation

On constate que l'intensité des colorations est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-BSA **[Ac1]**. On peut donc ainsi déterminer par comparaison où se situe le niveau de concentration du sérum étudié. Ici, le sujet présente un taux d'anticorps  $\leq 1,06 \mu\text{g d'Ac. mL}^{-1}$



## 8. En résumé

Un test ELISA est une technique d'immunodosage qui offre la possibilité de déterminer la quantité d'anticorps spécifiques ayant réagi avec les antigènes fixés sur le fonds des cupules, et ce, avec une sensibilité de l'ordre du µg/mL. Le dosage a été réalisé grâce à une gamme étalon qui a permis d'établir une échelle de teintes de référence

## 9. Pour aller plus loin

En fin de manipulation chaque groupe réalise une photographie (à l'aide d'un Smartphone par exemple) de la barrette. À l'aide d'un logiciel de traitement de l'image (Mesurim), ils réaliseront une courbe d'étalonnage afin de déterminer plus précisément la concentration en anticorps du sérum et valider leur première mesure obtenue visuellement.

## 10. Trucs et astuces

- Bloquer la réaction à l'HCl (1N) dès que C1 présente une coloration bleue franche.
- Pour conserver le contenu des puits, sceller les puits avec un adhésif pour éviter l'évaporation puis placer une feuille d'aluminium autour.

## 11. Service après-vente

Pour toute question, veuillez contacter :

**JEULIN – S.A.V.**  
468 rue Jacques Monod  
CS 21900  
27019 EVREUX CEDEX France

**0 825 563 563\***

\* 0,15 € TTC/min. à partir un téléphone fixe

# Assistance technique en direct

Une équipe d'experts  
à votre disposition  
du lundi au vendredi  
de 8h30 à 17h30

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge  
immédiatement votre appel  
pour vous apporter une réponse  
adaptée à votre domaine  
d'expérimentation :  
Sciences de la Vie et de la Terre,  
Physique, Chimie, Technologie.

## Service gratuit\*

**0 825 563 563** choix n°3\*\*

\* Hors coût d'appel. 0,15 € TTC/min à partir d'un poste fixe.  
\*\* Numéro valable uniquement pour la France métropolitaine et la Corse. Pour les DOM-TOM et les EEE, composez le +33 2 32 29 40 50.

Aide en ligne  
**FAQ.jeulin.fr**

## Direct connection for technical support

A team of experts  
at your disposal  
from Monday to Friday  
(opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request  
immediately to provide you  
with the right answers regarding  
your activity field : Biology, Physics,  
Chemistry, Technology.

## Free service\*

**+33 2 32 29 40 50\*\***

\* Call cost not included.  
\*\* Only for call from foreign countries.

