

## RECHERCHE ET TITRAGE D'ANTICORPS PAR L'UTILISATION DU TEST ELISA

### Matériel

- Une barrette de 8 puits
- Du sérum à tester(X) ; du sérum témoin (non immunisé) (T)
- Une solution mère d'anticorps anti-antigène, 1 mL (17 µg d'anticorps par mL) (C1)
- Une solution d'anticorps conjugués de détection(AC)
- Une solution de lavagetween (lav)
- Une solution de tampon PBS (tp)
- Une solution de substrat de l'enzyme peroxydase, le TMB(TMB)
- Une micropipette de 40 µL
- Des tubes

### Principe du test de détection et de titrage d'anticorps

- Si des anticorps sont présents dans le sérum, ils reconnaissent l'antigène fixé au fond du puits.
- Les anticorps conjugués sont spécifiques des anticorps présent dans le sérum ; ils sont fixés à une enzyme : la peroxydase.
- Cette enzyme catalyse une réaction colorée (bleue) en présence de son substrat incolore, le TMB (tétra méthyl benzidine).

### Protocole

- **Réaliser la gamme étalon:** à partir de 1mL de la solution d'anticorps anti-antigène (C1), réaliser une dilution en cascade d'un facteur  $\frac{1}{2}$  à chaque étape, c'est à dire prélever 0,5 mL de la solution d'anticorps anti-antigène et compléter avec 0,5 mL de tampon PBS (tp), dans des tubes, de C2 à C6.
- **Repérer les puits et déposer** dans 80 µL du sérum à tester, du sérum témoin et des anticorps anti-antigène à différentes concentrations, en prélevant avec la même micropipette des concentrations les plus faibles vers les concentrations les plus fortes.
- **Laisser incuber** 15 min à température ambiante.
- **Vider** la barrette en la renversant d'un geste rapide au-dessus de l'évier ou d'un cristalliseur de manière à éviter le mélange des produits. **Tamponner** ensuite les puits sur du papier filtre pour éliminer l'excès de produits et éviter la contamination.
- **Laver** les puits : **remplir** tous les puits avec la solution de lavage et vider immédiatement comme précédemment. **Répéter** 2 fois ce lavage.
- **Mettre** dans tous les puits 80 µL de la solution d'anticorps conjuguésde détection
- **Laisser** incuber 15 minutes.
- **Vider** les puits et les **laver** 2 fois.
- **Mettre** dans les puits 80 µL de substrat de l'enzyme peroxydase, le TMB.
- **Attendre**30 secondes maximum qu'une coloration éventuelle se développe. (Au delà, tous les puits seront bleus !)

