

---

## Réaliser un protocole ELISA pour montrer la spécificité antigène - anticorps

---

### MATÉRIEL UTILISÉ

– kit APBG : recherche de molécules antigéniques (dosage de type ELISA)

– lait de soja

– lait cru de vache : bien respecter le facteur de dilution, soit 1 goutte de lait par litre.

Une concentration plus importante (3 ou 4 gouttes/l) peut conduire à un « effet crochet » : formation de complexes qui ne se fixent pas sur la phase solide et qui sont éliminés au cours de l'étape de lavage, ce qui aboutit à une diminution du signal.

– eau pure : eau distillée ou eau minérale très peu minéralisée (pauvre en calcium, magnésium et nitrates).

– pipettes : soit des pipettes de précision (volumes exprimés en  $\mu\text{l}$ ) soit des pipettes Pasteur (volumes exprimés en gouttes).

---

### OBJECTIFS ET PLACE DU TP

#### *Capacité indiquée dans le BO*

*Concevoir et réaliser une expérience permettant de caractériser la spécificité des molécules intervenant dans l'immunité adaptative*

#### **Acquis**

L'activité précédente a montré que l'entrée d'un organisme étranger induit la production importante d'immunoglobulines ou anticorps. Les anticorps produits sont spécifiques d'un antigène donné contre lequel ils sont dirigés.

---

### FICHE TP

Magalie ressort de chez le médecin. Suite à une série de tests, son médecin lui apprend l'origine de ses problèmes récurrents de digestion : elle est allergique à une molécule du lait : la  $\beta$ -lactoglobuline.

En faisant ses courses elle trouve du lait de soja et se demande alors si elle peut en consommer sans que cela lui pose des problèmes de digestion.

**Montrer et expliquer à Magalie qu'elle peut boire du lait de soja qui ne lui provoque pas de troubles digestifs.**

On dispose pour cela du matériel suivant :

- une barrette de puits au fond desquels sont fixés des anticorps anti  $\beta$ -lactoglobuline bovine (anti  $\beta$ lg) = Ac 1
- une solution d'anticorps de détection = complexe entre un deuxième anticorps anti  $\beta$ lg (Ac 2) et une enzyme (l'acétylcholinestérase)
- une solution de réactif d'Ellman (cette solution contient le substrat de l'acétylcholinestérase)
- quatre « solutions » à tester (les produits ont été dilués dans de l'eau distillée) :
  1. une solution de  $\beta$ -lactoglobuline bovine ( $\beta$ lg à 20 ng.mL-1)
  2. une « solution » de lait de soja
  3. une « solution » de lait cru de vache
  4. de l'eau distillée
- des pipettes

Remarques

- Quand des molécules sont fixées les unes aux autres, il est alors possible de laver les puits afin d'éliminer les molécules non fixées.
- La réaction enzymatique conduit à l'apparition d'une couleur jaune (réactif d'Ellman).

1 – **Énoncer** le principe du protocole afin de rechercher la présence de  $\beta$ -lactoglobuline bovine dans le lait de soja

Mise en commun

2 – **Réaliser** le protocole fourni

3 – **Présenter** vos résultats sous la forme de votre choix

4 – À partir de l'exploitation des résultats obtenus, **répondre** à l'objectif afin de savoir si un anticorps est spécifique d'un antigène.

### CRITÈRES DE RÉUSSITE

Critères de réussite	☺	☹
1 - Mise en contact de l'anticorps anti $\beta$ -lactoglobuline avec les laits à tester Mise en contact avec Ac 2 couplé à une enzyme + substrat Vidange des puits entre chaque manipulation Réalisation des témoins positif et négatif		
2 - Respect des étapes du protocole Respect des consignes de sécurité Gestion de son poste de travail		
3 - Possibilité de faire un tableau de comparaison, un schéma, une photo numérique : légendes (intitulés des lignes et des colonnes pour le tableau) et titre pertinent mis en évidence, soin (qualité de la photo pour la présentation numérique).		
4 - Le puits contenant du lait de soja n'est pas coloré. Le substrat, l'enzyme et l'Ac 2 ont été éliminés par le lavage donc aucun antigène présent dans le lait de soja n'a été retenu par Ac 1 fixé au fond du puits. Magalie peut donc boire du lait de soja sans trouble digestif car il ne contient pas de $\beta$ -lactoglobuline.		

## FICHE PROTOCOLE D'UTILISATION DU MATÉRIEL

1. **Organiser** votre plan de travail pour manipuler proprement tout en respectant les consignes de sécurité.

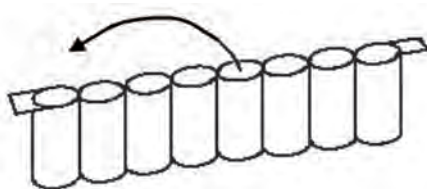
2. **Repérer les puits et déposer** dans chacun d'eux 100  $\mu\text{L}$  (3 gouttes) d'une des solutions à tester. Attention : mettre une solution différente dans chaque puits.

3. **Ajouter** dans chacun des puits 100  $\mu\text{L}$  (3 gouttes) de conjugué enzymatique (solution d'anticorps de détection Ac 2 associé à l'acétylcholinestérase).

4. **Laisser incuber** 15 min à température ambiante.

5. **Procéder au lavage** :

- **vider** le contenu de la barrette en la retournant d'un « coup sec », au dessus de l'évier (de manière à éviter le mélange des produits des différents puits) ;



- **laver** les puits délicatement : **remplir** tous les puits aux trois-quarts avec l'eau distillée et vider immédiatement comme précédemment ;

- **renouveler** ce lavage deux fois (trois lavages en tout).

6. **Ajouter** dans chaque puits 200  $\mu\text{L}$  (6 gouttes) de réactif d'Ellman (substrat de l'enzyme acétylcholinestérase).

7. **Laisser agir** environ 7 minutes (jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune dans certains puits) et lire les résultats.



