
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 μl) 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 β -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 β -lactoglobuline bovine (anti β lg) = Ac 1
- une solution d'anticorps de détection = complexe entre un deuxième anticorps anti β 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 β -lactoglobuline bovine (β 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 β -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	(3)	(4)
1 - Mise en contact de l'anticorps anti β -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 β -lactoglobuline.		

FICHE PROTOCOLE D'UTILISATION DU MATÉRIEL

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

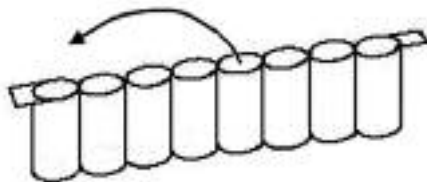
2. **Repérer les puits et déposer** dans chacun d'eux 100 μL (3 gouttes) d'une des solutions à tester. Attention : mettre une solution différente dans chaque puits.

3. **Ajouter** dans chacun des puits 100 μL (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 μL (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.

