

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) : 3 mL
- barrettes de microtitration pour 16 cupules sur un support
- solution étalon de P à 200 ng.mL^{-1} : 1 mL (une matrice formée par un extrait de vigne saine a été chargée en protéine P purifiée)
- conjugué antiP-PAL à la dilution adéquate, en tampon PBS-T-BSA : 2,8 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
- PBS-T-BSA : sérum albumine bovine à 1 % en tampon PBS-Tween : 5 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).
- solution d'arrêt NaOH 5 mol/L : 1 mL.

Mode opératoire

- Des cupules d'une barrette de 16 puits sont sensibilisées avec les anticorps anti-P puis saturées par la sérum albumine bovine :
 - 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, G2 et H2 de la colonne 2. Incuber 2 heures à 37°C puis rincer 1 à 2 fois au tampon PBS.
 - Réaliser la saturation de toutes les cupules de la colonne 1 ainsi que de A2, B2, **F2**, G2 et H2 avec $250 \mu\text{L}$ de solution PBS-T-BSA au moins 30 min à 37°C .
 - Rincer alors 2 fois au tampon PBS-T. Vider les cupules par retournement. Égoutter sur papier filtre. Ne pas laisser les cupules à sec trop longtemps.
- On peut alors mettre en place l'étape de liaison des protéines P :
 - Réaliser, dans 9 tubes à hémolyse 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 $200 \mu\text{L}$.
 - Identifier les barrettes
 - Répartir dans la cupule A1 et éventuellement dans les cupules témoins (F2, G2 et H2) $100 \mu\text{L}$ de la solution étalon P. Dans les autres cupules sensibilisées de la colonne 1 et dans A2 et B2, introduire $100 \mu\text{L}$ de chacune des dilutions de solution étalon P.
 - Couvrir d'un film autocollant et incuber 45 min à 37°C .
 - 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 réactions et éventuellement dans les cupules témoins (F2, G2 et H2), $200 \mu\text{L}$ 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 $200 \mu\text{L}$ de solution de révélation (pNPP à 1 mg.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.

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 $A_d = f(\ln([P]))$).
- Tracer la courbe : $A_d(405 \text{ nm}) = f(\ln(\text{concentration en P en } \text{ng.mL}^{-1}))$.
- Proposer un domaine de praticabilité pour le dosage de P. Déterminer le seuil de discrimination entre échantillons sains et infectés, sachant qu'il est défini comme la concentration en P correspondant à une absorbance égale à 2 fois celle du témoin le plus élevé.