

TP - Détection d'anticorps anti-adénovirus par ELISA

Les deux séances ont lieu au bâtiment Moissan

Objectifs

L'objectif des 2 séances est de comprendre la technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), d'apprendre à la réaliser et à analyser les résultats obtenus.

Compte-rendu

Un compte-rendu devra être préparé à l'issue des 2 séances de TP et être rendu au plus tard une semaine après la séance. Les consignes pour la rédaction de ce compte-rendu sont précisées dans le document « consignes rédaction CR TP ELISA.pdf » disponible sur ecampus.

Problématique

L'adénovirus humain de sérotype 5 (Ad5) est un virus responsable chez l'homme d'infections des voies aériennes. Ces infections sont souvent asymptomatiques mais peuvent avoir des conséquences dramatiques chez les enfants en bas âge, les personnes âgées ou les sujets présentant un déficit immunitaire. A partir de l'Ad5, des vecteurs codant pour des protéines hétérologues (eg. Ovalbumine) ont été dérivés dans le but d'exprimer chez l'homme des antigènes contre lesquels induire une réponse immunitaire. La mise au point de ces vecteurs nécessite l'utilisation de modèles animaux comme par exemple des lignées de souris consanguines (Balb/c, C57BL/6, ...). Ces souris permettent d'étudier les paramètres régulant l'efficacité de la vaccination en s'affranchissant de toute variabilité génétique.

Au cours de ce TP, vous quantifierez par ELISA la réponse humorale anti-Ad5 de souris C57BL/6. Ces souris ont reçu une injection sous-cutanée d'un vecteur adénoviral codant pour l'ovalbumine (10^{11} particules virales). Le sang de ces souris immunisées a été prélevé à différents temps et, après préparation, le sérum correspondant a été congelé.

TP ELISA - Séance 1 (2,5 heures)

1. Présentation de la technique ELISA

- Principe de la technique ELISA et application à la détection d'antigènes viraux
- Application à la détection d'antigènes viraux
- Présentation du matériel disponible

2. Préparation des solutions

- Préparer le TBST 1X (TBS 1X complété avec 0,05 % poids/volume de Tween 20),
- Préparer le TBST 1X complété avec 5% poids/volume de lait écrémé.

3. Saturation des plaques

- Récupérer les plaques chargées en antigènes viraux (dites « coatées »), préparées la veille ou décongelées.
- Retourner la plaque pour vider les puits (1 geste sec)
- Laver la plaque 5x avec une solution tampon TBS-T (composition p6) : Remplir avec la pissette puis vider par retournement. Au dernier lavage laisser la plaque retournée sur papier pour « sécher »,
- Ajouter 200µl/puits de la solution tampon TBS-T complétée avec 5% de lait écrémé (Régilait)
- Incuber 2h à température ambiante avec agitation
- Congeler les plaques à -20°C

4. Préparation de la solution d'antigènes viraux et « coating » des plaques

- Calculer le volume de solution d'antigènes viraux requis pour une plaque ELISA
- Préparer une solution d'antigènes viraux à 1µg/mL dans une solution tampon PBS 1X
- Distribuer 100µL par puits de plaque MW96 (Nunc Immunosorp)
- Incuber à 4°C sans agitation jusqu'au lendemain

(Les plaques que vous aurez préparées seront congelées à -20°C et utilisées par le groupe suivant)

5. Préparation du test :

Chaque binôme devra réfléchir aux dilutions de sérums (dilutions en série à partir d'une dilution initiale 1/2000) ainsi qu'aux contrôles à réaliser. Les différentes conditions seront analysées en duplicats ou 3 réplicats biologiques.

Attention de prendre en compte le fait que le sérum de souris est en quantité limitante, il faut donc optimiser son utilisation. Vous disposerez de 5µl d'un échantillon de serum pré-dilué au 1/10^{ème}.

TP ELISA - Séance 2

(3,5 heures)

1. Récupération des plaques « coatées » avec les antigènes viraux (Ad5) et saturées (TBS-0,05% Tween 20-5% lait écrémé) lors de la séance n°1.

2. Préparation des dilutions de sérum

En vous servant de vos calculs réalisés en amont de la séance, réaliser votre gamme de dilution et le (ou les) contrôle(s) approprié(s) en TBS-T + 5% lait écrémé en utilisant des tubes « eppendorf ».

3. Transfert des dilutions préparées

- Retourner la plaque pour vider les puits (1 geste sec)
- Laver 5x avec du TBS-T les plaques saturées (remplir avec la pissette puis vider par retournement) ; Au dernier lavage laisser la plaque retournée sur papier pour « sécher »
- Transférer les dilutions de sérum (100 µl) sur les plaques lavées (selon votre plan de plaque)
- Incuber 45 min à température ambiante avec agitation douce
- Durant l'incubation : *discussion sur les différentes méthodes ELISA*

4. Fixation de l'anticorps secondaire

- Retourner la plaque pour vider les puits (1 geste sec)
- Laver 5x au TBS-T (remplir avec la pissette puis vider par retournement) ; Au dernier lavage laisser la plaque retournée sur papier pour « sécher »
- Ajouter 100µl de solution d'anticorps secondaire anti-isotype murin couplé à la peroxydase (Anticorps choisi selon les anticorps murins que l'on veut détecter, dilution 1/2500 en TBS-T 5% lait écrémé ; à *préparer avant les lavages*)
- Incuber 30 min à température ambiante avec agitation douce
- Durant l'incubation : *discussion sur l'analyse et la présentation des résultats*

6. Révélation du test et lecture des plaques

- Retourner la plaque pour vider les puits (1 geste sec)
- Laver 5x au TBS-T (remplir avec la pissette puis vider par retournement) ; Au dernier lavage laisser la plaque retournée sur papier pour « sécher »
- Ajouter 200µl d'une solution d'OPD (1 pastille de chaque dans 20 ml d'eau ; à *préparer avant les lavages*).
- Incuber 30 min à l'obscurité sans agitation
- Arrêter la réaction avec 50µl d'HCl 3N
- Mesurer la densité optique (DO), aussi appelée absorbance, à 490nm (lecteur de plaque)
- Chaque binôme remet un exemplaire de ses résultats à l'enseignant et en garde un pour préparer son compte-rendu (rappel des objectifs, résultats bruts, analyse des résultats et interprétation).

Réactifs

Réactifs biologiques

Antigènes viraux :

- Sérums de souris injectées par des adénovirus recombinants (sérums déjà **dilués au 1/10**, aliquots de 50µl)
- Solution d'antigènes adénoviraux à **50µg/ml** (aliquotés en tube de 1 ml)
- Lait écrémé en poudre

Anticorps secondaire (anti-isotype)

Goat anti-mouse IgG-HRP human adsorbed (ref 1030-05, Southern Biotechnology Associates)

Tampon Phosphate-Buffered Saline (PBS)

1,37 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na₂HPO₄

18 mM KH₂PO₄.

Tampon Tris-Buffered Saline (TBS) 10X (mis à disposition)

160 g NaCl

4 g KCl

60 g Tris base

dans 1600 ml d'eau

Ajuster le pH à 7,4 avec HCl pur (30-35 ml)

Qsp 2 litres avec de l'eau

Tampon TBS-T

TBS 1X complété avec 0,05 % poids/volume de Tween 20 (tensioactif non ionique)

Révélateur (attention toxique : manipuler avec des gants)

OPD (Sigma Fast o-Phenylenediamine dihydrochloride tablet sets, ref P-9187)

Préparer par plaque 96 puits :

1 pastille jaune

1 pastille blanche

Qsp 20ml d'H₂O

Vortexer pour dissoudre (long)

HCl 3N

38,7 ml d'HCl pur

111,3 ml d'H₂O (150 ml final)

Matériel

Pipettman de 20 μ l, 200 μ l et 1mL

Pissettes pour TBST

Balances de pesée

Plaques ELISA Immunoabsorb

Spectrophotomètre lecteur de plaque (DO490nm)

Papier aluminium

Distributeur pour combitips + combitips

Agitateur

Vortex

Parafilm

Tubes Eppendorf d'1,5 ml et 2 ml

Tubes Falcon de 15 et 50 ml

4 éprouvettes graduées d'1 litre

Réservoirs en plastique

Pipette multicanaux

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<input type="checkbox"/>											
B	<input type="checkbox"/>											
C	<input type="checkbox"/>											
D	<input type="checkbox"/>											
E	<input type="checkbox"/>											
F	<input type="checkbox"/>											
G	<input type="checkbox"/>											
H	<input type="checkbox"/>											

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<input type="checkbox"/>											
B	<input type="checkbox"/>											
C	<input type="checkbox"/>											
D	<input type="checkbox"/>											
E	<input type="checkbox"/>											
F	<input type="checkbox"/>											
G	<input type="checkbox"/>											
H	<input type="checkbox"/>											