

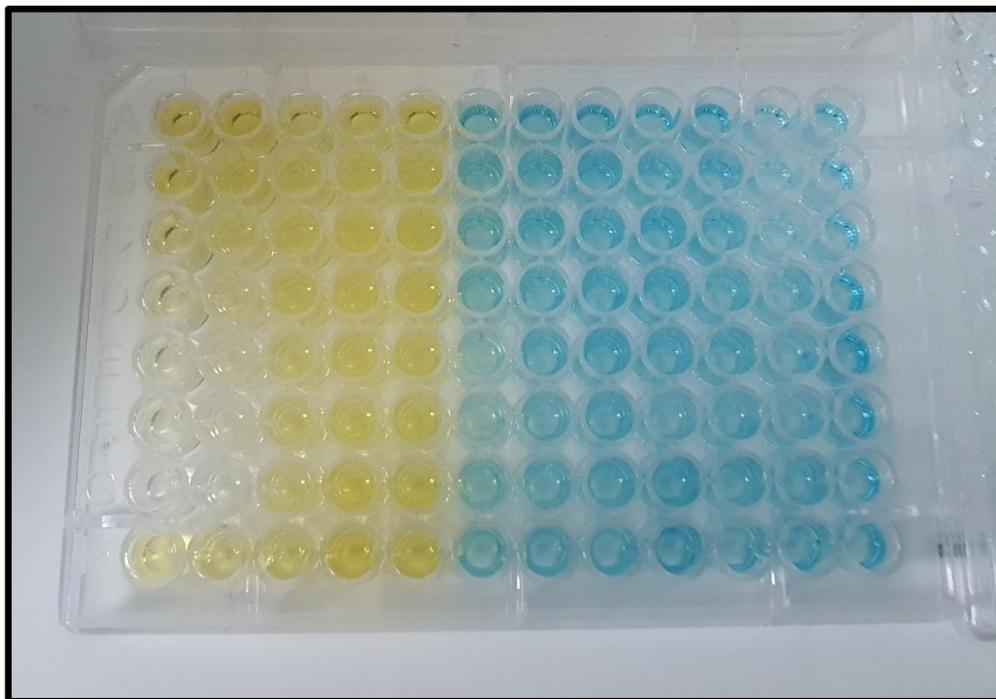
BROCHURE DE TRAVAUX PRATIQUES

**Dosage de la cytokine pro-inflammatoire Tumor Necrosis Factor-alpha
(TNF- α) dans un homogénat hépatique de souris Swiss Albinos**

Avec le kit :

Mouse TNF- α Uncoated ELISA

(ELISA non revêtu pour TNF- α de souris)



Mouse TNF- α Uncoated ELISA

ELISA non revêtu pour TNF- α de souris

Cat number : 88-7324-Invitrogen

Sensibilité : 8 pg

Plage de la courbe standard : 8 \rightarrow 1000 pg/ml

Stockage : entre 2 et 8°C

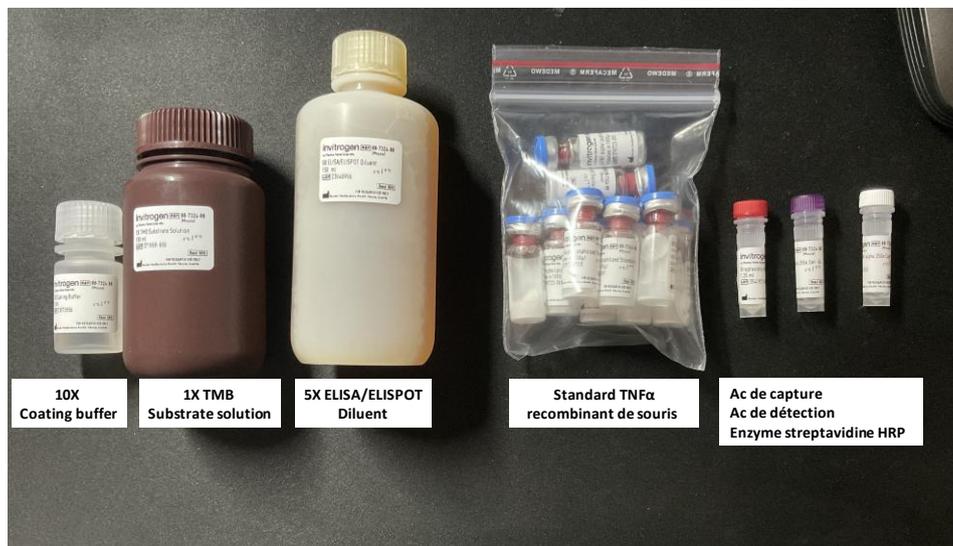
Durée du TP : 5h

Description :

Ce kit ELISA non revêtu pour le TNF α de souris contient les réactifs standards, tampons et diluants nécessaires à la réalisation de dosages quantitatifs par immun-enzymologie (ELISA). Cet ensemble est spécialement conçu pour une mesure précise et exact des niveaux de protéines TNF α de souris dans les échantillons tels que : le sérum, le plasma, les homogénats tissulaires, les fluides de lavage et les surnageants de cultures cellulaires.

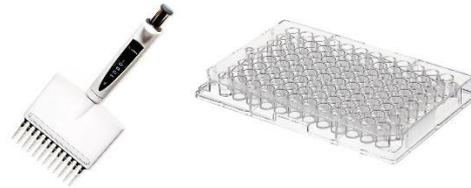
Contenu du kit : composant pour formats de 10 plaques (10 x 96 puits)

- 1) **Ac de capture** : Ac anti TNF α de souris purifié et prétitré.
1 flacon de 500 μ l d'Ac de capture concentré (250X)
- 2) **Ac de détection** : Ac anti TNF α de souris conjugué à la biotine et prétitré
1 flacon de 500 μ l d'Ac de détection concentré (250X)
- 3) **Standard TNF α recombinant de souris** : pour générer une courbe standard et calibrer les échantillons
10 flacons de standard TNF α de souris lyophilisé, 1000 pg/ml après reconstitution.
- 4) **Tampon de revêtement (coating buffer)**
1 flacon 12ml de tampon phosphate saline concentré (PBS 10X)
- 5) **Diluant 5X pour ELISA/ELISPOT**
1 bouteille de 150ml de diluant concentré 5X
- 6) **Enzyme**
1 flacon (1,25ml) de streptavidine HRP concentré prétitré (100X).



Accessoires et autres matériel

- 1) Tampon de lavage PBS 0,05 de Tween 20 (*préparation en annexe*).
- 2) Solution d'arrêt 2N H₂SO₄ (*préparation en annexe*)
- 3) Micropipettes multicanaux
- 4) Plaque 96 puits Costar™ 9018 (corning)
- 5) Lecteur de plaque ELISA 96 puits.



Préparation des réactifs

Si des cristaux se forment dans le concentré de tampon chauffez les doucement jusqu'à ce qu'ils se dissolvent complètement.

1) Tampon de revêtement (1X)

Préparez une solution 1 :10 de PBS (0X) dans le l'eau déionisée

2) Anticorps (*Antibody*)

Diluez L'Ac de capture (250X) 1 :250 dans le tampon de revêtement (1X) (*coating buffer*)

3) Diluez le concentré de diluant (*diluant concentrate*) (5X) 1 :5 dans l'eau déionisée

4) Standards : reconstituez le standard de TNF α murin en ajoutant de 1ml d'eau distillée, agitez ou mélanger doucement pour assurer une solubilisation complète et homogène (concentration du standard reconstitué = 1000pg/ml).

Remarque : Le standard doit être utilisé immédiatement après la reconstitution et ne peut être conservé.

5) Anticorps de détection (*detection antibody*)

Diluer l'Ac de détection (250X) 1 :250 dans le diluant ELISA/ELISPOT (1X)

6) Enzyme

Diluer le concentré HR (100X) 1 :100 dans le diluant ELISA/ELISPOT (1X)

Procédure expérimentale

- 1) Revêtir la plaque ELISA COSTAR 9018 avec **100µl/puits du tampon de revêtement contenant l'Ac de capture 1/250** (comme indiqué dans la préparation des réactifs). Scellez la plaque et incubez **toute la nuit** à 4°C sous agitation.
⇒ **L'étape 1 est préalablement effectué par l'enseignant la veille du TP**
- 2) Aspirez les puits et lavez les 3 fois avec 250µl de tampon de lavage PBS-T. Accordez du temps pour le lavage (environ 1minute). Epongez la plaque sur du papier absorbant pour éliminer tout tampon résiduel.
- 3) Bloquez les puits avec **200µl de diluant ELISA/ELISPOT (1X)**. Scellez la plaque et incubez à température ambiante pendant **1h**.
⇒ **Pendant ce temps : explication de la technique**
- 4) Préparez le standard (voir préparation réactif).
- 5) Aspirez et lavez au moins 1 fois avec le tampon de lavage PBS-T
- 6) Réalisez les dilutions en séries de 2 fois des standards de plus haute concentration pour créer la courbe standard avec un total de 8 puits. Pour cela :
⇒ Ajoutez **100µl de diluant ELISA/ELISPOT (1X)** dans les puits, en laissant les 1^{ers} puits, (A1, A2), vides,
⇒ Ajoutez 200µl/puits de la concentration la plus élevée du standard dans les 1^{ers} puits vides (A1, A2).
⇒ Transférez 100µl du standard de concentration la plus élevée des puits A1, A2 vers les puits B1, B2.
⇒ Mélangez le contenu des puits B1, B2 par aspirations et éjections répétées, puis transférez 100µl dans les puits C1, C2. Prenez soins de ne pas rayer la surface des micro-puits.
⇒ Répétez cette procédure 5 fois.
- 7) Ajoutez **100µl/puits des échantillons** dans les puits appropriés
- 8) Ajoutez **100 µl de diluant ELISA/ELISPOT (1X)** dans le puits témoin (blanc). Scellez la plaque et incubez à température ambiante pendant **2h** ou toute la nuit à 4°C pour une sensibilité maximale.
⇒ **Pendant ce temps : explication complémentaire de la technique + examen de TP**
- 9) Préparez l'AC de détection (voir préparation des réactifs)
- 10) Aspirez et lavez comme indiqué à l'étape 2 (faire un total de 3 à 5 lavages). Epongez la plaque sur du papier absorbant.
- 11) Ajouter **100µl/puits de l'Ac de détection** dilué dans tous les puits. Scellez la plaque et incubez à température ambiante pendant **1h**.
⇒ **Pendant ce temps : explication de l'exploitation et de l'interprétation des résultats**
- 12) Préparez le stréptavidine HR dilué (voir préparation réactif)
- 13) Aspirez et lavez comme indiqué à l'étape 2 (faire un total de 3 à 5 lavages). Epongez la plaque sur du papier absorbant
- 14) Ajoutez **100µl/puits de streptavidine HR** dilué. Scellez la plaque et incubez à température ambiante pendant **30min**.
- 15) Aspirez et lavez comme indiqué à l'étape 2 (5 à 7 lavages, 1 à 2 min/lavage). Epongez la plaque sur du papier absorbant
- 16) Ajoutez **100µl/puits de solution TMB 1X** et incubez à température ambiante pendant **10min**.
- 17) Ajoutez **100µl/puits de solution d'arrêt**.
- 18) Lisez la plaque à 450nm.

ANNEXES

Principe général de la détection sandwich

1- Fixation de L'Ac de capture de TNF α :

L'Ac de capture est fixé au fond du puit. Contrairement aux plaques en polystyrène brut (hydrophobes), la surface de la plaque Costar 9018 (High binding) est traitée pour être hydrophile et favoriser une adsorption passive et stable des Ac, renforcée par des interactions électrostatiques et hydrogène. Capacité de liaison (~400–500 ng/cm²).

2- Capture du TNF α :

Le TNF α présent dans l'échantillon est capturé par l'Ac de capture qui reconnaît spécifiquement un épitope.

3- Détection du TNF α :

L'Ac de détection **biotinylé** se fixe sur un autre épitope du TNF α .

4- Fixation de stréptavidine-HRP :

Se lie à l'Ac de détection biotinylé (*grâce à la très haute affinité entre la biotine et la stréptavidine*).

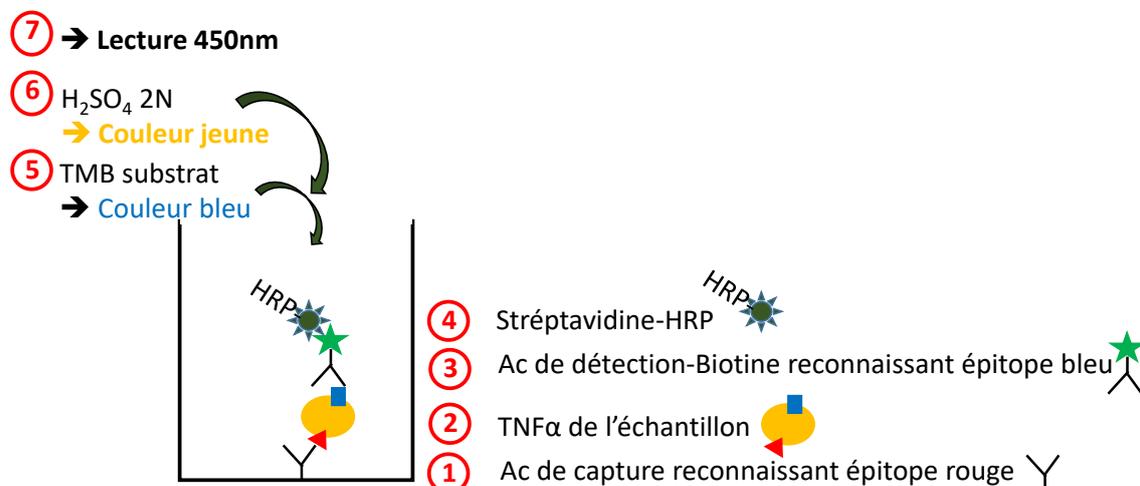
5- Révélation avec le substrat TMB:

L'enzyme HRP oxyde le substrat TMB (3,3',5,5' tetraméthylbenzidine) en présence de H₂O₂ et donne une couleur bleu (réaction chromogène).

6- Arrêt de la réaction :

En rajoutant l'acide sulfurique H₂SO₄ 2N → transformation de la couleur bleu en jaune et stabilisation du signal.

7- Lecture à 450nm.



Préparation du tampon de lavage PBS-Tween 20 (0,05%) → PBS-T (1x)

Pour 1 L :

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na₂HPO₄, 12H₂O / ou 0,57 g Na₂HPO₄ anhydre

0,24 g KH₂PO₄

+ 0,5 ml Tween 20

+ H₂O qsp 1 L

Vérifier pH = 7,4

} Dissoudre tout dans 800 ml H₂O

Rq : dans les marquages immunologiques on rajoute du Tween 20 à la solution de lavage car c'est un détergent qui élimine les interactions non spécifiques.

Préparation de la solution d'arrêt H₂SO₄ 2N

Rappels théoriques utiles au calcul :

La normalité indique la concentration en équivalents d'ions H⁺ / litre de solution.

H₂PO₄ peut libérer 2 H⁺ → la relation entre normalité (N) et molarité (M) est : $N = 2M$

Donc une solution de 1M de H₂SO₄ est 2N

La molarité (M) exprime le nombre de mole/litre → pour préparer une solution 2N de H₂SO₄ on dissout 1 mole (98g) dans 1 litre H₂O.

Lorsque H₂SO₄ est sous forme liquide...

La forme commerciale de H₂SO₄ concentré est à 98% (contient 98g de H₂SO₄ pour 100 g de solution.

On veut une solution 2N donc 1M car : $N = 2M \rightarrow M = N/2 = 2/2 = 1$

⇒ Il faut 1mole dans 1L d'H₂O

Comment déterminer le volume qui contient 1 mole ??

On utilise la masse volumique : $\rho_{(H_2SO_4) \text{ concentré } 98\%} = 1,84 \text{ g/ml}$

ON veut 1 mole, donc, 98 g. Donc il nous faut 100g de solution.

1,84 g → 1 ml
100 g → x

$X = 100 \text{ g} / 1,84 \text{ g/ml} = 54,3 \text{ ml}$

Pour 1 L de H₂SO₄ 2N:

800 ml H₂O dans un bécher,

Ajouter progressivement 54,3 ml de H₂SO₄ en agitant avec un ustensile en verre,

+ H₂O qsp 1 L

Attention : ajouter toujours l'acide dans l'eau, jamais l'inverse (risque d'ébullition).

Préparation de la gamme étalon TNF α et organisation de la plaque 96 puits

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
100 μ A	200 μ l TNF α 8 pg	200 μ L TNF α 8 pg	100 μ l Echant									
100 μ B	100 μ l Diluant 1X	100 μ l Diluant 1X										
100 μ C	100 μ l Diluant 1X	100 μ l Diluant 1X										
100 μ D	100 μ l Diluant 1X	100 μ l Diluant 1X										
100 μ E	100 μ l Diluant 1X	100 μ l Diluant 1X										
100 μ F	100 μ l Diluant 1X	100 μ l Diluant 1X										
Blanc	100 μ l Diluant 1X	100 μ l Diluant 1X										
	100 μ l Diluant 1X	100 μ l Diluant 1X										

Remarques :

- *Pour tous les constituants du Kit, ne diluer que les quantités requises pour la manipulation du jour. Toutes les solutions et surtout les Ac doivent être conservés à 4°C à leur état concentré.*
- *Lorsqu'on doit pipeter directement dans les flacons du kit, cela doit toujours être fait avec des cônes neufs ou des pipette Pasteur propre et préalablement lavées avec de l'eau distillée.*
- *A défaut d'eau ultra-pure, il est possible d'utiliser une eau doublement distillée pour l'ELISA.*

Interprétation

⇒ Complétez le tableau

Courbe étalon

[TNF α] (pg/ml)	8	4	2	1	0,5	0,25
DO 450nm

⇒ Sur Excel, réaliser la courbe de régression linéaire représentant la variation des DO en fonction des concentrations croissantes de TNF- α .

⇒ Afficher l'équation de la courbe et le coefficient de détermination (R^2).

⇒ Calculer les concentrations en TNF- α dans les échantillons à partir de l'équation de la courbe.

⇒ Représenter ces résultats sous forme d'histogramme.

⇒ Mettez les écart-types.

Expliquer :

⇒ Le mécanisme moléculaire qui se déroule dans le milieu réactionnel lorsqu'on rajoute le substrat TMB dans le puit qui est à l'origine de l'apparition de la couleur bleu.

⇒ Pourquoi la couleur vire au jaune lorsqu'on rajoute la solution d'arrêt.

⇒ Pourquoi la mesure de DO se fait-elle à 450 nm ?