

Test ELISA : gamme complète

Anticorps de lapin anti-BSA sur support tapissé de **BSA** (Bovine Serum Albumin) et utilisation d'un **anticorps de lapin anti-anti-BSA** couplé à la peroxydase.

Avant de commencer la manipulation : repérer les différentes solutions disponibles ainsi que la poubelle à cônes et s'assurer que vous savez faire fonctionner la pipette automatique.

Opérations	Puits								Remarques
	encoche								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Coating</i>	Fixation et lavage déjà réalisés								Fixation de BSA (par effet électrostatique) sur toute la surface intérieure des puits.
Opération 1 Sérum de lapin	C 1 17 µg/mL = 80 µL	C 2 8,5 µg/mL = 80 µL	C 3 4,25 µg/mL = 80 µL	C 4 2,125 µg/mL = 80 µL	C 5 1,063 µg/mL = 80 µL	C 6 0,531 µg/mL = 80 µL	C 7 0,266 µg/mL = 80 µL	C 8 0,138 µg/mL = 80 µL	ATTENTION. Changer le cône de la micropipette pour chaque nouvelle solution. Incuber 15 minutes à température ambiante sur la paillasse.
Opération 2 : 2 lavages Tampon PBS-Tween	Vider les puits en les retournant énergiquement dans l'évier. Sécher en tapotant la barrette renversée sur du papier absorbant. Remplir totalement les puits utilisés avec du tampon PBS-Tween . Recommencer (vider, sécher, remplir de tampon PBS-Tween). Vider les cupules en les retournant énergiquement dans l'évier. Sécher en tapotant la barrette renversée sur du papier absorbant.								Changer le cône qui pourra ensuite être utilisé pour tous les puits (solution identique). Le but est d'éliminer tout l'anticorps anti-BSA non lié à la BSA qui tapisse les cupules.
Opération 3 Conjugué = anticorps de détection	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	Changer le cône qui pourra être utilisé pour tous les puits (solution identique) Le conjugué (= anticorps de détection = anticorps anti-anti-BSA) se fixe spécifiquement aux anticorps anti-BSA (liés à la BSA qui tapisse les cupules) et il est couplé à une enzyme (ici la peroxydase). Incuber 15 minutes à température ambiante sur la paillasse.
Opération 4 : 2 lavages Tampon PBS-Tween	Procéder de la même manière qu'à l'opération 2.								L'opération a pour but d'éliminer tout le conjugué non lié à l'anticorps anti-BSA.
Opération 5 : révélation TMB (= substrat)	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	Changer le cône qui pourra ensuite être utilisé pour les autres puits (solution identique). Le TMB (= tétra-méthyl-benzidine) est un substrat de la peroxydase (réaction colorée). Incuber 5 minutes à température ambiante avant interprétation . L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de peroxydase, donc proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-BSA.

Test ELISA : détection et dosage d'un anticorps

Détection et dosage d'un **anticorps de lapin anti-BSA** à l'aide d'un supports tapissé de **BSA** (Bovine Serum Albumin) et d'un **anticorps de lapin anti-anti-BSA** couplé à la peroxydase.
Avant de commencer la manipulation : repérer les différentes solutions disponibles ainsi que la poubelle à cônes et s'assurer que vous savez faire fonctionner la pipette automatique.

Opérations	Puits								Remarques
	encoche								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Coating</i>	Fixation et lavage déjà réalisés								Fixation de BSA (par effet électrostatique) sur toute la surface intérieure des puits.
Opération 1 Sérum de lapin	vide	vide	négatif 80 µL	C n 80 µL	C n 80 µL	C n 80 µL	C n+1 80 µL	C n+2 80 µL	ATTENTION. Changer le cône de la micropipette pour chaque nouvelle solution. Négatif : sérum de lapin non immunisé contre la BSA. C n à C n+2 : contiennent éventuellement des anticorps anti-BSA à doser. Incuber 15 minutes à température ambiante sur la paillasse.
Opération 2 : 2 lavages Tampon PBS-Tween	Vider les puits en les retournant énergiquement dans l'évier. Sécher en tapotant la barrette renversée sur du papier absorbant. Remplir totalement les puits utilisés avec du tampon PBS-Tween . Recommencer (vider, sécher, remplir de tampon PBS-Tween). Vider les puits en les retournant énergiquement dans l'évier. Sécher en tapotant la barrette renversée sur du papier absorbant.								Changer le cône qui pourra ensuite être utilisé pour tous les puits (solution identique). Le but est d'éliminer tout l'anticorps anti-BSA non lié à la BSA qui tapisse les cupules.
Opération 3 Anticorps de détection ou conjugué	vide	80 µL	80 µL	vide	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	Changer le cône qui pourra être utilisé pour tous les puits (solution identique). Le conjugué (= anticorps de détection = anticorps anti-anti-BSA) se fixe spécifiquement aux anticorps anti-BSA (lié à la BSA qui tapisse les cupules) et il est couplé à une enzyme (ici la peroxydase). Incuber 15 minutes à température ambiante sur la paillasse.
Opération 4 : 2 lavages Tampon PBS-Tween	Procéder de la même manière qu'à l'opération 2.								L'opération a pour but d'éliminer tout le conjugué non lié à l'anticorps anti-BSA.
Opération 5 : révélation TMB (= substrat)	80 µL conjugué + 80 µL TMB	80 µL	80 µL	80 µL	vide	80 µL	80 µL	80 µL	Après avoir déposé le conjugué dans le puits 1, changer le cône qui pourra ensuite être utilisé pour les puits (solution identique). Le TMB (= tétra-méthyl-benzidine) est un substrat de la peroxydase (réaction colorée). Incuber 5 minutes à température ambiante avant interprétation . L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de peroxydase, donc proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-BSA.