

Matériel disponible et protocole d'utilisation du matériel

Principe : La technique ELISA (**Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay**) est une technique immuno-enzymatique de détection d'un antigène (Ag). L'Ag est « capturé » par un anticorps de capture (Ac1). Un second anticorps de détection (Ac2), sur lequel est fixée une enzyme (E), va révéler la présence de l'Ag en présence d'un réactif : le réactif d'Ellman, substrat de l'enzyme E, qui est transformé en produit coloré jaune par celle-ci (réaction enzyme-substrat).

Matériel disponible :

- 4 solutions à tester (les produits ont été dilués dans de l'eau distillée) :
 - Une solution de β -lactoglobuline bovine (20 ng.mL^{-1})
 - Une « solution » de lait végétal.
 - Une « solution » de lait cru de vache
 - De l'eau distillée.
- barrette de puits au fond desquels sont fixés des anticorps anti- β lg (**Ac1**) permettant de "capturer" l'Ag.
- solution d'un deuxième anticorps anti- β lg (**Ac2**) de "détection" (ou « traceur ») des Ag fixés : cet anticorps anti- β lg est associé à une enzyme **E**.
- solution du réactif d'Ellman, substrat de l'enzyme E. Celle-ci transforme le réactif d'Ellman incolore en produit coloré jaune (réaction enzyme-substrat).
- solution de lavage
- une pipette de prélèvement avec embouts jetables
- gants, lunettes, papier filtre, cuvette ou évier à proximité, micropipettes et embouts jetables (ou équivalent), un feutre permanent, un chronomètre, récipient avec eau de javel pour mettre les embouts usagés.

1. **Organiser** votre plan de travail pour manipuler proprement en respectant les règles de sécurité.
2. **Numéroter** les puits de 1 à 4 (Une barrette de 8 puits à partager entre 2 binômes)
3. **Déposer** dans chacun d'eux $100 \mu\text{L}$ d'une des solutions à tester (noter les numéros des solutions correspondant à chaque puits).
4. **Ajouter dans chacun des puits $100 \mu\text{L}$** de solution d'anticorps de détection Ac 2 (associés à l'enzyme E).

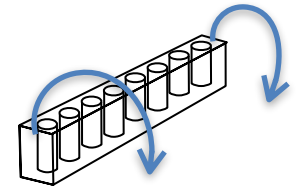
Les niveaux des liquides doivent être, au final, équivalents.

5. **Laisser incuber** 15 min à température ambiante.

Appeler l'examineur pendant ce temps d'attente afin qu'il vérifie la qualité de la manipulation.

Commencer à réfléchir à l'étape 3.

6. **Vider** la barrette en la renversant horizontalement (voir schéma ci-contre) et d'un geste rapide au-dessus de l'évier de manière à éviter le mélange des produits. Avant de la remettre à l'endroit, **tamponner** la surface des puits sur du papier filtre pour éliminer l'excès de produits et éviter la contamination.
 7. **Remplir** tous les puits aux 3/4 avec la solution de lavage, sans débordement, et vider immédiatement comme précédemment. **Répéter** 2 fois ce lavage (3 lavages en tout).
 8. **Ajouter dans chaque puits $200 \mu\text{L}$** de réactif d'Ellman (substrat de l'enzyme).
- Les niveaux doivent être, au final, équivalents.
9. **Laisser agir** 7 minutes (jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune dans certains puits) et lire les résultats.



Appeler l'examineur pour vérifier les résultats.