

# Dosage de la SAH par 2 techniques d'immunoprécipitation

## **1. Dosage de SAH par la technique de Mancini**

### 1.1. Principe et objectif de la technique

Principe immunoprécipitation quantitative par immunodiffusion radiale

Objectif: dosage d'une protéine : la SAH

### 1.2. Protocole

La technique est réalisé en microméthode avec des gels qu'il faut préparer.

#### a) Préparation de la plaque de gel d'agarose et incorporation du système Ac

Glaçage des supports: (facultatif en boîte de Pétri)

A partir d'une solution à 0,3% d'agarose (150 mg pour 50 ml d'eau distillée préparés à ébullition), passer à l'aide d'un pinceau une fine couche de ce mélange au fond de petites boîtes de pétri (ou sur des lames de microscope) et laisser sécher en position inclinée

Incorporation du système Ac dosant:

Préparation de 3 ml de gel:

- ajouter 120 $\mu$ l du système Ac antisérum humain total à 1900 $\mu$ l de tampon PBS préchauffés à 56°C dans un tube à essai et maintenir à 56°C

- ajouter à ce système 2ml d'agarose à 2 % en tampon véronal pH 8,6 en surfusion à 56°C

- homogénéiser par retournement et maintenir à 56°C

Vérifier la température: risque de dénaturation des Ac

Coulage sur support glacé:

- placer le support glacé sur une table parfaitement horizontale et répartir uniformément ce mélange

- laisser prendre le gel pendant Va d'heure à 4°C

Réalisation des puits:

- pour une boîte de Pétri: 6 puits de 2,5 mm de diamètre à l'emporte pièce plus aspiration sans fendre le gel (risque d'altération de diffusion) dont un puits central

#### b) Réalisation de la gamme étalon

A partir d'une solution étalon de SAH à 2g/L, réaliser la gamme avec les points suivants: 0,25; 0,50; 0,75 et 1,00g/L en tampon PBS.

#### c) Dépôts, immunodiffusion et révélation

Dépôts:

- déposer les solutions étalons et la solution à doser à raison de 7 $\mu$ l par puits

- laisser les boîtes immobiles pendant 30 minutes pour ne pas perturber l'entrée dans le gel du liquide déposé

Immunodiffusion:

- préparer une chambre humide (boîte et du papier filtre humide): l'immunodiffusion doit se réaliser sans déshydratation

- laisser diffuser pendant 24 h minimum

Lecture

- observer à l'œil nu ou après une coloration

- mesurer le diamètre des disques

### 1.3. Interprétation-compte rendu

- principe de la technique utilisée

- matériels, dilutions, aspects des résultats

- tableau de résultats expérimentaux

- tracé sur papier millimétré de la courbe d'étalonnage en indiquant la loi utilisée

- déterminer la concentration de la solution inconnue

## **2. Technique d'électroimmunodiffusion quantitative: technique de Laurell**

### **2.1. Principe et objectif de la technique**

Principe: immunoprécipitation quantitative par électroimmunodiffusion

Objectif : dosage d'une protéine : la SAH

### **2.2. Protocole**

La technique est réalisée en microméthode avec des gels qu'il faut préparer

#### **a) Préparation de la plaque de gel d'agarose et incorporation du système Ac**

##### **Glaçage des supports**

A partir d'une solution à 0,3% d'agarose glycinée (150 mg pour 50 ml d'eau distillée préparés à ébullition + 0,25 ml de glycérine), passer à l'aide d'un pinceau une fine couche de ce mélange sur les lames de Laurell et laisser sécher en position inclinée.

##### **Incorporation du système Ac dosant:**

Préparation de 8 ml de gel à 1% d'agarose:

- prélever 4ml d'agarose à 2% en tampon véronal pH 8,6 en surfusion à 56°C et les mélanger à 4ml de tampon véronal préchauffés à 56°C dans un tube à essai
- ajouter 200µl du système Ac antisérum humain total
- homogénéiser par retournement et maintenir à 56°C

##### **Coulage sur support glacé:**

- placer le support glacé sur une table parfaitement horizontale et répartir uniformément les 8ml du mélange
- laisser prendre le gel pendant 3/4 d'heure à 4°C

##### **Réalisation des puits:**

- réaliser 5 puits de 2,5mm de diamètre à l'emporte pièce plus aspiration sans fendre le gel (risque d'altération de diffusion) à 2 cm du bord inférieur

#### **b) Réalisation de la gamme étalon**

A partir d'une solution étalon de SAH à 2 g/L, réaliser la gamme suivante en tampon véronal: [250, 500, 750, 1000] en µg/ml

##### **Dépôts, immunodiffusion et révélation**

- déposer la plaque de Laurell dans la cuve à électrophorèse (il vaut mieux faire les dépôts quand la plaque est déjà en place afin de limiter les phénomènes de simple diffusion): attention au choix de l'emplacement
- déposer les solutions étalons et la solution à doser à raison de XµL par puits

##### **Electroimmunodiffusion:**

- réaliser un contact avec les réservoirs de tampons anodiques et cathodiques par l'intermédiaire de papiers filtres imbibés de tampon de migration
- migration électrophorétique: sous tension constante de 7 à 10 V/cm au niveau du gel durant 120 minutes

##### **Lecture**

- l'observation à l'œil nu est possible mais une coloration est préférable
- coloration: sécher le gel avec du papier filtre puis l'enlever après l'avoir légèrement humecté pour ne pas déchirer le gel
- colorer 30 sec au noir Amido puis décolorer dans 3 bains successifs d'acide éthanoïque à 5% (facultatif)

### **2.3. Compte rendu**

- principe de la technique utilisée
- matériels, dilutions, aspects des résultats, particularité expérimentale
- tableau de résultats expérimentaux
- tracé sur papier millimétré de la courbe d'étalonnage en indiquant la loi utilisée
- déterminer la concentration de la solution inconnue et comparaison des 2 méthodes