

# Marquage immunoenzymatique par immanocapture sur nitrocellulose: technique du dot blot pour la mise en évidence de gliadines dans un aliment

Introduction: le gluten de blé est un produit alimentaire obtenu après lixiviation de la farine. Il contient les protéines de réserve de la farine (gluténines et gliadines) et des traces de lipides et d'amidon. Les gliadines représentent la fraction protéique du gluten soluble dans l'éthanol à 70%.

Certains individus présentent une allergie aux gliadines se manifestant dès l'enfance (maladie cœliaque). En l'absence de régime, la mort survient rapidement. Tout aliment contenant un taux de gluten supérieur à 0,04 % doivent être exclus de l'alimentation de ces malades.

Objectifs: détecter des gliadines dans un aliment par un marquage immunoenzymatique.

## **1. Principe**

Principe: les gliadines seront fixées sur un support de nitrocellulose puis détectées à l'aide d'un anticorps spécifique marqué à la peroxydase.

## **2. Protocole**

### 1) Préparation des échantillons

Échantillons alimentaires:

- extrait A: aliment aux céréales pour enfant de plus de 6 mois extrait dans l'éthanol à 40%
- extrait B: aliment aux céréales portant la mention « dès trois mois » extrait dans l'éthanol à 40%

### 2) Fixation des échantillons

Une bande de nitrocellulose correspondant au schéma ci-dessous et prête à l'emploi est fournie:



Déposer sur la nitrocellulose sèche:

- emplacement 1: 0,8µl d'eau
- emplacement 2 et 3: 0,8µl de solution témoin gliadines à 1mg/ml
- emplacement 4: 0,8µl d'extrait A
- emplacement 5: 0,8µl d'extrait B

Le reste de la bande (en grisé) peut être utilisé pour s'entraîner à effectuer des dépôts.

### 3) Séchage et rinçage

Sécher soigneusement à l'air chaud la bande de nitrocellulose (attention à ne pas casser les bandes sèches).

Rincer 5 minutes dans un bain de tampon TBS en boîte de Pétri.

Essorer sur du papier filtre.

Découper la bande humide et transférer les carrés avec dépôts dans des tubes numérotés.

### 4) Saturation des sites

Introduire dans chaque tube 400µl de tampon SAB-TBS.

Incuber au moins 20 minutes à température ambiante sous agitation (bain agité).

### 5) Incubation

Remplacer le tampon SAB-TBS par 200µl de solution de conjugué Ac antigliadines-péroxydase pour les tubes 1, 2, 4 et 5 (solution Ac-POD) et par 200µl de solution de peroxydase (solution POD) pour le tube 3. Incuber au moins 2 heures à température ambiante sous agitation.

#### 6) Lavage

Laver 4 fois 1 minute à l'aide de 200µl de tampon TBS-Tween. La solution de lavage est éliminée par aspiration à la pipette.

Rincer à l'aide de 500µl de tampon TBS.

#### 7) Révélation

Remplacer les 500µl de tampon TBS par 200µl de réactif de révélation (réactif REV-DOT) puis laisser 30 minutes à l'obscurité.

Rincer chaque carré de nitrocellulose dans le bain de TBS en boîte de Pétri. Observer et schématiser les résultats.

### **3. Compte rendu**

- 1) Schématiser le principe de la réaction
- 2) Expliquer les rôles des tubes 1, 2 et 3
- 3) Décrire, interpréter les résultats expérimentaux et conclure