

TP Contrôle

On se propose de réaliser le dosage d'un additif alimentaire d'origine protéique (protéine P) par une technique immunoenzymatique en phase hétérogène.

Dans ce but, une gamme étalon sera réalisée en double essai. On dispose pour ce dosage d'une solution de protéine P étalon, de protéine P conjuguée à la phosphatase alcaline P-PAL et d'anticorps spécifiquement dirigés contre la protéine P.

On vous apporte une microplaque précédemment préparée sur laquelle vous devrez finir le dosage de la protéine P dans du sérum humain.

1. Matériel et réactifs à disposition du candidat:

- plaque de microtitration précédemment traité
- 10mL de SAB à 2%
- 50 mL de tampon PBS
- 50 mL de tampon PBS-Tween
- 0,5 mL de protéine P à 250µg/mL
- 2,5 mL de protéine P marquée à la phosphatase alcaline P-PAL
- 5 mL de solution tamponnée de substrat pNPP
- 2 mL de NaOH 2M
- 250µL d'additif alimentaire à doser noté S

2. Mode opératoire

2.1. Prétraitement de la microplaque

Les puits A1 à A10 et B1 à B12 ont été sensibilisés avec 200µL de solution d'anticorps anti-P à 20µg/mL.

2.2. Suite du mode opératoire

Rincer tous les puits pré-traités une fois avec du tampon PBS (250µL) puis ajouter 250µL de SAB à 2%. Incuber 50 minutes à 37°C.

Rejeter le contenu des puits, laver 3 fois en tampon PBS-Tween et rincer 2fois en PBS (250µL).

A partir de la solution étalon de protéine P fournie à 250µg/mL, réaliser en double 9 dilutions en série de progression géométrique 1/2, sous un volume de 125µL, jusqu'à la dilution $(1/2)^9$, en utilisant comme diluant du tampon PBS.

Utiliser pour ces dilutions des cupules vides de la plaque.

Distribuer 100µL de chacune de ces dilutions dans les puits A1 à A9 d'une part et de B1 à B9 d'autre part.

Le schéma ci-dessous visualise la composition des puits :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1/2								$(1/2)^9$			
B	1/2								$(1/2)^9$			

Déposer 100µL de protéine P à 250µg/mL dans le puit B12.

Déposer 100µL d'additif alimentaire à doser dans les puits A10 et B10.

Distribuer 100µL de protéine P conjuguée P-PAL dans les puits A1 à A11 et B1 à B12.

En A12, distribuer 200µL de tampon PBS.

En A11 et B11, ajouter 100µL de tampon PBS.

Placer la plaque pendant 2min sur un agitateur rotatif.

L'incuber, recouverte de son film autoadhésif, à l'étuve à 37°C pendant 45 minutes.

Laver 3 fois en tampon PBS-Tween puis rincer 2 fois en tampon PBS.

Distribuer dans tous les puits 150µL de solution de substrat pNPP. Recouvrir du film autoadhésif et incuber 15 minutes à l'étuve à 37°C.

Distribuer dans tous les puits 50 μ L de solution de NaOH.

Placer la plaque pendant 2 minutes sur agitateur rotatif puis lire les absorbances de chaque puits à 405nm dans un lecteur de microplaques à lecture automatique avec imprimante. La feuille d'impression des résultats après identification sera jointe au compte-rendu.

3. Résultats et compte-rendu

- Préciser à l'aide d'un ou plusieurs schémas le principe du dosage réalisé.
- Indiquer les compositions et en déduire les rôles des puits A11, A12, B11 et B12. Discuter des valeurs d'absorbances obtenues pour ces puits.
- Sous forme d'un tableau, présenter les quantités de protéines P exprimées en ng déposées dans les puits pour chacune des dilutions; le logarithme décimal de chacune de ces quantités; l'absorbance moyenne pour chaque puit; l'absorbance corrigée si besoin pour chaque puit.
- Tracer (si possible à l'aide de l'outil informatique) la variation de l'absorbance à 405 nm en fonction du logarithme décimal des quantités de protéines P.
- Commenter l'allure de la courbe obtenue en tenant compte du principe de la technique utilisée.
- En déduire les paramètres fondamentaux de cette courbe d'étalonnage.
- Déterminer la concentration de protéine P dans l'additif alimentaire.