

Révision méthodes d'immuno-précipitation

1. Technique de LAURELL

On réalise le dosage d'une solution de sérum albumine humaine.

1.1. Protocole expérimental

a) Préparation de la plaque de gel

• glaçage des plaques

- Préparer une solution à 0,03% d'agarose (15mg pour 50mL d'eau distillée) par chauffage à l'ébullition. Ajouter alors 0,25mL de glycérine.
- Passer une fine couche de mélange à l'aide d'un pinceau et laisser sécher en position inclinée. (Glaçage et séchage sont réalisés à 50°C)

• préparation du mélange gel-sérum

- Prélever 4mL d'agarose en surfusion à 2% en tampon véronal et les mélanger à 4mL de tampon véronal à 56°C dans un tube à essai.
- Ajouter alors 0,250mL d'immun sérum et homogénéiser par retournement.
- On obtient ainsi 8mL de mélange à 1% d'agarose.

• coulage de la plaque

- Placer la plaque sur une table parfaitement horizontal et répartir uniformément les 8mL du mélange sur la plaque glacée. Laisser prendre le gel.

• perforation de la plaque

- Percer 6 puits, selon un calque préétabli, à 2cm du bord.

b) Préparation des dépôts

• préparation de la gamme étalon

- A partir de la solution mère de SAH à 4g.L^{-1} , réaliser 4 points de gamme de $0,2\text{mg.mL}^{-1}$ à $0,8\text{mg.mL}^{-1}$.

• dépôts

- Afin de limiter le phénomène de simple diffusion, les dépôts seront faits la plaque dans la chambre d'électrophorèse.
- Déposer 5 μL des 4 solutions de référence et les deux essais.

c) migration et révélation

- La migration électrophorétique est réalisée sous une tension constante de 15 à 20V.cm⁻¹ durant 120min.
- La révélation sera réalisée après séchage léger du gel puis coloration 30sec au noir Amido et décoloration dans 3 bains successifs d'acide éthanoïque à 5% si nécessaire.

1.2. Compte rendu

Vous rappellerez le but et le principe de ce dosage immunologique. Vous expliquerez la réalisation de la gamme étalon, présenterez le plan des dépôts et les hauteurs des fusées. Vous établirez alors la concentration de l'échantillon à analyser.

2. Technique de Mancini

Matériel

- Gel d'agarose à 2% PBS en surfusion 4mL
- PBS pH = 7,2
- Sérum anti-sérum humain total
- Solutions étalon de SAH à 4g.L^{-1} et solution à doser

Mode opératoire

1. Préparation et coulage du gel

- Placer la boîte sur une surface plane.
- Préparer 8mL de gel d'agarose à 1% en PBS.
- Ajouter 128 μL de sérum anti sérum humain, homogénéiser
- Couler le gel et laisser prendre en masse 45 min à 4°C.

2. Réalisation des puits

- Creuser à remporte-pièce dans le gel 6 puits de 3 mm de diamètre selon le modèle ci-dessous. (Laissez une distance de 1 cm entre les puits et le bord de la boîte)
- Repérer les puits sur une matrice papier et orienter la boîte.

3. Réalisation de la gamme étalon

A partir d'une solution de SAH à 4g.L^{-1} , réaliser une gamme de dilution de 0,5 à 2mg.mL^{-1} en tampon PBS.

4. Dépôts

- Déposer les solutions étalons et les solutions à doser à raison de 5 μL par puits
- Laisser les boîtes immobiles pendant 30 minutes
- Fixer une bande de papier filtre humide sur le couvercle de la boîte, pour éviter la déshydratation du gel
- Laisser migrer 24 heures à 48 heures

Compte rendu

- Rappeler le principe d'un dosage par la technique de Mancini
- Indiquer la technique de réalisation de la gamme étalon
- Mesurer le diamètre des anneaux de précipitation obtenus
- Construire un tableau récapitulatif des résultats obtenus
- Tracer sur papier millimétré la courbe d'étalonnage
- Déterminer la concentration de la solution inconnue.

