

# Protocole du test ELISA

Vue d'ensemble des tubes:

Couleur	Contenu	Etiquetage	Quantité
vert	Antigène	“AG“	800 µl
orange	Anticorps secondaire	“sAB“	800 µl
marron	Substrat	“SUB“	800 µl
violet	Anticorps primaire	“pAB“	800 µl
bleu	Tampon de lavage	“WB“	1600 µl
jaune	Tube vide	“?“	- -



## 1. Préparation des échantillons P1 – P8 (correspondant aux échantillons de sérums à tester)

- Légèder les 8 tubes jaunes avec le numéro de votre groupe
- Introduire 60 µL d'**anticorps primaire** (pAB, résultat positif du test)

**ou**

60 µL de **tampon de lavage** (WB, résultat négatif du test) dans chacun des 8 tubes jaunes! Notez votre démarche (P1 – P8 sont les échantillons de sérum)

- Distribuer 1 tube à chacune des 8 équipes



## 2. Réalisation du test

### 2.1 Fixation de l'antigène sur la microplaque de titration

- Légèder la microplaque selon l'image ci-dessous



- Introduire 50 µl de solution d'antigène (AG, **tube vert**) dans chacun des 12 puits
- Incuber pendant 5 minutes

### 2.2 Lavage des microplaques de titration

- Tapotez les microplaques sur un papier absorbant
- Introduire 250 µl de tampon de lavage dans chaque puits



**Attention: pendant le pipetage, ne pas renverser de solution de lavage dans les autres puits!**

- Tapotez les microplaques sur un papier absorbant

### 2.3 Préparation des contrôles et des échantillons

- contrôle positif: introduire 50 µL d'anticorps primaire (pAB, **tube violet**) dans les 2 puits étiquetés “+”
- contrôle négatif: introduire 50 µL de tampon de lavage (WB, **tube bleu**) dans les 2 puits étiquetés “-”
- échantillons 1 – 8: introduire 50 µL “d'échantillons de sérums à tester” P1 – P8 (**tubes jaunes**) dans les 8 puits étiquetés correspondant
- Incuber pendant 5 minutes

### 2.4 Lavage des microplaques deux fois (voir 2.2)!

### 2.5 Ajout des anticorps secondaires

- introduire 50 µL d'anticorps secondaire (sAB, **tube orange**) dans chacun des 12 puits
- incuber pendant 5 minutes

### 2.6 Lavage des microplaques deux fois (voir 2.2)!

### 2.7 Ajout du substrat

- introduire 50 µL de substrat (SUB, **tube marron**) dans chacun des 12 puits
- Incuber pendant 5 minutes

## 3. Résultats:

Les échantillons positifs sont colorés en bleu, les échantillons négatifs restent incolores (Valider les contrôles).

Vérifiez vos résultats (P1 – P8) dans l'équipe!