PROTOCOLE

TEST DAS-ELISA Biotine *spécifique Vigne*

1. PRINCIPE DU TEST

Ce test DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une méthode immunochimique qui met en œuvre successivement deux anticorps pour détecter des antigènes. Dans un premier temps, des anticorps sont déposés et se lient à la surface d'une plaque de microtitration ; ils permettent la capture des antigènes recherchés. La présence des antigènes dans l'échantillon analysé est alors détectée grâce à des anticorps secondaires spécifiques couplés à la biotine. Le complexe immun est révélé par l'addition de streptavidine, couplée à la phosphatase alcaline (SAV-PAL), qui se lie à la biotine. Au final, l'addition du substrat de l'enzyme (pNPP) provoque l'apparition d'un produit jaune qui absorbe à 405 nm, révélant la présence éventuelle des antigènes.

Avant l'ouverture des tubes de réactifs (coating, conjugué et SAV-PAL), merci de les **centrifuger** afin de réunir tout le volume au fond des tubes.

2. PROTOCOLE

ETAPE DE COATING — code couleur : bleu

Préparation des tampons :

· Préparer le volume de tampon coating 1X nécessaire pour le test. Vous aurez besoin de 100 µL de tampon coating par puits de votre plaque ELISA (voir les recommandations pour un exemple de dilution).
· La composition des tampons est fournie page 4.
· Le tampon coating **SEDIAG** (ref: COAT-Buf) doit être dilué à sa concentration finale d'utilisation (1X) avec de l'eau osmosée ou distillée.

Préparation de l'anticorps de Coating :

· Diluer l'anticorps de coating dans le **tampon coating 1X** à la dilution requise sur l'étiquette des réactifs et également mentionnée sur la fiche technique. Homogénéiser.
· Déposer **100** µl par puits.
· Incuber la plaque 2 heures à +37°C (*)

Lavage des plaques:

· Vider les puits, dans un évier ou dans un container prévu pour ce type de déchet, en renversant la plaque ELISA. Remplir ensuite les puits à ras bord avec du tampon de lavage 1X (disponible chez SEDIAG à la concentration 20X, ref: WASH-Buf). Répéter **2** fois (voir recommandations pour plus de détails).

Note : Utiliser immédiatement les plaques fraichement préparées.

ETAPE DE FIXATION DES ANTIGENES

Préparation des tampons :

· Préparer le volume de tampon d'extraction 1X nécessaire pour le test. Vous aurez besoin de 100 µL de tampon d'extraction par puits de votre plaque ELISA.
· La composition des tampons est fournie page 4.
· Le tampon d'extraction vigne **SEDIAG** (ref: GRAPEXTR-Buf) doit être dilué à sa concentration finale d'utilisation (1X) avec de l'eau osmosée ou distillée.

(*) *Lors des incubations, les plaques doivent être couvertes par un film plastique adhésif ou un couvercle*

Préparation des échantillons :

· Broyer 1g d'échantillon dans 10 mL de **tampon d'extraction vigne** (Grapevine Extraction Buffer, voir les recommandations pour plus de détails). Dans certains cas, le ratio Echantillon/Tampon d'extraction peut être réduit dans le but d'obtenir un meilleur signal si le matériel végétal est faiblement infecté.
· Réhydrater les éventuels témoins lyophilisés selon les indications mentionnées sur l'étiquette (voir leur fiche technique).
· En suivant votre plan de plaque, déposer avec précaution **100** µl de chacun de vos échantillons et de vos contrôles positif et négatif et 100 µL de tampon d'extraction dans vos puits contrôles "tampon d'extraction"/Blanc.
· Incuber la plaque 16 heures (toute la nuit) à +4°C (*)

Lavage des plaques:

· Laver **5** fois comme précédemment.

ETAPE DE DEPOT DE L'ANTICORPS CONJUGUE BIOTINE — code couleur : rouge

Préparation des tampons :

· Préparer le volume de tampon conjugué 1X nécessaire pour le test. Vous aurez besoin de 100 µL de tampon conjugué par puits de votre plaque ELISA.
· La composition des tampons est fournie page 4.
· Le tampon conjugué **SEDIAG** (ref: CONJ-Buf) doit être dilué à sa concentration finale d'utilisation (1X) avec de l'eau osmosée ou distillée.

Préparation de l'anticorps Conjugué :

· Diluer l'anticorps conjugué dans le **tampon conjugué 1X** à la dilution requise sur l'étiquette des réactifs et également mentionnée sur la fiche technique. Homogénéiser.
· Déposer **100** µl par puits.
· Incuber la plaque 2 heures à +37°C (*)

Lavage des plaques:

· Laver **3** fois comme précédemment.

Note : Toujours préparer l'anticorps conjugué 10 minutes avant utilisation.

ETAPE DE DEPOT DE SAV-PAL — code couleur : jaune

Préparation des tampons :

· Préparer le volume de tampon conjugué 1X nécessaire pour le test. Vous aurez besoin de 100 µL de tampon conjugué par puits de votre plaque ELISA.
· La composition des tampons est fournie page 4.
· Le tampon conjugué **SEDIAG** (ref: CONJ-Buf) doit être dilué à sa concentration finale d'utilisation (1X) avec de l'eau osmosée ou distillée.

Préparation de l'anticorps Conjugué :

· Diluer la SAV-PAL dans le **tampon conjugué 1X** à la dilution requise sur l'étiquette des réactifs et également mentionnée sur la fiche technique. Homogénéiser.
· Déposer **100** µl par puits.
· Incuber la plaque **30** minutes à +37°C (*)

Lavage des plaques:

· Laver **3** fois comme précédemment.

Note : VEILLER A NE PAS DEPASSER CE TEMPS D'INCUBATION

ETAPE DE DEPOT DU SUBSTRAT

Préparation des tampons :

· Préparer le volume de tampon substrat 1X nécessaire pour le test. Vous aurez besoin de 100 µL de tampon substrat par puits de votre plaque ELISA.
· La composition des tampons est fournie page 4.
· Le tampon substrat **SEDIAG** (ref: SUBST-Buf) doit être dilué à sa concentration finale d'utilisation (1X) avec de l'eau osmosée ou distillée.

Préparation du substrat :

· Chaque tablette de substrat pNPP (ref: TAB-Acc) permet de préparer 5 mL de solution de pNPP (après reconstitution par du tampon substrat 1X porté à température ambiante), à une concentration de 1mg/mL, suffisante pour 45 puits environ. Homogénéiser.
· Si vous utilisez du substrat en poudre, le dissoudre avant utilisation à raison de 1 mg de pNPP/mL par du **tampon substrat 1X** porté à température ambiante. Homogénéiser.
· Déposer **100** µl par puits.
· Incuber la plaque à +37°C (*)
· Lire les absorbances à l'aide d'un spectrophotomètre, à 405 nm, après 1 heure et 2 heures d'incubation. Voir les recommandations pour l'interprétation des résultats.

Note : Ne pas toucher les tablettes de pNPP avec vos doigts sans gants. Ne pas exposer la solution de pNPP à une lumière trop forte. La lumière ou la contamination peuvent entraîner la présence de bruit de fond dans vos puits contenant les témoins négatifs.

(*) *Lors des incubations, les plaques doivent être couvertes par un film plastique adhésif ou un couvercle*

3. RECOMMANDATIONS

▪ **Stockage** : Afin d'assurer au maximum leur validité, Il est important de stocker les réactifs et tampons aux températures recommandées. Ne pas conserver les tampons reconstitués à la concentration 1X.

▪ **Sécurité** : Eviter le contact direct des réactifs et tampons avec les yeux ou la peau. Ne pas avaler. Il faut toujours bien vous laver les mains après l'utilisation des tampons et réactifs. N'hésitez pas à contacter SEDIAG si vous avez des questions à propos de l'utilisation de nos réactifs. Les fiches de sécurité de chacune de nos références sont disponibles sur demande.

▪ **Préparation des anticorps de Coating, Conjugué Biotine et de la Streptavidine PA**

Il est impératif d'utiliser les plaques de microtitration MaxiSorp Nunc® et de suivre un plan de plaque établi au préalable. Le volume de solution à préparer dépend du nombre de tests à réaliser. En règle générale, il est conseillé de préparer 10 ml de solution par plaque de 96 puits ou 1mL pour chaque bande de 8 puits. Déposer les solutions d'anticorps immédiatement dans la plaque ELISA après leur préparation.
Exemple : Si la dilution des réactifs (anticorps ou streptavidine) mentionnée sur leur étiquette est de **1/100** et que vous avez besoin de préparer 10 mL de solution d'anticorps, vous devrez mélanger 10 ml de tampon avec 100 µl de réactif concentré.

▪ **Lavages**

Laver les plaques avec du tampon de lavage 3 à 5 fois selon les instructions du mode opératoire. La plaque peut être vidée soit par aspiration de la solution soit par renversement en faisant un brusque mouvement de la main et en tapant fermement la plaque sur une couche de papier absorbant. Regarder ensuite le fond des puits, ils ne doivent plus contenir d'extrait de plante ni de bulles d'air. Si ceux-ci sont toujours présents, répéter le lavage et taper de nouveau fermement la plaque sur une couche de papier absorbant.

▪ **Préparation des échantillons**

Lorsque cela est possible, utiliser du matériel végétal présentant des symptômes. Généralement, la feuille est le matériel le plus utilisé pour réaliser les tests ELISA. Cependant, les tiges, graines et autres tissus peuvent également être analysés.
Pour écraser les échantillons, il est possible d'utiliser des sachets de broyage (ref: SAC-Acc) spécialement conçus, un mortier et un pilon ou tout autre appareil de broyage. Il est nécessaire de bien laver et rincer le mortier et le pilon entre chaque échantillon. Après broyage, le matériel peut être stocké à +4°C pendant 12 heures maximum. La sensibilité du test peut être altérée par une mauvaise conservation, il est donc préférable de déposer immédiatement les échantillons après broyage.
L'utilisation de contrôles positif et négatif est fortement recommandée afin de valider les résultats.

▪ **Evaluation des résultats**

Les puits dans lesquels une couleur jaune apparaît indiquent un résultat positif. Les puits dans lesquels aucune couleur significative n'apparaît indiquent des résultats négatifs. Les résultats de vos tests ne sont valides seulement si les puits dans lesquels vous avez déposé vos contrôles positifs sont positifs et si vos témoins négatifs et vos blancs sont bien négatifs. Les résultats peuvent être interprétés après plus de 60 minutes d'incubation aussi longtemps que les puits négatifs restent virtuellement clairs.

4. ASSISTANCE TECHNIQUE

Si vous avez des questions concernant l'utilisation de nos réactifs, n'hésitez pas à nous contacter pour plus de détails par téléphone (03 80 67 49 42) ou par email (info@sediag.com).

5. COMPOSITION DES TAMPONS

▪ **PBS 1X**
Dissoudre dans 1 l d'eau distillée :
NaCl ..... 8 g
Na_2HPO_4-$12H_2O$ ..... 2.9 g
KH_2PO_4 ..... 0.2 g
KCl ..... 0.2 g
NaN_3 ..... 0.2 g
Cette solution est à pH 7.4

▪ **PBST 1X = Tampon de Lavage 1X**
A 1 l de PBS, ajouter :
Tween20 ..... 0.5 ml
Cette solution est à pH 7.4

▪ **Tampon d'extraction Vigne 1X**
Dissoudre dans 1 l d'eau distillée :
Tris ..... 24.2 g
NaCl ..... 8 g
PVP (Mw 10,000-40,000) ..... 20 g
Tween20 ..... 0.5 ml
NaN_3 ..... 0.2 g
Ajuster le pH à 8.2 avec HCl

▪ **Tampon Coating 1X**
Dissoudre dans 1 l d'eau distillée :
Na_2CO_3 ..... 1.59 g
$NaHCO_3$ ..... 2.93 g
NaN_3 ..... 0.2 g
Pourpre de Bromocresol..... 5 mg
Cette solution est à pH 9.6

▪ **Tampon Conjugué 1X**
A 1 l de PBST, ajouter :
BSA ..... 2 g
Rouge Congo..... 40 mg
Cette solution est à pH 7.4

▪ **Tampon Substrat (pNPP) 1X**
Dissoudre dans 1 l d'eau distillée :
Diethanolamine ..... 97 ml
NaN_3 ..... 0.2 g
Ajuster le pH à 9.8 avec HCl