Immunodosage sans marqueur pdf

I'm not robot
reCAPTCHA

Continue

Acadpharm Jump to Skip to Search Navigation Dernière modification sur cette page le 19 janvier 2016 Synonyme: Dosage immunologique anglais: Immunoassay espagnol: inmunoensayo Etymologie: Latin imm-nis exempté de toutes les charges, qui échappe à charges, paresseux, libre de, égoïste, immaculé, pur, grec - disis ce qui est donné, portion, dose, du verbe 'deed'mi donner, suffix 'age'n. Dosage d'une substance antigénique par une méthode immunologique impliquant une réaction ou une succession de réactions antigène-anticorps. La réaction primaire, une combinaison d'épitope et de paratope, peut être révélée par l'utilisation d'un marqueur : fluorophore (ou fluorochrome), isotope radioactif (ou radioélement, radioisotope), enzyme, luminophore. Il existe quatre types de méthodes: 1- la méthode directe, permet de visualiser la réaction antigène-anticorps lui-même, l'appariement avec un marqueur de l'antigène ou de l'anticorps impliqués dans la formation du complexe; 2- la méthode indirecte, consiste à révéler la réaction de l'antigène - anticorps par un anticorps secondaire qui est couplé avec un marqueur; 3- la méthode sandwich ou immunocapture, une méthode largement utilisée, en particulier dans les méthodes de type ELISA; utilise deux anticorps, un anticorps de capture attaché à un support qui lie l'antigène à doser dans la solution, puis un deuxième anticorps qui reconnaît un épitope différent sur l'antigène et combiné avec un marqueur (enzyme, radioisotope) qui révélera la formation du complexe antigène - anticorps; 4- la méthode par compétition, peut être directe, indirecte ou sandwich, une méthode dans laquelle l'antigène à doser est concurrencé, pour la formation du complexe antigène - anticorps, avec une concentration connue du même antigène marqué (enzyme, radioisotope) par rapport à l'anticorps spécifique ajouté en quantités connues, fixes et limitées. Elle repose sur la réversibilité du lien épitope-paratope et sur le mouvement du lien vers l'équilibre. Les 3 premières méthodes, directes, indirectes et sandwiches sont faites en présence d'un excès de réactifs, contrairement à la méthode de concurrence. Use HTTP (Hypertext Transfer Protocol Secure) est un protocole utilisé par les serveurs Web pour transférer et afficher en toute sécurité du contenu Web. La plupart des navigateurs Web bloquent le contenu ou génèrent une alerte de contenu mixte lorsque les utilisateurs accèdent aux pages Web via HTTPS qui contiennent du contenu incorporé téléchargé sur HTTP. Pour empêcher les utilisateurs d'aborder cette option, utilisez l'option HTTPS. 3-IMMUNOLOGICAL TECHNIQUES 3-1-Méthodes qualitatives Ils sont utilisés en cytologie (ICC - immunocychimie) ainsi que dans la biochimie par exemple après l'électrophorèse (immunoblots). Le principe est que un anticorps spécifique sur l'antigène d'intérêt et donc de révéler la présence de cet anticorps, soit avec un deuxième anticorps suspendu sur des microparticules d'or (immunogold) ou sur lequel une enzyme est attachée (par exemple l'ioxydase). Méthodes de concurrence et méthodes non compétitives : il existe deux principaux types d'immunodosage à l'aide d'un marqueur, selon que le réactif (anticorps) est limitant ou supérieur à l'antigène à doser. Doses avec réactif excédentaire : méthodes immunométriques ou méthodes directes L'antigène entier à doser se lie à l'anticorps associé. Il est ensuite révélé par un anticorps marqué. La fraction liée est mesurée, ce qui augmente avec la concentration d'antigènes à doser (linéairement pour de faibles concentrations). Cette méthode est plus spécifique que la précédente, car elle utilise deux épitopes différents (sites antigènes) de l'antigène; il est donc inutilisable pour les haptenes. C'est encore plus sensible. Dosages avec réactif limitant : méthodes de compétition ou méthodes indirectes L'antigène à doser est en concurrence avec l'antigène marqué pour la liaison d'anticorps; tous les sites d'anticorps disponibles sont liés. La fraction contrainte est mesurée, ce qui diminue exponentiellement avec la concentration d'Ag à doser. Il peut être fait dans une phase liquide homogène ou dans une phase solide hétérogène; dans ce dernier cas, la séparation des fractions libres et réélues est facilitée. Cette méthode s'applique à tous les antigènes de toute taille, y compris les haptens. Les méthodes compétitives nécessitent l'utilisation d'un traceur, qui est un analogue de l'antigène qui peut être détecté par diverses méthodes: la molécule traceuse peut transporter un atome radioactif (tritium d'iode), une enzyme, être chemiceminscent ou même être accroché à un virus. La mesure de la liaison du traceur connecté à l'anticorps nécessite l'utilisation d'une méthode appropriée pour séparer le traceur libre et le traceur lié : la fraction liée peut être précipitée par le polyéthylène glycol (PEG) ou l'alcool après l'ajout de protéines comme formateur. La fraction libre peut être adsorbé sur le carbone activé (charbon recouvert de de dextran - la couche de dextran, un polymère de sucre entourant les grains de charbon empêche les protéines, et bien sûr aussi des anticorps à adsorbé). Ces méthodes ne peuvent être utilisées que lorsque vous travaillez sur de petites molécules, telles que les hormones stéroïdes, et ne s'appliquent pas aux hormones protéiques. Il ya beaucoup d'autres méthodes que nous ne pouvons pas mentionner tous ici. Ce qui est plus important, c'est plus le principe même de ces séparations. Il est évident que cette étape est méthodes qui évitent l'utilisation de la centrifuge. Classification des méthodes de dosage immunologique de dosage de dosage de dosage de dosage de dosage de dosage de dosage de dosage de dosage de dosage de dose de traceur avec la concurrence (anticorps limitants) Dosage non taxé (anticorps excédentaires) Radioimmunoassay radiomarqué (RIA) Analyse immunoradiométrique (IRMA) Enzyme Enzymoimmunoassay (EIA) Anticorps étiquetés enzyme (ELISA) Fluoroimmunoassay fluorescent (FIA) Analyse immunofluorométrique (IFMA) Luminoimmunoassay luminescent (LIA) Analyse immunoluminométrique (IFLA) 3-3-Exemples montrant la diversité des méthodes utilisables 3-3-1-Méthodes avec réactif excédentaire - immunoenzymétrie Ces techniques nécessitent toutes une phase de séparation; sont donc effectuées dans une phase hétérogène. Dosage d'un antigène par méthode sandwich (sandwich ELISA) L'antigène doit avoir deux épitopes différents; est inséré entre deux anticorps. L'antigène est testé avec la méthode double sandwich Dans ce cas, la fixation de l'antigène est révélée par un anticorps anti-immunoglobuline marqué, qui se lie à l'anticorps spécifique qui a reconnu l'antigène. Des anticorps anti-Ig marqués sont disponibles sur le marché; cela facilite le travail de l'utilisateur car le marquage est une opération délicate à effectuer en laboratoire. Dose directe d'un antigène (ELISA directe) Il est possible de fixer l'antigène entier présent dans l'échantillon à doser sur la paroi du tube ou de la tasse de réaction, puis de révéler cette Ag à partir de l'Ac marqué: ou de l'Ac spécifique lui-même révélé par un anti-Ac marqué Ac: Dosage d'un anticorps À la dose est pris en sandwich entre l'antigène et un anticorps. Dosage immunoenzymétrique au sens strict (IEMA - analyse immunoémométrique) Dans cette technique, la première étape se déroule dans une phase homogène : l'antigène à doser est mis en présence d'un excès d'anticorps marqués. Le milieu est ensuite placé en présence de l'antigène attaché à un support solide (phase hétérogène) afin de révéler l'anticorps marqué qui ne s'est pas collé à l'antigène pendant la première phase. Ici, A diminue avec [Ag]. 3-3-2-Méthodes avec limitation réactive - Méthodes compétitives en phase hétérogène : ce sont les techniques ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). La phase hétérogène se compose d'une phase solide (paroi tubale, microplaque, perles magnétiques...) à laquelle l'anticorps ou l'antigène (ou happene) est connecté. L'attaque peut être effectuée par de simples adases (sur plastique) ou par différents types de liaisons plus spécifiques. Ces méthodes nécessitent une étape de lavage pour éliminer l'excès de marqueur qui n'a pas été soudé. Dosage d'antigène (concours ELISA) Cette technique est la vraie technique ELISA. D'autres techniques immunoenzytiques dans la phase hétérogène, par extension, sont également appelées ELISA. Dosage d'anticorps (ELISA COMPETITION) Méthodes cohérentes Enzyme hipten-conjuguée: TECHNIQUE EMIT (Enzyme Multidiped Immunoassay Technique) Dans ces méthodes (tous les trois sont utilisés pour la dose d'antigènes), il n'y a pas de phase de lavage. Dans les deux premiers cas, le signal augmente avec [Ag], dans le troisième, il diminue quand [Ag] augmente. L'antigène à doser est en concurrence avec l'haptène marqué pour la fixation de l'anticorps. Deux cas possibles: - masquer le site actif de l'enzyme lors de la fixation de l'anticorps: diminution de l'activité. A augmente avec [Ag]. - la restauration de l'activité qui avait été réduite par conjugaison: augmentation de l'activité. Une diminution avec [Ag]. N.b. Il existe de nombreuses variantes avec un conjugué haptène-substrat ou inhibiteur de l'haptene... Les enzymes utilisées dans l'EEE Doivent être faciles à obtenir et à purifier, stables et impliquer une réaction en produisant un composé de couleur (cas le plus courant). Enzyme Source Lysozyme Malate déshydrogénase Glucose-6P déshydragen Peroxydase Oxydant Glucose Oxydise Phosphatase alcaline -Galactosidase Acétylcholinesterase White Chicken Egg Mitochondries Porc bactérien (Leuconostoc mesentéroides) Raifort Aspergillus niger Escherichia coli ou intestin veaux Escherichia coli Organes de torpille électrique L'enzyme (marqueur) est couplée à l'antigène (ou haptène) ou à l'anticorps. Ce couplage doit préserver: - le site actif de l'enzyme - le couplage covalent Ag ou Ac est effectué à l'aide d'un réactif bifonctionnel comme le glutaraldéhyde, qui établit un pont covalent entre deux atomes d'azote (fonctions amine) des protéines. Le couplage indirect implique deux molécules ayant une affinité l'une pour l'autre, chacune attachée par un pont covalent à l'antigène d'une part et à l'enzyme d'autre part; c'est le cas du système avidine-biotine. Réactions enzymatiques Substrats Produits Phosphatase alcaline PNPP (4-nitrophényle-phosphate) incolore PNP (4-nitrophénol) (jaune) 405 nm Peroxydase H2O2 - OPD (diamine fesphénylene) H2O2 lumin produit luminescent -galactosedose ONPG (2-nitrophényl - galactoside) ONP (2-nitrophénol) (jaune) 405 nm Glucose 6-phosphate disidrogen glucose 6-phosphate - NAD ou NADP-NADH ou NADPH, 340 nm Détection est de mesurer l'activité catalytique de l'enzyme : c'est pourquoi nous mesurons le taux initial de la réaction catalysée par l'enzyme, après l'ajout du ou des substrats de l'enzyme, et l'incubation. En général, nous travaillons dans une méthode en 2 points : nous dosons le produit après l'ajout arrêter le réactif. Dans certains cas, il peut également être fait par méthode cinétique. L'activité etimatique est mesurée par spectrophotométrie d'absorption moléculaire, fluormétrie ou luminométrie. Le plus souvent, des plaques de microtistrazione de 96 puits sont utilisées pour traiter un grand nombre d'échantillons en même temps : 3-4-Méthode de calcul Le principe général est d'établir une courbe d'étalonnage avec des solutions contenant des concentrations connues de l'antigène. Une série de dilutions successives est ensuite effectuée par une solution parente afin d'obtenir des concentrations finales autres qu'un facteur de 2 o . Différents modes de représentation sont utilisés pour ces courbes d'étalonnage. Dosage d'EIA de 20-hydroxyecdysone (20E) Le traceur se compose de 20E couplé avec l'iroxydase. Deux modes de représentation sont utilisés ici. La représentation classique se compose du report de B/Bo-f (log[H]) qui donne une courbe avec une partie centrale relativement linéaire et permet de déterminer des mesures précises, en particulier autour de la valeur correspondant à B/Bo - 0,5. La représentation dite log-logit consiste à utiliser la fonction log (B/Bo-B) dans l'ordre, puis la fonction est tracée: log (B/Bo-B) - f (log[H]) qui s'avère être une ligne droite, à partir de laquelle il est plus facile de faire des calculs (en tout cas fait par un programme informatique). 3-5-Applications - Dosage de protéines à faible concentration : dosages spécifiques de certaines protéines plasmatiques : IgE, ferritine, hormones protéiques : hCG..., marqueurs tumoraux : alpha-foetoprotéine... Des techniques homogènes permettent la posologie de petites molécules (haptenes): hormones stéroïdes, hormones thyroïdiennes, médicaments... - Recherche et dosage d'anticorps pour le diagnostic des maladies infectieuses (sérologie): en parasitologie (toxoplasmose...) et en virologie (virus de l'hépatite B, virus du sida...) Résumé Bibliographie Fisher, J., Arnold, J.R.P. (2001) Essentials in Chemistry for Biologists. Éditions Berti, Paris. Jaussaud, P. (1996) Exploration des molécules. Université Nathan, Paris. Kamoun, P. Appareils et méthodes en biologie moléculaire. Médecine-Science / Flammarion, Paris. Mahuzier, G., Hamon, M. (1986) Résumé de la chimie analytique. Volume 2. Méthodes de séparation. Masson, Paris. Schwedt, G. (1993) Pocket Atlas of Analysis Methods, Medicine-Sciences / Flammarion, Paris. Technoscopes de Biofutur : chromatographie liquide haute performance. Supplément au no 52 (décembre 1986). Protéines : électrophorèse et électrofocalisation. Supplément au numéro 54 (février 1987). Chromatographie préparatoire basse pression. Supplément au n° 59 (juillet-août Purification par des techniques d'affinité. Partie 1 : Stratégies de purification. Supplément au no 61 (octobre 1987). Absorption et fluormétrie. Supplément no 15 au no 63 (décembre 1987). Analyse des électrophorogrammes bidimensionnels. Supplément nos 17 à 65 (février 1988). L'endroit occidental. Supplément no 19 au no 67 (avril 1988). Purification par des techniques d'affinité. Deuxième partie. Supplément no 20 au no 68 (mai 1988). Chromatographie : fluides supercritiques. Chemiluminescence et diagnostic. Supplément no 25 à no 75 (janvier 1989). Agarose. Supplément nos 35 à 88 (mars 1990). Nouvelles approches de la chromatographie biomoléculaire. Supplément nos 36 à 89 (avril 1990). Macromolécules investies dans la spectrométrie de masse. Supplément nos 37 à 91 (juin 1990). Cheveux électrophorèse: nouveaux développements à San Francisco. Supplément no 38 au n° 93 (septembre 1990). Chromatographie informatique. Supplément no 40 à no 96 (décembre 1990). Électrophorèse protéique bidimensionnelle. Supplément no 58 au n° 123 (mai 1993). Électrophorèse dans les champs alternatifs d'ADN. Supplément nos 61 à 127 (octobre 1993). Séparation sur des billes de taille uniforme. Supplément no 76 au n° 147 (juillet-août 1995). Chromatographie en phase liquide. Supplément no 78 au no 149 (octobre 1995). Spectrométrie de masse. Supplément no 89 à no 164 (février 1997). Chromatographie rapide. Supplément no 95 au n° 170 (septembre 1997). Électrophorèse capillaire. Supplément no 103 au no 178 (mai 1998). Chromatographie de partage centrifuge. Supplément no 104 au no 179 (juin 1998). Spectrométrie de masse tandem. Supplément no 106 au n° 181 (septembre 1998). La RMN des macromolécules. Supplément no 112 au no 189 (mai 1999). Les outils pour étudier le protéome. Supplément no 115 à no 192 (septembre 1999). Bio-singis, mycotoxines et risque alimentaire. Supplément no 125 à no 203 (septembre 2000). 2000).

grammaire_progressive_du_francais_intermediaire_corriges.pdf
3284436855.pdf
veromajexedonalaxalagebej.pdf
2323508932.pdf
xpress_platinum_countertop_cooker.pdf
is-235.c emergency planning study guide
degreeing a camshaft instructions
totalitarianism case study stalinist russia answer key
manual impresora hp laserjet pro mfp m130fw
verb moods worksheet
requisicion de personal contestado
working principle of gas chromatography pdf
speed distance and time worksheets grade 5
toastmasters advanced manuals
franklin and marshall college campus map pdf
custom order maid 3d2 english
class _____ fires involve combustible metals such as sodium have odd symbols
smartphone repair course pdf
makeup guide book pdf
8767144.pdf
31cc541155e.pdf
bufibobuj.pdf