

Les solutions courantes :

- PBS (tampon phosphate salin) tampons qui a la même osmose que les cellules. Il est composé principalement de ions qui stabilise les biomolécules.
- SDS il est à la fois un détergent et un dénaturant. Le SDS est fortement négatif. Il se lie de façon importante et permet de même charge à toutes les protéines (utilisé notamment pour les électrophorèses).
- Les alcools :
 - éthanol, isopropanol pour précipiter de les acide nucléiques
- Sels Favorisent les liaisons d'hydrogène.
- Intercalant ADN
- Chloroforme
- Fixateur. Évite l'autolyse :
 - Formaldéhyde (abrégié en formol). Liaison covalente intra et inter protéines.
- H₂O₂ inhibition irréversible par une suroxydation du co facteur (hème Fe²⁺) des peroxydases. Des peroxydases sont utilisées comme cytochrome.
- Dextran de sulfate formamide molécule qui s'entourent d'eau. Elle augmente la concentration des autres composées notamment leur probabilité de rencontre.
- Agents chélateurs molécules qui bloquent les ions bivalents.

Les protéines

- pour linéariser les protéines :
 - Saut de pH et d'acrylamide

Westernblot

Nature du support utilisé :

Nature du support	sensibilité			
nitrocellulose	++			
PVDF	-			

Immunomarquage

Important les anticorps atteignent leur maximum d'efficacité en condition physiologique. Il faut penser à les rétablir.

L'immunomarquage utilise le fait que les anticorps sont :

- Spécifiques. Ils reconnaissent une séquence particulière.
- Capable de reconnaître une très grande quantité de molécules différentes. Le nombre de combinaison différentes de la zone de reconnaissance pouvant être générée est de plusieurs milliards.

Certains anticorps ont été transformés pour être « visible » par l'ajout d'une enzyme :

- Fluorescente.
- Transforme un substrat en composé coloré (généralement avec une peroxydase).

NB : ces deux propriétés ne dépendent pas de la liaison de l'anticorps avec son antigène. Cela explique l'importance des étapes de lavage.

Contrôle

- Négatif vérifier que seul l'anticorps primaire est spécifique. Tous sauf C1.
- Positif vérifier que C1 reconnaît l'antigène d'intérêt. (Test sur un milieu dont la composition est connue).

Les types de lots d'anticorps

Deux types de lots d'anticorps sont utilisés :

- Monoclonaux. L'anticorps issue d'une seule cellule souche de lymphocytes.
- Polyclonaux. Plusieurs anticorps qui ciblent le même antigène notamment avec des épitopes différents.

Rmq.: Les polyclonaux peuvent permettre d'amplifier le signal.

Principe de l'utilisation des anticorps secondaires

/ antigène + anticorps avec enzyme substrat via la région constante.

Elisa

Il existe deux méthodes ELISA :

- ELISA détecter la présence d'un anticorps.
- ELISA sandwich détecter la présence d'un antigène.

Méthode pour détecter des anticorps.

La production des anticorps se fait par des cellules transformé en cellules « immortelles ».

Purifier par chromatographie.

Sandwich 2 anticorps qui réagissent avec le même antigène

Immunomarquage sur coupe histologique (tissu)

En fonction de l'enzyme utilisé

Démasquage :

- Dénaturation par pH et température (y un baffle cheloud avec le formol. Ce dernier étant lié de façon covalente).
- Lavage avec un sérum de l'animal qui possède les anticorps pour saturer. ????

Blocage ou inhibition :

- Neutraliser les peroxydases déjà présentes avec de l'eau oxygéné (H_2O_2), le substrat de l'enzyme.

Problèmes spécifiques :

- Membrane cellulaire traversé
- La fixation peut interférer un obstacle

Immunomarquage.

Contre coloration pour accentuer et faciliter la lecture.

Histologie

Biopsie prélèvement d'une petit portion d'un tissu.

Préparation des organes l'histologie

1. Fixation avec du formaldéhyde.
2. Déshydratation succession de bain d'éthanol pour prévenir de la dégradation des tissus.

Préparation des tissus pour l'observation au microscope optique

1. Substitution par du butanol car il solubilise la paraffine.
2. Imprégnation avec la paraffine
3. Enrobage (ou inclusion)
4. Coupe très fine de l'organe avec un microtome.
5. Déparaffinage (toluène)

NB : Xylène, toluène et butanol 3 solvants dans la paraffine.

Préparation des tissus pour l'observation au microscope électronique

Coloration

Réhydratation des tissus pour la coloration.

Coloration les plus fréquentes :

Coloration	Noyau	Cytoplasme	MEC
HES ou trichrome de Masson	Hématoxyline de Gill (eau)	Éosine (alcool)	Safran (alcool)
			Bleu d'aniline
Picro-Indigo-Carmin	Rouge nucléaire	Picro-Indigo-Carmin	

Attention utilisé pour les lavages des solvants des colorants (généralement alcool ou eau).

Montage lame

Conservation du prélèvement préserver de la déshydratation.

Microscopie électronique

Osmium fixateur de lipides et de protéines. Métaux contient de nombreux électrons.

Les acides nucléiques ADN ARN

Stabilité des complexe bi caténaire $ARN/ARN > ARN/ADN > ADN/ADN$.

Problème lié à l'hybridation :

- Les séquences ARN et ADN masqué avec des protéines.
- Les interactions non spécifiques (sonde et anticorps). Solution :
Lavage et saturé en composé organique (protéines, ADN ARN).

Hybridation in situ (dans un tissu)

Problème de :

- Traversée la membrane cellulaire
- La fixation des protéines peut bloquer la reconnaissance des sites d'intérêts.

Il est utile de détruire les sondes non hybridées avec une DNase ou une RNase pour limiter le bruit.