



Quantification AlphaLISA de l'insuline humaine à l'aide d'un lecteur de microplaques hybride multimode Synergy™ 4

Paul Held Ph.D., Responsable scientifique, Service des applications, BioTek Instruments, Inc.

BioTek Instruments GmbH - Bureau de Liaison France - Florence Levent - Tel. : +33 (0) 3 89 20 63 29 - Fax : +33 (0) 3 89 20 43 79 - Email : levent@biotek.fr - Web : www.biotek.fr

Le diabète sucré est une maladie qui est en train d'atteindre des proportions épidémiques dans les pays développés, comme aux États-Unis. L'insuline joue un rôle crucial dans la régulation du taux de glucose sanguin. Sa production et sa sécrétion par les cellules bêta des îlots de Langerhans est bien régulée dans des conditions normales. La quantification du taux d'insuline dans des échantillons de sérum ou de plasma après traitement par des composés pharmaceutiques potentiels est une procédure essentielle dans la recherche sur le diabète. Nous décrivons ici l'utilisation du lecteur de microplaques multimode Synergy™ 4 pour quantifier l'insuline à l'aide d'un dosage AlphaLISA.

Introduction

Le dosage AlphaLISA™ (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay : dosage homogène de la luminescence de proximité amplifiée) utilise des billes donneur et accepteur revêtues d'une couche d'hydrogel permettant leur conjugaison avec des molécules biologiques (Figure 1). Sur excitation, un photosensibilisateur dans la bille donneur convertit l'oxygène ambiant en oxygène singulet réactif. Une concentration élevée en photosensibilisateur dans la bille donneur peut générer jusqu'à 60 000 molécules d'oxygène singulet par seconde et est utilisée comme moyen d'amplifier le signal de façon significative. L'oxygène singulet réagit avec les composés thioxènes dans la bille accepteur pour générer un signal chimio-luminescent émettant à 370 nm. L'énergie est immédiatement transférée aux fluorophores contenus dans la

même bille accepteur, ce qui a pour effet un décalage de l'émission à une longueur d'onde de 520 à 620 nm. L'oxygène singulet étant instable, avec une durée de vie moyenne d'environ 4 µs, il ne peut diffuser qu'à une distance de 200 nm avant sa décroissance. La limite de distance assure qu'en l'absence d'une interaction biologique spécifique entre les deux billes, l'oxygène singulet produit par la bille donneur ne sera pas détecté. Les billes accepteur qui sont à une distance trop éloignée n'émettront pas de lumière.

Le dosage de l'insuline humaine utilise deux anticorps monoclonaux différents contre l'insuline pour rapprocher suffisamment les billes donneur et accepteur. Les billes accepteur AlphaLISA ont été conjuguées avec des anticorps anti-humains 8E2, qui peuvent lier et capturer l'insuline humaine contenue dans l'échantillon. L'anticorps monoclonal anti-humain biotinylé 3A6 forme un pont avec la bille donneur revêtue de streptavidine en liant le complexe insuline-bille accepteur et la bille donneur (Figure 1).

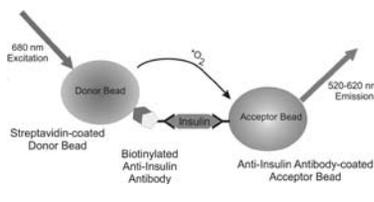


Figure 1. Schéma du dosage AlphaLISA de l'insuline humaine.

Matériel et méthodes

Un kit de détection de l'insuline humaine, contenant des billes accepteur AlphaLISA, des billes donneur-streptavidine AlphaLISA et des anticorps anti-humains biotinylés, a été généreusement donné par la société PerkinElmer (Boston, MA, États-Unis). Des microplaques blanches opaques de 384 puits (référence catalogue 3705) ont été obtenues auprès de la société Corning (Corning, NY, États-Unis).

Une série de dilutions d'insuline humaine allant de 0 à 400 µU/mL a été faite en utilisant le tampon du dosage comme diluant. Le tampon du dosage était constitué de 30 mM de tampon Tris pH 7,4, 0,5 % de Triton X-100, 0,1 % de BSA. Une solution mère contenant un anticorps anti-insuline humaine biotinylé (2,5 nM) et des billes revêtues d'un anticorps anti-insuline 8E2 (25 µg/mL) a été préparée en utilisant le tampon du dosage comme diluant. Les billes donneur revêtues de streptavidine ont été diluées à 80 µg/mL à l'aide du tampon du dosage. Les réactions ont été préparées en ajoutant 5 µL de dilution d'insuline aux puits d'une microplaque de 384 puits, à raison de 8 réplicats, suivi de l'ajout de 20 µL de solution mère dans tous les puits.

Ces microplaques ont été incubées 30 minutes à température ambiante, suivi de l'ajout de 25 µL de solution de billes donneur. Le mélange réactionnel complet contenait 1 nM d'anticorps biotinylé 3A6, 10 µg/mL de billes accepteur et 40 µg/mL de billes donneur en plus de la dilution d'insuline humaine. La réaction a été incubée dans le noir pendant 60 minutes et le signal AlphaLISA a été déterminé à l'aide du lecteur de microplaques multimode Synergy™ 4 (BioTek Instruments). Le lecteur était commandé et les données collectées puis analysées à l'aide du logiciel d'analyse de données Gen5™ (BioTek instruments).

Résultats

La Figure 2 montre la relation entre la concentration en insuline et le signal AlphaLISA. L'ajustement logistique des données selon 4 paramètres décrit le mieux cette relation. Ce dosage permet de quantifier directement la concentration en insuline et à ce titre, le signal AlphaLISA augmente lorsque la concentration en insuline augmente.

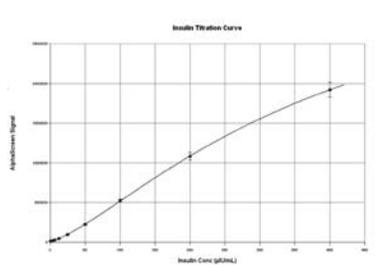


Figure 2. Courbe de concentration en insuline humaine. Le signal AlphaLISA généré par le titrage de l'insuline humaine est représenté en fonction de la concentration en insuline. L'ajustement logistique selon 4 paramètres a été appliqué aux données à l'aide du logiciel d'analyse de données Gen5.

En utilisant la fonction « zoom » du logiciel d'analyse de données Gen5™, on peut examiner le signal pour de faibles concentrations en insuline. Comme le montre la Figure 3, même à des concentrations très faibles en insuline, l'ajustement logistique des données montre une très bonne relation par rapport aux données réelles. La limite de détection du dosage a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage utilisant le calcul de 3 écarts-types au-dessus du zéro standard. Cette valeur a ensuite été utilisée

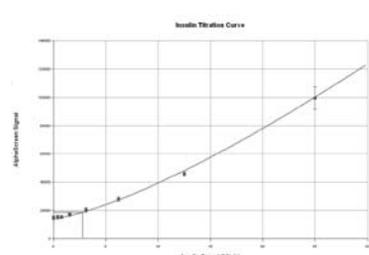


Figure 3. Titrage des concentrations faibles en insuline. Les données représentées sur la Figure 2 ont été agrandies pour montrer la courbe d'étalonnage aux concentrations faibles. Le signal AlphaLISA™ et la concentration de la limite de détection calculée sont indiqués par la ligne verte.

pour interpoler la courbe d'étalonnage. Une valeur moyenne de 2,8 µU/mL ou 120 pg/mL a été calculée comme étant la limite de détection la plus basse.

Discussion

Cette note d'application décrit la quantification de l'insuline humaine à l'aide de la technologie du dosage AlphaLISA™. Le dosage AlphaLISA™ est un dosage homogène qui, contrairement au dosage ELISA conventionnel, ne nécessite aucune étape de séparation ni de lavage. Grâce à l'absence d'étapes de séparation, le dosage AlphaLISA permet non seulement de faire gagner du temps et de faire des économies de réactifs, mais il permet également une amélioration de la facilité et de la simplicité d'utilisation de ce dosage. Parce qu'ils ne nécessitent pas d'étapes de lavage, les dosages homogènes peuvent également être plus facilement effectués sur des microplaques à matrice plus importante (par ex. 1536 puits).

Les billes accepteur AlphaLISA conjuguées aux billes donneur revêtues de streptavidine fournissent un moyen aisé pour développer un dosage des biomarqueurs reposant sur la détection d'anticorps. Les exigences de base sont l'existence de deux anticorps spécifiques vis à vis de l'analyte. Un anticorps est fixé par liaison covalente à la bille accepteur AlphaLISA et l'autre est biotinylé, ces deux procédures étant simples et efficaces.

Les données présentées ici démontrent la capacité du lecteur hybride Synergy 4 à être utilisé pour les dosages AlphaLISA™. Les appareils conçus pour les dosages AlphaLISA sont en général très onéreux car ils utilisent un laser comme lumière excitatrice. Les lasers monochromatiques fournissent une sortie lumineuse continue, ainsi qu'une spécificité en terme de longueur d'onde, ces deux paramètres étant nécessaires pour le dosage AlphaLISA. Les lampes flash au Xénon sont généralement utilisées sur les lecteurs de microplaques multimodes car ils peuvent fournir une sortie lumineuse sur une large gamme de longueurs d'onde et car l'illumination s'arrête très rapidement, comme l'exigent les mesures en temps résolu. Malheureusement, la lampe flash ne fournit pas l'illumination continue nécessaire pour les dosages AlphaLISA. Le temps entre les flashes permet à la réaction excitatoire de diminuer. Contrairement à la plupart des lecteurs de microplaques multimodes, le Synergy 4 dispose à la fois d'une source lumineuse halogène tungstène constante et d'une lampe flash au Xénon. Cette conception multi-optimisée unique offre la capacité de fournir une source lumineuse d'excitation constante, une spécificité en matière de longueur d'onde, ainsi que la sensibilité élevée nécessaires pour ces dosages.

AlphaLISA est une marque déposée de PerkinElmer.



Maintenance & Etalonnage COFRAC

Premier laboratoire français accrédité par le COFRAC en 2001 et aujourd'hui le seul accrédité par le COFRAC sur site!

TOUTES MARQUES

Etalonnage couvert par l'accréditation COFRAC portée disponible sur demande (service.france@biohit.com)



- Pipettes à piston monocanal et multicanaux (volume nominal de 2µl à 25ml, 10 ou 4 mesures)
- Distributeurs répétitifs (volume nominal de 20µl à 10ml, 10 mesures)
- Mono-distributeurs (volume nominal de 5ml à 50ml, 10 mesures)

NB: Pour une traçabilité complète, il est recommandé de réaliser un contrôle volumétrique en l'état avant toute maintenance de vos pipettes

Faites confiance à un fabricant spécialisé dans le pipetage !

EN ATELIER OU SUR SITE

Tarif adapté en fonction de l'étude de votre parc



Biohit France SAS • 2 rue du grand chêne • 78830 Bonnelles
Tel: 01 30 88 41 30 • Fax: 01 30 88 41 02
Commercial.france@biohit.com • www.biohit.com