

Dosage de la sécrétion de cytokines par des cellules mononucléées humaines

Introduction

Les cytokines, sécrétées par les cellules effectrices du système immunitaire, ont un rôle majeur dans la plupart des maladies inflammatoires chroniques.

Leur dosage constitue donc une cible biologique pertinente dans la recherche d'actifs anti-inflammatoires.

Principe

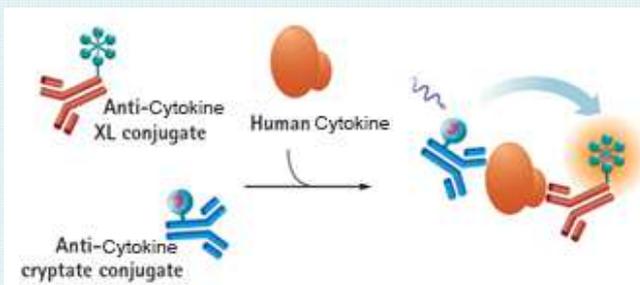
Le dosage de cytokines sécrétées par des cellules mononucléées humaines peut être réalisé par test immuno enzymatique ELISA ou avec la technologie HTRF.

1. Dosage ELISA



Les protéines à doser, liées à un anticorps de capture sont détectées par un complexe biotine-streptavidine couplé à la peroxidase, qui en présence de son substrat permet le développement d'une réaction colorimétrique quantifiée par mesure d'absorbance à 450 nm. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration de la cytokine dosée.

2. Dosage HTRF (CISBIO INTERNATIONAL)



Deux fluorophores partenaires donneur (cryptate d'europium) / accepteur (XL665) sont fusionnés respectivement à un anticorps spécifique de la protéine à doser.

Le transfert d'énergie en temps retardé (TR-FRET) entre le couple de fluorophores est proportionnel à la concentration en cytokine dosée présente dans l'échantillon.

www.cisbio.com Cet essai est homogène et ne nécessite que de faibles quantités de protéines

Protocole

Cellules mononucléées isolées à partir de sang périphérique humain

1. Traitement

Formats: 24 ou 96 puits

Stimulation: 5 µg/mL LPS ou 5 µg/mL PHA

Molécules de référence: Dexaméthasone ; Rolipram

Incubation : 24H à 37°C sous 5% CO₂.

2. Révélation

Dosage ELISA : Format 96 puits / mesure d'absorbance à 450 nm

Dosage HTRF: Format 384 puits

Longueur d'onde d'excitation : 337 nm

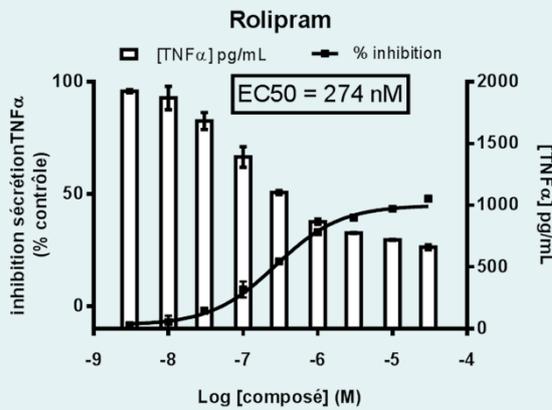
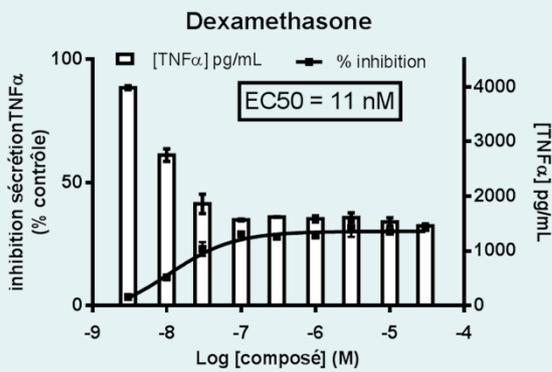
Longueur d'onde d'émission 1 : 615 nm (émission du fluorophore donneur)

Longueur d'onde d'émission 2 : 665 nm (émission du fluorophore accepteur)

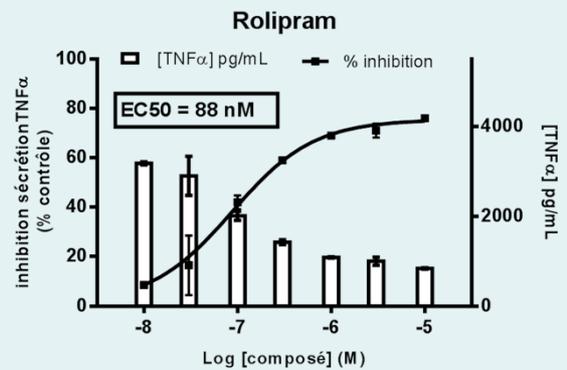
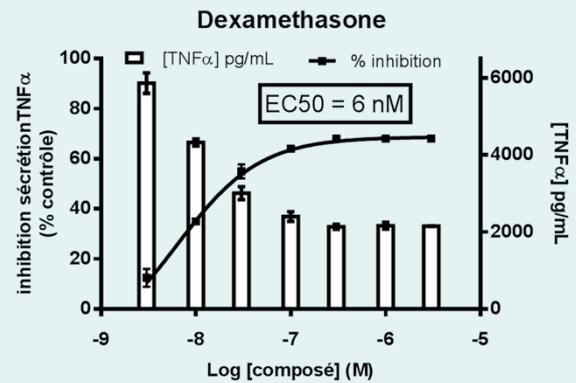
Dosage de la sécrétion de cytokines par des cellules mononucléées humaines

Sécrétion de TNF- α par des cellules mononucléées humaines en présence de composés anti-inflammatoires

1. Dosage ELISA



2. Dosage HTRF (CISBIO)



Les dosages du TNF- α , de l'IL1- β , de l'IL-6 et de l'IL-8 ont été développés par ELISA.

Les dosages du TNF- α , de l'IL1- β , de l'IL-6, de l'IL-8, de l'IL-10 et de l'INF- γ ont été développés par HTRF.

D'autres cytokines peuvent être testées sur demande.