

DOSAGE DIRECT DES PROTÉINES SÉRIQUES

Méthode de biuret

Il est souvent nécessaire de connaître la concentration totale de l'ensemble des différentes protéines d'un milieu, par exemple pour suivre les différentes étapes d'une purification. C'est pourquoi on cherche à mettre en œuvre les réactions capables de révéler plus ou moins stœchiométriquement toutes les protéines. Malheureusement, vu l'hétérogénéité de ces molécules, l'intensité de la réaction retenue est très variable d'une protéine à l'autre et le résultat global dépend de la nature des protéines présentes et de leur composition relative. L'interprétation est souvent difficile, parfois fautive.

Parmi les nombreuses méthodes de dosage des protéines par spectrophotométrie on peut citer :

- **Réaction du biuret (1949)** : méthode dont la limite de détection est moyenne, mais une des méthodes les plus fiables pour les solutions assez concentrées comme les milieux biologiques (sérum,...).
- Méthode de Lowry (1951) : limite de détection 100 fois plus faible que celle de biuret mais dont la précision n'est que de l'ordre de 5 à 10 % (la loi de Beer Lambert ne semble pas tout à fait respectée et la spécificité est diminuée par l'interférence de nombreux dérivés ; réducteurs en particuliers).
- Méthode au BCA (acide bicinchonique) 1970 : technique ayant une très bonne limite de détectabilité et facile à mettre en œuvre.
- Mesure directe de l'absorbance ($\lambda = 280 \text{ nm}$: aminoacides aromatiques ou $\lambda = 210 \text{ nm}$: liaisons peptidiques) très bonne limite de détectabilité ($0,1 \text{ gL}^{-1}$) mais utilisable uniquement sur des solutions parfaitement limpides.
- Méthodes utilisant la fixation de colorants sur les protéines avec modification de la couleur :
 - Technique de Bradford (1976) : Bleu de Coomassie.
 - Technique au méthylorange (hélianthine).
 - Technique au vert de bromocrésol.

1. Principe de la méthode du biuret

En milieu alcalin (NaOH), à froid, les ions cuivriques (Cu^{2+}) forment avec les liaisons peptidiques un complexe de coordination coloré en rose, qui ajouté à la teinte bleue du réactif donne finalement une coloration pourpre (bleu-violet). Cette réaction est positive dès que la molécule possède 3 à 4 liaisons peptidiques, elle est donc utilisable pour les protéines et les polypeptides.

La mesure de l'absorbance se fait à 540 nm après avoir laissé la coloration se développer 30 min.

La technique tire son nom de la molécule le biuret $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$ (obtenu par condensation de 2 molécules d'urée $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$) qui donne une coloration violette.

La technique a été développée par Gornall (1949) qui a laissé son nom au réactif utilisé pour la colorimétrie.

2 GAMME D'ÉTALONNAGE

Tous les prélèvements de sérum seront réalisés avec une pipette automatique à cône éjectable. Dans le cas contraire il faudra utiliser des **gants de protection** (voir les explications au cours du TP pour une utilisation correcte des gants).

Diluer le sérum (☠) étalon au $1/10^{\text{ème}}$ dans de l'eau physiologique (solution de NaCl à 0,9 %) à l'aide de la fiole jaugée de 10 mL (homogénéiser par retournement *sans agiter* pour éviter la formation de mousse).

Dans 5 tubes à essai introduire des volumes de sérum étalon dilué contenant 2, 4, 6, 8 et 10 mg de protéine.

Compléter chaque tube à 2 mL avec de l'eau ϕ puis ajouter 8 mL de réactif de Gornall (☠).

Homogénéiser et placer les tubes 30 min à l'obscurité pour développer la coloration.

Mesurer l'absorbance à $\lambda = 545 \text{ nm}$ contre un blanc (tube 0) dans lequel la solution protéique est remplacée par de l'eau physiologique.

3. DOSAGE DES PROTÉINES SÉRIQUES (2 essais à faire en même temps que la gamme)

On réalisera 2 essais E_1 et E_2 , l'un avec 0,05 mL et l'autre avec 0,1 mL de sérum non dilué à doser.

Compléter chaque tube à 2 mL avec de l'eau physiologique.

Ajouter alors 8 mL de réactif de Gornall (☠) homogénéiser chaque tube et placer les tubes 30 min à l'obscurité pour développer la coloration.

4. RÉSULTATS

Rappeler le principe de la réaction de Biuret.

Faire un tableau de colorimétrie complet en justifiant les calculs sur un tube de la gamme.

Méthode graphique :



- Tracer la courbe d'étalonnage $A = f(qm \text{ protéines en mg})$.
- À partir des quantités de masse de protéine X_1 et X_2 des deux essais, calculer la concentration du sérum à doser en protéines totales.

Méthode mathématique par régression linéaire sur calculatrice :

- Déterminer l'équation de la droite de régression et le coefficient de corrélation.
- Calculer les quantités de masse de protéine \hat{x}_1 et \hat{x}_2 contenues dans les deux essais.

Le pourcentage d'erreur admis est de 2 % ; vérifier que votre dosage est satisfaisant.

5. SÉCURITÉ

Sérum		Prendre les précautions habituelles à la manipulation des produits sanguins (cf. fiche 3RB)
Réactif de Gornall		Contient de la soude concentrée à environ $0,75 \text{ mol.L}^{-1}$, donc corrosif – (pour la soude concentrée R : 35 - S : 26 - 37/39 - 45) Utilisation en flacon répartiteur sous hotte. La teneur en Cu^{2+} est faible et ne nécessite pas un traitement particulier des déchets.

Feuille de résultats expérimentaux DOSAGES DES PROTÉINES SÉRIQUES

Compléter le tableau de colorimétrie

Tubes	0	1	2	3	4	5	Essai 1	Essai 2
Masse de protéines par tube	0							
Absorbance (A = 540nm)	0							

Expliciter le calcul pour un des tubes de la gamme :

Tracer, sur papier millimétré, la courbe d'étalonnage:

A = f (masse de protéines par tube).

Déterminer la concentration massique en protéines du sérum du patient (g.L⁻¹)

Le pourcentage d'inexactitude admis est de 2 % . conclure sur la validité des résultats.

Régression linéaire sur calculatrice

Équation de la droite de régression :

Coefficient de corrélation :

Valeurs estimées :

$$\hat{x}_1$$

$$\hat{x}_2$$

Dosage des protéines biuret

PRODUITS

SÉRUM ÉTALON $\approx 70 \text{ g.L}^{-1}$ 1 mL ÉLÈVE
| fixer arbitrairement la concentration à 72 g.L^{-1}

TUBE EPPENDORF OUVERTS

SÉRUM À DOSER
| dilution connue ($9/10^6$) du sérum étalon.

TUBE EPPENDORF OUVERTS

RÉACTIF DE BIURET

CuSO₄ 1,5 g
EDTA 6 g
KI 1 g
NaCl 0,9 g

Dissoudre dans 300 mL d'eau.

Ajouter en une fois 300 mL de NaOH à $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ puis compléter à 1 L.

FLACON RÉPARTITEUR (HOTTE) (8 mL)

MATÉRIEL

SPECTROPHOTOMÈTRE VISIBLE 545 nm

MACRO-CUVES À SPECTROPHOTOMÉTRIE

TUBES À ESSAI

F IOLES JAUGÉES DE 10 mL

1 / ÉLÈVE

PIPETTES AUTOMATIQUES P1000 ET P200 À CÔNE ÉJECTABLE

PIPETTES GRADUÉES DE 2 mL

1 / ÉLÈVE