

DOSAGE DE SUBSTRAT

Méthode enzymatique « en point final »

1. Principe général

On dose le produit formé ou le substrat disparu, par méthode spectrophotométrique une fois la réaction enzymatique terminée (**réaction totale**). Si le substrat ou le produit n'absorbe pas, on couple la **réaction principale** à une **réaction indicatrice**. La réaction indicatrice permet la mesure photométrique.

La variation de concentration d'une substance chromogène est **proportionnelle** à la concentration en substrat à doser.

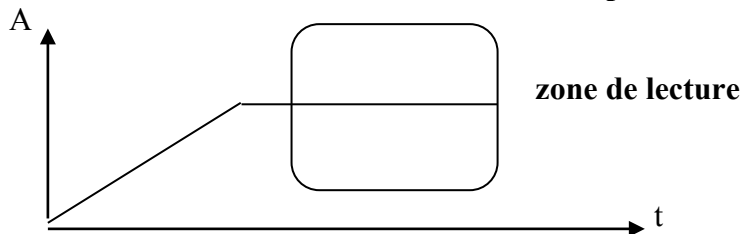
L'enzyme sert à catalyser les réactions, c'est un réactif qui permet un dosage **spécifique** dans un milieu complexe sans purification au préalable de la molécule à doser.

2. Conditions expérimentales

- [S] à doser : facteur limitant
- [E] en grande quantité pour que la réaction soit totale rapidement
 - pH optimal
 - T°C non régulée, mais influence la durée de la réaction
 - Temps de contact : long pour que la réaction soit totale

- En pratique : cette méthode est **fidèle et exacte**, mais le temps total de réaction est **souvent long** ce qui empêche **l'automatisation**.
- Il faut un **blanc réactif** et **parfois un blanc échantillon**.
- Exemple de dosage en point final : dosage de l'urée par l'uréase (Berthelot), du glucose par la GOD, du cholestérol...

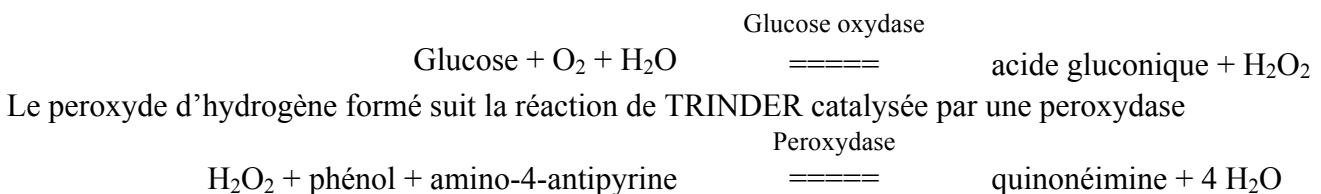
Représentation de l'absorbance en fonction du temps lors de la réaction.



3. Calcul de la concentration des essais

Avec ϵ	Avec 1 étalon de référence	Avec gamme d'étalonnage
$A = \epsilon \cdot l \cdot C_{MR}$ MR : milieu réactionnel $C_{essai} = \frac{A_{essai}}{\epsilon \cdot l} \times \frac{V_{MR}}{V_{essai}}$	$A_{essai} = \epsilon \cdot l \cdot C_{essai}$ <hr/> $A_{étalon} = \epsilon \cdot l \cdot C_{étalon}$ $C_{essai} = C_{étalon} \times \frac{A_{essai}}{A_{étalon}}$	Calcul de la concentration avec la courbe d'étalonnage. $A = a \cdot C_{essai} + b$ $C_{essai} = \frac{A - b}{a}$
$C_{échantillon} = C_{essai} \times F_d$		

4. Dosage du glucose à la glucose oxydase (GOD)



L'absorbance du chromophore (quinonéimine) est mesurée à 505 nm.