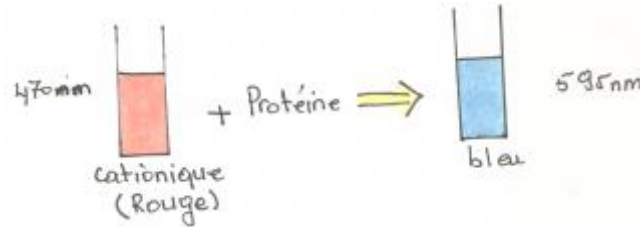


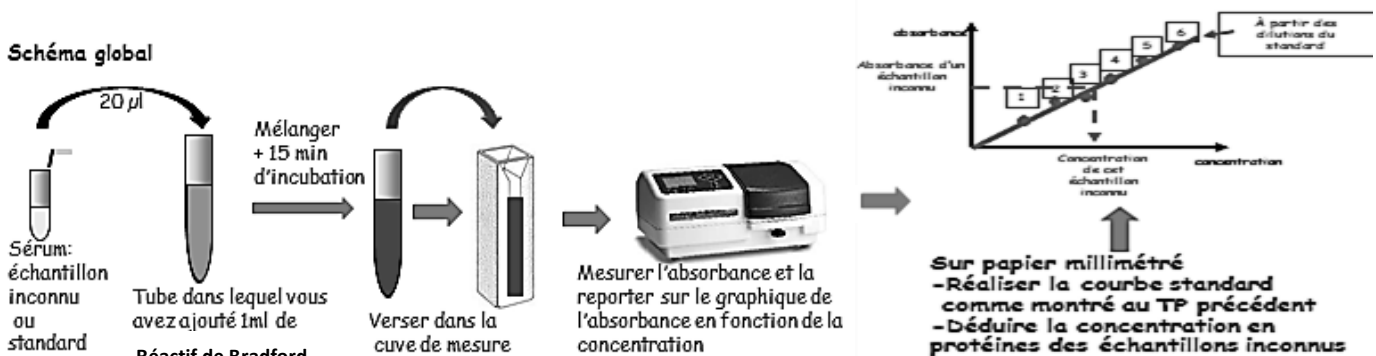
TP n° 2 : Dosage spectrophotométrique des protéines par étalonnage (Méthode de Bradford) :

Principe :

La méthode de Bradford est un dosage spectrophotométrique, basé sur le changement d'absorbance après la fixation d'un colorant, se manifestant par le changement de la couleur du Bleu de Coomassie après liaison (complexification) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine.) et les résidus hydrophobes des acides aminés (aromatiques) présents dans la ou les protéines. La forme liée (anionique) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé à 595 nm. Les formes libres (cationiques) du colorant sont rouges et marrons, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.



Mode opératoire :



1. Préparation du Réactif de Bradford :

Une solution mère de colorant a été préparée. Celle-ci contient 5 mg de bleu de Coomassie G250 dissout dans 5 ml d'acide phosphorique 88%, 2,5 ml d'éthanol 95% et 50ml d'eau distillée. Ce réactif doit être filtré puis ; il peut être conservé pendant 1 mois à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

2. Préparation des solutions de concentrations inconnues de protéines

- ✓ Réaliser des dilutions au 1/2, 1/4 et 1/8 du sérum sanguin en eau distillée.

3. Préparation d'une gamme étalon d'albumine (BSA)

- ✓ A partir de la solution étalon de BSA à 0.1 g/L, réaliser une gamme de 6 tubes (tubes n° 1-6).
- ✓ Préparer en même temps les tubes expérimentaux qui contiendront une prise d'essai de solutions de concentration inconnues (tubes Echantillon 1-3).

✓ Pipeter les quantités de solutions indiquées dans le tableau ci- après :

N° tube	Blanc	1	2	3	4	5	6	E1	E2	E3
Dilution	-	1/....	1/....	1/....	1/.....	1/....	1/....			
Solution mère										
BSA (µl)	0			
Eau distillée (q.s.p 1 ml)	1			
Concentration finale (g/L)	0	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,0001			
Échantillon du sérum								1	1	1
Réactif de Bradford (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Absorbance à 595nm

- ✓ Bien homogénéiser à l'aide du vortex.
- ✓ Après 10 minutes et avant 1 heure, Observer l'intensité de la coloration ; procéder ensuite à la lecture des D.O. au spectrophotomètre par rapport au blanc réactif.
- ✓ Tracer la courbe d'étalonnage, c'est-à-dire l'absorbance à 595nm en fonction de la quantité d'albumine bovine (µg), $A_{595} = f(\text{quantités de BSA})$.
- ✓ Déduire à partir du graphe les concentrations des solutions diluées du sérum ; puis, en tenant compte de ces dilutions, donner la valeur de la concentration en protéines totales du sérum sanguin.

Vidéo explicative : <https://youtu.be/dLEE0KhVCJE>