

### **TP3 DE TAB : dosage des protéines de blanc d'œuf par méthode d'étalonnage**

#### **1. Introduction**

Les méthodes de dosage des protéines sont nombreuses. Le choix d'une méthode dépend donc du contexte. Citons quelques méthodes : par l'intermédiaire du dosage de l'azote total protéique (**méthode de kjeldahl**), par mesure directe de l'absorbance en domaine UV à 280 nm (**méthode de Christian-Warburg**), par méthodes spectrophotométriques après mise en œuvre d'une réaction chimique (**méthode du Biuret, méthode de Lowry**) ou de la fixation d'un colorant (**méthode de Bradford**) ...

#### **2. 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 présents dans la ou les protéines. La forme anionique (liée) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé historiquement à 595 nm. Les formes cationiques (libres) 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.

#### **3. But**

L'objectif de la présente manipulation est le dosage des protéines des œufs de poulet par la méthode de Bradford en comparaison avec une gamme d'étalonnage.

#### **4. Principe d'une gamme étalon**

On utilise trois types de solution :

1. Une solution de la protéine dont on veut déterminer la concentration.
2. Une solution de concentration connue d'une protéine considérée comme une référence ou un standard par rapport à la protéine dont on veut déterminer la concentration (l'albumine de sérum bovin ou BSA).
3. Une solution de réactif qui développe une coloration en réagissant avec des acides aminés spécifiques de ces protéines, le réactif de Bradford Bleu brillant de Coomassie.

#### **5. Préparation d'une gamme étalon**

- On dispose d'une solution mère de BSA à 1 mg.ml<sup>-1</sup> .
- Le volume total (BSA + diluant) doit être de 50 µl dans tous les tubes.
- On calcule les volumes à prélever de la solution mère de BSA et du diluant pour faire une gamme étalon de différentes concentrations de BSA.

NB :On utilise comme diluant l'eau distillée.

Volume de BSA à 1mg/ml (µl)	00	10	20	30	40	50
Volume de H <sub>2</sub> O (µl)	00	40	30	20	10	00

## 6. Préparation du réactif de Bradford

Bleu de coomassie G250 .....	50 ml
Ethanol 95% .....	50 ml
Acide orthophosphorique 85% .....	100 ml
L'eau distillée en complet jusqu'à.....	1000ml

## 7. Préparation des échantillons à doser

- Casser un œuf et récupérer dans un bêcher taré le blanc bien séparé du jaune.
- Peser le blanc d' œuf.
- Le diluer dans du tampon pH 10 (tampon glycine - NaOH 0,1 M) jusqu'à un volume final de 200 ml.
- On prélève 50µl de la solution des protéines préalablement préparée et on la met dans des tubes.
- On ajoute 2 ml de réactif de Bradford dans les 2 séries des tubes.
- On mélange et on laisse 5 à 15 min à l'obscurité afin que l'équilibre de fixation **protéine-colorant** s'établisse.
- Lire la densité optique des 2 séries des tubes à 595 nm, contre le blanc.
- Tracer, sur papier millimétré, la courbe d'étalonnage:  $A = f(\text{quantité de protéines/tube})$ .
- Calculer la concentration du blanc d'œuf en protéines exprimée en g de protéines pour 100 g de blanc d'œuf.