Département des Sciences de l’Environnement et Sciences Agronomiques

1iere année Master Écologie Fondamentale et Appliquée

Module de BBRE

**TP N° 2 : Dosage des protéines**

1. **Principe**:

La quantité des protéines dans les extraits est déterminée généralement selon la méthode de (**Bradford, 1976)**, c’est un dosage colorimétrique basé sur le changement d’absorbance a une longueur d’onde 595nm ; se manifestant par le changement de la couleur du bleu brillant de coomassie (BBC : G250) ; après des liaisons avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Le changement d’absorbance est proportionnel à la quantité du colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l’échantillon.

Ceci permet de déterminer la quantité de protéines contenues dans l’extrait et d’exprimer les résultats des biomarqueurs du stress oxydant par rapport aux protéines.

1. **Objectif :**

Le choix de cette normalisation est justifié par le fait que le contenu en protéines totales est généralement un bon reflet du nombre de cellulesde l’échantillon.

3.**Méthode**

* 1. **Réalisation de la gamme d’étalonnage des protéines**

La réalisation de ce dosage nécessite l’élaboration d’une gamme d’étalonnage de protéines standards. Les résultats sont exprimés en équivalent-albumine (l’albumine de sérum du bœuf BSA 1 mg/ml) produit de référence servant à la standardisation, la courbe d’étalonnage est réalisée à partir de tableau suivant :

**Tableau 1 :**Réalisation de la gamme d’étalonnage des protéines

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tubes** | **Blanc** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| BSA (**µl)** | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Eau distillée (**µl)** | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Réactif BBC (**ml)** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

* 1. **Dosage des protéines dans les extraits**

1. **Dosage des protéines dans les extraits**

* Prendre 100 µl Pour chaque extrait,
* Ajouter 4ml de réactif de Bradford
* Laisser reposer entre 5-30 minutes
* Lire l’absorbance à 595 nm
* Déterminer la concentration en protéines de chaque extrait à partir de la courbe d’étalonnage
  1. **Préparation des solutions**
* **Préparation de la solution Bradford (BBC) :**
* Peser 100 mg du BBC.
* Ajouter 50 ml d’éthanol (95 %) + 100 ml d’acide orthrophosphorique (85 %).
* Mélanger par agitation sous la haute jusqu'à dissolution totale pendant quatre heures.
* Compléter à un litre par l’eau distillée.
* Mettre la solution préparée dans une bouteille ambrée à une température ambiante.
* **La solution de SAB (1mg/ml)**
* Dissoudre 5mg de la SAB dans un volume de 5 ml d’eau distillée