

TP2 : Préparation des extraits protéiques à pH variables et quantification des lectines par la méthode de Folin-Lowry

Introduction

L'étude de la lectine, issue du monde végétal nécessite un environnement en laboratoire afin d'étudier et identifier les propriétés de cette molécule. Pour mesurer la concentration totale en protéines obtenues nous pouvons utiliser plusieurs techniques, telles que la *méthode de Biuret*, la *méthode de Lowry*, la *méthode de Bradford*, *test de l'acide bicinchoninique* et absorption UV à 280 nm.

Dans la méthode de Folin- Lowry, il ya complexation d'ions Cu^{2+} avec les atomes d'azote des liens peptidiques de la protéine dans des conditions de pH alcalin. Les complexes formés réduisent le complexe contenu dans le réactif Folin- Ciocalteau (couleur jaune), produisant ainsi une couleur bleue. Le dosage des protéines par la méthode LOWRY est un dosage colorimétrique complémentaire à celle de Biuret qui absorbe à 750 nm. En parallèle, une gamme étalon à différentes concentrations de BSA (Bovin Serum Albumin) est réalisée pour déterminer la concentration de protéines.

But du TP

Cette expérience a pour but de :

- ✓ Quantifier les lectines présents dans les surnageants obtenus par la méthode de Folin-Lowry.
- ✓ Préparer une courbe d'étalonnage $\text{DO} = f([\text{BSA}])$.

Matériels

- | | |
|-------------------------|------------------------|
| -Béchers | -Cuve |
| -Micropipettes | - Tubes à hémolyse |
| -Eprouvette gradué | -Tubes |
| -Etiquettes | - Portoirs |
| -Embouts (jaune + bleu) | -Pissette en plastique |

Appareillage

- Spectrophotométrie
- Centrifugeuse
- Plaque agitatrice
- Balance analytique et de précision

Réactifs

- Carbonate de sodium (Na_2CO_3),
- Hydroxide de sodium (NaOH),
- Sulphate du cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$),
- Tartrate de sodium,
- BSA (Bovin Serum Albumin)
- Réactif du Folin-Ciocalteu,

Préparation des solutions

1. Préparation du réactif A

-Ajouter 2g de carbonate de sodium dans 100 ml NaOH (0.1 N) (réactif A).

2. Préparation du réactif B

Ajouter 0.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 100mL d' une solution de tartrate de sodium et de potassium (0,5g et 0,5g dans 100mL d'eau distillée) (réactif B).

3. Préparation du réactif C

-Mélangez lentement 25mL de réactif A et 0.5 mL de réactif B manière à ce que $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se dissolve (Réactif3). Il doit être préparé frais avant l'expérience.

4. Préparation du réactif E

-Diluer le réactif de Folin -ciocalteu avec de l'eau distillée (1:1), avec un volume final d'environ 3 mL.

5. Préparation d'une gamme étalon de BSA

- Préparer une gamme d'étalons à différentes concentrations de BSA (0-1 mg/mL)

Mode opératoire

- Après 24h d'incubation à 4°C, la préparation précédemment préparé (pH=7) durant la 1^{ère} séance du TP est centrifugé à 5000 tr /min pendant 10 min (extrait brut E₁).
- Après 24h d'incubation à 4°C, les tubes à différentes valeurs de pH (4, 5, 9,12) sont soumis à une centrifugation de 5000tours/min pendant 10 min (extraits brut E₂, E₃, E₄, E₅).
- Prendre environ 0.2 mL d'extrait brut (E₁, E₂, E₃, E₄, E₅) et compléter à 1 mL par l'eau distillée.
- Ajouter 1mL de réactif C aux solutions protéiques et incuber pendant 10 minutes.
- Mélanger 0.1mL de solution de Folin–Ciocalteu
- vortexer et incuber pendant 30 min.
- Mesurer l'absorbance à 750 nm.

Présentation du 2^{er} compte rendu du TP

Il doit comporter :

- ✓ Intitulé de la séance du TP
- ✓ Introduction
- ✓ But de TP
- ✓ Principe
- ✓ Matériel et méthodes
- ✓ Résultats et interprétations
- ✓ Tracer la courbe d'étalonnage $DO=f([BSA])$.
- ✓ Déduire la concentration des protéines dans les échantillons.
- ✓ Quel est l'extrait la plus riche en lectines ?
- ✓ Conclusion