

Atelier 04 : Dosage des protéines à partir des microalgues

INTRODUCTION :

Les protéines sont des macromolécules composées d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques, présentes chez les organismes vivants et essentielles à leur fonctionnement. Découvertes en 1838, elles sont les principaux composants des cellules, représentant plus de 50 % de leur poids sec. Le mot protéine vient du grec proteios qui signifie « premier »

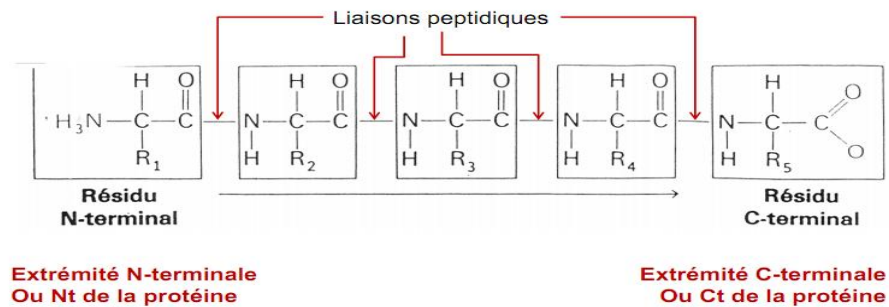


Figure 01 : Structure générale d'une protéine

Les acides aminés possèdent tous, une fonction amine (NH₂) et une fonction carboxylique (COOH), ils se distinguent par leur chaîne latérale R, qui peut être un simple atome d'hydrogène (c'est la glycine) ou bien plus complexe.

Les protéines peuvent assurer des rôles très diverses au sein de la cellule ou de l'organisme, elles peuvent avoir :

- ❖ Un rôle structural (l'actine qui participe à l'architecture de la cellule)
- ❖ Un rôle enzymatique (l'ADN polymérase qui recopie l'ADN)
- ❖ Un rôle dans la régulation de la compaction de l'ADN (les histones) ou l'expression des gènes (les facteurs de transcription)

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Le choix dépend des besoins et des caractéristiques recherchées : fiabilités, sensibilités, rapidités, taille des échantillons, possibilité de récupérer l'échantillon après dosage, présence de substances interférentes dans l'échantillon. Le choix d'une méthode dépend du contexte, dans la suite nous proposons de doser des échantillons protéiques selon une méthode :

- ❖ Photométrie à 595nm après réaction de Bradford.

OBJECTIF

Réaliser un dosage protéique à partir de différentes de microalgues , en utilisant la :
Méthode de Bradford)

MATERIELS ET PRODUITS REQUIS

- ⇒ Spectrophotomètre
- ⇒ Cuves en plastique
- ⇒ Les microalgues
- ⇒ Eau distillée
- ⇒ Micropipettes de 1000ml

- ⇒ Tubes de 20ml et portoirs à tubes
- ⇒ Réactif de Bradford
- ⇒ Albumine de sérum bovin (BSA)
- ⇒ Tubes eppendorf

Principe

Bradford et al.(1976) ont développé une méthode basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. En milieu Méthanolique acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu avec une absorption maximale à 595nm

Cette adsorption se fait principalement par des liens ioniques avec des acides aminés basiques et des interactions hydrophobes (acides amines aromatiques). C'est une méthode très sensible (2.5µ de protéines) et très rapides.

Composition du réactif de Bradford

- Bleu de coomassie : 5mg
- Ethanol à 95% :2.5ml
- Acide orthophosphorique : 5ml
- Eau distillée Q.s.p 50ml (Q.s.p =Quantité suffisante pour).

Protocole :

Extraction des protéines

- Prendre 2ml d'une culture de Microalgue
- Centrifuger la culture de microalgue à 5000 rpm pendant 10min
- Ajouter 1ml de NaOH à 0.5N au culot et mettre au bain marie à 80°C pendant 10mn sous agitation.
- laisser refroidir
- Centrifuger les échantillons à 5000 rpm pendant 10mn
- Récupérer le surnageant dans un nouveau tube
- Répéter l'opération pendant 3 fois
- mettre le dernier surnageant à 100°C pendant 10 min
- Regrouper les 3 Surnageants et mixer avant le dosage

Préparation d'une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (BSA) :

- A partir de la solution étalon de BSA à 1mg/ml, réaliser une gamme de 6 tubes contenant de 20 à 100µg de BSA par tube pour un volume total de 1ml.

Préparation de la solution inconnue en protéines

- Préparer en même temps, les tubes expérimentaux qui contiendront 10µl de solution protéique inconnue de la microalgue et 990µl de l'eau physiologique (travailler en triplicata).
- Ajouter 1ml du réactif de Bradford dans chaque tube à essai.
- Préparer le blanc : 1ml d'eau physiologique + 1ml du réactif de Bradford

*-Incuber pendant 15mn à l'obscurité à température ambiante
Lire la DO à 595nm.*