

TP 7 DOSAGE COLORIMETRIQUE PAR ETALONNAGE

Dosage des protéines sérique par la méthode de lowry

Principe

La méthode de Lowry est très sensible, elle permet de déterminer les concentrations en protéines comprises entre 0,05 mg/ml et 0,1 mg/ml. Il s'agit de la combinaison d'un traitement cupro-alcalin et de la réaction de Folin.

Le réactif de Folin (acides phosphotungstique et phosphomolybdique) réagit de façon spécifique avec certain phénol des aminoacides en donnant une coloration bleue spécifique.

Réactifs :

Réactif A : Na_2CO_3 à 2% dans NaOH 0,1 N.

Réactif B : tartrate de Na et K à 2% dans l'eau.

Réactif C : $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ à 1% dans l'eau.

Réactif D : mélange constitué de 96 ml de réactif A, 2 ml de réactif B et 2 ml de réactif C (préparé juste avant l'emploi).

Réactif E : réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3.

Solution saturée de sulfate d'ammonium $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$.

Solution étalon de l'albumine bovine à 0,2 mg/ml (BSA).

Solution F : sérum dilué 20 fois (concentration protéique inconnue).

Mode opératoire

1- Précipitation par les sels

Les globulines sériques sont séparées des albumines par précipitation au sulfate d'ammonium (relargage). Elles précipitent à 50% de saturation.

- Réaliser le test comme c'est décrit dans le tableau ci-dessous

| | Tube 1 (Témoin) | Tube 2 (Essai) |
|--------------------|------------------------|-----------------------|
| Sérum dilué | 0 ml | 4 ml |
| Eau distillée | 4 ml | 0 ml |
| Sulfate d'ammonium | 4 ml | 4 ml |

- Ajouter goutte à goutte, 5 ml d'une solution saturée en sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) tout en agitant lentement le tube maintenu dans la glace. Laisser précipiter 20 minutes.
- Centrifuger à 5000 tours/min pendant 15 minutes. Le précipité contient les globulines. Les albumines restent dans le surnageant.
- Eliminer le surnageant et égoutter le tube sur du papier filtre.
- Dissoudre le précipité dans 4ml d'eau distillée en agitant vigoureusement. On utilisera 1ml de cette solution (solution H) pour doser les globulines.

2- Dosage des protéines sériques totales

- Réaliser le test comme c'est décrit dans le tableau ci-dessous

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Solution de SAB à 200 µg/ml (ml) | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | | | | |
| Sérum dilué (ml) | | | | | | 0,5 | 0,8 | | |
| Solution H (culot) (ml) | | | | | | | | 0,5 | 0,8 |
| Eau distillée | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0 | 0,3 | 0 | 0,3 | 0 |
| Sol. cupro alcaline (ml) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Attendre 10 mn | | | | | | | | | |
| Réactif de Folin (ml) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |

- Incuber 30 minutes à l'obscurité
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 750 nm

Résultats et discussion :

1. Remplir le tableau suivant :

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DO | | | | | | | | | |
| SAB en microgramme | | | | | | | | | |

2. Tracer la courbe étalon sur papier millimétré, en déduire les quantités de protéines des tubes 6 à 9.
3. Donner la concentration en mg/ml des protéines dans les solutions de sérum et de culot utilisées directement dans l'expérimentation
4. Déterminer la concentration en mg/ml des globulines dans le sérum.
5. Calculer la concentration en mg/ml des albumines dans le même sérum (en générale les taux normaux des différentes protéines sériques sont : Albumines 60% (52%-67%) - Globulines 40%)

6. Déterminer la concentration en mg/ml des protéines totales.
7. Quel est l'intérêt du dosage des protéines du sérum pour le diagnostic clinique ?