

Dosage des protéines totales d'un échantillon

3 basiques de laboratoire

Les méthodes de dosage des protéines totales sont nombreuses et présentent chacune des caractéristiques différentes : sensibilité, interférents, réponse plus ou moins différente selon la composition en acides aminés Le choix d'une méthode dépend donc du contexte. Citons quelques méthodes : par l'intermédiaire du dosage de l'azote total protéique, par mesure de l'absorbance intrinsèque à 280 nm, par méthodes photométriques après mise en œuvre d'une réaction chimique ou de la fixation d'un colorant ...

Dans la suite, on se propose de doser des échantillons protéiques selon 3 méthodes : absorbance intrinsèque à 280 nm, photométrie à 540 nm après réaction du biuret, photométrie à 562 nm après réaction au Cu(II) et révélation à l'acide bicinchoninique (méthode dite au BCA)

1. Dosage des protéines totales par mesure d'absorbance à 280 nm

La méthode est décrite dans le document annexe n°2.

Réaliser le spectre de la sérumalbumine bovine en solution en NaCl 0,15M entre 230 et 350 nm. Commenter le spectre. Calculer le rapport A_{280}/A_{260} .

Estimer, si cela vous paraît possible, les protéines totales des extraits enzymatiques préparés lors des séances précédentes par mesures d'absorbances à 280 nm.

2. Dosage des protéines par méthode du biuret

La méthode est décrite dans le document annexe n°2.

Adapter la méthode en microplaque 96 puits en utilisant les données du document n°2 et du tableau ci-dessous à compléter. Mesurer les protéines totales des extraits enzymatiques préparés lors des séances précédentes.

	TR	1	2	3	4	5
Etalon SAB 5mg/mL en NaCl 0,15 M	0					
NaCl 0,15 M						
Réactif de Gornall	200 μ L					
Protéines par tube réactionnel (q en μ g)	0					
Recouvrir la plaque. <u>Homogénéiser sur agitateur de plaques</u> , incuber 40 minutes à 37°C puis remettre à température ambiante.						
Lire les absorbances (A) entre 540 et 590 nm contre le TR. Étalonnage $A = f(q)$ par régression linéaire.						
Étalonner en triplicate .						
Essais : échantillon à doser qsp μ L plus μ L de réactif de Gornall.						

3. Dosage des protéines par méthode au BCA

La méthode est décrite dans le document annexe n°3.

Mettre en œuvre la méthode en microplaque 96 puits en utilisant les données du document n°3. Mesurer les protéines totales des extraits bruts enzymatiques réalisés lors des séances précédentes (sur 20 μ L non dilué et sur 20 μ L dilué au 1/10 en NaCl 9g/L) et des extraits partiellement purifiés (volumes essais à 20 μ L). Prévoir les témoins de compensation échantillon nécessaires.

4. Compte-rendu

Compte-rendu technique puis conclusion générale (comparative).

Bibliographie

E. Layne, *Methods in Enzymology*, 1957, III, 447.

S. Tsuyoshi Ohnishi, J.K. Barr, *Methods in Enzymology*, vol. xx (1978).

M.P. Deutscher, *Methods in Enzymology*, vol. 182 (1990).

Smith, P.K. et al., *Anal. Biochem.*, 150, 76-85, (1985).

Peterson G. L., *Anal. Biochem.*, (1977) 83, 346.

PACE, VAJDOS, FEE, GRIMSLEY, GRAY, *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*, *Protein Science* (1995), 4:2411-2423.

Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration, Moore ..., *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010, vol. 9(4), 330-357

Document n°1. Dosage des protéines totales et absorbance intrinsèque à 280 nm

Most proteins have relatively intense ultraviolet light absorption centered at 280 nm. This is due to tyrosinyl and tryptophanyl residues in the protein. However, the amount of these residues varies in different proteins and the mass absorption coefficient varies in different proteins : 0 to $2.8 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (0.673 for bovine serumalbumin, 1.38 for human IgG, 2.64 for lysozyme ...). If no extinction coefficient information exists for a protein or protein mixture of interest, a rough estimate of the mean mass absorption coefficient is $1.1 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for a solution that has no other interfering substances.

Any non-protein components (ie nucleic acids...) that absorbs ultraviolet light will interfere with the assay. The assay must not be turbid.

Warburg, Christian and Layne developed methods to correct for the interference with nucleic acids, which would be common contaminants in a protein extract (nucleic acids adsorb strongly at 280 nm, $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$).

Layne equation

Unknowns with possible nucleic acid contamination. Use the following formula to estimate protein concentration :
 Concentration (mg/ml) = $(1.55 \times A_{280}) - 0.76 \times A_{260}$

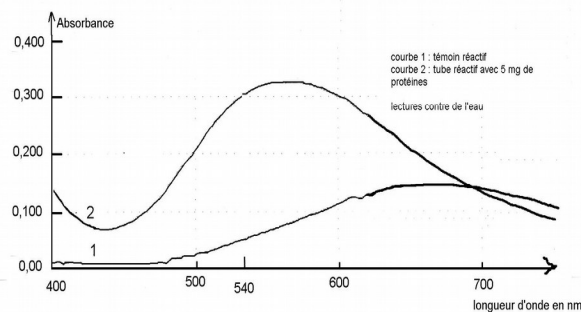
Protein estimation by UV absorption. Protein concentration (mg/mL) = $A_{280} \cdot F$ (E. Layne, Methods in Enzymology, 1957, III, 447)											
A280/A260	1.75	1.52	1.30	1.09	0.94	0.82	0.77	0.71	0.67	0.64	0.6
%Nucleic Acid	0	0.5	1.25	2.5	4	6	7.5	10	12	14	20
F	1.12	1.05	0.97	0.85	0.74	0.63	0.57	0.48	0.42	0.38	0.28

Document n°2. Dosage des protéines par la méthode dite du biuret

a) Principe

Pour toute chaîne polypeptidiques contenant au moins 2 liaisons peptidiques, les liaisons peptidiques forment, en milieu très alcalin, un complexe coloré avec les ions Cu^{2+} . Si on met en œuvre un réactif standardisé, en excès, on peut ainsi doser les protéines par colorimétrie à 540 nm.

Le réactif standardisé utilisé est appelé réactif de Gornall (la concentration en Cu^{2+} , en OH^- est standardisée, il contient du KI : 1,5 g de CuSO_4 , 5 H₂O pour 6 g de tartrate double de sodium et de potassium et 30 g de NaOH et 1 g de KI).



(La molécule de biuret donne la même réaction que les liaisons peptidiques avec les ions Cu^{2+} , c'est pourquoi la méthode a été appelée méthode du biuret.)

b) Qualités de la méthode

Méthode de mise en œuvre très simple et très peu onéreuse.

La méthode possède une sensibilité influencée par la nature (composition en aminoacides) des protéines à doser : il y a par exemple un effet proline, hydroxyproline et cystéine réel !. La méthode est malheureusement peu sensible. Elle n'est applicable qu'à des milieux très concentrés en protéines (plus de 0,8 mg/mL). C'est justement le cas du plasma sanguin ! D'où son utilisation en analyses médicales.

De très nombreuses substances portant des fonctions amines ou amides interfèrent avec la réaction de dosage (voir la littérature spécialisée). Cependant les interférents sériques sont négligeables, d'où l'utilisation en analyses médicales.

c) Modes opératoires

Le mode opératoire type est le suivant :

- Echantillon à doser ou étalon qsp 1 mL avec une solution de NaCl à 9 g/L. 0,8 à 10 mg de protéines par tube. (Les dilutions éventuelles des solutions protéiques sont réalisées en NaCl à 9 g/L.)

- réactif de Gornall 4 mL (réactif très stable) ;

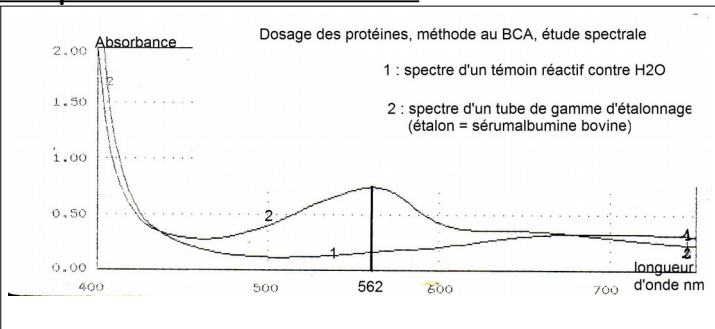
- homogénéiser, attendre 30 minutes à l'obscurité et lire au spectrophotomètre à 540 nm.

La méthode est évidemment adaptable en microplaque à puits.

Document n°3 Dosage des protéines par la méthode dite au BCA

a) Principe

En milieu alcalin, les protéines réduisent C^{2+} en Cu^+ . Le sel de l'acide bicinchoninic (BCA) forme un complexe coloré mesurable à 562 nm avec les ions Cu^+ .



b) Qualités de la méthode

Méthode compatible avec la plupart des surfactants jusqu'à 5%. Méthode influencée par la composition en acides aminés des protéines mesurées :facteur 1 à 3. Méthode à réaliser en durée contrôlée (cinétique complexe, évolution dans le temps).

Les chélateurs de $Cu(II)$, donc l'EDTA, les agents réducteurs (thiols, vitamine C ...) et les solutions à très haut pouvoir tampon interfèrent. Voir par exemple

<http://www.sigmaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/bca1bul.Par.0001.File.tmp/bca1bul.pdf> pour les interférents.

Selon les réactifs le domaine de praticabilité de la méthode est du type 0,1-2 mg/mL ou 0,01-0,2 mg/mL.

c) Modes opératoires

Le mode opératoire avec un réactif standard est le suivant :

Étalonnage	TR	1	2	3	4	5
Étalon sérum albumine bovine à 1 mg/mL en NaCl 0,15 mol/L	0	20 µL	40 µL	60 µL	80 µL	100 µL
eau	100 µL	80 µL	60 µL	40 µL	20 µL	0
Réactif Cu^{2+}/BCA du jour	2 mL					
Quantité de protéines par tube réactionnel (q)	0	20 µg	40 µg	60 µg	80 µg	100 µg
Homogénéiser, couvrir et incuber 2 heures à température ambiante ou 30 min à 37°C.						
Lire les absorbances (A) à 562 nm contre le TR. Etablir la relation d'étalonnage $A = f(q)$ par régression linéaire.						

Essais : échantillon à doser qsp 100 µL plus 2 mL de réactif Cu^{2+}/BCA .

Un mode opératoire en microplaque 96 puits et le réactif standard est le suivant :

Étalonnage en triplicate	TR	1	2	3	4	5
Étalon sérum albumine bovine à 0,5mg/mL en NaCl 0,15 mol/L	0	4 µL	8 µL	12 µL	16 µL	20 µL
eau	20 µL	16 µL	12 µL	8 µL	4 µL	0
Réactif Cu^{2+}/BCA du jour	200 µL					
Quantité de protéines par tube réactionnel (q)						
Recouvrir la plaque. Homogénéiser au moins 5 minutes sur agitateur de plaque et incuber 2 heures à température ambiante (30 minutes à 37°C).						
Lire les absorbances (A) entre 540 et 590 nm contre le TR. Établir la relation d'étalonnage $A = f(q)$ par régression linéaire.						

Essais : échantillon à doser qsp 20 µL plus 200 µL de réactif Cu^{2+}/BCA .

Réalisation du réactif Cu^{2+}/BCA du jour. Réactif A : solution commerciale standard pour dosage des protéines au BCA (1g/L en sodium bicinchoninate, 20 g/L en $Na_2CO_3 \cdot H_2O$, 1,6g/L sodium tartrate $2H_2O$, 4g/L NaOH, 9,5 g/L $NaHCO_3$, Sigma B9643 ou autre fournisseur évidemment) ; Réactif B : $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ à 4% ; Mélanger 50 V de réactif A (BCA) plus 1 V de réactif B = réactif Cu^{2+}/BCA , stable la journée. A savoir, il existe des réactifs plus concentrés en BCA (40g/L) avec des modes opératoires différents et plus sensibles (praticabilité 0,01 à 0,2 mg/mL) !