

## TP 2 - TAB

### I)- Extraction protéique & dosage protéique

Combiner les différents réactifs.

#### Tampon d'extraction :

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 75 mM	5.32 g de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (PM=141,96 g/mol)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25 mM	1.70 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (PM=136,09 g/mol)
EDTA 2mM	292.2 mg d'EDTA (PM=292.2 g/mol)
pH=7.2.	

#### Le protocole consiste en 2 extractions successives :

- La **1<sup>ère</sup> extraction** est réalisée à partir d'un tissu pesant en moyenne 25 - 30 mg sur lequel il était ajouté 500 µl de tampon d'extraction dans un tube eppendorf pour avoir une dilution finale de 1/20 (poids / volume)
- Un broyage des tissus suivi d'une agitation régulière pendant 5 minutes.
- L'homogénat était soumis à des ultrasons 2 x 10 sec, suivi d'une centrifugation 15 000g x 10 minutes à 4°C.
- Le surnageant était récupéré dans un tube eppendorf refroidi à 4°C.
  
- **La 2<sup>ème</sup> extraction** était réalisée à partir du culot de centrifugation, avec le même volume de tampon d'extraction permettant d'avoir une dilution finale 1/40.
- Une agitation régulière pendant 5 minutes
- L'homogénat était soumis à des ultrasons 2 x 10 sec, suivi d'une centrifugation 15 000g x 10 minutes à 4°C.
- Le surnageant était récupéré dans un tube eppendorf refroidi à 4°C.
- Le 2<sup>ème</sup> surnageant était alors associé au surnageant de la première extraction.

## II- Dosage de la concentration en protéines musculaires totales

### Méthode BRADFORD :

Sa longueur d'onde d'absorbance maximale est 465 nm. Le pigment forme un complexe avec les protéines : sa structure est modifiée par cette interaction et sa longueur d'onde d'absorbance maximale est déplacée de 465 à 595 nm. L'interaction pigment - protéine s'effectue essentiellement avec : En milieu acide, la forme anionique du bleu de Coomassie G250 interagit (par des liaisons non covalente = adsorption) avec les radicaux aromatiques des acides aminés constitutifs des protéines. Sa longueur d'onde maximale d'absorption augmente alors de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu).

Etablir une gamme étalon de concentration protéique allant de 0 à 50 µg/mL à l'aide d'une solution de sérum albumine bovine (BSA) à 2 mg/mL.

<b>µg protéines</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
<b>µl ΔH<sub>2</sub>O</b>	<b>795</b>	<b>790</b>	<b>785</b>	<b>780</b>	<b>775</b>	<b>770</b>
<b>µl BSA (2 mg/ml)</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>25</b>
<b>TE (µl)</b>	<b>5</b>					
<b>µl Bradford</b>	<b>200</b>					

TE : Tampon d'extraction

### Remarque :

Ajouter dans l'ordre 200 µL de solution Bradford en agitant la cuve directement sur un vortex. Ceci évite la formation d'un précipité. Réaliser les mêmes étapes sur 5 ou 10 µl d'échantillons protéiques.

1. Incuber 10 min à température ambiante à l'abri de la lumière.
2. Mesurer la densité optique à une longueur d'onde de 595 nm avec un spectrophotomètre .
3. Établir une courbe étalon à partir de la gamme réalisée avec la BSA, puis calculer la concentration de l'échantillon d'après l'équation de la droite étalon.