*Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene*

*Faculté des sciences biologiques*

*Module : Physiologie Cellulaire et Moléculaire*

*Master 1 GD*

*2013-2014*

Compte rendu n° 2

« Extraction et purification des protéines du foie de poulet»

Fait par :

TIAIBA Imene

CHALAL Ikram

CHOUKRANE Thilelli

Groupe 1

***PLAN***

1. ***Introduction***
2. ***But***
3. ***Matériels***
4. *Matériel biologique*
5. *Matériel de laboratoire*
6. ***Manipulation***
7. *Extraction des protéines*
8. *Dosages des protéines par méthode de Biuret*
9. *Réalisation de la Gamme étalon*
10. ***CONCLUSION***
11. ***Introduction :***

Les protéines sont des macromolécules composées d'acides aminés reliés par des liaisons  peptidiques, présentent chez les organismes vivants et essentiels à leur fonctionnement. Découvertes en 1838, les protéines sont le principal composant des cellules, représentant  plus de 50% de leur poids sec.

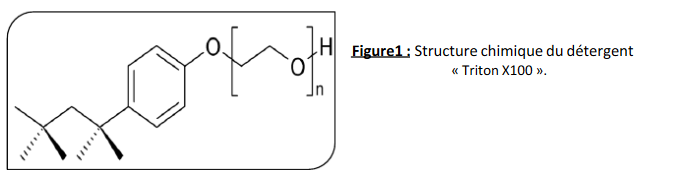
L’extraction des protéines est un moyen efficace pour séparer et récupérer les protéines des autres constituants non protéiques, pour isoler une certaine protéine dans une mixture, on applique une méthode dite la purification de protéines.

1. ***BUT***

Pour ce TP d’extraction et de purification des protéines on va choisir le foie de poulet comme un organe expérimental (organe riche en protéines et facile à le brouiller avec le mortier) et nous présenterons donc les principales étapes mises en œuvre au cours de cette opération, notamment pour la ***purification*** de ces protéines on utilisant des ***solutions de détergents*** à fin de lyser les cellules hépatiques par choc osmotique et leur ***dosage*** par la méthode de ***Biuret.***

***Définition:***

*Les détergents* sont des molécules amphiphiles qui ont largement contribué à l’analyse des membranes cellulaires, il existe des détergents ioniques dites forts qui détruisent les liaisons non covalentes et dénaturent les protéines, et des détergents non ioniques dites doux le cas de notre TP afin de purifier les protéines membranaires sans les dénaturer, pour cela on a utilisé le détergent « triton X100 »



***« Triton X100 » :*** Agent tensioactif non-ionique, soluble en milieu aqueux et contenant en moyenne 10 moles d'oxyde d'éthylène. Ces caractères chimiques permettent au Triton d’entourer les protéines en interagissant avec ses parties hydrophobes et les déchausser en les recouvrant de charges.

1. ***Matériels***
2. Matériel biologique :

**Foie de poulet.**

1. Matériel de laboratoire :



### Mortier Pipettes centrifugeuse Spectrophotomètre

### 10268376_618876358205901_636320116_n.jpgProduits chimiques :

### Solution triton X-100, Solution SDS, Solution de BSAà 0.1%, Eau distilée

### 

### Réactif de Biuret

1. ***Manipulation :***

***Première partie***

1. On broie tout d'abord le foie à l’aide du mortier, cette étape nécessite l’utilisation d’un bac à glaçons
2. L'homogénat ainsi obtenu est mis dans des tubes à essais pour centrifugation à fin d’éliminer les grosses particules peu ou mal broyée.
3. Préparation dans 4 tubes à essais des solutions du Triton X-100 à : 0.1%,0.3%,0.4% et 0.5% à partir de la solution mère de 10%

🡪Pour cette étape le calcule des volumes se fait selon la loi suivante

***C1 X V1 = C2X V2***

Exemple : Pour la solution à 0.1 % :

10 x V1= 0.1 X 3 🡺 V1 = 0.03 ml

* On obtient ainsi les volumes suivants : *0.03ml, 0.09ml, 0.12ml et 0.15ml* respectivement. On ajuste avec de l’eau distillée les 4 tubes au volume final de ***3ml.***

1. Ajout dans les tubes précédents 0.5ml de l’échantillon
2. Incubation 1h à 4°C puis centrifugation à 10 000g pendant 2minutes à 4°C
3. Récupération du surnageant
4. Dosage par la méthode de biuret

* Le réactif de ***Biuret*** est préparé comme suit :
* Dissoudre 1.5g de CuSO4, 5H2O
* 6g de tartrate double Na+, K+
* 500 ml d’eau
* 300 ml de NaOH à 10 %
* 1g de KI pour que la solution soit stable indéfiniment
* Ajuster la solution à 1L de volume

***Réalisation de la gamme étalon :***

1. La gamme étalon est réalisée avec des concentrations croissantes de BSA à 0.1% diluée dans de l’eau distillée pour un volume total de 0.5 ml au quel on rajoute 1 ml de réactif de biuret.

* ***BSA***« *L'albumine de sérum bovin » : une des* [*protéines*](http://fr.wikipedia.org/wiki/Prot%C3%A9ine) *extraites du sérum de bovin, elle contient 583 Acides aminés et son poids moléculaire est égale à : 66,430* [*kDa*](http://fr.wikipedia.org/wiki/KDa)

La gamme étalon est réalisée selon le tableau suivant, avec lecture des densités optiques à une longueur d’onde de 540 nm

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Tubes | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| BSA (0.1%) en µl | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| Eau distillée (µl) | 500 | 490 | 480 | 470 | 460 | 450 |
| Réactif de Biuret (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

La courbe de la gamme étalon donnant la densité optique en fonction des concentrations de BSA (µg/µl) est alors établie selon le tableau suivant :

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| BSA (0,1%) en µl | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| DO à 540 nm | 0 | 0.048 | 0.005 | 0.071 | 0.059 | 0.067 |

***La courbe de la gamme étalon :***

***Commentaire :***

La courbe de la gamme étalon représentant la DO (densité optique) en fonction des différentes concentrations croissantes de la solution de BSA est une droite qui passe par l'origine ce qui veux dire que la DO dépends de la concentration de la solution dans spectrophotomètre, en augmentant sa concentration la DO augmente (l’absorbance augmente).

***Deuxième partie***

***Calcule de la concentration en protéines dans les échantillons :***

*Préparation des échantillons :*

Les solutions sont préparées à partir de nos échantillons traités par Triton X-100 et SDS après les avoir bien conservé, on prélève 0.5 ml de chaque tube et on ajoute 1 ml du réactif de biuret on mélange bien les tubes à l’aide d’un vortex et on laisse les tubes 30 minutes environs avant de lire les DO décrites sur le tableau suivant :

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Tubes avec Triton X-100 | | | | Tubes avec SDS | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 1’ | 2’ | 3’ | 4’ |
| DO à 540 nm | 0,335 | 0,326 | 0.142 | 0.304 | 0.515 | 0.308 | 0.207 | 0.209 |

*Réalisation des courbes*

Le calcule se fait par extrapolation des DO obtenues dans la courbe de la gamme étalon obtenue dans la 1ere partie : DO= f (concentration BSA)