

Module : Enzymologie Appliquée et Génie Enzymatique  
2<sup>ème</sup> Master BFA et MFA

### **TP 5 : Précipitation des protéines sérique par sulfate d'ammonium et dosage colorimétrique par étalonnage**

#### **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-alkalin 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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 2% dans NaOH 0,1 N.

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

Réactif C : CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>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 ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (761 g/L).
- Solution étalon de l'albumine bovine à 0,2 mg/ml (BSA).
- Solution F : sérum dilué 20 fois (concentration protéique inconnue).

#### **Etape 1 : Précipitation des globulines sériques par sulfate d'ammonium**

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

	<b>Tube 1 (Témoin)</b>	<b>Tube 2 (Essai)</b>
Sérum dilué	0 ml	4 ml
Eau distillée	4 ml	0 ml
Sulfate d'ammonium	4 ml	4 ml

- Ajouter goutte à goutte, 4 ml d'une solution saturée en sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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.

#### **Etape 2 : Dosage des protéines sériques totales**

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

