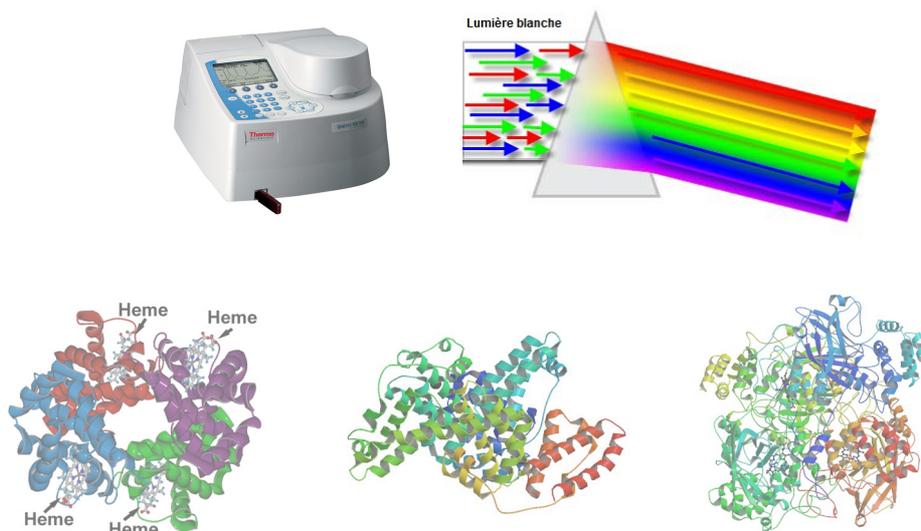


UNIVERSITE de TOURS
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
TOURS

Licence L1 Sciences de la Vie
Mention Sciences du Vivant

TRAVAUX PRATIQUES de BIOCHIMIE STRUCTURALE

Spectrophotométrie appliquée aux biomolécules



NB : **BLOUSE OBLIGATOIRE** pour entrer en salle de T.P.

Matériels indispensables: Calculatrice + marqueur indélébile

SALLE S070 (sous-sol bât L)

Utilisation des micropipettes

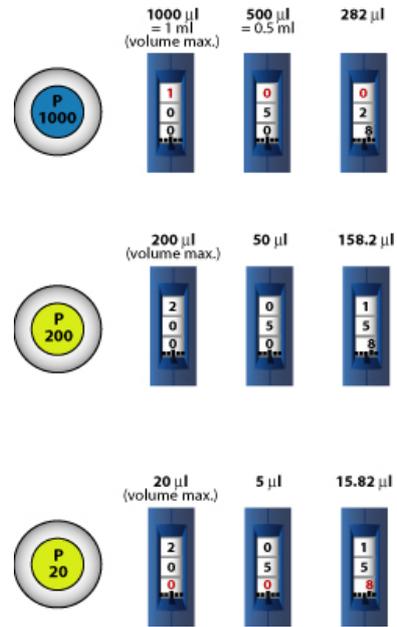
Les 3 micropipettes les plus courantes en laboratoire:

Micropipette volumes possibles à prélever

P1000 100-1000 μ l

P200 20-200 μ l

P20 2-20 μ l



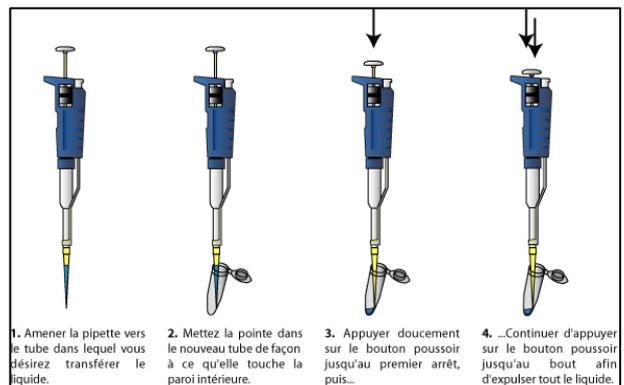
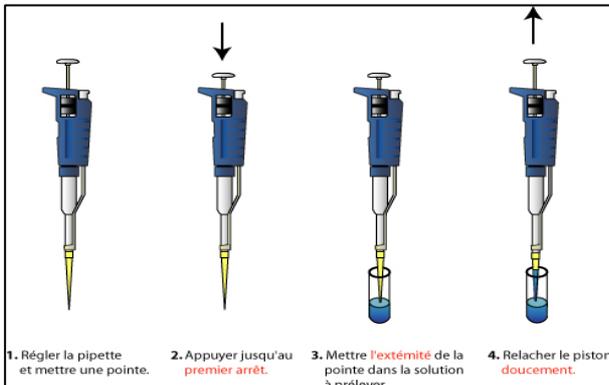
Comment pipeter:

1) Régler la pipette au volume désiré

2) Mettre un cône

3) Prélever le liquide

4) transférer le liquide



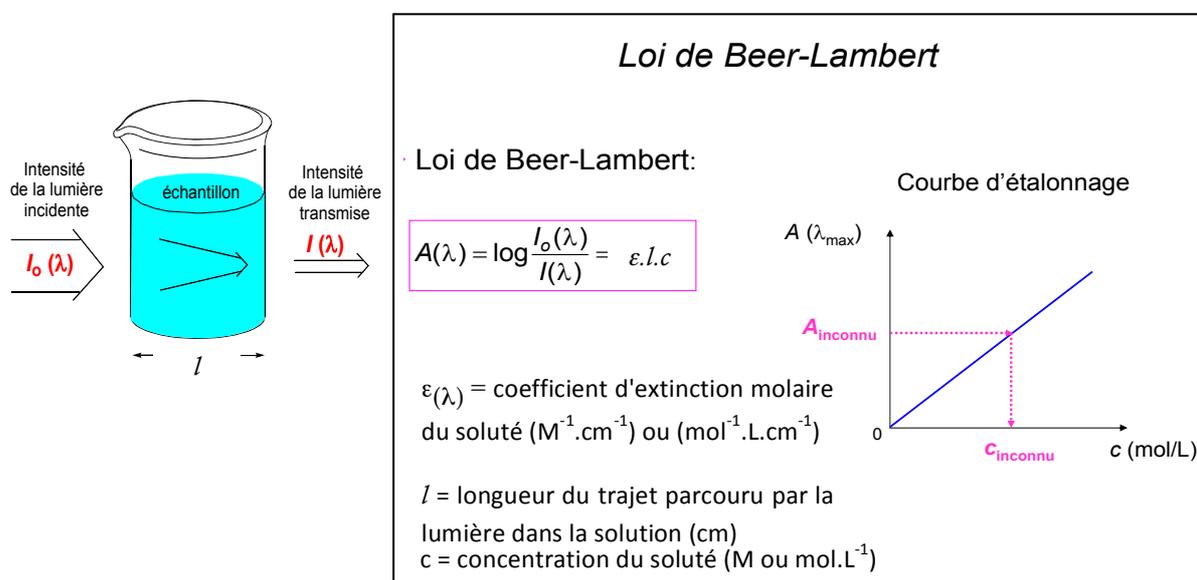
Illustrations extraites de http://bioutils.unige.ch/experiences/info_pipettes.php

I. INTRODUCTION

Principe de la spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative, rapide et non dénaturante, qui permet de mesurer l'absorbance (A) d'une substance chimique donnée en solution. L'absorbance de solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde (λ) de l'espèce à étudier.

La spectrophotométrie consiste à mesurer la lumière traversant un milieu contenant une ou plusieurs substances absorbantes (chromophores). Lorsqu'un faisceau d'intensité I_0 traverse une solution contenant une substance dissoute (échantillon) il est partiellement absorbé et le faisceau émergent I possède une intensité inférieure. Plus la substance absorbante est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert.



REMARQUE: La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance (A) à la longueur d'onde étudiée (λ). **A est une valeur sans unité.** La spectrophotométrie UV-visible emploie le spectre compris entre 200 et 800 nm.

Application

La **spectrophotométrie** est utilisée dans beaucoup de domaines : chimie, pharmacie, environnement, agroalimentaire, biologie etc., aussi bien au laboratoire que sur site industriel.

Exemples d'applications: **Dosage** (détermination d'une concentration inconnue d'une substance chimique), **suivi de la cinétique** d'une réaction chimique, **analyses structurales** (spectres UV), etc.

Dans l'analyse des protéines, il est soit nécessaire d'identifier les fractions contenant des protéines (ex: présence d'acides aminés aromatiques: Phe, Tyr et Trp) ou de déterminer la concentration de protéines dans un échantillon purifié.

II. PARTIE EXPERIMENTALE

1. Préparation d'un tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,4

En Biologie, l'étude des protéines nécessite de travailler dans un milieu tamponné afin de minimiser les variations de pH. Pour les mêmes raisons, les mesures d'activité enzymatique se font en milieu tamponné, à un pH correspondant au maximum de l'activité de l'enzyme étudiée.

Un des systèmes tampon les plus utilisés dans les laboratoires de recherche est le système phosphate parce qu'il permet d'obtenir des conditions proches des conditions physiologiques (force ionique et pH).

Au cours de la première partie de la séance de TP, vous préparerez un tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,4, à partir d'une solution d'acide faible (NaH_2PO_4 , 0,1 M) et de sa base conjuguée (Na_2HPO_4 , 0,1 M).

2. Détermination de la concentration d'une protéine en solution

La concentration d'une protéine dans un échantillon inconnu peut être déterminée à partir de sa valeur de ϵ (dans la région de linéarité de la loi Beer-Lambert) ou à partir d'une courbe d'étalonnage préparée avec des échantillons contenant différentes concentrations de la protéine en question.

Au cours de la deuxième partie du TP, vous calculerez la concentration de votre protéine purifiée, après avoir déterminé son coefficient d'extinction molaire.

III. MANIPULATIONS

1. Préparation d'un tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,4 (Volume final= 50 mL)

- Mesurer le pH des deux solutions NaH_2PO_4 (0,1 M) et Na_2HPO_4 (0,1 M).
- La solution basique (40 mL) est placée dans un bécher contenant un barreau aimanté. L'autre solution (NaH_2PO_4 , 0,1 M) va servir à ajuster le pH.
- Placer le bécher sur l'agitateur magnétique au poste pH-mètre. Avec la solution acide et à l'aide de la pipette P1000, ajuster d'abord jusqu'à pH 8, puis avec la P200 jusqu'à pH 7,4.

2. Détermination de la concentration en protéine d'un échantillon par spectrophotométrie

* Préparation de la gamme d'étalonnage

Vous disposez d'un tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,4 (prêt à l'emploi) et d'une solution de protéine notée H ou A, correspondant à l'une des 2 protéines suivantes de concentration connue :

Hémoglobine (H) d'érythrocytes bovins : solution à 1,5 mg/mL, MM = 67000 g/mole (67 kDa)

Albumine (A) sérique bovine : solution à 10 mg/mL, MM = 69000 g/mole (69 kDa)

A l'aide des pipettes, P1000 et P200, distribuer, comme indiqué dans le tableau ci-dessous, les volumes de tampon phosphate à 0,1 M, pH 7,4, dans 7 tubes à hémolyse identifiés de 1 à 7.

Ajoutez ensuite les volumes nécessaires de solution de protéine préalablement homogénéisée.

N° tube	1	2	3	4	5	6	7
Solution tampon (μL)	1000	950	900	850	800	750	700
Solution de protéine (H ou A) (μL)	0	50	100	150	200	250	300

Lorsque la gamme pour la courbe d'étalonnage est prête, veillez à bien agiter les tubes au vortex.

*** Préparation de l'échantillon de concentration inconnue**

Vous disposez également d'une solution de votre protéine (échantillon) à une concentration inconnue, notée: (H1, H2, H3, H4, H5 ou H6) ou (A1, A2, A3, A4, A5 ou A6).

A l'aide des pipettes, P1000 et P200, distribuez, comme indiqué dans le tableau ci-dessous, les volumes de tampon phosphate à 0,1 M, pH 7,4, dans 3 tubes à hémolyse identifiés de **E1 à E3**.

Ajoutez ensuite les volumes nécessaires d'échantillon (protéine de concentration inconnue).

N° tube	E1	E2	E3
Solution tampon (μL)	925	875	775
Echantillon (μL)	75	125	225

Lorsque les dilutions sont prêtes, veillez à bien agiter les tubes au vortex.

1. Faire le spectre d'absorption de l'échantillon

Au préalable, effectuez (**en présence du responsable de la séance de TP**) la calibration de la ligne de base du spectrophotomètre avec la solution tampon uniquement dans une cuvette (volume final = 1 mL). Mettez dans l'autre cuvette votre échantillon **E2** et faire son spectre d'absorption **entre 250 et 500 nm**. Choisissez la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance et à laquelle vous réaliserez ensuite les mesures d'absorbance.

2. Mesure de l'absorbance de vos différentes solutions

Mesurer l'absorbance à la longueur d'onde adéquate:

- de votre gamme de solutions étalon (tubes 1-7)
- de l'échantillon de concentration inconnue (E1, E2 et E3)

3. Calcul de la concentration de votre échantillon

Calculer la concentration molaire et massique des solutions étalon (tubes 1-7) et de votre échantillon.

IV. COMPTE-RENDU

N'oublier pas d'indiquer avec quelle protéine vous avez travaillé.

- Expliquer, de façon concise, le but de ce TP et le principe de la détermination de la concentration en protéine d'une solution par spectrophotométrie.
- Identifier à quel spectre d'absorption de protéine (X ou Y) correspond votre échantillon (Hémoglobine ou Albumine).
- Remplir le tableau de l'absorbance (en indiquant à quelle longueur vous travaillez) en fonction de la concentration molaire en protéine de la gamme d'étalonnage.
- Tracer sur papier millimétré la droite d'étalonnage de l'absorbance = f(concentration molaire). Calculer graphiquement la concentration molaire, massique ainsi que le coefficient d'extinction molaire: $\epsilon(\lambda)$ de votre protéine.
- **Détailler vos calculs.**

- Exercice d'application: voir le CR