

Rapport de Biochimie

Dosage des protéines et catalyse enzymatique

Groupe 8
Simon Santacatterina
Ramy Moumneh

11 avril 2022

0.1 Modifications suite au premier rapport rendu

- Modes opératoires ajoutés
- Les unités du graphe absorbance-BSA ont été corrigées
- Les concentrations en CIP ont été ajoutées
- Un exemple de calcul d'activité spécifique a été ajouté
- Les valeurs de l'activité spécifique ont été corrigées

1 Introduction

Les buts de ce laboratoire sont de déterminer la concentration de la CIP commercialisée par la firme Sigma ainsi que de mesurer son activité spécifique sous l'influence du PH. La mesure de la concentration a été effectuée en utilisant la méthode de Bradford et en prenant comme référence la BSA. Par la suite, grâce à la mesure de l'absorbance du p-nitrophénol, de l'utilisation de la loi de Beer-Lambert ainsi que de la connaissance de ϵ , le coefficient d'absorption molaire, nous pouvons trouver la concentration du substrat et donc l'activité spécifique.

2 Détermination de la concentration de CIP

2.1 Mode Opérateur

Le protocole de cette expérience est présent dans la figure 1.

	Blanc		Test pour différentes concentrations de BSA										solution à caractériser			
Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Eau [μl]	100	→	96	→	92	→	88	→	84	→	80	→	95	→	90	→
BSA 0,5 mg/ml [μl]	0	→	4	→	8	→	12	→	16	→	20	→	0	→		→
CIP [μl]	0											→	5	→	10	→
Solution de Bradford [μl]	900															→
Mélangez																
Transfert 200 μl	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	B1	B2	B3	B4
Absorbance*			0,032	0,070	0,071	0,084	0,124	0,101	0,164	0,180	0,214	0,264	0,055	0,082	0,189	0,128

FIGURE 1 – Protocole pour essais blanc, solutions pour différentes concentrations de BSA et solution à caractériser.

*Valeurs corrigées en tenant compte des blancs

2.2 Explication

Les mesures de cette expérience permettent de construire la courbe d'étalonnage de la BSA. Il s'agit de réaliser le graphe de l'absorbance en fonction de la concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Cette courbe possède, pour les concentrations faibles, une allure linéaire. Par contre, pour des concentrations plus élevées, il y a une diminution de la pente de la courbe dû au phénomène de saturation de la solution. C'est dans la partie linéaire que nous allons déterminer, sur base des valeurs de l'absorbance des échantillons de CPI à 5 et 10 μL dans un volume de 1 ml, la concentration de la CPI.

2.3 Graphes et mesures

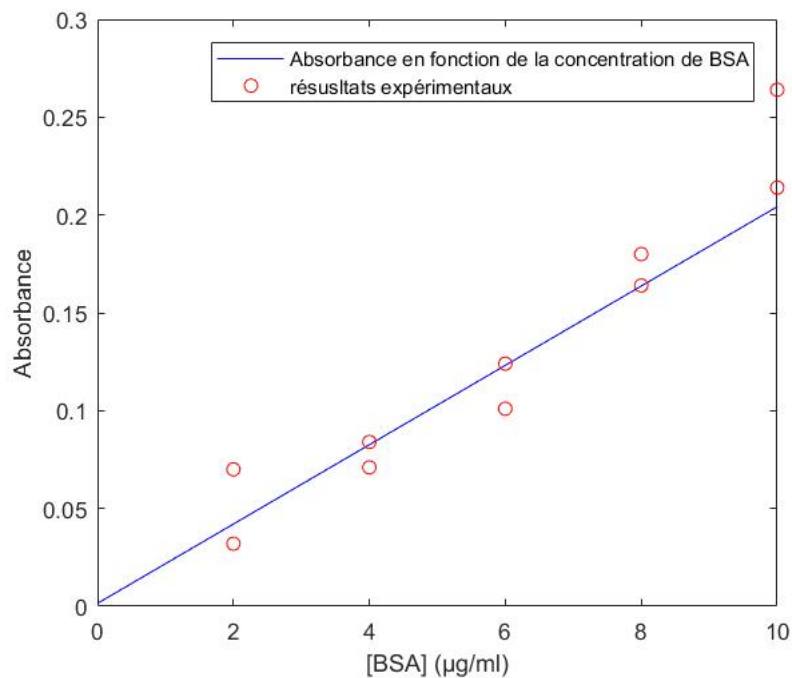


FIGURE 2 – Graphe de l'absorbance en fonction de la concentration en BSA. Les points rouges étant les données expérimentales brutes et la droite en bleu l'ajustement linéaire des premières données. Les deux dernières mesures étant ignorées.

Essai	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6	Tube 7	tube 8	tube 9	tube 10
BSA [μg]	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10
A_{595nm}^*	0.032	0.070	0.071	0.084	0.124	0.101	0.164	0.180	0.214	0.264

TABLE 1 – Tableau Courbe d'étalonnage : tableau reprenant les masses de BSA et leurs absorbances respectives à une longueur d'onde de 595 nm. *Valeurs corrigées en tenant compte du blanc

2.4 Calculs et résultats

La droite représentée sur la figure 2 possède pour équation :

$$A = Kc$$

A étant l'absorbance(.), c la concentration($\mu\text{g/mL}$) et K la pente de la droite qui vaut 0.0207 ($\text{mL}/\mu\text{g}$)

Avec pour valeurs moyennes des absorbances de la CIP $A_1 = 0.0685$ et $A_2 = 0.1585$ à 5 et 10 μL prélevés, respectivement, et par la relation linéaire ci-dessus cela donne $c_1 = 3.31 \mu\text{g/mL}$ et $c_2 = 7.66 \mu\text{g/mL}$. On peut donc trouver la masse totale en CIP par essai et en déduire la concentration en CIP de la solution de concentration inconnue. Pour des volumes de 1 mL cela donne $m_1 = 3.31\mu\text{g}$ et $m_2 = 7.66\mu\text{g}$. Avec ces valeurs, les concentrations initiales sont calculées de la manière suivante :

$$c_{\text{init}i} = \frac{m_i}{V_i}$$

Où V_i est égal au volume prélevé de la solution de concentration inconnue pour l'essai i. Les valeurs calculées sont $c_{\text{init}1} = 0.662 * 10^{-3}$ (mg/mL) $c_{\text{init}2} = 0.766 * 10^{-3}$ (mg/mL). Ainsi, la concentration en CIP de la solution à caractériser est $0.714 * 10^{-3}$ (mg/mL), soit la moyenne des deux valeurs trouvées précédemment.

Essai	Tube 11	Tube 12	Tube 13	Tube 14
Volume [μL]	5	5	10	10
$A_{595\text{nm}}$ *	0.055	0.082	0.189	0.128
[CIP] [$\frac{\text{mg}}{\text{L}}$]	2.66	3.96	9.13	6.18
CIP [μg]	2.66	3.96	9.13	6.18

TABLE 2 – Tableau Dosage de la CIP : tableau reprenant les volumes prélevés de la solution à concentration inconnu, l'absorbance des solutions, leur concentration en CIP ainsi que la masse de CIP présent dans ces solutions.

2.5 Interprétation des résultats et conclusion

Théoriquement les données expérimentales reportées sur un graphe doivent mettre en évidence le phénomène de saturation de la solution lorsque la concentration augmente, plus particulièrement lorsqu'elle est supérieure à 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Les points rouges de la figure 2 ne devraient dès lors plus représenter une augmentation linéaire. La pente entre les concentrations successives diminue alors et les points rouges passent sous la courbe bleue. Ceci n'est pas le cas dans la situation expérimentale rencontrée au laboratoire. Les données d'absorbance à 8 et 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sont donc erronées, ceci vraisemblablement à cause d'erreurs lors de la procédure expérimentale.

Notre méthode consiste à faire la moyenne des absorbances. Cependant, les valeurs trouvées, pour des essais différents, des concentrations de la solution de concentration inconnue donne des valeurs proches. Ceci laisse penser que la manipulation expérimentale n'est pas entachée d'erreurs significatives. Un nombre plus grand de prélèvement et un traitement statistique des données seraient néanmoins nécessaires pour trouver une valeur plus appropriée de la concentration.

3 Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline CIP

3.1 Mode Opérateur

Le protocole de cette expérience est présent dans la figure 3.

	Blanc		Test pour différents Ph											
Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
PH	8,5	8,5	8,5	8,5	9,5	9,5	10	10	10,5	10,5	11	11	11,5	11,5
MR 2X [μl]	500													
Eau [μl]	80													
pNPP 5mM [μl]	400													
NaOH 1M [μl]	1000		0											
Agitez														
Incubation 5 min [°C]	37													
Temps [min,sec]	0,00	0,30	1,00	1,30	2,00	2,30	3,00	3,30	4,00	4,30	5,00	5,30	6,00	6,30
CIP 1000X [μl]	20													
Mélangez														
Temps [min,sec]	9,00	9,30	10,00	10,30	11,00	11,30	12,00	12,30	13,00	13,30	14,00	14,30	15,00	15,30
NaOH 1M [μl]	0		1000											
transfert 200 μl	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	E1	E2
Absorbance*			0,071	0,057	0,365	0,367	0,533	0,511	0,341	0,224	0,247	0,383	0,522	0,553

FIGURE 3 – Protocole pour essais blanc et solutions à différents pH .*Valeurs corrigées en tenant compte des blancs

3.2 Explication

L'activité de la phosphatase alcaline CIP va être donnée par le nombre de p-nitrophénylphosphate (μmol) transformée par unité de temps. Nous allons obtenir ce nombre par la concentration de p-nitrophénol formée. Cette dernière est trouvée par la loi de Beer-Lambert en considérant $\epsilon = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.3 graphes

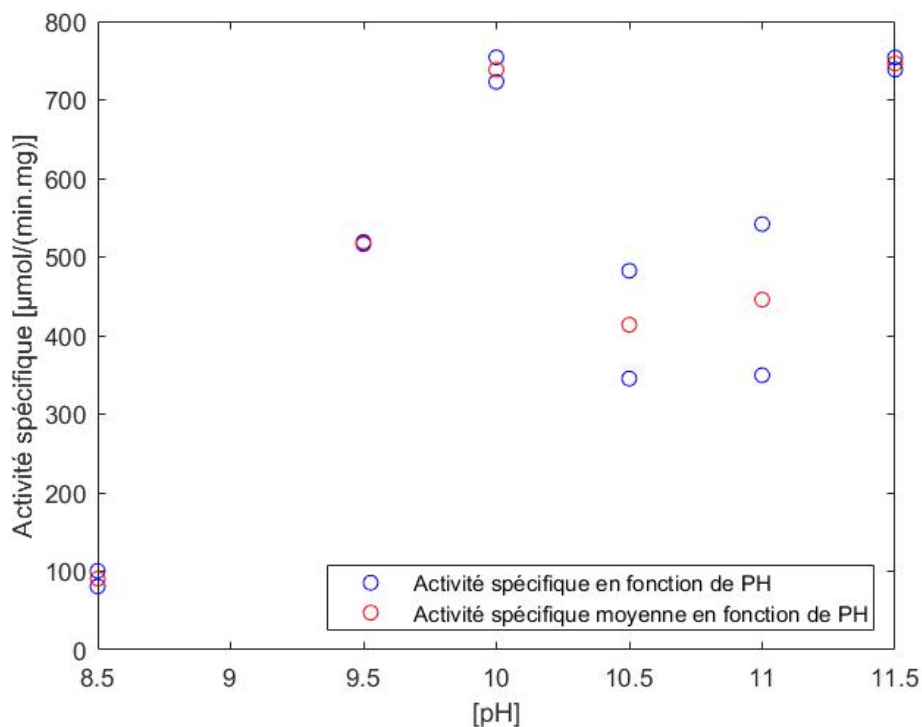


FIGURE 4 – Graphe de l'activité spécifique de la CIP en fonction du PH de la solution pendant 9 minutes

3.4 Calculs et résultats

La courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction du pH des solutions est reprises dans la figure 4.

La première étape consiste à utiliser la loi de Beer-Lambert et d'en tirer c soit :

$$c = \frac{A}{\epsilon d}$$

où c est la concentration en mM.

En remplaçant dans l'équation par $A_{12} = 0.064$, la valeur moyenne de l'absorbance des deux premiers essais :

$$c = \frac{0.064}{22 * 0.5} = 0.0058 [mM]$$

Puis grâce aux valeurs de ces concentrations, on obtient le nombre de moles de p-nitrophénol produites pour chaque essai.

$$n = c * V = 0.0058 * 10^{-3} * 2 * 10^{-3} = 0.012 [\mu mol]$$

Pour calculer l'activité spécifique de la CIP, il faut utiliser la formule :

$$A.S. = \frac{n}{tm}$$

où n est le nombre de mol de p-nitrophénol en μmol , t est le temps de réaction en minute et m la masse en mg de la CIP.

Lors de la première expérience de ce laboratoire il a été prélevé 20 μL d'un échantillon dont la concentration $c = 0.714 * 10^{-3} [mg/mL]$ a été caractérisée au point précédent. On obtient la masse de CIP :

$$m = c * V = 0.714 * 10^{-3} * 20 * 10^{-3} = 1.428 * 10^{-5} [mg]$$

et donc on calcule l'AS :

$$AS = \frac{0.012}{9 * 1.428 * 10^{-5}} = 93 [\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}]$$

Avec les valeurs des concentrations, on obtient les nombre de moles du p-Nitrophénol produit pour chaque essai. Les résultats sont repris dans la table 4.

Le pourcentage de substrat hydrolysé par le CIP se calcule en comparant la fraction de moles de p-Nitrophénol produites avec le nombre de moles de p-NPP initial pour la solution qui possède la plus grande absorbance. Cette solution est celle au pH 10 et son pourcentage est de 4.7455%.

Essai	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6	Tube 7	tube 8	tube 9	tube 10	tube 11	tube 12
pH	8.5	8.5	9.5	9.5	10	10	10.5	10.5	11	11	11.5	11.5
A_{405nm}^*	0.071	0.057	0.365	0.367	0.533	0.511	0.341	0.244	0.247	0.383	0.522	0.553

TABLE 3 – Tableau des mesures et calculs de l'expérience 2. *Valeurs corrigées en tenant compte du blanc

3.5 Interprétation des résultats et conclusion

Le pH optimal est celui pour lequel l'absorbance est maximale, c'est-à-dire le pH pour lequel le plus de p-nitrophénol a été produit. Dans cette expérience, le pH optimal est donc de 10 comme observé sur le graphe d'étalonnage.

On remarque, pour le dernier essai que les valeurs d'absorbance sont anormalement grande par rapport à la théorie. En effet, la courbe ne doit posséder qu'un seul maximum. Il s'agit probablement d'une erreur expérimentale. Quant au pourcentage, sans connaître la valeur que ce dernier doit prendre, on peut remarquer qu'il est assez bas.

PH	A_{405nm}	p-nitrophénol (μmol)	AS ($\mu mol min^{-1} mg^{-1}$)
8.5	0.0640	0.012	90.5
9.5	0.3660	0.067	517.8
10	0.5220	0.095	738.5
10.5	0.2625	0.053	413.8
11	0.3150	0.057	445.6
11.5	0.5275	0.096	746.3

TABLE 4 – Tableau des mesures et calculs de l'expérience 2 en prenant les moyennes des 2 essais pour chaque ph