



HAL
open science

Mode opératoire : Dosage des protéines dans des extraits de tissus intestinaux d'oiseaux d'élevage

Irène Gabriel

► **To cite this version:**

Irène Gabriel. Mode opératoire : Dosage des protéines dans des extraits de tissus intestinaux d'oiseaux d'élevage. 2015. hal-03794904

HAL Id: hal-03794904

<https://hal.inrae.fr/hal-03794904>

Submitted on 3 Oct 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Mode opératoire
Dosage des protéines dans des extraits de tissus intestinaux
d'oiseaux d'élevage

Date d'émission : 2015

Rédaction : Irène Gabriel

Revu par :

Version : n°1

Diffusion : Personnels de laboratoires étudiant la physiologie digestive des volailles

Mots clés :

Muqueuses digestives, Extrait de tissus intestinaux, Protéines, Oiseaux d'élevage

SOMMAIRE

- 1 Objet - Domaine d'application**
- 2 Principe**
- 3 Réactifs**
- 4 Appareillage**
- 5 Mode opératoire**
- 6 Hygiène et sécurité**
- 7 Références**
- 8 Annexe**

1. Objet - Domaine d'application

Dans le cadre de la détermination des activités enzymatiques dans les tissus intestinaux, l'expression de l'activité enzymatique peut s'effectuer par unité de poids de tissu intestinal (Gabriel et al, 2008 ; Williams et al, 2008) ou par rapport au poids de l'animal (Gabriel et al, 2003). Il peut aussi se rapporter à la teneur en protéines de l'échantillon ; c'est l'activité enzymatique spécifique. Cette teneur en protéines peut aussi être utilisée pour mesurer le niveau de développement cellulaire de l'intestin en effectuant le rapport avec la quantité d'ADN et d'ARN (Uni et al, 1995 ; Gabriel et al, 2003).

2. Principe

Dans un premier temps, les extraits de protéines des muqueuses sont effectués selon la méthode d'extraction indiqué dans le protocole « Prélèvement de tissus intestinaux d'oiseaux d'élevage et préparation d'extrait de ces tissus pour le dosage d'activités enzymatiques des muqueuses » (voir Annexe). Ces extraits sont ensuite dilués pour avoir une concentration compatible avec la gamme utilisée pour le dosage des protéines. Celui-ci est alors effectué par un dosage colorimétrique des protéines.

Le dosage décrit ici est celui effectué avec l'acide bicinchoninique. Il s'agit de la méthode du BCA, ou BC Assay (BiCinchoninic acid Assay). Dans une première étape, les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu(II) en Cu(I) en milieu alcalin. Ensuite l'acide bicinchoninique, qui est un réactif chromogène hautement spécifique pour le Cu(I), se chélate avec cet ion, ce qui forme un complexe pourpre ayant une absorption optique maximale à 562 nm (peut être lu entre 540 et 590nm). L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines. Cette méthode est une alternative à la méthode Lowry, elle-même une amélioration du réactif Folin-Ciocalteu. D'autres dosages des protéines sont utilisables, comme la méthode de Lowry et al. (1951) (Gabriel et al, 2003). Le dosage présenté ici est classiquement utilisé pour le dosage de protéines dans des milieux biologiques. Il présente l'avantage de pouvoir être effectué en présence de détergent (ici du dodécylsulfate de sodium ; en anglais, sodium dodecyl sulfate, SDS), et a aussi l'avantage de sa simplicité (une seule étape) et de sa rapidité de réalisation (30 min de réaction).

3. Réactifs

- Milieu de dilution des protéines

SDS (dodécylsulfate de sodium ; en anglais, sodium dodecyl sulfate) ou Solution de SDS à 1% ou PBS

- Protéine utilisée pour la gamme

Albumine bovine sérique (SAB: Serum Albumine Bovine) (Sigma Fraction V, A 4503)

- Réactifs pour le dosage des protéines selon la méthode avec l'acide bicinchoninique (BCA) contenant 10 flacons d'1 ml pour la réalisation de plusieurs gammes de SAB

Interchim : <http://www.interchim.fr/ft/4/40840A.pdf>

ou Pierce <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=02020101> (ref 23225)

4. Appareillage

- Balance de précision à 0.01 g pour les différents constituants du tampon
- Étuve 37°C pour réaction colorimétrique
- Lecteur de plaque 96 puits (ex : Tecan ®, modèle Infinite M200), pour une lecture de densité optique à 562 nm*
- * Si le lecteur à des filtres de longueur d'onde fixe, choisir le plus proche du maximum d'absorption (562 nm)

5. Mode opératoire

5.1. Dilution des extraits

Décongeler les extraits de muqueuses (dans le SDS ou le PBS) conservés à -70°C.
Maintenir tous les tubes à température ambiante.

Pour des extraits dans le SDS à 1 g / 2 ml

Dilution au **1/100*** dans des tubes de 3 ml avec de l'eau pour limiter les erreurs de prélèvement liées au pipetage de SDS.

Rq : De plus, bien que le dosage des protéines soit théoriquement fonctionnel avec du SDS 1% il ne semble pas fonctionner ;

Rq : Les protéines ne précipitent pas avec le changement de concentration en SDS

* Une dilution différente peut être nécessaire ; faire des essais

Dilution	Diluant (Eau déminéralisée)	Extrait dans du SDS 1%
1/50	1960 µl	40 µl
1/100	1980 µl	20 µl
1/200	1990 µl	10 µl

Effectuer 3 dilutions différentes pour chaque échantillon. Chaque dilution sera déposée une fois sur la plaque.

Ex : Pour des extraits d'iléon à 1 g / 5 ml dans du PBS

Dilution au 1/10 pour avoir une concentration de 1 mg/ml

5.2. Dosage colorimétrique des protéines

5.2.1. Gamme de SAB

Solution de SDS ou de PBS

La gamme doit être effectuée dans un milieu similaire à celui des échantillons (pour un milieu SDS, à une même dilution de SDS)

Ex : SDS 0.01 % :

1 ml de SDS 1% dans une fiole avec de l'eau et compléter à 100ml

Solution mère de SAB : 250 mg / 25 ml de SDS 0.1% ou de PBS

Rq : adapter le tampon pour la SAB en fonction du tampon d'extraction des protéines (SDS ou PBS)

Dilution au 1/5 : 5 ml de solution mère dans 25 ml de tampon (2 mg / ml)

Dilution pour la gamme

Conc finale (µg/ml)	Solution SAB à 2 mg/ml (µl)*	Tampon (µl)
0	-	500
400	100	400
800	200	300
1 200	300	200
1 600	400	100
2 000	500	-

* ou solution mère du kit du BCA (2 ml)

Rq : Pour une DO max de 2.0 et un dépôt de 25 µl

5.2.2. Préparation du réactif

Pour une plaque 96 puits :

Mélanger 20 ml de réactif A (incolore) avec 400 µl de réactif B (bleu)

5.2.3. Réaction colorimétrique

Plan de la plaque 96 puits :

Exemple en remplissant la plaque entière avec les 6 points de la gamme en double et 28 échantillons en triple

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gamme 1		Gamme 2		Gamme 3		Gamme 4		Gamme 5		Gamme 6	
B	Ech 1		Ech 2		Ech 3		Ech 4		Ech 5		Ech 6	
C	Ech 7		Ech 8		Ech 9		Ech 10		Ech 11		Ech 12	
D	Ech 13		Ech 14		Ech 15		Ech 16		Ech 17		Ech 18	
E	Ech 19		Ech 20		Ech 21		Ech 22		Ech 23		Ech 24	
F	Ech 25		Ech 26		Ech 27		Ech 28		Ech 29		Ech 30	
G	Ech 31		Ech 32		Ech 33		Ech 34		Ech 35		Ech 36	
H	Ech 37		Ech 38		Ech 39		Ech 40		Ech 41		Ech 42	

Remplissage de la plaque 96 puits

S'assurer que le lecteur de plaque est disponible avant de commencer de remplir la plaque
Mettre un papier noir sous la plaque pour faciliter le remplissage

- Mettre 25 µl* d'échantillon (Gamme en double / Echantillon en triple)

- Ajouter 200 µl du mélange A+B avec une pipette multicanal

Rq : remplir à température ambiante (rapidement ; 1 à 2 min / plaque)

* Volume recommandé par le fournisseur (il semble que l'on puisse aussi mettre 50µl)

- Couvrir la plaque (couvercle ou Parafilm®)

- Agiter 30 sec

- Incuber à 37°C, 30 min

- Enlever le couvercle ou Parafilm® sans contaminer les échantillons entre eux
- Lire la DO à 562 nm (entre 540 et 590 nm)

6. Hygiène et sécurité

6.1. Utilisation des réactifs

Tous les travaux doivent être effectués avec une blouse et des gants.

6.2. Elimination des produits

Les produits sont à éliminer dans des containers pour déchets chimiques.

7. Références

- Gabriel I, Mallet S, Leconte M. 2003. Differences in the digestive tract characteristics of broiler chickens fed on complete pelleted diet or whole wheat added to pelleted protein concentrate. *British Poultry Science* 44:283-290.
- Gabriel I., Mallet S., Leconte M., Travel A., Lalles J. P. (2008). Effects of whole wheat feeding on the development of the digestive tract of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 142 (1-2), 144-162.
- Uni, Z., Noy, Y., Sklan, D. (1995) Development of the small intestine in heavy and light strain chicks before and after hatching. *British Poultry Science*, 36: 630–71.
- Williams J, Mallet S, Leconte M, Lessire M, Gabriel I. 2008. The effects of fructo-oligosaccharides or whole wheat on the performance and the digestive tract of broiler chickens. *British Poultry Science* 49:329-339.

8. Annexe

Protocole de « Prélèvement de tissus intestinaux d'oiseaux d'élevage et préparation d'extrait de ces tissus pour le dosage d'activités enzymatiques des muqueuses »
Protocoles de dosage enzymatique des muqueuses (Phosphatase alcaline, leucine aminopeptidase, maltase)