









2019	Séquence – C
TP – 06	Doser un composé non-coloré 4

<p>Introduction</p> <p>Le dosage des protéines est très efficace pour déterminer le contenu total en protéine d'un échantillon, sans aucune distinction. La méthode est tellement efficace qu'elle peut également compatibiliser des molécules non-protéiques, comme l'urée. Ces petites erreurs sont tolérées, et intégrées dans les calculs et les normes finales.</p> <p>Si on veut doser une protéine en particulier, la méthode par le Gornall n'est pas la plus efficace. Il faut une autre approche, spécifique de la protéine qui nous intéresse.</p> <p>Utiliser les propriétés biochimiques d'une protéine peut être une piste de réflexion pour la cibler lors du dosage. C'est d'autant plus simple si la protéine présente une PROPRIÉTÉ UNIQUE... Protéine, propriété unique, dosage : ça a un air de déjà-vu ?</p> <p>Ben oui, les enzymes ! On va utiliser l'unicité réactionnelle de l'enzyme pour mettre en place un dosage qui ne prend en compte que l'enzyme.</p>	
<p>Problématique <i>Comment utiliser l'activité biologique d'une enzyme pour la doser ?</i></p>	
<p>Objectifs méthodologiques</p> <ul style="list-style-type: none"> • Méthode point-final ; • Spectrophotomètre ; • Etalon interne. 	<p>Connaissances</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dosage d'enzyme par colorimétrie.
<p>Points de vigilance</p> <ul style="list-style-type: none"> • Utilisation d'un étalon interne ; • Gestion des déchets. 	<p>Livrables – Evaluation</p> <ul style="list-style-type: none"> • Compte-rendu écrit complet et individuel.
<p>Organisation du travail</p> <ul style="list-style-type: none"> • TRAVAIL INDIVIDUEL ! 	
<p>Documentation</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Document 01 ➤ Document 02 	<p>Fiches techniques</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ CID ➤ Organigramme « déchets »

Consigne 1 – Principe du dosage

1. **Utiliser** le document 01 pour compléter la CID ;
2. **Expliquer** pourquoi il est difficile de compléter la case « molécule dosée ». **Proposer** un terme plus adapté ;
3. **Proposer** une présentation détaillée de la case « famille » ;
4. **Expliquer** pourquoi « enzymatique » n'est pas une proposition valide de « type de dosage » ;
5. **Indiquer** un contexte biotechnologique mettant en œuvre ce type de dosage ;

Consigne 2 – Sécurité

Nom du produit	Pictogramme	Mentions de danger	Conseils de prudence
<p>p-nitrophénylphosphate (pNPP)</p> 		H315, H318, H373	P305 + P351 + P338
<p>p-nitrophénol (pNP)</p> 		H301, H312 + H332, H373	P261 P301 + P310 + P330 P302 + P352 + P312 P304 + P340 + P312
<p>Hydroxyde de sodium</p> 		H314	P280 P305 + P351 + P338 P310

6. **Réaliser** l'analyse de risque correspondante à l'utilisation du pNPP ;
7. **Utiliser** l'organigramme des déchets pour déterminer le code du bidon de déchet ;

Consigne 3 – Recherche d'une activité PAL dans le lait

Tubes	T	C	E1	E2
p-nitrophénylphosphate tamponné (mL) <i>Maintenir au froid avant utilisation !</i>	3			
	5 minutes à 37°C			
Lait (mL)		0.1	0.1	0.1
	Mélanger et incuber exactement 30 minutes à 37°C			
NaOH à 1 mol/L (mL)	1,9			
Lait (mL)	0,1			
	Abs @405 nm contre T (👉📖)			

Le lait à utiliser pour le témoin (T) et le contrôle (C) est identique = tube noté C ;

Le lait à utiliser pour les échantillons : tube noté E. (Ef pour les fenêtres et Ep pour les placards).

8. **Expliquer** le maintien à 37°C, en utilisant le document 02 ;
9. **Expliquer** le rôle de NaOH ;
10. **Expliquer** pourquoi on attend 30 minutes ;
11. **Expliquer** pourquoi le lait est ajouté après la soude, dans le témoin T ;
12. **Mettre** en œuvre le tableau de gamme en respectant les consignes de sécurité ;

Note : tous les tubes doivent être traités simultanément, lors de la réalisation d'un tableau de gamme ! Vous devez donc vous présenter au spectrophotomètre avec un portoir comportant 4 cuves prêtes et fermées par du parafilm.

Consigne 4 – Compte-rendu

13. **Présenter** les résultats obtenus ;
14. **Indiquer** si le lait contient de l'APase. **Préciser** s'il s'agit d'un dosage qualitatif ou quantitatif ;
15. **Proposer** une méthode permettant de doser quantitativement l'enzyme dans le lait (aide : vous aurez besoin d'une courbe d'étalonnage du pNP) ;
16. **Faire** des recommandations vis-à-vis de la méthode de stérilisation.

