

FICHE PROTOCOLE N° 3

Dosage de la gélatine par la méthode de Biuret

Principe

En milieu basique, les ions cuivriques Cu^{2+} forment un complexe bleu violet avec les composés contenant au moins deux groupements voisins du type $-\text{CO}-\text{NH}-$ ou $-\text{CO}-\text{NH}_2$ (exemple : le biuret ayant donné son nom à la méthode $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$).

Les peptides ($n > 3$) et les protéines donnent donc un complexe violet stable présentant une absorbance maximale à 540 nm.

Le développement de la couleur et l'intensité de cette coloration dépendent de différents facteurs : alcalinité et concentration des ions Cu^{2+} , température, nature des protéines (composition en acides aminés basiques : Asn, Gln, et longueur : nombre de liaisons peptidiques). Cependant, l'influence de la structure primaire de la protéine reste assez faible et la formation du complexe est à peu près équivalente pour toutes les protéines.

Matériels et réactifs

- **Echantillon « B »**
- Fractions recueillies à la chromatographie
- Solution étalon de gélatine à 10 g/L
- Réactif de Gornall
- P1000 + P200 + cônes
- Finpipette
- Spectrophotomètre + cuves

Protocole opératoire

1. Gamme d'étalonnage

Préparer directement la gamme d'étalonnage dans une série de cuves spectrophotométriques, selon le protocole suivant :

Cuves	B	1	2	3	4	5
Sol étalon de gélatine à 10 g/L (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Eau distillée (mL)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Réactif de Gornall (mL)	2,5					

Homogénéiser. Attendre 20 minutes à l'obscurité et lire les absorbances à 540 nm contre le blanc.

2. Dosage des fractions de la chromatographie

Réaliser le dosage selon le même mode opératoire, à partir de 0,5 mL de chacune des fractions.

3. Dosage de l'échantillon « B » initial

Réaliser le dosage selon le même mode opératoire, à partir de 0,5 mL de l'échantillon « B ».