

CR000870



Centre d'Etude Régional pour
l'Amélioration de l'Adaptation à la
Sécheresse

RAPPORT DE MISSION
“APPUIMETHODOLOGIQUEPOUR LE
DEVELOPPEMENTD'ETUDES BIOCHIMIQUESAU
C.E.R.A.A.S.”

Monteiro Da Paula F.
Université Paris VII

C.E.R.A.A.S. 1993
18/06-16'07

EXTRACTION DES LIPIDES VEGETAUX

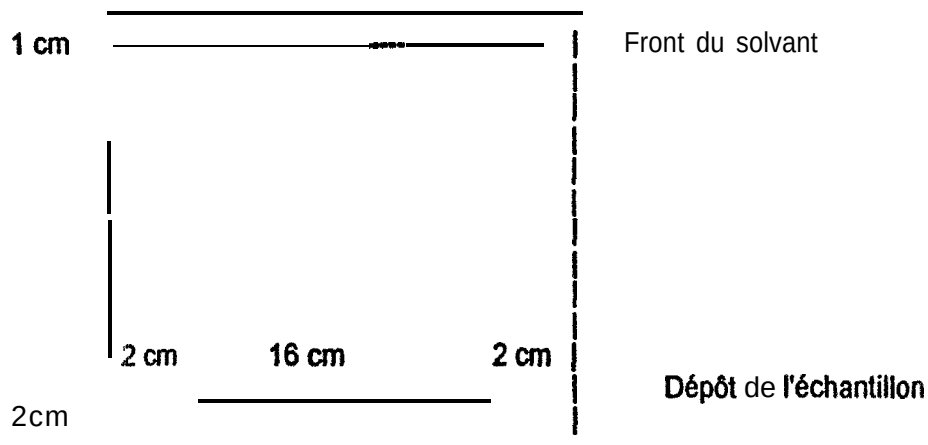
Méthode de Bligh & Dyer.

- Utiliser entre 2 et 4g de feuilles en évitant les grosses nervures. Déterminer le poids frais exact.
- Peser un **bécher** vide (de 100 à 150 ml), noter le poids
- Peser le **bécher** plus les feuilles et **compléter le poids à 20g** avec de l'eau distillée - le tout c'est **à dire les** feuilles plus l'eau distillée doit faire 20g.
- **Fixer** les feuilles dans l'eau bouillante pendant 2 mn.
- Laisser refroidir **à** température ambiante.
- Repeser le tout et **compléter le poids à 20 g** avec de l'eau distillée
- Prendre les feuilles sans eau (bien **égouttées**) et les broyer dans 20ml de méthanol - utiliser un petit volume (2 à 5 ml) et le restant pour bien **rincer** le mortier.
- Verser l'**homogénat** dans un tube **à** centrifuger
- Ajouter 20 ml de chloroforme
- Ajouter l'eau **utilisée** pour fixer les feuilles, et ajouter une **pinçée** de NaCl (0,88 % ou 88 mg)
- Bien agiter
- Centrifuger **à 600 t/mn (4 500g)** pendant 10 mn
- **Pipeter à** l'aide d'une pipette Pasteur la phase **inférieure** (qui contient les lipides totaux et les pigments)
- Refaire l'extraction avec 10 ml de chloroforme
- Centrifuger et **prélever** la phase **inférieure**
- Si la phase aqueuse résultante de la **2ème** extraction reste encore verte (vert foncé), on **procède à** une **3ème** extraction avec 10 ml de chloroforme
- Evaporer tout le solvant dans un bain-marie **à 60° C sous courant d'azote**.
- Reprendre dans un volume exact (1 à 2 ml) du mélange **éthanol/toluène (1/4)**, dans un petit flacon (**bouchons à vis et joints en téflon** ou **bouchons à deux jupes** résistant aux solvants). Mettre un peu **d'azote**-air dans les flacons juste avant de les boucher et les garder au congélateur **à - 80°C**. Cette procédure permet de conserver les lipides pour longtemps.
- Si on utilise l'extrait lipidique tout de suite **après** l'extraction, on peut reprendre les lipides dans un volume exact de chloroforme.

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE - CCM

- Utiliser plaques **silica gel 60 (merck)** 20 x20 cm
- Tracer une ligne avec un crayon, **sans gratter la plaque**, **à 2 cm** du bord inférieur.
- Pour effectuer les **dépôts**, laisser une marge de 2 cm de chaque **côté** de la ligne tracée, c'est **à dire** faire les **dépôts** sur une longueur de 16 cm maximum.

Schéma :



• Pour un seul échantillon on fait les dépôts sur toute la longueur de la ligne (16 cm). On **prélève**, dans un petit flacon, 400 μ l de l'extrait des lipides totaux. Si les lipides sont conservés dans le mélange **éthanol/toluène**, il faudra les sécher et reprendre dans 400 ml de chloroforme avant de faire les dépôts.

• Pour **déposer** 2 échantillons par plaque on laisse un espace de 2 cm entre eux, c'est **à** dire deux bandes de 7 cm chacune. Dans ce cas on dépose entre 200 et 300 μ l de chaque échantillon.

Les **dépôts** sont faits **à** l'aide d'une microseringue (de 10 ou 20 μ l) ou d'un tube capillaire (de 10 ou 20 μ l) sur une bande la plus fine possible. On attend que la **première** couche déposée sur toute la longueur de la ligne se **sèche**, avant d'en déposer une autre.

Au fur et **à** mesure qu'on **dépose**, on peut sécher avec un courant d'azote

• Après avoir **déposé** la totalité de l'extrait on rince **le** petit flacon avec 400 μ l de chloroforme (deux fois 200 μ l) et on les dépose de la **même** manière **déjà** décrite.

• Attendre que la bande **déposée** soit **complètement sèche** (15 mn environ) avant de mettre la plaque dans la cuve de migration.

CHROMATOGRAPHIE DE DIFFERENTES CLASSES LIPIDIQUES

• Mélange de solvant utilise : **Lepage** (1964)

Chloroforme	50 ml
Acétone	20 ml
Méthanol	10 ml
Acide acétique pur cristallisable	10 ml
Eau distillée	5 ml

• Mesurer les volumes **inférieurs à** 20 ml avec une pipette

• Le **mélange** est fait dans un **erlen** ou ballon, l'acide **acétique** et l'eau distillée sont versées sur les parois

• **Bien mélanger** et verser le solvant dans une cuve de migration. Le mélange doit avoir une seule phase et **être** limpide (non trouble) sinon on peut ajouter quelques gouttes de méthanol.

• Pour une bonne migration la cuve doit être saturée, pour cela on y met le mélange **~** 2 heures avant la migration

• La plaque est mise **à** migrer bien droite dans la cuve et la migration se fait **jusqu'à** 1 cm du haut de la plaque (entre 1 h 30 et 2 h de migration)

• Lorsque la migration est finie sortir la plaque et la laisser sécher sous hotte **à** température ambiante

• Après séchage on vaporise la plaque **à** la Primuline (10 mg dans 100 ml **d'acétone** 80 %)

• Observer sous UV, et démarquer tes bandes avec un crayon.

ANALYSE DES LIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE - C.P.G.

1. ACIDE GRAS TOTAUX

e Saponification :

• Prendre entre 100 et 200 μ l de l'extrait de lipides totaux dans un tube de 20 ml, bouchon **à** vis muni d'un joint en **téflon**

• Evaporer sous courant d'azote

• Reprendre dans 4 ml de **soude** méthanolique **0,5 N** (peser 1g de **NaOH** et le dissoudre dans un peu d'eau distillée et **compléter** le volume **à** 50 ml avec du méthanol)

• Fermer le tube et bien agiter

• Mettre au bain-marie **à** 65° C pendant 15 mn

• Refroidir sous robinet.

• Méthylation

• Ajouter un **témoin** interne -C17 : 0 (acide **heptadécanoïque**) - 100 μ g (=100 μ l)

• Ajouter 2 ml de **trifluorure** de bore dans méthanol (**BF3**)

• Chauffer au bain-marie **à** 65° C pendant 15 mn

- Refroidir sous robinet
- Ajouter 10 **ml** de pentane (ou hexane ou heptane) et 2 ml d'eau **distillée**. Fermer et bien agiter,
- Après la **décantation** (les phases bien séparées) **prélever** la phase supérieure, qui contient les esters méthyliques, avec une pipette pasteur.
- Evaporer le solvant et reprendre dans 100 à 200 **µl** d'un solvant compatible pour le CPG (hexane ou heptane) si on injecte **tout** de suite, sinon on reprend dans **éthanol/toluène** (114).

2. CLASSES LIPIDIQUES

- Gratter les bandes de lipides, après révélation à la primuline et identification sous UV et les recueillir dans des tubes de 20 ml (bouchons à vis et joints en téflon)
- Ensuite, pour la saponification et méthylation, procéder de façon identique comme pour les acides gras totaux.

DOSAGE DES CHLOROPHYLLES

- Prendre entre **0,25** et **0,5 g (PF)** de feuilles (déterminer le poids sec en utilisant un autre morceau de la même feuille)
- Mettre dans un mortier **préalablement** refroidi et procéder au broyage à l'aide de sable **stérile** et une **pincée** de Mg CO₃ ou Ca CO₃ (pour neutraliser l'acidité)
- Broyer pendant 3 minutes avec de l'acétone 80 %
- Filtrer l'**homogénat** sous vide dans un tube entouré de papier aluminium ou d'adhésif noir
- Bien rincer le mortier et le dépôt qui reste sous le filtre
- Verser l'extrait **filtré** dans une éprouvette (afin de mesurer le volume obtenu) et le retourner dans le tube d'origine le plus vite possible
- Garder au frais jusqu'au moment de déterminer les D.Q. (15 min maxi) à 645 et 663 nm.

Précautions à prendre

- Verrerie **très propre**
- 12 h avant la manipulation, mettre au frais tout le **matériel** (mortier, tube à essai, éprouvettes, fioles à vide) et l'acétone 80 %
- Eliminer toutes lumières directes et entourer les tubes à essai avec du papier aluminium ou d'adhésif noir
- Travailler le plus rapidement possible.

Calcul pour les **chlorophylles** : (Coefficients de Mackinnon & Arnon)

$$\text{Chl a (mg/l)} = 12,7 \times D.O_{663} - 2,69 \times D.O_{645}$$

$$\text{Chl b (mg/l)} = 22,9 \times D.O_{645} - 4,68 \times D.O_{663}$$

$$\text{Chl a + b (mg/l)} = 8,02 \times D.O_{663} + 20,20 \times D.O_{645}$$

- Remplacer les valeurs obtenues pour les deux D.O. et le **résultat** est donné en **Xmg/l**
- **Calcul** de la concentration de chlorophylle par rapport au volume de l'extrait :

$$\text{Chl a} = \frac{X_{\text{ma}} \times \text{Vol. total de l'extrait (ml)}}{1000} = Y_{\text{mg}}$$

Pour calculer la concentration des chlorophylles par rapport au PF ou PS on divise le Ymg par l'unité choisie (PF ou PS) :

$$\text{Chlorophylle a} = Z \text{ mg/g PF ou PS}$$

- Calcul identique pour la chlorophylle b et pour les chlorophylles a + b.

SPECTROPHOTOMETRE BECKMAN DU 68

installation du Moniteur vidéo (graphic display)

- Mettre une extrémité du **cable** de connexion sur la prise **à gauche, derrière** le moniteur
- Brancher **l'autre extrémité** du **cable** de connexion sur la prise **CRT/RS232 à gauche** du **spectro**

Installation de l'imprimante

- Brancher le **cable** de connexion de l'imprimante sur la prise **PRINTER** du **spectro**
- Utiliser du papier listing.

Installation du ruban

- Retirer le couvercle
- Placer la tête **d'impression** au centre du rail. Ne pas toucher la tête d'impression si elle est chaude.
- Installer la cassette ruban
- Utiliser un stylo pour bien placer le ruban entre la tête d'impression et le guide du ruban. Ensuite tourner le petit bouton, localisé **à gauche** sur la cassette, dans la direction **indiquée**.

Installation du papier

- **Vérifier** si la **lumière verte "Power"** n'est pas allumée, sinon appuyer sur le bouton **à gauche** de **l'imprimante**, pour le mettre en "off".
- Retirer le couvercle
- Mettre la **tête** d'impression au centre du rail
- Installer le papier en le faisant passer par dessous le **séparateur** du papier et ensuite le faire avancer jusqu'à ce qu'il arrive sur les deux roues dentées. Fixer le papier **à l'aide** de deux pinces
- Appuyer sur "on line".

PRINCIPES D'OPERATION

Clavier

Il comprend deux sortes de touches: les touches de fonction primaires et les touches de fonction secondaires

Touches de fonctions primaires : Ce sont les touches de fonctions directes, les symboles, chiffres ou lettres sont **placés** au centre de chaque touche du clavier en gros caractères noirs.

Touches de fonctions secondaires : Ces touches sont localisées au dessous des touches primaires, en petites lettres ou symboles en bleu. Pour utiliser une touche de fonction secondaire il faut appuyer sur **Func** et ensuite sur la touche de fonction secondaire choisie. En appuyant sur **Func + ClrSc** on nettoie l'écran et **Func + PrtSc** on imprime l'écran.

Le Clavier Alpha est représenté par des petits **caractères** en jaune-or en haut et **à droite** des gros **caractères** sur les touches de **fonctions** primaires. Ces touches sont activées en appuyant **sur Alpha + la lettre ou symbole** choisi. Si on appuie deux fois sur Alpha on active les touches du clavier **numérique**.

Si le **spectro** n'est pas utilisé pendant quelques minutes, **l'écran s'éteint**. Pour le rallumer on appuie sur **Fonc**.

Compartiment 8 cuves

- le rail installé **à l'intérieur** du compartiment **à cuves** ne **doit pas être enlevé**
- Utiliser toujours des cuves standards rectangulaires de 10 mm
- Pour les lectures en **UV**, utiliser toujours des cuves en quartz
- Pour les lectures en **VIS**, utiliser des cuves en verre (Pyrex) ou en plastique, qui présentent une meilleure **réponse** que **les** cuves en quartz.

Allumage : Allumer **premièrement** le **spectro** (brancher la prise), puis le moniteur **vidéo**, puis **l'imprimante**

Lorsqu'on fait les trois branchements, le "system test" est automatiquement mis en route, si cela ne se produit pas, enlever la prise du **spectro**, attendre quelques secondes et la **rebrancher**. A la fin de chaque étape testée, "**Pass**" ou **Fail**" s'affiche sur l'écran. Lorsque toutes les étapes sont **testées** "Test completed" s'affiche et l'appareil est prêt à travailler, Si "**Fail**" s'affiche à la fin d'une étape, débrancher la prise du **spectro**, **arrêter** le Moniteur vidéo et attendre quelques secondes avant de démarrer un nouveau "**system test**".

OPERATION

1. Lecture à une seule longueur d'onde

- Choisir la source : **UV** ou **VIS**
- **Sélectionner** le mode de lecture : **ABS** ou **%T**
- **Sélectionner** la longueur d'onde : **λ** + la valeur choisie
- Mettre une cuve avec le blanc et appuyer sur **CALB** pour la calibration, "**calb**" ou "**calib**" s'affiche au cours de la calibration
- Retirer la cuve avec le blanc et la remplacer par l'échantillon. La valeur de **D.O.** (Densité Optique) s'affiche en bas et à droite de l'écran
- Appuyer sur **READ** pour "**fixer**" la valeur obtenue, qui s'affiche comme "**x - valeur enregistrée**", à gauche de l'écran
- Pour imprimer les valeurs, appuyer sur **Func + Prt** → au niveau de la touche 6, à la fin de chaque lecture.

2. Lecture à plusieurs longueurs d'onde

- Choisir la source : **UV** ou **VIS**
- Sélectionner le mode de lecture : **ABS** ou **%T**
- Mettre une cuve avec le blanc
- Sélectionner la **1ère** longueur d'onde en appuyant sur **λ** + la valeur de **D.O.** ensuite appuyer sur **CALB** pour la **calibration**
- Répéter la dernière étape pour chaque longueur d'onde
- Retirer le blanc et mettre à sa place la cuve avec l'échantillon
- ~ Introduire la valeur correspondante à la **1ère** longueur d'onde : **λ** + la valeur de **D.O.**, la lecture s'affiche tout de suite
- @ Appuyer sur **READ** pour le **fixer** et ensuite sur **Func + Prt** pour l'imprimer
- * Répéter les deux avant **dernières** étapes pour chaque longueur d'onde **et/ou** pour un autre échantillon.

3. Scanning

Si on veut une grille sur l'écran. procéder de la façon suivante :

1 → CALL → Alpha + G → Alpha + R → Alpha + I → Alpha + D → ENTER

Pour enlever la grille on fait "**reset**" (**arrêter** le moniteur)

* Sélectionner la source **VIS**, **UV** **et/ou** **VIS/UV**. Si on veut travailler avec les deux sources il faut appuyer sur **VIS** **et/ou** **UV** jusqu'à l'affichage sur l'écran de "**V/u**" ou "**u/V**". La source **UV** prend **2,30** min pour se charger, s'affichant sur l'écran comme un grand **U**. → **V/u** ou **u/V** devient donc **V/U** ou **U/V**.

- Sélectionner **ABS** ou **%T**
- Choisir le mode **SCAN** - "Ediing" s'affiche et les 5 **paramètres** suivants peuvent être introduits :
 - **Starting nm** : le choix doit rester entre 210 et 900 nm. Entrer la valeur + **Entr**
 - **Ending nm** : entrer la valeur + **Entr**
 - **"Speed"** - appuyer sur **"Step"** pour afficher sur l'écran les options suivantes : "**750 nm/min**", "**500 nm/min**", "**graph display**" ou "**graph plot**". Après le bon choix faire **"Entr"**
 - **"upper limit"** - entrer la valeur + **Entr**
 - **"Lower limit"** - entrer la valeur + **Entr**

Pour vérifier les **paramètres** introduits, appuyer sur **Entr** après l'affichage de chacun d'eux. Pour les modifier, entrer la nouvelle valeur suivie de **Entr**.

- Calibration

Mettre une cuve avec le blanc et appuyer sur **CALIB** "calib" ou "**calb**" s'affiche sur l'écran au cours de la **calibration**. Suite à l'affichage de "**Bkg**" on appuie sur READ, au bout de quelques secondes on voit sur l'écran :

- soit "**InsBkg**" et on appuie sur **READ**, "**RunBkg**" apparaît sur l'écran et ensuite "**InsSamp**" ;
- soit directement "**InsSamp**", dès que ce message s'affiche on remplace le blanc par l'échantillon suivi de READ
- "Editing" s'affiche lorsque le scanning est fini
- Pour imprimer le spectre on fait **funct + PrtSc**
- Pour un nouvel échantillon, si on maintient les mêmes conditions, on fait READ
- Pour modifier les axes en conservant les mêmes données, appuyer sur **Entr + Entr** et "speed" s'affiche sur l'écran. Utiliser la touche STEP pour atteindre les **paramètres à modifier**, puis Entr **après** chaque modification introduite. Pour effectuer le nouveau scanning faire READ.
- Pour quitter le mode scanning, appuyer sur SCAN.

PROGRAMMATION POUR LE "MODE SCANNING"

- Appuyer sur la touche PROG
- Utiliser la touche **STEP*** ou **BSTP*** pour sélectionner le programme (**PROG** : 0, **PROG** : 1, **PROG** : 2, **PROG** : 3)
- * **STEP** pour avancer
- * **BSTP** pour reculer
- Pour créer un programme, appuyer sur **fonc + f** (au dessous de la touche **ENTR**) : "**000** : **strl**" s'affiche sur l'écran.

<u>Touches à utiliser</u>	<u>Affichage</u>	<u>Fonction</u>
	000 : Srtr	Initier le programme
ALPHA + A + B + S	001: ABS	
8 + 0 + 0	800.00	Première longueur d'onde
ENTR	003 : ENTR	
4 + 0 + 0	400.00	Dernière longueur d'onde
ENTR	005 : ENTR	
1	006 : 1.0000	Sélection de la vitesse de balayage : 1 = 750 nm/min 2 = 500 nm/min
CALL + s + s + P	007 : CALL SSP	Permet l' introduction des limites de l' échelle
3	008 : 3.0000	Limite supérieure
ENTR	009 : ENTR	
0	010 : 0.0000	Limite inférieure
CALL + S + S + L	011: CALLSSL	
CALL + S + C + L + B	012 : CALL SCLB	Calibration
CALL + S + B + K + G	013 : CALL SBKG	Çalibration
Func + lbl + S + U + B	014 : lbl SUB	
CALL + C + C + R + T	015 : CALL CCRT	Nettoie l'écran et met les axes
Alpha + Func + l + N + S	016 : MSG clNS	
Alpha + E + R + T	017: MSG ERT	

Pour introduire le pas suivant, il faut revenir sur le pas **précédent** (le 016) avec la touche **BSTP** et ensuite avancer avec la touche **SPEP** vers le pas **017**.

Alpha + S + A + M + P	018 : MSG SAMP	Prépare le spectro pour la lecture de l'échantillon
Alpha + L + E	019 : MSG LE	Active la lecture
R / S	020: RIS	Pour démarrer le scanning
CALL + S + C + A + N	021 : CALL SCAN	Scanning et affichage sur l'écran

8 + 0 + 0	022 : 800.00	Remet les
ENTR	023 : ENTR	conditions
4 + 0 + 0	024 : 400.00	initiales du
ENTR	025 : ENTR	scanning
4	026 : 4.0000	Imprimer le scanning affiché sur l'écran
CALL+S+S+P	027 : CALL SSP	
CALL + S + C + A + N	028 : CALL SCAN	
GOTO S + U + B	029 : GOTO SUB	
Func + rtn	030 : rtn	

- Pour sauvegarder le programme, appuyer sur PROG, "store PROG at **X**" s'affiche sur l'écran (le x peut être 0, 1, 2 ou 3). Ensuite refaire PROG pour la sauvegarde.
- Pour modifier un pas **déjà** introduit, il faut se mettre sur le pas précédent et introduire la modification nécessaire.
- Pour effacer un pas de programme, se mettre sur le pas **à** effacer et faire **Func + del**.
- Pour effacer un programme complet appuyer sur **Func + clr**
- Pour appeler un programme sauvegardé appuyer sur PROG + STEP ou BSTP pour atteindre le programme choisi (1, 2 ou 3). Ensuite appuyer sur **Func + f** et faire défiler les différents pas **à** l'aide des touches STEP et BSTP.
- Pour démarrer un scanning, procéder de la **façon** suivante :
 - * appuyer sur PROG et choisir le programme **à** utiliser (avec les touches STEP ou BSTP)
 - * mettre le blanc dans le compartiment **à** cuves
 - * appuyer sur **R/S** pour démarrer la **calibration**
 - * **à** la fin de la calibration "INSER SAMP" s'affiche sur l'écran
 - * remplacer le blanc par l'échantillon et appuyer sur **R/S**
- Pour faire le scanning d'un autre **échantillon**, appuyer sur PROG et répéter toutes les **étapes** décrites ci-dessus.

DOSAGE DES SUCRES

Methods in Enzymology Vol. 3, p. 84

EXTRACTION

Extraction dans un tampon approprié ou broyage direct dans l'alcool éthylique (l'extrait final doit être à 80 % d'alcool. Pour broyer avec de l'alcool à 06 %, il faut prendre un volume d'alcool égal à 5 fois la quantité d'eau contenue dans le matériel végétal).

Mettre l'homogénat dans un tube de centrifugation en verre, agiter dans un bain marie à 70°C pendant 30 min., laisser refroidir, centrifuger : le surnageant contient les sucres solubles, le culot contient l'amidon.

SUCRES SOLUBLES

Dans un tube à essai mettre 5 ml de solution d'anthrone (2 g d'anthrone dans 1 litre d'H₂SO₄ pur. La solution se conserve une semaine dans un flacon brun). Ajouter 2,5 ml d'extrait. L'opération se fait dans un bain de glace fondante. Agiter les tubes, puis faire chauffer 10 min. dans un bain marie bouillant. Refroidir brusquement en plongeant dans la glace. Lire la DO à 640 nm.

La gamme étalon est faite avec du glucose dissous dans de l'eau:

Dissoudre 0,1 g de glucose anhydre dans 100 ml d'ed. (ajouter 0,1 % de benzoate comme conservateur) → Solution stock. Avant utilisation, diluer 10 ml de cette solution stock dans 0,1 litre. 5 ml de cette solution diluée contient 50 µg de glucose.

AMIDON

Le culot précédent est lavé avec de l'alcool à 86 % chaud. Agiter - laisser 5 min - centrifuger. Le surnageant est rejeté. L'opération se répète jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de réaction à l'anthrone avec le surnageant.

On ajoute alors au culot 1,5 ml d'acide perchlorique HClO₄ à 35 %. Agiter dans un bain d'eau glacée pendant 15 min. Centrifuger + Surnageant S₁. Le culot est rehydrolysé pendant 30 min avec HClO₄. Centrifugation + Surnageant S₂. Rassembler S₁ et S₂. Compléter à 5 ml avec de l'ed. Doser à l'anthrone les sucres solubilisés.

La gamme étalon est faite ici avec du glucose en solution dans l'acide perchlorique à 21 % (entre 0,50 et 100 µg de glucose). La gamme étalon doit être faite à chaque expérience. Pour avoir la quantité d'amidon x 0.90.

SUCRES REDUCTEURS

2 ml d'extrait + 2 ml de solution d'acide dinitro salicylique (1 g d'acide sodium et potassium. Compléter à 100 ml avec de l'ed.). Chauffer 5 min au bain marie bouillant. Mesurer la DO à 505 et 540nm.

La gamme étalon est faite avec du saccharose.

Gamme étalon pour les sucres solubles

- Peser **0,1 g** de glucose **anhydre** et dissoudre dans 100 ml d'eau distillée
- Diluer 10 ml de **cette** solution stock dans 100 ml d'eau **distillée**
- **2,5 ml** de la solution **diluée** contient 25 μg de glucose.

μg de glucose	ml d'eau distillée	ml de solution de glucose	+ 5 ml de solution d'anthrone = Volume total de 7,5 ml
0	2,5	0	
2	2,3	0,2	
4	2,1	0,4	
6	1,9	0,6	
8	1,7	0,8	
10	1,5	1,0	
12	1,3	1,2	
14	1,1	1,4	
16	0,9	1,6	
18	0,7	1,8	
20	0,5	2,0	
22	0,3	2,2	
24	0,1	2,4	
25	0	2,5	

Gamme étalon pour l'amidon

- Peser **0,1 g** de glucose et diluer dans 100 ml d'acide perchlorique **à 21 %** (solution stock)
- Diluer **10 ml** de la solution stock dans 100 ml d'acide **perchlorique à 21 %**
- **2,5 ml** de la solution **diluée** contient 25 μg de glucose. Pour avoir la quantité d'amidon, x **0,90**.

μg de glucose	ml de HClO₄	ml de solution de glucose	+ 5 ml de solution d'anthrone = Volume total de 7,5 ml
0	2,5	0	
2	2,3	0,2	
4	2,1	0,4	
6	1,9	0,6	
8	1,7	0,8	
10	1,5	1,0	
12	1,3	1,2	
14	1,1	1,4	
16	0,9	1,6	
18	0,7	1,8	
20	0,5	2,0	
22	0,3	2,2	
24	0,1	2,4	
25	0	2,5	

MATERIEL ET PRODUITS NECESSAIRES POUR LES DIFFERENTS DOSAGES BIOCHIMIQUES

I • DOSAGE DES LIPIDES VEGETAUX

Extraction

- Chloroforme Prolabo (Normapur)
- Méthanol Prolabo (Normapur)
- Ethanol Prolabo (Normapur)
- Toluène Protabo (Normapur)
- NaCl
- Mortier
- Azote • air
- Petits tubes (de +/- 4.0 ml), bouchons à vis et joints en téflon
- Plaque chauffante

Dosage des acides gras totaux et chromatographie sur couche mince - CCM

- Acide heptodécanoïque (CI 7:0) Sigma
- Trifluorure de bore dans Méthanol- (BF3) Merck
- Pentane Prolabo (Normapur)
- Hexane Prolabo (Normapur)
- Chloroforme Prolabo (Normapur)
- Méthanol Prolabo (Normapur)
- Acétone Prolabo (Normapur)
- Acide acétique pur cristallisable Prolabo
- NaOH
- Primuline
- Lampe UV
- Tubes (de 20 ml), bouchons à vis et joints en téflon
- Cuves de migration en verre
- Plaques Silica gel 60 20 x 20 cm Merck
- Vaporisateur
- Spatules pour grattage
- Azote-air, Hélium, Hydrogène et air comprimé
- Bain-marie (60° C)
- Pipettes Pasteur
- Gas Chromatographe (Varian 3300) avec intégrateur

Analyse des lipides par chromatographie liquide à haute pression-HPLC

- Chloroforme qualité HPLC Merck (Lichrosolve)
- Méthanol HPLC Carlo Herba
- Hexane HPLC BDH
- Isopropanol HPLC Cado Herba
- Acétonitrile HPLC Carlo Herba
- Chlorure de Choline Sigma
- Eau qualité HPLC Merck
- Tubes à vis (de 20 ml) joints en téflon
- Seringue en verre de 2 à 5 ml avec un système métallique de filtration
- Filtre millipore FH 5 µ
- Système HPLC :
 - * deux pompes
 - contrôleur de gradient
 - * détecteur UV
 - moniteur
 - * imprimante

II • DOSAGE DE LA CHLOROPHYLLE

- Acétone Prolabo (Normapur)
- MgCO₃ ou CaCO₃

- Sable pour broyage
- Entonnoir de buchner
- Filtre à plaque poreuse
- Fiole à vide
- Tubes à essai ou tubes à vis
- Pompe à vide
- Spectrophotomètre (645 et 663 nm)
- M o r t i e r

III - DOSAGE DES PROTEINES

Extraction

- TRIS
- HCl pur
- NaOH

Sigma
Prolabo **p.a.**

Dosage par la méthode de Bradford

- Loomassie Brilliant blue G250
- Ethanol 95 %
- Acide phosphorique (85")
- SAB (sérum albumin Bovin)

Sigma
Prolabo (Normapur)
Prolabo **p.a.**
sigma

Dosage par la méthode de LOWRY

- Na₂ CO₃
- CuSO₄ · 5H₂O
- Citrate ou tartrate
- Réactif de Folin
- Mortier
- Azote liquide
- pH mètre
- Glace pilée
- Centrifugeuse
- Spectrophotomètre (entre 500 et 750 nm)

Merck

IV - DOSAGE DES SUCRES

Extraction

- Alcool éthylique

Dosage des sucres solubles

- Anthrone
- H₂SO₄
- Glucose anhydre

Dosage d'amidon

- Alcool éthylique
- Acide perchlorique

Dosage des sucres réducteurs

- Acide 3 · 5 dinitro safycitique
- NaOH
- Tartrate double de sodium et potassium
- Saccharose
- bain-marie
- Chauffe ballon
- Centrifugeuse
- Mortier
- Spectrophotomètre (500 à 700 nm).

LISTE DES PRODUITS CHIMIQUES POUR LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

• Alcool éthylique 95 %	Prolabo Normapur
• Chloroforme	Prolabo Normapur
• Alcool éthylique pur	Prolabo
• Méthanol	Prolabo Normapur
• Hexane	Prolabo Normapur
• Pentane	Prolabo Normapur
• Acétone	Prolabo Normapur
• Toluène	Prolabo Normapur
• Chloroforme HPLC (ultra pur)	Merck
• Méthanol hplc	Carlo Erba
• Hexane HPLC	BDH
• Acétonitrile HPLC	Carlo Erba
• Isopropanol HPLC	Carlo Erba
• Eau HPLC	Merck
• Acide acétique	Prolabo p. a. - Acide
• Acide chlorhydrique pur cristalisable	Prolabo p.a.
• Acide sulfurique	Prolabo p.a.
• Acide chlorhydrique technique	Prolabo
• Acide perchlorique	Prolabo p.a.
• Acide phosphorique	Prolabo p.a.
• Acide 3-5 dinitro salycilique	
• Acide trichloracétique	
• Chlorure de chloline	
• Glucose anhydre	
• Saccharose	
• Tartrate double de sodium et potassium	
• MgCO₃	
• CaCO ₃	
• NaOH	
• Primuline	
• Trifluorure de bore dans méthanol (BF₃)	Merck
• TRIS	Sigma
• SAB (Serum Albumin Bovin)	Sigma
• Acide heptadécanoïque • Cl 7:0	Sigma
• Loomassie Brillant Blue G250	Sigma
• Réactif de Folin	Merck
• Citrate	
• Sable stérile	
• Plaques silica gel 60 • 20 x 20 cm	Merck
• Azote • air	
• Azote • liquide	
• Hélium	
• Hydrogène	
• Air comprime	

LISTE DES APPAREILS POUR LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

- Centrifugeuse **à** haute vitesse
- Gaz chromatographe de colonne capillaire
- HPLC
- Compteur **à** scintillation liquide
- **Système** de chromatographie pour protéines - FPLC
- Système pour **électrophorèse**
- pH **mètre**
- Balance de précision
- Balance (étendue de pesée $\cong$ 1 kg)
- Agitateur de tubes type vortex
- Agitateur magnétique non-chauffant
- Agitateur magnétique chauffant
- Plaque chauffante
- Bain-marie
- Système d'évaporation de solvants sous flux gazeux
- **Distillateur**
- Bidistillateur
- Pompe **à** vide
- Réfrigérateur pour stockage de matières inflammables
- Machines **à** glace en paillettes
- **Minuteur** avec alarme sonore

LISTE DE VERRERIE ET PETIT MATERIEL POUR LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

- **Bechers** Pyrex - Forme basse : **25, 50, 100, 250, 500, 1 000** et 2 000 ml
- Fioles jaugées-bouchées : **10, 20, 50, 100, 200, 500** et **1 000** ml
- Epruvettes **à** pied hexagonal **à** bec : **10, 25, 50, 100, 250** et 500 ml
- **Erlenmeyers** Pyrex col étroit : **50, 100, 250, 500, 1000** et 2 000 ml
- Fioles **à** vide : 250, 500 et 1 000 ml
- Entonnoirs Pyrex - tige courte : **45, 55, 80** et 100 mm $\emptyset$
- Tubes (dse **10** et 20 ml) bouchons **à** vis et joints en téflon
- *Tubes de $\cong$ **4,0** ml, bouchons **à** vis et joints en téflon ou bouchon **à** jupes résistant aux solvants
- Tubes **à** centrifuger (pour la centrifugeuse **BioBlock** de paillasse), bouchons **à** vis et joints en **téflon** ($\cong$ 250ml)
- **Pipettes** en verre : **8, 16** et 32 ml - capuchons en **polyéthylène**
- Tubes capillaires gradués : **5, 10** et 20 μ l
- Micropipettes **Gibson** : **20, 100, 200, 1 000** et 5 000 ml
- **Thermomètres** de -10 **à** 110°C
- pissettes en **polyéthylène** 250 et 500 ml
- Auxiliaires de macropipette (Poires) :
 - système de succion avec filtre de protection
 - poires conventionnelles
 - capuchons pour pipettes (Mines)
- Statif en H standard :
 - * noix usuelle
 - * noix asymétrique
 - * anneaux
- Pince bouchons
- **Portoirs**
- Panier de lavage : carrés et ronds
- Boîtes de rangements pour **congélateur** et **réfrigérateur**

- Etiquettes ordinaires
- Etiquettes avec pellicule de protection
- Etiquettes **adhésives** ultrarésistantes
- **Parafilm**
- Marqueurs **indélébiles** noirs et en couleurs
- Papier **filtre**
- Papier kleenex (**ultra** doux pour nettoyage des cuves **spectro**)
- Seringues en verre : **2,5** et 10 ml
- Microseringues : **10,50** et 100 μ l
- Bonbonnes avec poignées et robinet : 10 et **20 l**
- **Portoirs** pour micropipettes Gibson
- Spatules
- Pincers **à** pointes arrondies et pointes plates
- Cuillères acier inox.

TABLEAU DES APPAREILS ET ACCESSOIRES POUR LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

Total Général (FF)		107 705,56				
Matériel	Fournisseur	Référence	Volume ou Ø	Quantité	Prix (FF)	Total FF
pHmètre 0 à 14 pH base de support pour l'électrode électrode combiné pH 7.0 étalon pH 4,7 et 10 câble DIN/S7 électrode combine Redex S7 soude température plus câble	Bioblock	K 24310 K 50301 K 90401 K 93150 K 90419 K 90417 K 24305	1 m 1,5 m		3 676,20 385,00 653,40 386,10 236,50 975,70	6 312,9-
pHmètre électrode de rechange	Polylabo	8417			2 940,00 450,00	3 390
Balance de précision						
Balance (étendue de pesée 1200 g)	Bioblock	K 170431			6 043,40	6 043,40
Agitateur magnétique non chauffant Heidolph	Bioblock	K 35011			875,60	875,6
Agitateur de tubes type Vortex Heidolph Top Mix	Bioblock	K 94323			1230,30	1230,3
Agitateur magnétique chauffant Nuova	Bioblock	K 92619			2 382,60	2 382,60
Kit barreaux magnétiques TFE	Bioblock	K 13354			503,80	503,80
Système d'évaporation de solvants sous flux gazeux à sec - version ana- logique temps maxi 120°C capacité de 32 tubes puissance de 500 W	Bioblock	K 85952			19 847,30	19 847,30
Bain-marie Polystat 33 thermoplonger numérique Serpentin refroidisseur Support pour thermomètre Thermomètre à mercure Cuve 9 litres Portoirs en plexi (hauteur d'immersion 9,5 cm) (hauteur d'immersion 6 cm)	Bioblock	K 86633 K 86612 K 86640 K 86604 K 86611 K 86662 K 86661 K 86654	0 à 105°C ; 110°C ; Ø 16 mm Ø 16 mm Ø 22 mm	20 tubes ; 20 tubes ; 12 tubes ;	4 952,20 360,80 38,50 229,90 814,00 438,90 271,70 374,00	7 480
Bidistillateur	Bioblock	K 45906	2l/heure		27 332,80	27 332,80
Pompe à vide	Polylabo	99201	100 mbar		2 717,00	2 717,00
Trompe à vide (pour robinets) avec système de sécurité anti-reflux pompe jeu de joints	Polylabo	97102 97106			897,76 140,45	1038,21
Minuteur avec alarme 0 à 50 sec. (poche porte clefs)	Potylabo	00157			91,65	91,65
Minuteur de pailleasse avec alarme (60 minutes)	Polylabo	63113			437,50	437,50
Machine à glace en paillettes - refroi- dissement par air. Machine Filtre antitartre	Bioblock	K 61872 K 61739	90 kg/24 h		20 420,40 1 334,30	21 754,7
Réfrigérateur pour le stockage de matières inflammables - 5 clayettes	Bioblock	K61847	29 12 °C 500 l.		6 267,80	6 267,80-
Plaque chauffante						

TABLEAU DE VERRERIE ET PETIT MATERIEL POUR LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

Total Général (FF)	67081,4					
Matériel	Fournisseur	Référence	Volume ou Ø	Quantité	Prix unit. (FF)	Total
Bechers Pyrex - Forme basse	Polylabo	11361/112-28	ml 25	/10	164,38	2044,41
		11362/112-33	50	10	164,38	
		11363/112-40	100	10	158,93	
		11365/112-47	250	10	172,48	
		11367/112-55	600	10	256,61	
		11369/112-60	1000	10	409,90	
		11370/112-65	2000	10	717,73	
Fioles jaugées bouchées (Pyrex)	Polylabo	11417/322-10	10	/10	267,85	2577,96
		11419/322-33	50	10	321,20	
		11420/322-40	100	10	341,77	
		11422/322-47	250	10	537,57	
		11423/322-54	500	10	659,67	
		11424/322-60	1000	5	449,90	
Fioles à vide Pyrex	Polylabo	11311/347-47	250	/10	668,91	2079,44
		11312/347-54	500	10	849,97	
		11313/347-60	1000	5	560,56	
Eprouvettes à pied hexagonal à bec	Polylabo	11403/034-20	ml 10	110	117,15	2530
		11404/034-28	25	10	251,13	
		11405/034-33	50	10	275,22	
		11406/034-40	100	10	304,92	
		11407/103-47	250	10	580,03	
		11408/034-54	500	10	1001,55	
Erlenmeyers Pyrex - Col étroit	Polylabo	11295/313-33	50	/10	178,64	1878,8
		11296/313-40	100	10	165,39	
		11298/313-47	250	10	175,12	
		11299/313-54	500	10	228,29	
		11300/313-60	1000	10	394,02	
		11301/313-65	2000	10	737,34	
Entonnoirs pyrex-tige courte	Polylabo	11990/513-04	Ø mm 45	120	644,71	3222,67
		11991/513-05	55	20	736,56	
		11992/513-07	80	20	838,11	
		11993/513-10	100	20	1003,22	
Tubes Pyrex bouchons à vis et joints en PTFE	Polylabo	11269/611-52	ml 20	/100	1132,12	1132,12
Tubes Pyrex bouchons à vis et joints en PTFE	Polylabo	11271/611-53	ml 10	1100	1178,16	1178,16
Petit tubes à bouchons à vis et joints en téflon ou bouchons à jupes résistant aux solvants			ml 4			
Pilluliers en verre et capuchons en polyéthylène	Polylabo	07041	ml 8	/144	638,16	2304,94
		07043	16	144	792,60	
		07045	32	144	874,18	
Micropipettes graduées; en verre (tubes capillaires)	Polylabo	11061	5 µl	/250	155,60	466,8
		11062	10 µl	250	155,60	
		11063	20 µl	250	155,60	

Pipettes en verre	Polylabo	11026	ml 0,2	1x10	58,08	4470,30
		11012	0,5	10	89,28	
		11027	1,0	10	54,30	
		11029	2,0	10	58,04	
		11031	5,0	10	74,97	
		11017	10,0	10	112,36	
Micropipettes Gibson	Polylabo	90401	20 µl	1x2	1130,00	11760
		90438	100 µl	2	1130,00	
		90402	200 µl	2	1130,00	
			500 µl	2		
		90403	1 000 µl	2	1130,00	
		90404	5 000 µl	2	1360,00	
Seringues en verre	polylabo	02006	ml 2	1x5	21,57	361,65
		02008	5	5	23,24	
		02009	10	5	27,52	
Microseringue Hamilton (avec manche et aiguille amovible)	Polylabo	17267-80SRNE	50 µl	1x2	582,00	2328
		17268-81ORNE	100 µl	2	582,00	
Microseringue Hamilton (sans manche et aiguille fixe)	Polylabo	17001-701N (84856)	10	1x2	803,00	3214
		17003-702N (84858)	25	2	804,00	
Perce bouchons	Polylabo	K 34616		1x2	434,50	869
Spatules acier inox (longueur en mm)	Polylabo	57349	mm 102	1x5	28,60	476
		57351	152	5	31,90	
		57353	203	5	34,70	
Spatule en acier inox (large)	Polylabo	57379	mm 175	1x5	26,80	134
Pincen en acier inox - extrémités arrondies	Polylabo	63012	mm 105	1x5	29,00	435
		63014	200	5	58,00	
Pincen de préhension en acier inox pour bechers	Polylabo	57375		1x2	347,00	694
Pince aux extrémités plates	Polylabo	63033	mm 105	1x2	34,00	68
Thermomètres à mercure	Polylabo	65003	-10à 110°C	1x3	26,75	80,25
Thermomètre sans mercure-"Ecologique"	Polylabo	65040	- 10 à 110°C	1x3	31,57	94,71
Ampoules de décantation en verre	OSI					
Statif en H standard (tige de 25 mm et 70 cm de haut)	Bioblock	K 94304		1x5	893,20	4466
Noix usuelle	Bioblock	K 34618		1x5	31,90	
Noix asymétrique	Bioblock	K 35244		1x5	91,30	
Pince 2 doigts	Bioblock	K 34603		1x5	90,20	
Pince 3 doigts	Bioblock	K 34601		1x5	90,20	
Anneaux	Bioblock	K 34610	Ø mm 50	1x5	49,50	2354
		K 34611	Ø 69	5	58,30	
		K 34612	Ø 75	5	59,40	
Pissettes en polyéthylène remise 10 % par 36 et 24 unités. prix par 6	Bioblock	K 22500	ml 250	/6	60,50	134,2
		K 22501	500	6	73,70	

Portoirs en plastique Ø 20,25,13,16	Bioblock	K 22215/rouge K 22230/vert K 22066/bleu K 22357	tubes 401 40 72 72	1x5 5 5 5	56,10 61,60 56,10 55,00	1144
Panier de lavage carré	Polylabo	12,5x12,5x14,0		1x3	222,60	2848,17
		16,0x16,0x14,0		3	248,20	
rond		18,0x18,0		3	193,66	
		30,0x20,5		3	284,93	
Boîtes de rangement pour congélateur et réfrigérateur	Polylabo	11340 11336 11338		1x10 10 10	109,62 44,58 71,27	2254,7
Portoir pour micropipettes	Polylabo	47240		1x3	355,00	1065
Auxiliaires de macropipetage (avec système de sé- curité)	Polylabo	23055		1x2	274,00	632
Fil de recharge		23056		2	42,00	
Poires convention- nelles pour pipette	Polylabo	rouge 23024 bleu 99976		1x5 5	97,50 97,50	975
Capuchons pour pipettes Pasteur	Polylabo	98312	ml 2	1x20	4,95	99
Pipette - Pump	Polylabo	47305 47306 47307	ml 2/bleu 10/vert 25/rouge	1x3 3 3	99,00 112,00 149,00	1080
Bonbonnes avec poignée et robinet	Polylabo	11729 11730	l 10 20	1x3 3	163,00 299,50	1387,5
Papier filtre-ramas de 7 K (42x52 cm) carton de 7 rames	Polylabo	10116		1x2	335,00	670
Parafilm (100 mm x 38 m)	Polylabo	97950		1x2	133,00	266
Dévidoir avec massicot	Polylabo				1101,00	1101
Étiquettes avec pel- licule de protection (paquets de 100 feuilles) dim en mm	Polylabo	67505 67502	29x69 12x33	4(400/p.) 14(1400 /paquet)	190,00 190,00	380
Étiquettes ultraré- sistantes (températures extrêmes) mm	Polylabo	22684	51x22	les 240	134,62	134,62
Marqueurs universels noirs	Polylabo	85901	cdepar 10	1x50	12,20	610
Marqueurs en cou- leurs	Polylabo	67510 - rouge 67513 - bleu 67512 - vert 67514 - noir		1x20 1x20 1x20 1x20	13,50 13,50 13,50 13,50	1080
Mortiers en porcelaine émaillée (vol en ml, diam en mm)	OSI	A 74.081.54 A 74.081.58 A 74.081.61 A 74.081.64	100/Ø87 150/Ø102 250/.. 500/Ø150	5 5 5 5		
Pilons en porcelaine émaillée (longueur)	OSI	A 74.082.10 A 74.082.12 A 74.082.14	mm 100 120 140	5 10 5		
Buchner en porcelaine	OSI	A 74.070.34 A 74.070.38 A 74.070.42 A 74.070.50	Ø 40 Ø 50 Ø 65 Ø 80	2 2 2 2		