Semestre : SVI-S3 **Module** : Techniques chimiques pour la biologie

TD N°2 (Exercices corrigés)

Exercice 1 :

L'une des étapes de purification des protéines est la précipitation fractionnée par addition d'un sel dans la solution protéique. L'addition du sel se traduit par une augmentation du volume de la solution. La grandeur qui tient compte de cette augmentation est le volume spécifique (c'est l'inverse de la densité).

A. Définir la méthode de précipitation fractionnée. Donner un exemple de son application.

B. Calculez la concentration molaire d'une solution saturée de $(NH_4)_2SO_4$ à 0°C.

C. Calculez, à 0°C, la quantité de $NH_4)_2SO_4$ solide à ajouter à 500 mL d'une solution à 40 % de saturation pour l'amener à 60 % de saturation.

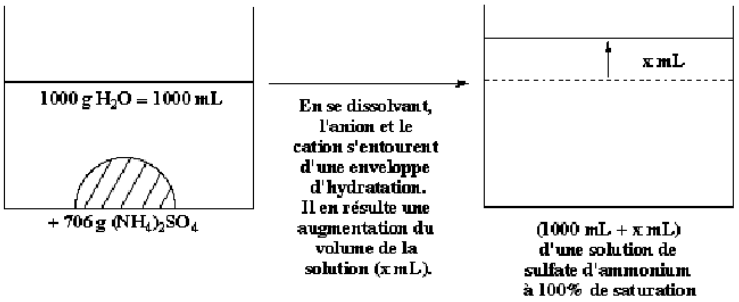
Données :

- solubilité de $(NH_4)_2SO_4$ = 706 g / L H_2O à 0°C
- volume spécifique de $(NH_4)_2SO_4$ = volume occupé par 1 g de $(NH_4)_2SO_4$ = 0,565 $mL.g^{-1}$
- masse molaire $(NH_4)_2SO_4$ = 132 $g.mol^{-1}$

Correction :

A- La précipitation fractionnée est une précipitation douce qui permet de préserver l'intégrité fonctionnelle de la protéine d'intérêt, elle se fait par l'ajout progressif du sel afin d'isoler la protéine d'intérêt dans une des fractionnes récupérées. Le sulfate d'ammonium est largement utilisé dans cette méthode. (voir le chapitre 2). Exemple de son application : purification des enzymes (cellulases, laccases, lipases…)

B- La dissolution d'un soluté correspond à la formation de liaisons hydrogène entre les groupements polaires ou chargés du soluté et les molécules d'eau. En solution, l'anion SO42-et le cation NH4+sont donc entourés d'une enveloppe d'hydratation et occupent un volume plus important que sous la forme de sel (cristal). Cette augmentation de volume est traduite par le volume spécifique.



La concentration molaire de $(SA)_{100\%}$ = nombre de mole (SA)/volume de solution = masse (SA)/(MM de (SA) x volume de solution).

Volume de solution = volume du solvant + volume occupé par le sel

Pour arriver a une solution saturée (= 100% de saturation), il faut solubiliser 706 g dans un litre d'eau ➔ [SA] = m/MM x V = masse / (MM (SA) x (volume de solvant + volume spécifique x masse)

AN : [SA] = 706 g / (132 g/mol x (1000 ml + 0,565 ml/g x 706 g) = 3,82 mol/l = 3,82 M

Concentration massique = concentration molaire x Masse Molaire (MM)

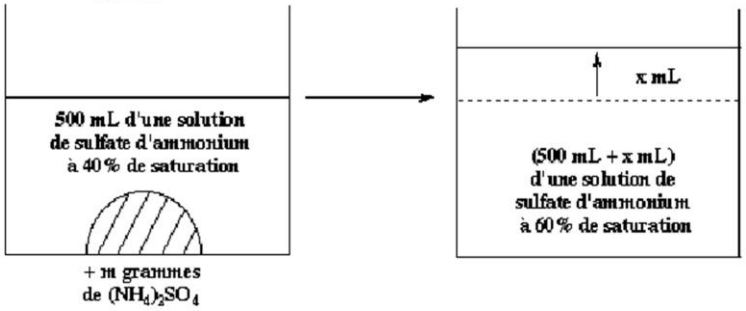
AN. Concentration massique de SA = $C_{100\%}$ (SA) = 3,82 mol/l x 132 g/mol = 504, 24 g/l = 0,5 g/ml

D'une manière générale, la concentration massique d'une solution saturée de sulfate d'ammonium (=100% de saturation) est égale à 0,5 g/ml à 0°C.

C- On cherche la masse (ajoutée) à ajouter de telle sorte :

masse (40%) + masse $_{(ajoutée)}$ = masse (60%) (figure ci-dessous)

(1) C40% V40% + masse $_{(ajoutée)}$ = C60% V60%



(2) $V_{60\%} = V_{40\%}$ + Volume occupé par la masse (ajoutée) = $V_{40\%}$ + Volume spécifique (Vs) x masse (ajoutée)

(1) et (2) ➔ $C_{40\%}\ V_{40\%} + masse_{(ajoutée)} = C60\% (V40\% + Vs \times masse_{(ajoutée)})$

$masse_{(ajoutée)} = V_{40\%} (C_{60\%} - C_{40\%}) / (1 - C_{60\%} \times Vs)$

C60% = 60% x C100% ➔ C60% = 0,6 x 0,5 = 0,3 g/ml

C40% = 40% x C100% ➔ C40% = 0,4 x 0,5 = 0,2 g/ml

AN : masse (ajoutée) = 60,2 g

Exercice 2 :

Un extrait contenant une enzyme E a été fractionné selon des concentrations croissantes de sulfate d'ammonium en vue de mettre au point une méthode de purification par précipitation.

-A l'aide de tableau (ci-dessous), retrouver la concentration en sel de chaque étape en fonction de la quantité ajoutée. On part de 500 cm^3de solution.

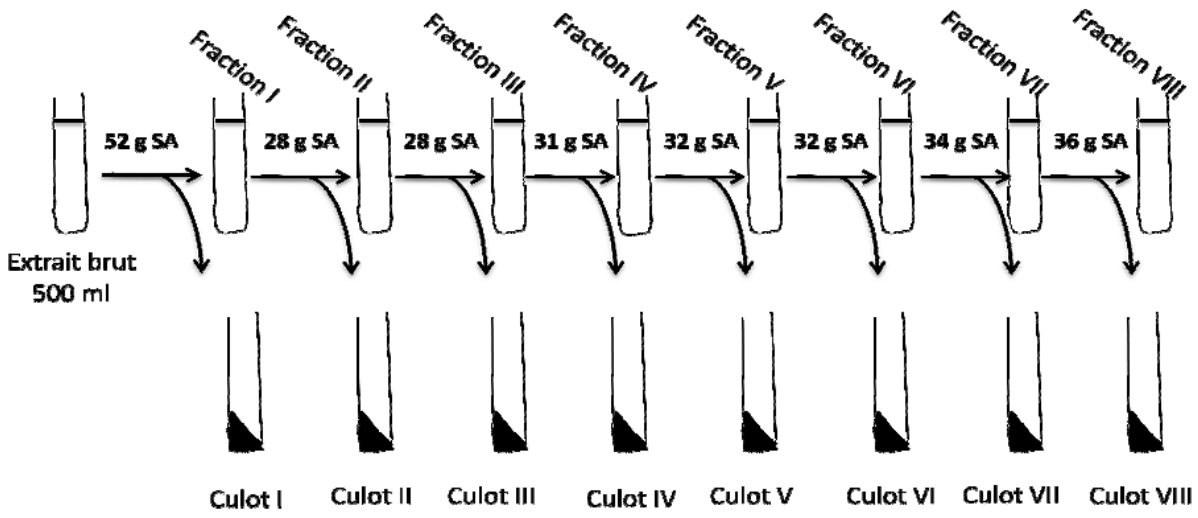
Fraction	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Volume cm^3	518	527	537	547	558	569	581	593
Quantité de $(NH_4)_2SO_4$ (g)	53	28	28	31	32	32	34	36

Après décantation de chaque fraction, l'estimation des protéines totales a été effectuée pour la partie soluble.

Parallèlement, un prélèvement de 0,1 cm3 de cette fraction soluble a permis de déterminer l'activité de l'enzyme

Correction :

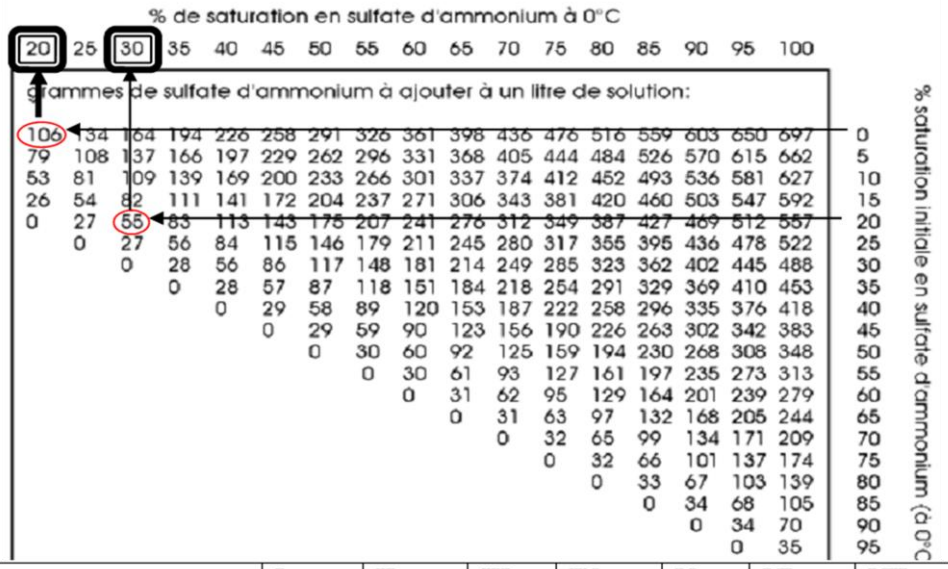
ı Pour mieux comprendre le tableau, il faut suivre la figure ci-dessous :



1 ère méthode (Tableau)

Fraction I : le volume initial = 500 ml, Masse (SA) = 53g ➔ masse SA (pour un litre) = 53 g x 1000 ml / 500 ml = 106 g ➔ sur le tableau, vous trouverez que la masse de 106 g correspond à une concentration de 20% de saturation

Fraction II : le volume initial = 518 ml, Masse (SA) = 28 g ➔ masse SA (pour un litre) = 28 g x 1000 ml/ 518 ml = 54 g ➔ sur le tableau, vous trouverez que la masse 54 correspond a une concentration de 30% de saturation



Fraction	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
La concentration en termes de % de saturation. (%)	20	30	40	50	60	70	80	90

Deuxième méthode : par calcul

Fraction I :

Concentration massique (Fraction I) = masse (SA) / (volume extrait brut + volume occupé par SA)

$C_{fractionI} = m\ (SA) / (V\ (extrait\ brut) + Vs \times m\ (SA)$

$AN\ C_{fractionI} = 53\ g / (500\ ml + 0{,}565\ ml/g \times 53\ g) = 0,\ 1\ g/ml$

$C_{fractionI} = a\% \times C_{100\%} \rightarrow a\% = C_{fractionI} / C_{100\%} \rightarrow a\ \% = 0{,}1/0{,}5 = 20\%$

Fraction II:

Concentration massique (Fraction II) = Concentration massique (fraction I) + masse (SA) / (volume (fractionI) + volume occupé par masse (SA)

$C_{fractionII} = C_{fractionI} + m/ (V_{fractionI} + Vs\ x\ m) = 0{,}1\ g/ml + 28\ g / (518\ ml + 0{,}565\ ml/g \times 28g) = 0{,}15\ g/ml$

$C_{fractionII} = a\% \times C100\% \rightarrow a\ \% = C_{fractionII} / C100\% \rightarrow a\ \% = 0{,}15/\ 0{,}5 = 30\%$

<u>Exercice 3 :</u>

Une chromatographie d'un mélange réactionnel a été effectuée sur couche mince.

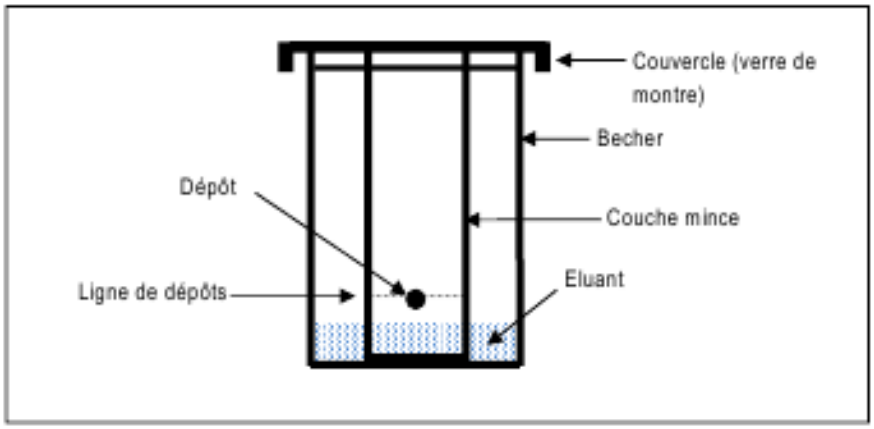
Après avoir tracé une ligne de dépôts à 2 cm du bord inférieure de la plaque et déposé un échantillon grâce à un capillaire et après une heure d'élution dans un bécher couvert par un verre de montre et contenant l'éluant, ce dernier a présenté un front de migration à 9 cm de la ligne de dépôt.

La révélation a été réalisée sous UV et a montré 3 taches a, b et c, distantes de la ligne de dépôt de respectivement 2, 5 et 7 cm.

1) Faire un schéma du montage chromatographique sachant que le bord inférieur de la plaque touche le fond du bécher.
2) Quel doit être la hauteur maximale de l'éluant dans le bécher et pourquoi ?
3) Positionner sur la plaque rectangulaire de 3 x 10 cm, le niveau du front de migration et les taches obtenues après révélation et calculer leurs Rf.
4) Classer les produits a, b et c par ordre de polarité croissante.
5) Pour permettre au produit a de migrer plus loin, a-t-on intérêt à utiliser un solvant de polarité supérieure ou inférieure au 1er éluant utilisé ? justifier votre réponse.
6) La tache b est soupçonnée contenir plus d'un produit. Comment pourrait-on séparer ce mélange ?

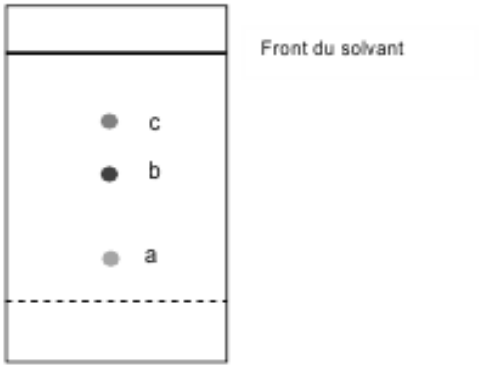
Correction :

1) Schéma du montage chromatographique :



2) La hauteur maximale de l'éluant dans le bécher doit être inférieure à 2 cm pour qu'il ne touche pas l'échantillon déposé.

3)



Rf = Hauteur de migration du soluté / Hauteur du front de migration

Rf (a) = 2/9 = 0,22 ; Rf (b) = 5/9 = 0,55 ; Rf (c) = 7/9 = 0,77

4) Classement par ordre de polarité croissante : c < b < a (Plus un composé est polaire, plus il s'accroche au support, moins il migre avec l'éluant).
5) La polarité du solvant doit être supérieure à celle de l'éluant ; le solvant polaire va mieux attirer le soluté et permettre son décrochage du support et sa migration rapide vers le haut.

6) Pour dévoiler la composition exacte de la tache b, on peut procéder par une chromatographie de la seconde dimension (chromatographie bidimensionnelle).

Exercice 4 :

1) Quelle sera l'absorbance d'une solution de 37 mM de tyrosine?

2) Vous désirez déterminer la concentration d'hémoglobine dans un échantillon sanguin par spectrophotométrie. Pour cela, vous établissez une courbe standard de l'absorbance à 412 nm de solutions d'hémoglobine de concentration connues. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous. Quelle est la concentration (en µg/mL) en hémoglobine dans votre échantillon, si vous obtenez une valeur d'absorbance à 412 nm de 0.303?

Absorbance (412nm)	Concentration du standard (µg/mL)
0.069	1
0.113	2
0.201	4
0.377	8
0.730	16

Correction :

1) La relation entre l'absorbance d'une solution et sa concentration est donnée par l'équation de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon c l$$

Où : A = absorbance
ε = coefficient d'extinction molaire (unités : litres x mol^{-1} x cm^{-1})
c = concentration (unités : mol/l = M)
l = trajet optique (épaisseur de la cuvette; unités : cm)

On aura alors :

$$A = 1420\ l\ mol^{-1}\ cm^{-1} \times (37 \times 10^{-3} M) \times 1cm$$

$$A = 52.54$$

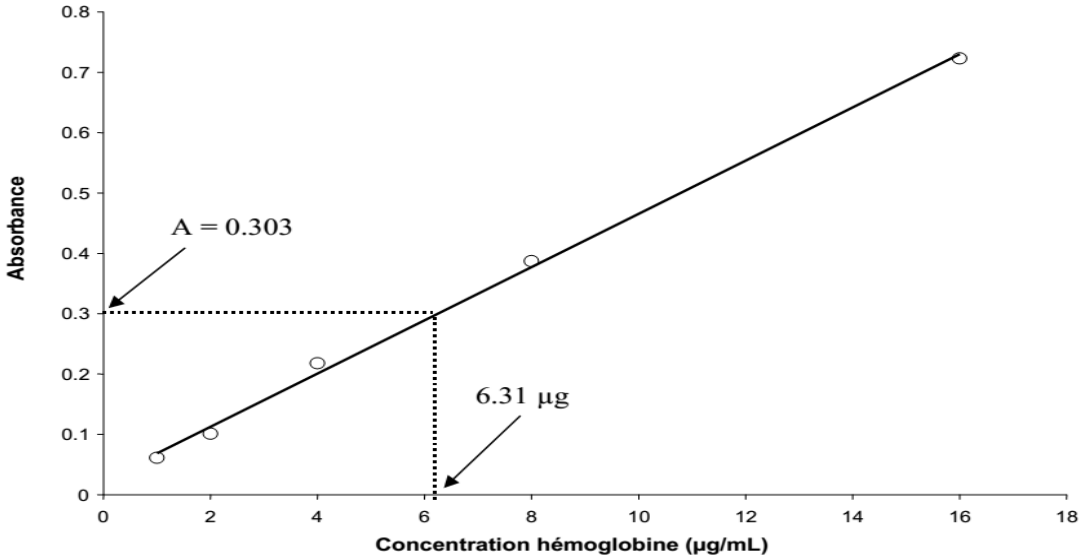
2) Nous devons tout d'abords tracer la courbe standard de l'absorbance en fonction de la concentration en hémoglobine. Ce graphique est représenté à la page suivante.

Comme l'inconnu a une absorbance de 0.303, nous pouvons reporter cette valeur sur la courbe standard afin de trouver la concentration en hémoglobine correspondante, qui est de 6.31µg/mL.

Cette valeur peut aussi être obtenue avec beaucoup plus de précision en utilisant l'équation d'une droite :

$y = mx + b$

où y = valeur sur l'axes des y
x = valeur sur l'axe des x



m = pente de la droite
b = intersection sur l'axe des y

Les valeurs de m et b sont obtenues soit directement sur le graphique, soit en les calculant par régression linéaire (de loin la meilleure méthode).

Donc, on aura :

$$y = 0.0441x + 0.0246$$

$$x = (y-b)/m$$

$$x = (0.303-0.0246)/0.0441 mL\mu g^{-1} = 6.31\ \mu g/mL.$$