TD N°2

Exercice 1 :

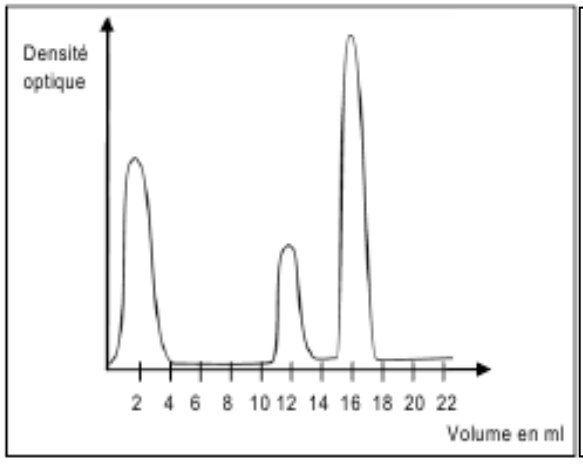
On veut séparer 3 acides-aminés : l'acide L-glutamique, la L-leucine et la L-lysine par chromatographie sur une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate (-SO3-). Les pH isoélectriques de l'acide L-glutamique, de la L-leucine et de la L-lysine sont respectivement : 3,22 ; 5,98 ; 9,74, à 25 °C.

On dépose ces 3 acides aminés sur la colonne, à pH 2, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7.

1 - Quels acides aminés sont élués et dans quel ordre ? (On considérera que les interactions acide aminé-résine sont uniquement d'ordre électrostatiques).

Exercice 2 :

Un mélange de macromolécules a été séparé par chromatographie d'exclusion-inclusion. L'élution a permis de récupérer des fractions de 2 ml de volume chacune et le contenu de ces fractions a été suivi par densité optique à une même longueur d'ondes. Le résultat est mentionné dans le profil ci-après :



Questions :

1) Schématiser le dispositif expérimental de cette chromatographie.

2) Déterminer le volume mort.

3) Combien de macromolécules différentes contenait le mélange ?

4) Quelle est la macromolécule la plus abondante dans le mélange ? Justifier

Exercice 3 :

On veut déterminer la masse moléculaire (MM) d'une protéine **P** par chromatographie d'exclusion. La limite d'exclusion du gel se situe entre 40000 et 400000 de MM.

L'étalonnage du gel se fait par diverses substances, dont les MM (exprimées en Daltons) et les volumes d'élution (Ve, exprimé en ml) sont indiqués dans le tableau suivant :

	MM (Da)	**Ve (ml)**
Dextran	2000000	45
Fibrinogène	340000	60
Catalase	230000	75
Lactoglobuline	19000	132

1- Rappeler à quoi correspond le Dalton.

2 - La protéine **P** montre, quant à elle, un volume d'élution Ve = 113 ml. Déterminer sa MM.

Exercice 4 :

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 12 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 ?