

TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE L1

PRINTEMPS 2011

**Les acides aminés : chromatographie sur couche mince
courbe de titrage**

Etude d'une enzyme : la phosphatase alcaline

QUELQUES RECOMMANDATIONS IMPORTANTES

Le port de la blouse est OBLIGATOIRE. Son oubli ainsi qu'un retard non justifié seront sanctionnés par une diminution la note de TP.

L'étudiant doit IMPÉRATIVEMENT respecter son groupe.

IL N'Y A PAS DE SEANCE DE RATTRAPAGE.

Il vous est demandé d'apporter du **papier millimétré**, une **calculatrice** et un double décimètre à chaque séance.

Le compte-rendu doit être remis **OBLIGATOIREMENT** à la fin de la séance.

Le compte-rendu, doit être rédigé à **l'encre** (pas au crayon à papier) sur la feuille de résultats pré-imprimée. Le mode opératoire détaillé dans le polycopié ne doit pas être recopié.

À propos des **graphes expérimentaux** :

Ce type de graphe n'est pas exclusivement réservé à votre usage : il doit être lu facilement par les correcteurs (et, plus tard, les collaborateurs).

Les échelles doivent être faciles à lire et les axes bien normés (avec 1 – 2 – 3 – 4 – 5...)

Quand on trace une droite expérimentale à partir de points qui ne sont pas parfaitement alignés (ce qui est en général le cas), il faut autant de points au-dessus que de points en dessous de la droite.

Il faut toujours un titre explicatif à un résultat présenté sous forme de figure.

Quand on lit une absorbance, il faut toujours rappeler à quelle longueur d'onde on s'est placé pour faire la lecture.

S. Chantepie
C. Morin
C. Lacombe
M.T. Tournaire

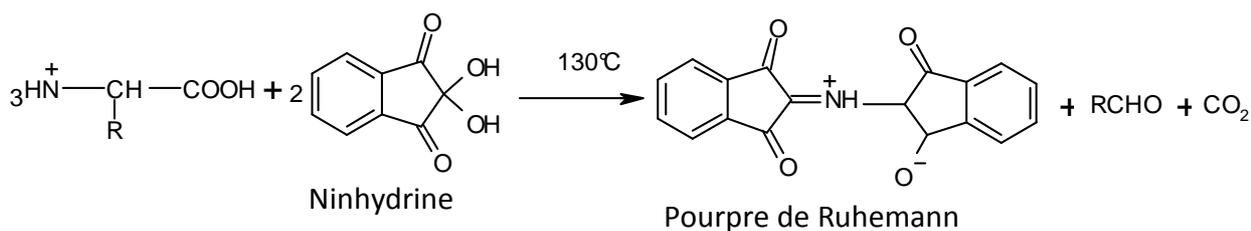
LES ACIDES AMINÉS :

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE – IONISATION

I – CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE : Analyse qualitative d'un mélange d'acides aminés.

1°) Principe

Chaque acide aminé a un coefficient de partage déterminé entre l'eau fixée sur une couche de cellulose (phase stationnaire) et un mélange de solvants organiques (phase mobile). Il en résulte que chaque acide aminé présente en chromatographie sur couche mince une vitesse de migration caractéristique. Après avoir migré, les acides aminés sont mis en évidence sur le chromatogramme par une réaction colorée avec la ninhydrine :



Le pourpre de Ruhemann est un composé coloré ($\lambda_{\text{Max}} = 570 \text{ nm}$) qui, comme son nom l'indique, est bleu-violet.

2°) Manipulation

a) Préparation des chromatographes

Un trait fin, qui n'entame pas la couche mince de cellulose déposée sur la plaque de chromatographie, est tracé dans le sens de la largeur à environ 2 cm d'une extrémité. C'est sur cette "ligne de dépôt", qui servira d'origine aux mesures des distances parcourues par les différents acides aminés, que se feront les dépôts d'échantillons.

– Dépôt des échantillons

Les dépôts doivent faire une tache d'environ 2 mm de diamètre. Pour cela, on utilise une pipette Pasteur en séchant bien sous ventilation après chaque goutte (pour éviter qu'elle ne diffuse). On déposera ainsi les différents acides aminés de référence et la solution inconnue à identifier.

– Développement

Les plaques sont ensuite placées verticalement dans une cuve à chromatographie contenant le solvant constitué d'un mélange : butanol, acide formique, eau. Le niveau du solvant dans la cuve doit être au-dessous de la ligne de dépôt des échantillons. Les faces de la cuve peuvent être garnies de papier-filtre imbibé du solvant pour maintenir une atmosphère saturée.

– Révélation

Lorsque la migration est suffisante (fin de la séance de TP), sortir la plaque de la cuve et, **sous hotte**,
- marquer soigneusement le front du solvant et sécher la plaque sous ventilation (avec un séchoir).

- pulvériser la solution de ninhydrine sur la plaque, puis la porter à l'étuve (100°C) pendant 5 à 10 minutes.

- entourer les taches d'un trait de crayon.

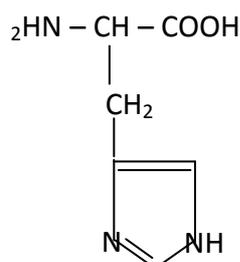
II – ÉTUDE DE L'HISTIDINE : COURBE DE TITRAGE

1°) Principe

Les acides aminés, de formule générale ${}^2\text{HN} - \text{CHR} - \text{COOH}$ possèdent un groupement basique dont le pK est d'environ 9 et un groupement acide carboxylique dont le pK est d'environ 2. Certains présentent en plus une fonction acide ou basique sur la chaîne latérale R. Le tracé des courbes de dosage par un acide fort et par une base forte permet de mesurer ces pKs et de déterminer la concentration de l'acide aminé.

Dans le cas de l'histidine, ces dosages nous permettront de définir également le caractère acide ou basique du radical.

Formule de l'histidine :



pK \approx 2 – 6 – 9

2) Mode opératoire

Avant le début des dosages, il est nécessaire de standardiser le système électrode-pHmètre à l'aide de solutions tampons. **Rincer soigneusement l'électrode avant chaque immersion** dans une nouvelle solution. Veiller à ce que l'électrode soit parfaitement immergée à chaque essai.

NE JAMAIS LAISSER L'ELECTRODE À SEC.

ATTENTION : Une burette est prévue pour HCl, une autre pour NaOH. Respecter ces attributions. Une lecture de pH se fait TOUJOURS sous agitation.

Avant toute manipulation, prévoir les valeurs approximatives de NaOH et de HCl à verser pour les différentes neutralisations afin de réaliser un dosage précis en versant NaOH ou HCl goutte à goutte autour des 3 points équivalents et 0,5 ml par 0,5 ml ailleurs.

Solutions données :	NaOH	0,5 N
	HCl	0,5 N
	Histidine	0,05 M environ

a) Titrage par NaOH

Dans un bécher de 50 mL, verser exactement 25 mL d'Histidine. Verser NaOH à la burette par petits volumes (0,1 mL au voisinage des points d'équivalence, 0,5 mL ailleurs). Relever le pH en fonction du volume versé.

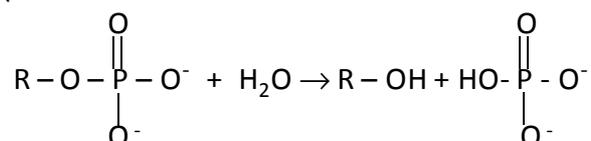
b) Titrage par HCl

Dans un bécher de 50 mL, verser exactement 25 mL d'Histidine. Verser HCl à la burette par petits volumes (0,1 mL au voisinage des points d'équivalence, 0,5 mL ailleurs). Relever le pH en fonction du volume versé.

À la fin de la séance, plonger l'électrode dans un bécher d'eau distillée jusqu'à ce que le pH soit voisin de la neutralité.

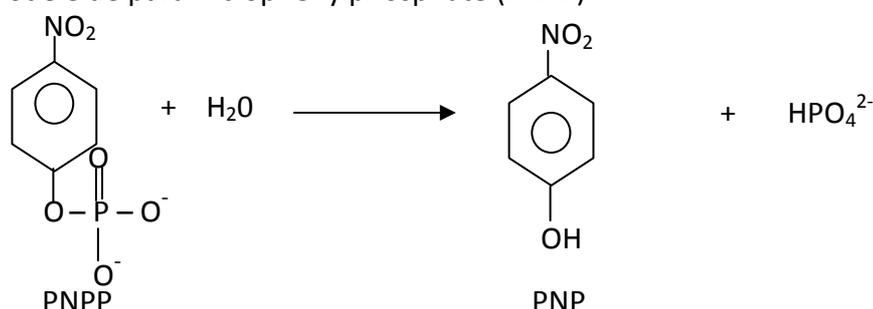
Cinétique enzymatique : étude d'une phosphatase alcaline

Les phosphatases, alcalines ou acides, catalysent l'hydrolyse des fonctions esters phosphoriques selon la réaction suivante (l'état d'ionisation des fonctions acides varie, bien-sûr selon le pH):



Les phosphatases alcalines qui ont un maximum d'activité à pH9-10 sont présentes pratiquement dans tous les tissus animaux ou humains et, chez les humains, en quantité plus importante qu'ailleurs dans la bile et les ostéoblastes. La détermination de la teneur en phosphatase alcaline du sérum ou de divers tissus peut fournir des indications importantes quant à l'existence de certaines maladies osseuses ou hépatiques.

Nous étudierons l'effet catalytique de la phosphatase alcaline d'intestin de veau sur l'hydrolyse d'un substrat modèle de para-nitrophénylphosphate (PNPP) :



Cette hydrolyse libère du paranitrophénol (PNP), jaune en milieu alcalin. La réaction enzymatique est donc suivie en mesurant l'absorption du PNP par spectrophotométrie à 405 nm.

1°) Conditions et méthodes d'étude

L'étude cinétique est réalisée à 25°C en bain thermostaté et en milieu tampon glycine 10⁻¹M à pH 10,5 contenant ZnCl₂ 10⁻³M et MgCl₂ 10⁻⁴M.

Le temps zéro est déterminé par l'instant où l'enzyme et le substrat sont mis en contact.

La réaction enzymatique est stoppée par effet de pH, ici en passant à pH très alcalin par addition de soude molaire.

2°) Courbe d'étalonnage

Préparer la série des 9 tubes à essai suivants :

Tubes	0	1	2	3	4	5	6	7	8
PNP (1,5. 10 ⁻⁴ M) (mL)	0	0,1	0,3	0,5	0,7	1	1,3	1,6	2
Tampon glycine (mL)	3	2,9	2,7	2,5	2,3	2	1,7	1,4	2
Soude 1M (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Pour chaque tube, mesurer l'absorbance à 405 nm par rapport au tube 0 qui sert à régler le zéro du spectrophotomètre.

Garder les tubes après mesure.

3°) Etude de l'avancement de la réaction en fonction du temps

- Dans un tube, qui constituera le tube témoin (**appeler ce tube T**), ajouter 2 mL PNPP 0,009 M, 1 mL de tampon glycine et 2 mL de NaOH.
- Préparer la série de tubes suivants correspondant aux différents temps d'incubation :

Temps incubation (min)	t0	t1	t2	t5	t6	t8	t10
NaOH (mL)	2	2	2	2	2	2	2

- Dans un erlenmeyer de 50 mL, mettre 29 mL de PNPP 0,009 M. Le placer au bain-marie et attendre quelques minutes que la température s'équilibre.
- Ajouter 1 mL d'enzyme et homogénéiser (temps = 0, on démarrer le chronomètre).



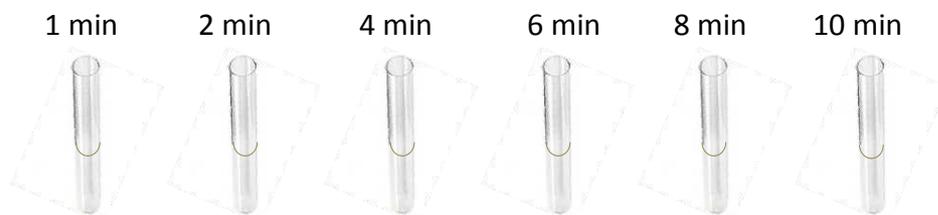
- Faire **immédiatement** un prélèvement de 3 mL de ce mélange et l'introduire dans le tube n° 0 (qui correspond au Zéro de la réaction).

t = 0 min

Tube contenant 2 mL de soude



- Faire des prélèvements de 3 mL au bout de 1, 2, 4, 6, 8 et 10 minutes et les introduire dans les différents tubes à essai préparés ci-dessus.



- Mesurer l'absorbance à 405 nm des différents tubes en réglant le zéro du spectrophotomètre sur le tube témoin (T).

4°) Etude de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration initiale de substrat.

Préparer la série de tubes à essai suivants :

Tube	0	1	2	3	4	5	6
PNPP 0,009 M (mL)	0	0,1	0,2	0,4	1	1,5	2
Tampon glycine (mL)	2,9	2,8	2,7	2,5	1,9	1,4	0,9
Enzyme (mL) en décalant de 10 secondes entre chaque tube	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Placer 10 minutes au bain-marie							
NaOH 1M (mL) (même décalage de 10 secondes)	2	2	2	2	2	2	2

Pour chaque tube, mesurer l'absorbance à 405 nm en réglant le zéro du spectrophotomètre avec le tube 0.