

Printemps des sciences 2011

La protéine sous toutes ses formes

1. Mise en évidence de la dénaturation de la papaïne

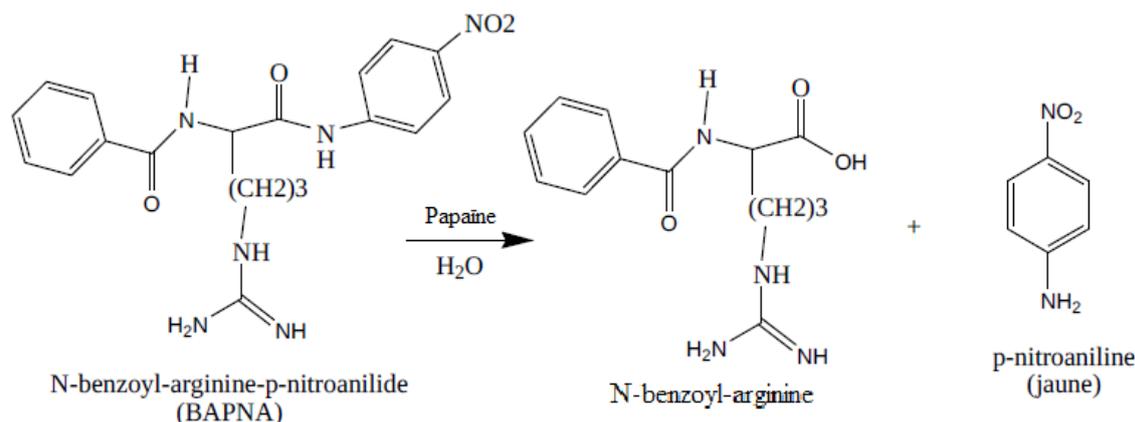
Cette manipulation démontrera l'impact de la dénaturation d'une enzyme.

But

Mise en évidence de la relation entre la structure et la fonction.

Principe

La **papaïne** est une enzyme présente dans le latex de la papaye (*Carica papaya*) ainsi que dans l'ananas. Elle a la propriété de fragmenter les protéines en hydrolysant les liaisons peptidiques. Elle est donc capable de briser le lien amide du BAPNA (N-benzoyl-arginine-p-nitroanilide), soluble dans le DMSO. Le p-nitroaniline produit par cette réaction, a une coloration jaune. On voit ainsi que la protéine est active.



Protocole

Préparation de la solution de protéine active: 1mg/mL

Dissoudre 1mg de protéine dans un 1mL de solution tampon acétate de sodium pH 4,6

Préparation du solvant: 1mg/mL

Dissoudre 1mg de BAPNA dans un 1mL de DMSO

Préparation de la solution de protéine dénaturée:

Même protocole que pour la protéine active et y ajouter NaOH 1M (1mL par 5mL de solution environ=> pH 12 environ)

Laissez ensuite pendant 30 min minimum à 100°C.

Pour montrer l'activité protéique, on mélange la protéine active avec le BAPNA, la solution devient alors jaune vif. Attention cette réaction est exothermique.

Ensuite, pour montrer la dénaturation, on mélange la protéine dénaturée avec le BAPNA, la solution reste alors incolore.

2. Renaturation de l'ovalbumine

Cette manipulation introduira les notions de dénaturation et des interactions mis en jeu dans la structure tridimensionnelle.

But

Mise en évidence de la réversibilité de la dénaturation.

Printemps des sciences 2011

Principe

Les protéines sont des macromolécules constituées d'une séquence linéaire d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques. La forme tridimensionnelle des protéines est maintenue par des liaisons intramoléculaires. Dans le cas de l'ovalbumine, la protéine à l'état natif n'est maintenue que par des liaisons hydrogène ; liaisons faciles à rompre. Lors de la cuisson de l'œuf, les liens H sont rompus par agitation thermique. La protéine, ainsi dénaturée, est déroulée rendant certaines parties accessibles pour former de nouvelles liaisons. Des ponts disulfures se créent entre les cystéines de la protéine. Ce phénomène est appelé coagulation.

Un réducteur, comme le NaBH_4 , va détruire les ponts disulfures. La chaîne polypeptidique, ainsi libérée, peut se replier correctement et retourner, dans des conditions adéquates, à son état natif.

Protocole

Mettre un morceau de blanc d'œuf dans un tube à essai et y ajouter 2mL de NaBH_4 5M ; une mousse se forme.

3. Extraction d'ADN de kiwi

Cette manipulation introduira l'importance de la molécule d'ADN et son rôle dans la cellule.

But

Extraction de molécules d'ADN contenues dans les cellules et observation de sa structure filamenteuse.

Principe

L'extraction de l'ADN est réalisée sur un végétal, le kiwi dont les cellules sont riches en ADN. La manipulation consiste à récupérer l'ADN contenu au cœur des cellules.

La technique d'extraction comporte plusieurs étapes :

- destruction mécanique des cellules (éclatement du tissu végétal et des cellules).
- destruction chimique des membranes biologiques.
- précipitation de l'ADN extrait (apparition sous une forme non soluble).

Protocole

Traitement des cellules végétales de kiwi

Ajouter, à l'aide de l'éprouvette, 40 mL de solution de NaCl à 60 g/L. Cette solution permet d'inactiver des enzymes cellulaires qui pourraient dégrader l'ADN que l'on cherche à extraire.

Ajouter 15 gouttes de solution détergente afin de dissoudre les composés lipidiques cellulaires. Mélanger doucement à l'aide de la spatule pendant environ 20 secondes.

Filter le contenu du bécher sur du papier filtre, et récupérer le filtrat dans l'Erlenmeyer.

Visualisation de l'ADN

Homogénéiser doucement le contenu de l'Erlenmeyer, puis transférer 10 mL de ce filtrat dans l'éprouvette. Ajuster ensuite le volume jusqu'à 40 mL avec la solution froide d'éthanol à 90% (verser très délicatement et lentement la solution d'éthanol), Cette solution permettra de visualiser la présence d'ADN en le précipitant.

Laisser reposer le contenu de l'éprouvette pendant quelques minutes. L'ADN apparaît sous forme d'une pelote blanche.

Soulever le précipité à l'interface des deux liquides en l'enroulant autour d'un bâtonnet et le placer dans une goutte de vert de méthyle.