

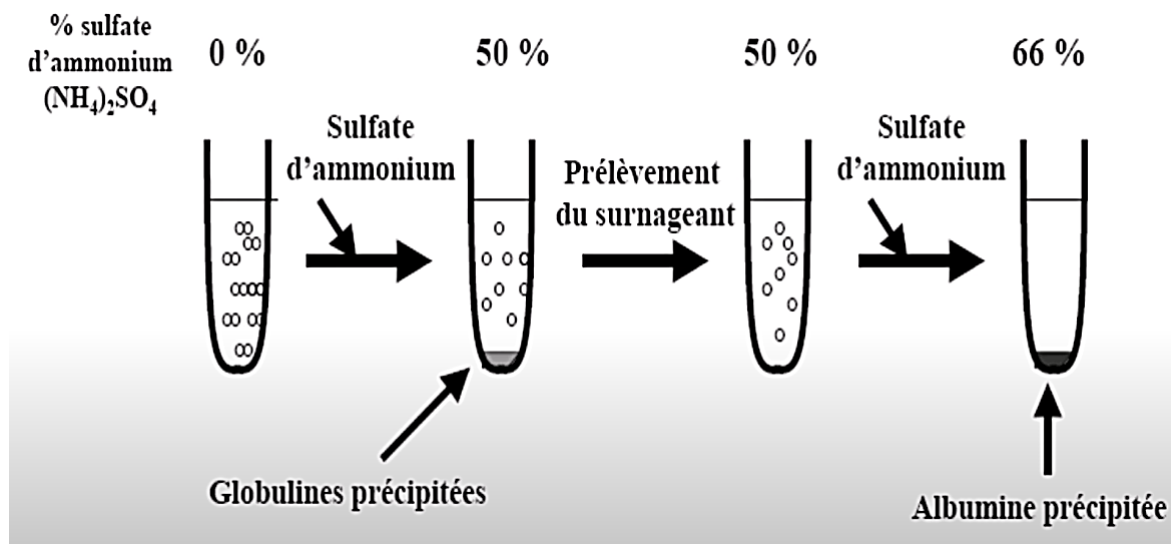
TP n° 1 : Séparation des protéines sérique par précipitation au sulfate d'ammonium

Principe :

La précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium (SA) permet de les fractionner selon leur **solubilité**. Cette méthode consiste à ajouter une quantité de SA dans la solution des protéines de façon à arriver à un **degré (%) de saturation** précis (à la température et au pH de travail). Il s'agit bien du pourcentage de saturation (donné par des tables) et non pas du pourcentage de concentration. Grâce à la centrifugation, on peut collecter (dans le culôt) les protéines précipitées et on élimine (dans le surnageant) les protéines encore solubles au degré de saturation en SA défini (protéines contaminantes). Pour déterminer la quantité de SA à ajouter on utilise un **tableau de saturation**.

Mode opératoire :

Les globulines sériques sont séparées des albumines par précipitation au sulfate d'ammonium (relargage). Elles précipitent à 50% de saturation.



On vise à récupérer les albumines sériques en solution dans un volume de ml sérum et qui précipite entre **50% et 75%** de saturation en SA. On procède de cette façon:

1/ Précipiter les protéines entre **0% et 50%** de degré de saturation en SA. En se servant du tableau ci-dessous, il faudrait tout ajouter g de SA par 1000 mL, soitg de SA pour ml. L'opération se fait addition de SA 'petit à petit' sous agitation et avec la solution des protéines dans un bécher maintenu dans la glace. On laisse précipiter et on centrifuge. Le culôt est écarté. Le volume du surnageant est mesuré à l'aide d'une éprouvette.

2/ On ramène le surnageant (qui est à 50% degré de saturation en SA) à 75% de saturation en SA. Grâce au tableau de saturation, on détermine la quantité de SA à ajouter. Elle est deg/L soitg/ ml. On précipite comme avant et après centrifugation on garde cette fois ci le et on écarte le

Le tableau de saturation donne les quantités de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C. (Le tableau indique aussi combien de sel ajouter à une solution qui en contient déjà).

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

Les valeurs sont données en termes de % de saturation, c'est-à-dire en proportion de la quantité de sulfate d'ammonium nécessaire pour saturer complètement une solution d'eau à 0°C.

La procédure suivie d'habitude quand on travaille en aveugle est de préparer quelques précipitats avec des concentrations croissantes de sulfate (qu'on peut ajouter directement à la solution protéique):

- | | |
|---|---|
| (1) Ajustement à 20% sulfate | Centrifugation et récupération du culot (fraction C20) |
| (2) Ajustement du surnageant à 40% sulfate | Centrifugation et récupération du culot (fraction C40) |
| (3) Ajustement du surnageant à 60% sulfate | Centrifugation et récupération du culot (fraction C60) |
| (4) Ajustement du surnageant à 80% sulfate | Centrifugation et récupération du culot (fraction C80) |
| (5) Ajustement du surnageant à 100% sulfate | Centrifugation et récupération du culot (fraction C100) |

Notre protéine se trouvera dans une des fractions C20, C40, C60, C80 ou C100.

Bien sûr, si on sait à l'avance comment notre protéine réagit au *salting-out*, on peut viser avec plus de précision.