

Université de Jijel
Faculté SNV/Département MASA
Master I Microbiologie Appliquée
UE : Séparation/purification des MM biologiques
Correction exercices

Exercice 1 :

Etape	Protéine (mg)	Activité enzymatique (UE)	Activité spécifique	Taux de purification	rendement
Extrait brut	1000	20000	20	1	100%
Gel filtration	200	14000	70	3.5 fois	70%
CEI	15	4500	300	15 fois	22.5%
C. affinité	0.5	3500	7000	350 fois	17.5%

Conclusion : Suite aux différentes étapes de purification, on a pu récupérer 3500 unités sur les 20000 que l'on avait au départ, soit 17.5%. L'enzyme a été purifiée 350 fois. La perte en unités a eu lieu suite à CEI.

Exercice 2 :

$$K = I_2 (\text{solvant organique}) / I_2 (\text{dans l'eau}) = 100 \dots \textcircled{1}$$

$$I_2 (\text{solvant organique}) + I_2 (\text{eau}) = 5 \text{ g/L} \dots \textcircled{2}$$

On peut déduire que : $I_2 (\text{eau}) = 0.049 \text{ g/L}$

$$I_2 (\text{CCl}_4) = 4.99 \text{ g/L}$$

Exercice 3 :

1. Calcul des Rf : $Rf = \text{distance de migration des échantillons} / \text{distance de migration du solvant} = d/D$

$$D = 16 \text{ cm } (20 - 2 - 2)$$

A partir du schéma : $d_{aa_1} = 2.3 \text{ cm}$; $d_{aa_2} = 1.2 \text{ cm}$; $d_{aa_3} = 4.7 \text{ cm}$

$$d_{x_1} = 4.8 \text{ cm} ; d_{x_2} = 3.7 \text{ cm} ; d_{x_3} = 2.4 \text{ cm}$$

Le calcul donne :

$$R_{faa_1} = 0.14 \text{ (tryptophane)}$$

$$R_{faa_2} = 0.075 \text{ (inconnu)}$$

$$R_{faa_3} = 0.29 \text{ (hydroxyproline)}$$

Pour les acides aminés du mélange x :

$$R_{fx_1} = 0.3$$

$$R_{fx_2} = 0.23$$

$$R_{fx_3} = 0.15$$

On constate que R_{faa_1} est proche de R_{fx_3} et que R_{faa_3} est proche de R_{fx_1} .

2. Le mélange x est donc constitué de proline (x_1) et trp (x_3) et un troisième aa inconnu (x_2).

Exercice 4 :

1. Le dalton est une unité de masse atomique et correspond à $1.66 \cdot 10^{-27}$ Kg

2. Il faut tracer la représentation $\log MM = f(Kd)$

$$Kd = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

$V_0 = 45$ ml (volume d'exclusion du dextran)

$V_t = 132$ ml (volume total nécessaire à l'élution de la protéine la plus petite)

A partir de la courbe, on trouve que $\log MM_p = 4.5$ donc la $MM_p = 31600$ Da

Marqueur de taille	MM (Da)	Log MM	Ve (ml)	KD
Dextran	2000000	6.3	45	0
Fibrinogène	340000	5.53	60	0.17
Catalase	230000	5.36	75	0.34
Albumine bovine	66000	4.81	105	0.68
Lactoglobuline	19000	4.27	132	1
Protéine p	31600	4.5	113	0.78

Exercice 5 :

PM (10^3)	10	20	40	60	80	200	300
logPM	4	4.3	4.6	4.78	4.9	5.3	5.47
Ve (cm^3)	210	188	169	150	140	120	105
Kd	1	0.79	0.6	0.43	0.33	0.14	0

a) On trace la courbe $\log PM = f(Kd)$

On calcule les Kd pour les autres échantillons ; on trouve

Echantillon	Ve (cm^3)	Kd	LogPM (à partir de la droite)	PM
Enzyme à faible concentration	160	0.52	4.68	47860
Enzyme à forte concentration	135	0.28	5.04	112200
Enzyme à faible concentration + facteur de soja	125	0.19	5.19	154880
Enzyme dans 1% de SDS	205	0.95	4.07	11750

L'utilisation du SDS fournit une estimation du PM de la sous-unité qui est égal à environ 11750.

A faible concentration l'enzyme a 4 sous-unités ($47860/11750=4$)

A forte concentration l'enzyme a 9 sous-unités ($112200/11750=9$),

En effet, à forte concentration l'enzyme tend à former des agrégats ce qui donne un PM supérieur à la réalité.

b) Le PM de l'enzyme en plus du facteur de soja (FS) est égal à 154880,

La masse du FS est égale à $154880 - 47860 = 107020$

Le nombre de sous-unités du FS = $107020/13375 = 8$ unités de FS par molécule d'enzyme

c) Le nombre d'unités du FS par sous-unité d'enzyme = $8/4 = 2$ unités de FS par SU d'enzyme.

Exercice 6 :

Le volume de la colonne est égal à 100 cm^3

Le volume occupé par le gel est égal à $100 - 34 = 66 \text{ cm}^3$

Le volume relatif de la protéine inconnue est égal à $50/34 = 1.47$

Exercice 7 :

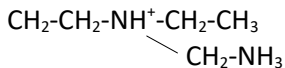
Si les trois acides aminés ont été retenus sur la colonne, c'est que la charge de la colonne a été réalisée à un pH inférieur au plus petit des pHi, soit un pH inférieur à 2.87, afin que les aa se présentent sous une forme cationique et qu'ils puissent être retenus sur la résine chargée négativement.

Acide aminé	pHi	Charge à pH<2.87	Charge à pH 6
Asp	2.87	+	-
Leu	6	+	Neutre (50/50)
Arg	10.76	+	+

A pH 6, Asp est chargé négativement, il est donc élué de la colonne, la leucine est ensuite éluée, l'arginine toujours chargé positivement à pH6 reste sur la colonne et n'est donc pas éluée.

Exercice 8 :

La diéthyl-aminoéthyl-cellulose (DEAE-cellulose) est un support échangeur d'anions obtenu en substituant la cellulose par des groupements diéthyl-aminoéthyl.



1. Le pH est donné par la relation suivante:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log(\text{N}/\text{NH}^+)$$

à pH = 2

$$\log(\text{base}/\text{acide}) = \text{pH} - \text{pKa} = 2 - 9.4 = -7.4 \dots \text{donc} \quad \text{base}/\text{acide} = 3.98 \cdot 10^{-8}$$

$$(\text{Base}) = 3.98 \cdot 10^{-8} \text{ (Acide)} \dots \text{①}$$

$$(\text{Acide}) + (\text{Base}) = 100\% \dots \text{②}$$

Donc (Acide) \approx 100% et (base) \approx 0%

à pH = 7

$$\log(\text{base}/\text{acide}) = \text{pH} - \text{pKa} = 7 - 9.4 = -2.4 \dots \text{donc} \quad \text{base}/\text{acide} = 3.98 \cdot 10^{-3}$$

$$(\text{Base}) = 3.98 \cdot 10^{-3} \text{ (Acide)} \dots \text{①}$$

$$(\text{Acide}) + (\text{Base}) = 100\% \dots \text{②}$$

Donc (Acide) \approx 99.996% et (base) \approx 0.004%

à pH = 9.4

$$\log(\text{base}/\text{acide}) = \text{pH} - \text{pKa} = 9.4 - 9.4 = 0 \dots \text{donc} \quad \text{base}/\text{acide} = 1$$

$$(\text{Base}) = (\text{Acide}) \dots \text{①}$$

$$(\text{Acide}) + (\text{Base}) = 100\% \dots \text{②}$$

Donc (Acide) = 50% et (base) = 50%

à pH = 12

$$\log(\text{base}/\text{acide}) = \text{pH} - \text{pKa} = 12 - 9.4 = 2.6 \dots \text{donc} \quad \text{base}/\text{acide} = 398.1$$

Donc (Acide) \approx 0.25% et (base) \approx 99.75%

Globalement, on peut donc constater qu'à un pH inférieur au pKa (pH acide), les groupements DEAE se présentent majoritairement sous forme acide (-NH⁺). A l'inverse, à un pH supérieur au pKa (pH basique), les groupements DEAE se présentent majoritairement sous forme basique (-N).

2. A pH 7, on a pu calculer que la résine était à 99.99% sous forme acide, chargée positivement.

protéine	pHi	Charge à pH=7
Sérumalbumine	4.9	Négative

Uréase	5	Négative
chymotrypsinogène	9.5	positive

Ainsi, à pH 7, la sérualbumine et l'uréase sont chargées négativement, et seront retenues sur la colonne. Le chymotrypsinogène ne sera pas retenu.

Exercice 9 :

Même chose que l'exercice 8, mais avec l'équation suivante :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log\left(\frac{-\text{COO}^-}{-\text{COOH}}\right)$$

à pH 1

$$(-\text{COO}^-) \approx 0.017\% \quad \text{et} \quad (-\text{COOH}) \approx 100\%$$

à pH 4.76

$$(-\text{COO}^-) \approx 50\% \quad \text{et} \quad (-\text{COOH}) \approx 50\%$$

à pH 7

$$(-\text{COO}^-) \approx 99.42\% \quad \text{et} \quad (-\text{COOH}) \approx 0\%$$

à pH 9

$$(-\text{COO}^-) \approx 100\% \quad \text{et} \quad (-\text{COOH}) \approx 0\%$$

Exercice 10 :

Acide aminé	pHi	Charge à pH 2	Charge à pH 7
Glu	3.22	+	-
Leu	5.98	+	-
Lys	9.75	+	+

C'est une résine échangeuse de cations

Le Glu est élué en premier car c'est le plus acide, puis la leucine, à son pH i, elle n'est pas chargée, elle tombe. La lysine n'est pas éluée.

Exercice 11 :

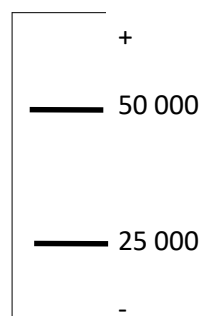
On trace la courbe log PM en fonction de la distance de migration, ensuite on extrapole sur la droite le point de la distance de migration de la protéine inconnue (49.3 mm), on trouve le PM de la peptidase qui est égal à environ 31000.

Exercice 12 :

A = 100000 = 4 sous-unités

B et C = 50000 = 1 sous-unité.

On révèle deux bandes, l'une correspond à 100000/25000, l'autre à 50000 (B et C).



Exercice 13 :

1. Le traitement des protéines par le SDS les dénature et elles seront chargées négativement, donc migrent vers l'anode (+)
2. On remarque que la variation de la distance en fonction de logPM est linéaire.

3. Après extrapolation on trouve les résultats suivants :

Protéine	PM calculé
Lysozyme	14 790
Sérumalbumine	69 255
Anhydrase carbonique	28 200
Pepsine	34 600

4. Concernant l'hémoglobine l'électrophorèse a donné une distance $d=73$ mm et PM apparent de 15 800.

Le PM de l'hémoglobine est de 64 000

Donc le nombre de sous-unités = $64\,000/15\,800 \approx 4$ sous-unités identiques