**TD 5 : Electrophorèse**

**Par : GAOUAOUI R**

**Exercice1: Choisissez la ou les bonne (s) réponse (s):**

1. **A propos de la purification d'une protéine:**
2. On extrait toujours les protéines à chaud pour limiter la protéolyse.
3. La dialyse est une technique permettant de purifier les protéines en fonction de leur taille.
4. L'ultracentrifugation est une technique permettant de purifier les protéines en fonction de leur taille ou leur masse (non exhaustif).
5. Pour purifier une enzyme, on regarde l'augmentation de l'activité spécifique enzymatique au fur et à mesure des étapes de purifications.
6. **A propos de la purification d'une protéine:**
7. 1000 Da correspondent en moyenne à 8,42 résidus (soit 118,7 Da environ pour un résidu).
8. Le SDS permet de rompre les ponts disulfures.
9. Le SDS permet de séparer les protéines en fonction de leur charge.
10. L'urée casse les liaisons hydrophobes.
11. La coloration au nitrate d'argent est plus sensible que la coloration a bleu de coomassie pour révéler une électrophorèse.
12. **Melting pot:**
13. Le SDS est un détergent entourant les protéines de cations.
14. La migration d'une protéine lors d'une électrophorèse en présence de SDS dans un gel de polyacrylamide est proportionnelle au log du poids moléculaire
15. L'électrophorèse SDS- polyacrylamide est aussi appelée électrofocalisation.
16. **Melting pot:**
17. Deux sous unités liées entre elle grâce à deux cystéines seront séparée lors d'une électrophorèse SDS- polyacrylamide en présence d'urée.
18. Le SDS ne casse pas les liaisons ioniques
19. L'électrophorèse bidimensionnelle permet d'augmenter la résolution.

**Exercice 2:**

I. La papaïne, enzyme d’origine végétale, présente de nombreuses applications industrielles et pharmaceutiques. Elle est extraite d’un latex obtenu à partir de la tige, des feuilles et des fruites du papayer. Une électrophorèse sur acétate de cellulose des extraits **(E1, E2)** et d’étalons **(chymopapaïne, lysozyme, papaïne pure)** donne les résultats schématisés sur la figure suivante :

Ligne de dépôt

Pôle +

Pôle -

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **A** | **B** | **C** | **D** | **E** |
|  |  |  |  | Figure1: Electrophorégrammes  A : extrait E1  B : extrait E2  C :chymopapaïne  D : lysozyme  E : papaïne pure |

1. Analyser les résultats obtenus ?

2. Quel est l’ordre de grandeur du pHi des protéines impliquées dans l’électrophorèse ? De quel type de protéines s’agit-il ?

3. Justifier l’utilisation de l’extrait E2 en pharmacologie ?

II. La masse molaire moléculaire de la papaïne pure est déterminée par électrophorèse SDS-PAGE sur gel polyacrylamide à pH = 7

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Protéines | M en g.mol-1 | d en mm |
| Ovalbumine | 43000 | 37,6 |
| Pepsine | 34700 | 44,5 |
| Myoglobine | 17200 | 70,0 |
| Cytochrome c | 13500 | 79,0 |
| Papaïne pur | ? | 59,5 |

1. Que signifie l’abréviation SDS-PAGE ?

2. Donner le principe de la méthode d’étude ?

3. Déterminer la masse molaire moléculaire de la papaïne pure ?

4. Peut-on utiliser cette technique (électrophorèse SDS-PAGE sur gel polyacrylamide) pour la séparation des isoenzymes ? Justifier ?

**Correction du TD 5 : Électrophorèse.**

**Exercice1: Choisissez la ou les bonne (s) réponse (s):**

1. **A propos de la purification d'une protéine:**
2. On extrait toujours les protéines à chaud pour limiter la protéolyse. **Faux (on extrait à froid pour limiter la protéolyse)**
3. La dialyse est une technique permettant de purifier les protéines en fonction de leur taille. **Vrai (on place l'extrait dans une poche avec des pores ayant une taille précise, ne laissant passer que les protéines d'une certaine taille)**
4. L'ultracentrifugation est une technique permettant de purifier les protéines en fonction de leur taille ou leur masse (non exhaustif). **Vrai (on peut aussi les séparer selon leur densité ou leur forme).**
5. Pour purifier une enzyme, on regarde l'augmentation de l'activité spécifique enzymatique au fur et à mesure des étapes de purifications. **Vrai (plus l'activité augmente, plus l'enzyme a été bien purifier).**
6. **A propos de la purification d'une protéine:**
7. 1000 Da correspondent en moyenne à 8,42 résidus (soit 118,7 Da environ pour un résidu). **Vrai**
8. Le SDS permet de rompre les ponts disulfures. **Faux (le SDS ne casse pas les liaisons covalentes).**
9. Le SDS permet de séparer les protéines en fonction de leur charge. **Faux (le SDS charge toutes les protéines négativement, on les sépare en fonction du poids (le plus petites migrent plus vite)).**
10. L'urée casse les liaisons hydrophobes. **Vrai**
11. La coloration au nitrate d'argent est plus sensible que la coloration a bleu de coomassie pour révéler une électrophorèse. **Vrai (on peut aussi faire une révélation radioactive).**

**3. Melting pot:**

1. Le SDS est un détergent entourant les protéines de cations. **Faux (ce sont des anions).**
2. La migration d'une protéine lors d'une électrophorèse en présence de SDS dans un gel de polyacrylamide est proportionnelle au log du poids moléculaire. **Faux (inversement proportionnel, les molécules les plus grosses migrent le moins).**
3. L'électrophorèse SDS- polyacrylamide est aussi appelée électrofocalisation.**Faux (électrofocalisation est la séparation selon le pHi).**

**4.Melting pot:**

1. Deux sous unités liées entre elle grâce à deux cystéines seront séparée lors d'une électrophorèse SDS- polyacrylamide en présence d'urée. **Faux (ni l'urée ni le SDS ne rompent les ponts disulfures).**
2. Le SDS ne casse pas les liaisons ioniques. **Faux (il entoure les protéines de charge négative et rompt par conséquent les liaison ioniques.**
3. L'électrophorèse bidimensionnelle permet d'augmenter la résolution. Vrai

**Exercice 2:**

I. La papaïne, enzyme d’origine végétale, présente de nombreuses applications industrielles et pharmaceutiques. Elle est extraite d’un latex obtenu à partir de la tige, des feuilles et des fruites du papayer. Une électrophorèse sur acétate de cellulose des extraits **(E1, E2)** et d’étalons **(chymopapaïne, lysozyme, papaïne pure)** donne les résultats schématisés sur la figure suivante :

Ligne de dépôt

Pôle +

Pôle -

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **A** | **B** | **C** | **D** | **E** |
|  |  |  |  | Figure1: Electrophorégrammes  A : extrait E1  B : extrait E2  C :chymopapaïne  D : lysozyme  E : papaïne pure |

1. Analyser les résultats obtenus ?

Etude des extraits E1et E2 par électrophorèse sur acétate de cellulose :

* L’extrait E1 (A electrophorégramme) est un mélange (3 taches) contient de la papaïne, mais celle-ci est contaminée par la chymopapaïne et le lysosome.
* L’extrait E2 ( B electrophorégramme) est constitué de papaïne pur.

2. Quel est l’ordre de grandeur du pHi des protéines impliquées dans l’électrophorèse ? De quel type de protéines s’agit-il ?

Les protéines migrent toutes vers la cathode et sont donc chargées positivement à pH = 9,3. Leurs pHi est supérieur à 9,3; Il s’agit de protéines basiques.

3. Justifier l’utilisation de l’extrait E2 en pharmacologie ?

La papaïne est utilisé pharmacologie pour ses propriétés protéolytiques. Il convient qu’elle soit pur et avec un titre protéolytique donné.

II. La masse molaire moléculaire de la papaïne pure est déterminée par électrophorèse SDS-PAGE sur gel polyacrylamide à pH = 7

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Protéines | M en g.mol-1 | d en mm |
| Ovalbumine | 43000 | 37,6 |
| Pepsine | 34700 | 44,5 |
| Myoglobine | 17200 | 70,0 |
| Cytochrome c | 13500 | 79,0 |
| Papaïne pur | ? | 59,5 |

1. Que signifie l’abréviation SDS-PAGE ?

SDS – PAGE = sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis = Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

2. Donner le principe de la méthode d’étude ?

Séparation des protéines selon leur charge et selon leur taille (influence du diametre des pores, c'est-à-dire du pourcentage d’acrylamide et le rapport acryl / bisacrylamide)

2. Déterminer la masse molaire moléculaire de la papaïne pure ?

Pôle +

Il convient de représenter d en fonction de log(M). L’équation de la droite de régression obtenue en présentant d en fonction de log (M) est : d = - 82,673.log (M) + 420,29.

Donc log (M) = 4,3641, soit M de l’ordre de 23100 g.mol-1.

La masse molaire moléculaire de la papaïne pure est de 23100 g.mol-1.