

Solution TD3

Exo 1

Etape 1 :

Culot : Les protéines E, I (Solubilité 0 %) (Complètement éliminées par précipitation au SA)

Surnageant : Les protéines B, F, H, (100 % soluble) D, G, C (Partiellement éliminées)

Etape 2 :

La protéine d'intérêt sera dans le culot, à $pH=pH_i$ la solubilité de la protéines est minimale et elle précipite

Culot : B, F, H

Surnageant : C, D, G

Etape 3 :

Dans la filtration sur gel les grosses molécules éluent en premier, donc l'ordre sera :

1- H (75000) 2- B (55000) 3- F (35000)

Exo 2

Un protocole simple et rapide pouvant séparer ces protéines implique d'abord la réalisation d'une chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Ceci permet de se débarrasser de la protéine dont le pI est différent de notre enzyme (on joue sur la différence de pI). Dans une seconde étape, on peut effectuer un tamisage moléculaire (chromatographie d'exclusion exploitant le critère de la taille des molécules) afin de séparer notre enzyme (Poids moléculaire 24 kDa) de l'autre protéine contaminante (Poids moléculaire 100 kDa). Des résultats similaires seraient obtenus si l'on effectue d'abord le tamisage, suivi de la chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

Exo 3

Les trois enzymes ont été retenus sur la colonne, à un pH inférieur à 2,87, afin que les enzymes se présentent sous une forme chargée positivement et qu'ils puissent être retenus sur la résine échangeuse de cations, chargée négativement.

Enzyme	pHi	Charge à pH=2	Charge à pH=6
A1	2,87	+	-
A2	6	+	Neutre
A3	10,76	+	+

À un pH de 6, A1 est chargée négativement ; elle est donc éluée de la colonne. A2 est ensuite éluée. A3, toujours chargée positivement à pH = 6 reste sur la colonne et n'est donc pas éluée.

Exo 4

Charge des différentes protéines à pH7

Protéine	pHi	Charge à pH=7
Sérumalbumine	4,9	-
Uréase	5	-
Chymotrypsinogène	9,5	+

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

- A pH 10 le DEAE (9.4) change de charge il sera négatif donc ne sera pas un échangeur d'anion

Exo 5

Afin de remplir le tableau, il faut connaître quelques définitions :

- L'activité spécifique (AS) représente un nombre d'unités enzymatiques (UE) par gramme de protéines (g) :

$$AS = (UE / g)$$

- Le taux de purification d'une enzyme est le rapport de l'AS mesurée après une étape de purification, sur l'AS mesurée à l'étape précédente :

$$\text{Taux de purification} = AS \text{ après une étape} / AS \text{ avant cette même étape}$$

- Le rendement correspond à un nombre d'UE mesuré après une étape de purification, sur un nombre d'UE mesuré à l'étape précédente :

$$\text{Rendement} = UE \text{ après une étape} / UE \text{ avant cette même étape}$$

Connaissant ces définitions, on peut remplir le tableau. Il faudra rajouter une colonne supplémentaire "AS" qui nous permettra de calculer le taux de purification :

	protéine (g) :	activité (UE) :	AS :	taux de purification :	rendement :
Extrait brut	1000	20000	20	-	-
Chromato. d'exclusion	200	14000	70	3,5 fois	70 %
Chromato. d'échange d'ions	15	4500	300	4,28 fois	32 %
Chromato. d'affinité	0,5	3500	7000	23,3 fois	77,7 %

On pourra utilement calculer :

- Le taux global de purification, qui est égal à l'AS mesurée à la fin de toutes les étapes, divisée par celle de départ. Ici, le taux global de purification est égal à $7000 / 20 = 350$.
- Le rendement global qui est égal à $3500 / 20000 = 17,5 \%$,

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.