

Exercice 1 :

On détermine les temps de rétention (t_r) au cours d'une chromatographie sur Sephadex, des protéines suivantes dont on connaît la masse moléculaire (MM) (Le débit de la colonne est de 5 ml / min) :

	MM	t_r (min)
Aldolase	145000	10,4
Lactate déshydrogénase	135000	11,4
Phosphatase alcaline	80000	18,4
Ovalbumine	45000	26,2
Lactoglobuline	37100	28,6

1 - Calculer les volumes d'élution (V_e) correspondants.

- Porter le log de MM en fonction de V_e - Que remarquez-vous ?

2 - Pour la glucokinase, $t_r = 21$ min. Déterminer sa masse moléculaire à l'aide du graphique précédent.

Exercice 2 :

Un mélange d'immunoglobulines G (MM = 160000 Da) et d'albumine sérique bovine (MM = 67000 Da) est déposé sur colonne de séphadex G-100 (limite d'exclusion = 100000 Da).

Rappel : MM = masse moléculaire.

- Tracer un diagramme d'élution vraisemblable (DO en fonction de V_e) en indiquant le volume mort.

Exercice 3

On veut déterminer la masse moléculaire (MM) d'une protéine p par chromatographie d'exclusion. La limite d'exclusion du gel se situe entre 40000 et 400000 de MM.

L'étalonnage du gel se fait par diverses substances, dont les MM (exprimées en Daltons) et les volumes d'élution (V_e , exprimé en ml) sont indiqués dans le tableau suivant :

	MM (Da)	V_e (ml)
Dextran	2000000	45
Fibrinogène	340000	60
Catalase	230000	75
Lactoglobuline	19000	132

2 - La protéine p montre, quant à elle, un volume d'élution $V_e = 113$ ml. Déterminer sa MM.

Question 1.

Quelles sont les raisons d'utilisation de la précipitation au sulfate d'ammonium comme étape initiale de purification d'une protéine ?

Question 2.

Justifier le choix d'utilisation de tampons à pH supérieur à 6,0 mais inférieur à 10,0 lors de la chromatographie sur DEAE-cellulose de la 6-phosphogluconate déshydrogénase qui possède un pI de 6 (marge de pH permettant la fixation de l'enzyme).

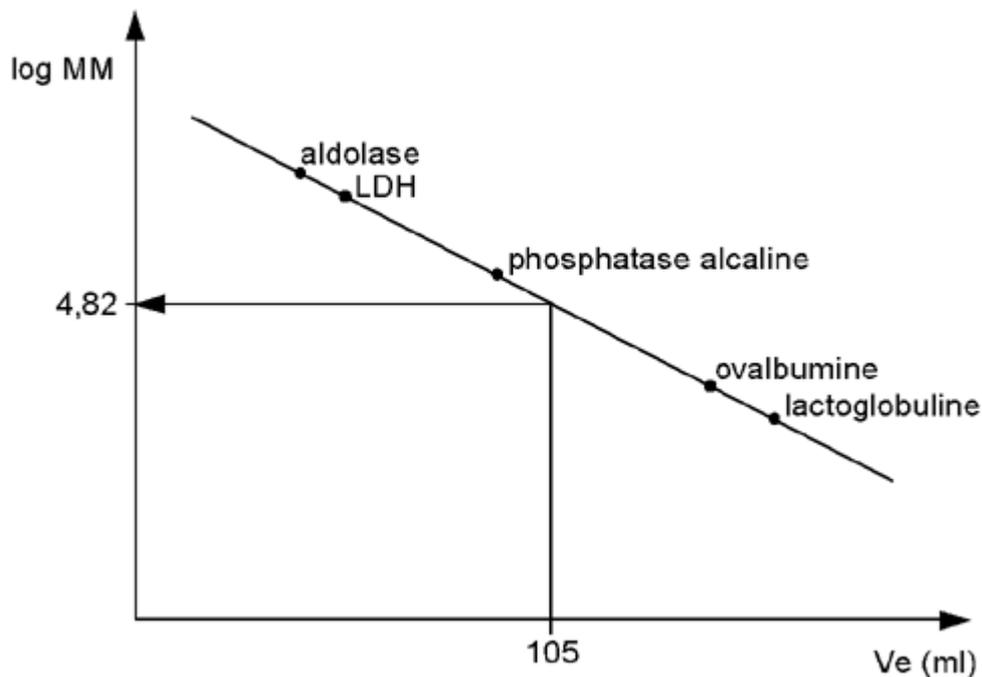
Solution Exercice 1

1 - Cet exercice met en jeu une chromatographie d'exclusion (encore appelée : tamisage moléculaire, gel filtration, perméation de gel). La connaissance du débit de la colonne (5 ml / min) et des différents temps de rétention nous permet de calculer le volume d'élution pour chaque composé (voir tableau), selon la relation :

$$V_e (\text{volume d'élution}) = d (\text{débit}) \times t_r (\text{temps de rétention})$$

	MM	<u>Log MM</u>	tr (min)	<u>Ve (ml)</u>
Aldolase	145000	5,16	10,4	52
Lactate déshydrogénase	135000	5,13	11,4	57
Phosphatase alcaline	80000	4,9	18,4	92
Ovalbumine	45000	4,65	26,2	131
Lactoglobuline	37100	4,57	28,6	143

La représentation graphique du log de la masse moléculaire (log MM) qu'il faut calculer préalablement (voir tableau) en fonction du volume d'élution (V_e) nous donne une droite :



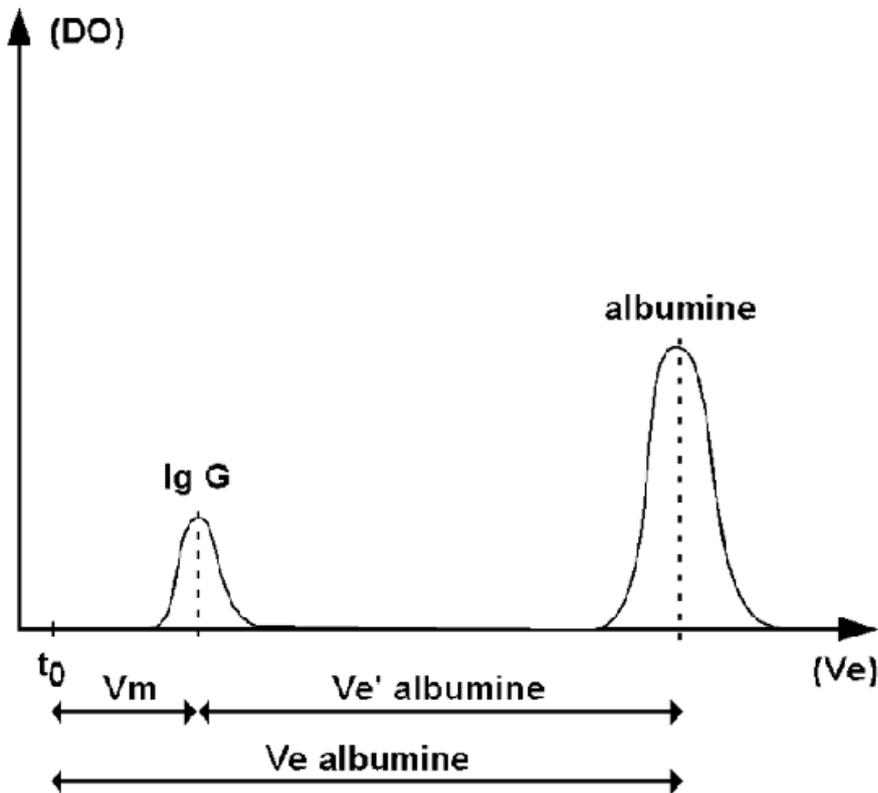
Le fait de visualiser une droite signifie qu'aucune protéine n'est exclue du gel.

2 - La glucokinase, avec un temps de rétention de 21 min, est élue à un volume d'élution de $5 \times 21 = 105$ ml. Il suffit de se reporter au graphe pour déterminer un log de MM = 4,82 environ, soit une masse moléculaire de 66070 Da (ou 66070 g/mol ou 66,07 kDa), environ

Solution exercice 2

Voici un diagramme d'élution vraisemblable pour une chromatographie d'exclusion séphadex G-100 (limite d'exclusion = 100000 Da), sur laquelle on aurait déposé un mélange d'immunoglobulines G (MM = 160000 Da) et d'albumine sérique bovine (MM = 67000 Da).

Ici on a représenté la mesure de la densité optique (DO) de l'éluât en fonction du volume d'élution (V_e):



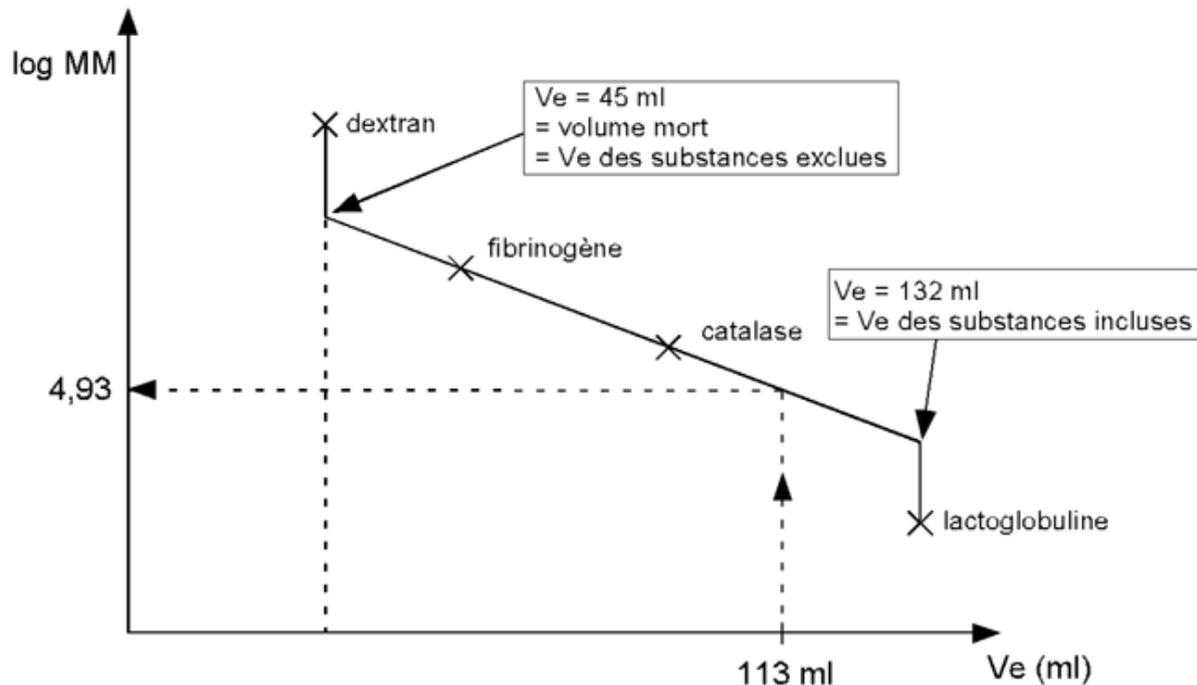
- Les IgG présentent une masse moléculaire supérieure à la valeur de la limite d'exclusion de la colonne (100000 Da). Elles seront donc éluées en premier, et donneront la valeur du volume mort de la colonne ($V_m = V_e \text{ IgG}$)
- L'albumine de masse moléculaire 67000 g/mol, sera incluse dans le gel et éluée plus tard, avec un $V_e \text{ albumine}$ qui est égal à $V_m + V_e' \text{ albumine}$.

Solution Exercice 3

Afin de déterminer la masse moléculaire (MM) de la protéine p ($V_e = 113 \text{ ml}$), il faut au préalable tracer la représentation du $\log(\text{masse moléculaire}) = f(V_e)$.

	MM (Da)	V_e (ml)	<u>$\log \text{MM}$</u>
Dextran	2000000	45	6,3
Fibrinogène	340000	60	5,53
Catalase	230000	75	5,36
Lactoglobuline	19000	132	4,28

Le schéma ci-dessous représente le tracé de $\log (MM) = f(V_e)$ pour les composés suivants : Dextran, Fibrinogène, Catalase et Lactoglobuline.



- Il suffit de reporter sur le tracé : $\log (MM) = f(V_e)$, le volume de 113 ml pour en déduire un $\log MM = 4,93$, soit une masse moléculaire de 85114 Da ou 85114 g/mol pour la protéine p.

Il est très important de noter que :

- 45 ml représente le volume mort de la colonne, c'est à dire le volume d'élimination des substances exclues (ici, le dextran).
- 132 ml représente le volume d'exclusion des protéines totalement incluses.

La droite a été tracée en ne tenant compte que des points correspondants au fibrinogène et à la catalase, car le dextran est un composé totalement exclu, alors que la lactoglobuline est une protéine totalement incluse dans le gel. Ainsi, il aurait été totalement faux de tracer une droite à partir des points correspondant à la catalase et la lactoglobuline (qui sont les protéines dont les volumes d'élimination encadrent celui de la protéine p).

Réponse Question 1

La précipitation au sulfate d'ammonium (fractionnement par le sulfate d'ammonium, relargage) exploite le critère de la solubilité des protéines. Elle permet de concentrer la protéine d'intérêt en précipitant de manière non-spécifique une proportion généralement importante des protéines contenues dans l'extrait total. On obtient un extrait brut (purification partielle) de la protéine, qui peut ensuite subir d'autres étapes de purification.

Réponse Question 2

A un pH supérieur à 6 (pI de la 6-phosphogluconate déshydrogénase), cette enzyme possède une charge globale négative ($\text{pH} > \text{pI}$). Elle peut se fixer sur la colonne DEAE-Cellulose. A un pH supérieur à 10, le groupe diéthylamino de la colonne perd son proton, empêchant en même temps toute séparation de l'enzyme selon sa charge.