**Université de Bejaia**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Microbiologie**

**3ème année Licence Microbiologie**

**TD 4 de Techniques d’Analyse Biologiques**

**Exercice 1**

On veut séparer 3 acides aminés : l’acide glutamique, la leucine et la lysine par chromatographie sur une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonates (–SO3-). Les pH isoélectriques de ces acides aminés sont respectivement : 3,22 ; 5,98 ; 9,74 à 25°C.

On dépose ces 3 acides aminés sur la colonne, à pH 2, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7.

1. Quels acides aminés sont élués et dans quel ordre ? (On considérera que les interactions acides aminés-résine sont uniquement d’ordre électrostatiques).

**Exercice 2**

On veut séparer l’acide aspartique, la valine et la lysine présents dans un mélange sur une résine polystyrénique substituée par des groupements NH3+. On dépose ce mélange sur la colonne de résine à pH 12 et on amène progressivement le pH à 4.

1. Quel type de chromatographie est illustré ici ?
2. Quel est le type d’interactions qui ont lieu entre les acides aminés et le support de la colonne ? Faites un schéma de l’intérieur de la colonne rendant compte de ces interactions à pH 12.
3. Quels sont les acides aminés élués et dans quel ordre ? Ont-ils été séparés ? Tracez le diagramme d’élution illustrant vos résultats : quantité d’acides aminés=f (volume d’élution).

**Exercice 3**

Un mélange de protéines est traité par le SDS et le β-mércaptoéthanol, après ce traitement, ce mélange est soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS à pH 7.

On mesure la distance de migration d de ces protéines dont les poids moléculaires sont connus.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Ovalbumine | Trypsine | Myoglobine | Cytochrome |
| **PM (Da)** | 43000 | 23000 | 17200 | 13500 |
| **d (mm)** | 37,6 | 59,9 | 70 | 79 |

**1.** Donner le rôle du SDS et du β-mércaptoéthanol

**2.** Tracer log de PM en fonction de d. Que remarquez-vous ?

**3.** Le poids moléculaire de l‘hémoglobine est de 64000. On a trouvé après une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, une seule bande dont la distance de migration est de 73mm. Quelle est la structure de cette protéine ?

**Corrigé type de la série 4 de TD**

Exercice 1

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **1 -**Cet exercice met en jeu une chromatographie échangeuse d'ions. Une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate (-SO3-) est chargée négativement et est donc une résine échangeuse de cations.  Lorsque le pH est supérieur au pHi (pH > pHi), l'acide aminé est chargé négativement (forme anionique).  Lorsque le pH est inférieur au pHi (pH < pHi), l'acide aminé est chargé positivement (forme cationique).  Le tableau ci-dessous donne les charges des 3 acids aminés, à pH = 2 et à pH = 7.   |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | acide aminé :  Acide L-Glutamique (Glu) L-Leucine (Leu) L-Lysine (Lys) | pHi :  3,22 5,98 9,74 | charge à pH = 2 :  + + + | charge à pH = 7 :  - - + |   Ainsi, à pH = 2, les trois acides aminés sont chargés positivement, et seront retenus lors du passage sur la colonne.  A pH = 7, seuls Glu et Leu, chargés négativement, seront élués. Lys reste fixé à la colonne.  Glu est élué en premier (pHi = 3,22) puis Leu l'est ensuite (pHi = 5,98). |

|  |  |
| --- | --- |
| |  | | --- | |  | |