

Exercice 3 :

On se propose de purifier la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) à partir d'un extrait brut A de B. subtilis. Pour tester le degré de purification après chaque étape, on détermine l'activité spécifique. La mesure de l'activité enzymatique est réalisée dans une cuve de 2 cm de trajet optique. Le volume réactionnel total est de 2 mL et tous les substrats de la réaction sont en concentration saturante pour l'enzyme.

NB : vos résultats seront exprimés en prenant comme unités : le litre, le gramme, la minute et pour les quantités catalytiques l'unité U. La valeur du coefficient d'extinction molaire du NADPH à 340 nm est de 6300 M⁻¹.cm⁻¹**QUESTIONS :**

Question 1 : écrire la réaction catalysée par la G6PDH et donner le principe de la détermination de l'activité enzymatique. La mesure de l'activité enzymatique de l'extrait brut A est effectuée à partir d'une prise d'essai contenant 0,1 mg de protéines totales. La variation d'absorbance lue à 340 nm pendant 5 min d'incubation est de 0,300.

Question 2 :

- a) calculer la concentration catalytique de la G6PDH dans la cuve réactionnelle.
- b) en déduire l'activité spécifique de la G6PDH dans l'extrait brut A.

La 1ère étape de purification est une chromatographie d'affinité sur une phase stationnaire greffée par du glucose 6-phosphate. Elle permet d'obtenir un éluat B contenant l'activité G6PDH. La mesure de l'activité enzymatique de l'éluat B est effectuée sur une prise d'essai contenant 1µg de protéines totales. La variation d'absorbance lue à 340 nm pendant 1 min d'incubation est de 0,358 dans le même type de cuve.

Question 3 : calculer le degré de purification de la G6PDH par l'étape de chromatographie d'affinité. L'éluat B est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) et de mercaptoéthanol. Après migration et révélation une seule bande est observée de masse moléculaire apparente 80 kDa. L'analyse de l'éluat B en conditions non dénaturantes par chromatographie d'exclusion sur gel se traduit par la présence d'un seul pic de masse moléculaire apparente 320 kDa.

Question 4 :

- a) quels sont les rôles du SDS et du mercaptoéthanol lors de l'électrophorèse ?
- b) interpréter les résultats de ces 2 analyses.
- c) calculer l'activité moléculaire spécifique de la G6PDH.