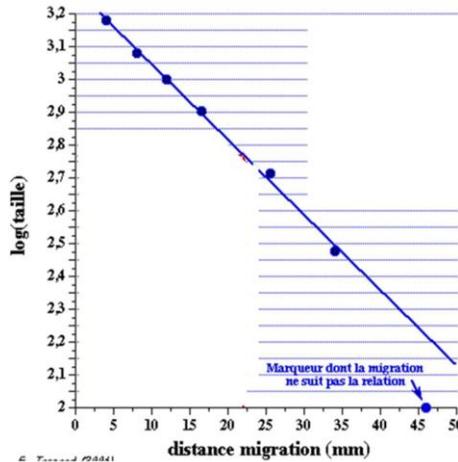
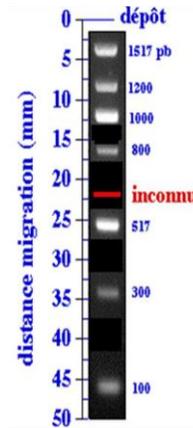


Exercice 1 (4 points) : Analyser et interpréter des résultats (mettre en relation des informations)



document 1



document 2

1- De quel type d'électrophorèse le document 2 est-il le résultat ?

Electrophorèse sur gel d'agarose ici electrophorèse d'ADN (1pt)

2- Comment obtient-on le résultat proposé par le document 1 ?

Il s'agit d'une courbe étalon, on fait migrer des fragments de taille connue pour établir une relation entre la taille des fragments et leur distance de migration. (1,5)

3- Quelle information apporte la mise en relation des deux documents ?

En reportant (traits rouges) la position du fragment inconnu sur le document 1, on obtient graphiquement sa taille soit 600 pb (paires de bases environ) (1,5).

Exercice 2 (4 points) :

On dispose d'un mélange de 3 protéines A, B, C. La protéine A a une masse molaire de 100 000, est composée de 4 sous-unités identiques et possède un pHi de 7,0. La protéine B a une masse molaire de 50 000, comprend qu'une seule sous-unité et possède un pHi de 3,0. La protéine C a une masse molaire de 50 000, ne comprend qu'une seule sous-unité et possède un pHi de 10,0. Les trois protéines sont sphériques. On considère que les techniques sont réalisées à pH = 7.

Justifier l'ordre d'élution de ces trois protéines lors d'une chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex. (1pt)

A=
B+
C-

Ces trois protéines sont soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS). Justifier le nombre de bandes attendues pour chacune des 3 protéines (1pt)

Protéine A : une bande 25000 da

Protéine B : une bande 50000da

Protéine C : une bande 50000da

Déterminer les masses molaires correspondant à ces bandes si on les compare à une courbe d'étalonnage obtenue avec des protéines de masses molaires connues (1pt)

Protéine A : une bande 25 kda=25 10³g/mol

Protéine B : une bande 50 Kda=50 10³g/mol

Protéine C : une bande 50 Kda= 50 10³g/mol

Exercice 3 (7 points) :

A l'aide d'un Spectrophotomètre, on réalise une série de mesures de A de solutions de Violet cristallisé, à la longueur d'onde $\lambda = 580 \text{ nm}$. $l = 1 \text{ cm}$. On obtient les résultats suivants : Violet cristallisé C25H30N3 : $M = 408,19 \text{ g/mol}$

$C_m \text{ en g/l}$	$0,6 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$4,5 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$
A en uA	0,075	0,25	0,42	0,515	0,775	1,04

Définir la Transmittance et l'absorbance (A) d'une solution (2pt)

.

Enoncer la loi de Beer – Lambert ; expliciter tous ces termes et donner leurs unités.

D'après la loi de Beer Lambert : $A = \log(I_0/I) = E \cdot l \cdot C$

Où E est un coefficient caractéristique de la substance appelé coefficient d'absorbance ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l est l'épaisseur de la cuve (cm) et C la concentration de la solution

(mol/L) (1pt)

.

Quel est le critère de choix de la longueur d'onde à laquelle s'effectue les mesures ? Pourquoi ?

La solution X présente une longueur d'onde lumineuse où l'absorption est maximale (0.5 points). Cette longueur d'onde maximale λ_{max} ne dépend pas de la concentration, c'est une grandeur caractéristique de l'ion absorbant. Elle est utilisée pour effectuer les mesures photométriques sur des solutions de différentes concentrations (1pt)

.

1- Montrer que la loi de Beer est vérifiée pour cette série de solutions.

La courbe obtenue est une droite passant par l'origine, cela signifie que l'absorbance est proportionnelle à la concentration de l'espèce absorbante. La loi de Beer-Lambert est donc bien vérifiée (1pt)

2- Déterminer la valeur du Coefficient d'absorption molaire (ϵ) du violet cristallisé.

$r \text{ gL}^{-1}$	$0,6 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$4,5 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$
A	0,075	0,25	0,42	0,515	0,775	1,04
$r / A \text{ gL}^{-1}$	$8 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$	$5,7 \cdot 10^{-3}$	$5,8 \cdot 10^{-3}$	$5,8 \cdot 10^{-3}$	$5,76 \cdot 10^{-3}$

$$r/A = 5,8 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}.$$

$$C/A = 5,8 \cdot 10^{-3} / \text{masse molaire (g/mol)} = 5,8 \cdot 10^{-3} / 408,19 = 1,42 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L} = 1,42 \cdot 10^{-2} \text{ mol m}^{-3}.$$

$$r/A = 1 / (\text{el}) \text{ avec largeur } l = 10^{-2} \text{ m ;}$$

$$1,42 \cdot 10^{-2} = 1 / (10^{-2} e) = 100 / e \text{ soit } e = 100 / 1,42 \cdot 10^{-2} = 10^4 / 1,42 = 7042 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}.$$

$$\text{Ou bien : } 1,42 \cdot 10^{-5} = 1 / (l * e) \text{ soit } e = 1 / 1,42 \cdot 10^{-5} = \underline{70420 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \text{ (1pt)}$$

3- La mesure de l'absorbance d'une solution de violet cristallisé de concentration inconnue, réalisée dans ces conditions, donne $A = 0,531$. Déterminer la concentration molaire C et la concentration massique C_m de cette solution. μ

$$4- \text{ si } A = 0,531 \text{ alors } C/A = 1,42 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L soit } C = 0,531 * 1,42 \cdot 10^{-5} = 7,54 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$$

Ou bien : $A = \log(I_0/I) = \text{elc}$ (A est l'absorbance ou densité optique)

$$C = A/e = 0,531 / 70420 = 7,54 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L (1 points)}$$

$$r = 7,54 \cdot 10^{-6} * 408,19 = \underline{3,08 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}}. \text{ (1 points)}$$

Exercice 4 (5 points) :

Etape de purification	Protéines (mg)	Activité enzymatique (U)
Lysat <i>E. coli</i>	11250	175
Eluat colonne DEAE-Sephacel	350	75
Eluat chromatographie affinité HAP	210	70
Précipitation $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	89	49
Eluat colonne Q-Sepharose	47	35
Eluat colonne 5'-AMP-Sepharose	20	???

Calculez le rendement et le taux de purification de chacune des étapes par rapport à la préparation initiale (lysate *E. coli*). En fin de purification, on ajoute dans une cuve de spectromètre un aliquot de la préparation correspondant à 20 μg de protéine à une solution d'acétaldéhyde et de NAD^+ qui restent en excès pendant toute la mesure. La longueur du trajet optique de la cuve est de 1 cm et le volume final de la préparation est de 1 mL. À 340 nm, le coefficient d'extinction molaire de NADH est de 6220 $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}$. Après 2 min, l'absorbance enregistrée passe de 0 à 0,311. (2pt)

1-

Activité spécifique = Activité enzymatique / masse de protéine

Rendement = Activité totale / Activité totale avant l'étape de purification

Taux de purification = Activité spécifique / activité spécifique avant l'étape de purification

Etape de purification	Rendement (%)	T purification
Lysat <i>E. coli</i>	100	1
Eluat colonne DEAE-Sephacel	43	13,8
Eluat chromato affinité HAP	40	21,4
Précipitation (NH ₄) ₂ SO ₄	28	35,4
Eluat colonne Q-Sepharose	20	47,9
Eluat colonne 5'-AMP-Sepharose	14	???

2- Calculez l'activité spécifique de la préparation à ce stade de purification et déduisez en le taux de purification final. Complétez le tableau concernant l'activité enzymatique de cette préparation.

Réponse 3 :

Absorption à 340 nm pour NADH seulement (NAD⁺ à 260 nm), augmentation de DO de 0,311 correspond à la production de NADH.

Loi de Beer-Lambert : $\Delta DO = \epsilon \cdot l \cdot C \rightarrow C = \Delta DO / \epsilon \cdot l$
 $\rightarrow C_{\text{NADH}} = 0,311 / (6220 \cdot 1) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Soit pour 1 mL de solution : $5 \cdot 10^{-5} \cdot 10^{-3} = 5 \cdot 10^{-8}$ mole de NADH produit
 \rightarrow donc consommation d'autant de mole de CH₃CHO en 2 min, soit $2,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$.

La réaction se fait sur 20 µg de protéines soit $2 \cdot 10^{-2}$ mg.
 $AS = 2,5 \cdot 10^{-8} / 2 \cdot 10^{-2} = 1,25 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} = 1,25 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$

Etape de purification	Protéines (mg)	Activité enzymatique (U)	Activité spécifique (U.mg ⁻¹)	T purification
Lysat <i>E. coli</i>	11250	175	0,015	1
Eluat colonne 5'-AMP-Sepharose	20	25	1,25	80,4