

Purification des enzymes :

Rôles :

$$\text{Activité Spécifique} = \frac{\text{Activité totale}}{m \text{ protéine}}$$

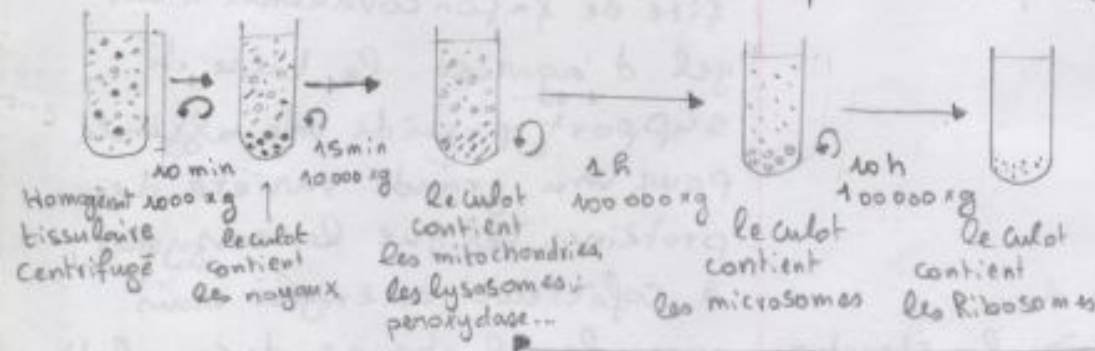
$$\text{Rendement} = \frac{\text{Activité totale étape X}}{\text{Activité totale de départ}} \times 100$$

$$\text{Facteur de Purification} = \frac{\text{AS étape X}}{\text{AS de départ}}$$

Ex : Purification de l'enz "CTP" à partir de mitochondries de foie de bœuf. L'enz est située dans la membrane interne de la mitochondrie.

a- Méthode d'isolement des mitochondries à partir d'un homogénat tissulaire de foie :

bœuf → sacrifice → dissection → prélèvement du foie → Homogénéité du foie



Les mitochondrie et les lysosomes contenu dans le culot & sont séparés par ultra-centrifugation à l'équilibre de densité

	Protéines (mg)	Activité totale (unités)	AS (unités/mg protéines)	Rendement
Extrait mitochondrial soluble	6982	405	0,058	100
Précipitation au sulfate d'ammonium	1425	85	0,059	20,98
chromatographie DEAE cellulose	687	44	0,064	10,86
Gel perméation	39	24	0,615	5,93
chromatographie sur bleu sépharose	2,95	16	5,43	3,95
chromatofocusing	0,33	7,92	24	1,955

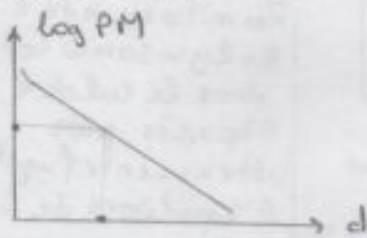
c) (Bon protocole \Rightarrow AS \uparrow \downarrow faible de R_x)

1/ Après précipitation au sulfate d'ammonium on a une perte importante de protéine associée à une baisse de l'activité totale ce qui explique un rendement très faible.

d) le 1^{er} renseignement qu'on peut tirer de l'exp 4 l'a ou on a obtenu 1 seule bande et que l'enzyme semblent pure \rightarrow bon purification.

* Les chaînes polypeptidiques dénaturer par le SDS migrent sur un gel d'acrylamide et sous l'influence d'un champ électrique parcourt une distance d.

Il faut donc tracer le graphe de $\log PM = f(d)$: ce qui permettrait d'évaluer la PM.



- On ne peut pas déduire la structure native de l'enzyme, il faudrait pour cela comparer les résultats pour ce type d'électrophorèse à celui donné. Par la mesure de la masse moléculaire après gel de filtration ou par gradient de saccharose.

e) **chromatofocusing** :

elle se base sur la séparation des protéines selon leur PH_i et elle s'applique sur une colonne (permet une excellente séparation des protéines ayant des PH_i voisins).

ou b1 : est une technique de séparation sur colonne en fonction du point isoélectrique. Il permet une excellente séparation des protéines au voisin du point isoélectrique (-1).

chromatographie sur bleu

Sépharose : est un support qui est constitué par un colorant le bleu de sibacron fixé de façon covalente à un gel d'agarose. Le type de support possède une affinité pour une grande variété des protéines tel que les enzymes à cofacteur adénylé mais aussi les facteurs de coagulation \Rightarrow type de chr d'affinité.