

TP BC 4 : chromatographie électrophorèse

BCPST, Lycée Hoche

Programme officiel

Nature, propriétés et techniques d'études des biomolécules (1 séance)	- réalisation d'une électrophorèse de protéines en conditions native et dénaturante - mise en évidence de l'existence de différents niveaux structuraux - chromatographie de pigments photosynthétiques de Chlorophyte et de Rhodophyte - analyse d'un résultat de blot (Western blot)
---	--

I. Electrophorèse

Electrophorèse en condition non dénaturantes

Migration en fonction de :

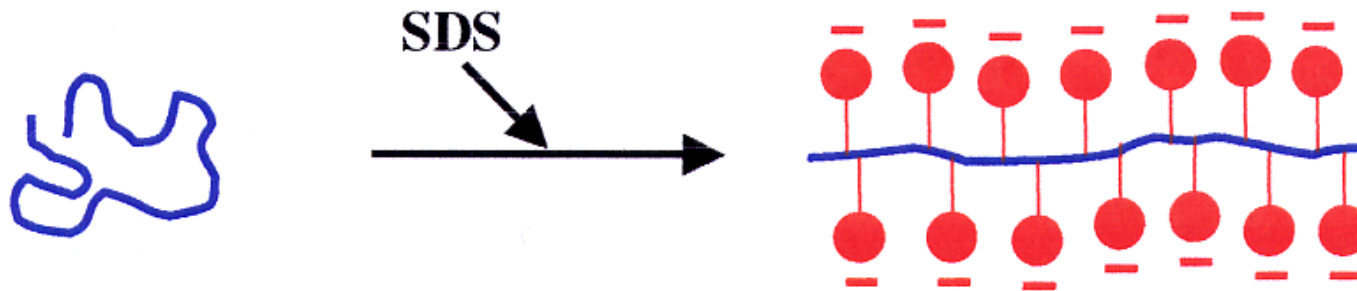
- la **charge**
- la taille ou masse
- la forme 3D (conformation)

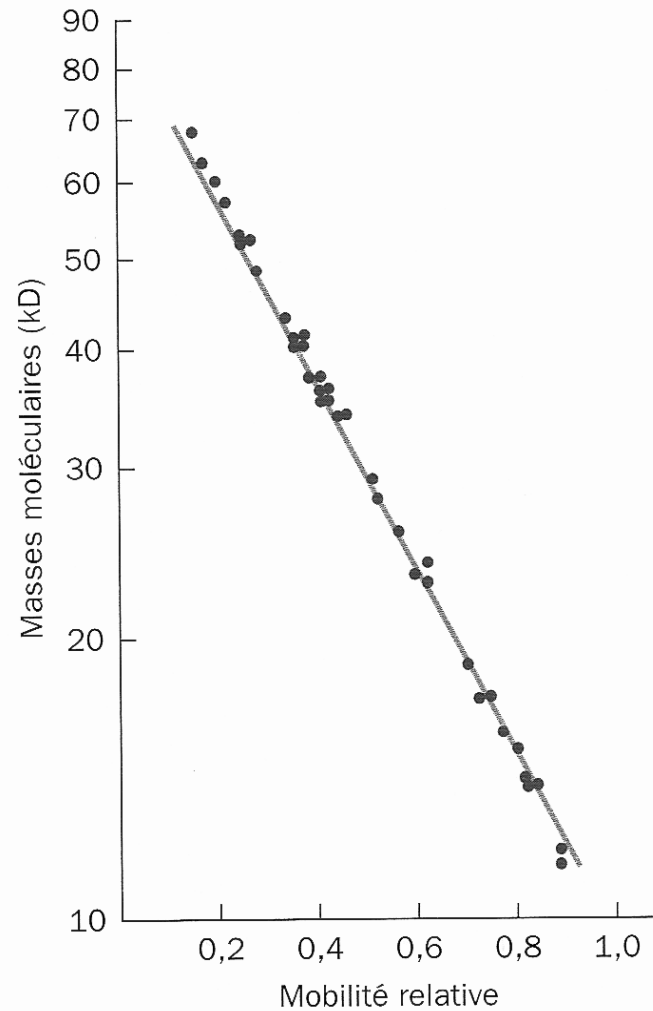
Electrophorèse en condition dénaturantes

Migration en fonction de la masse

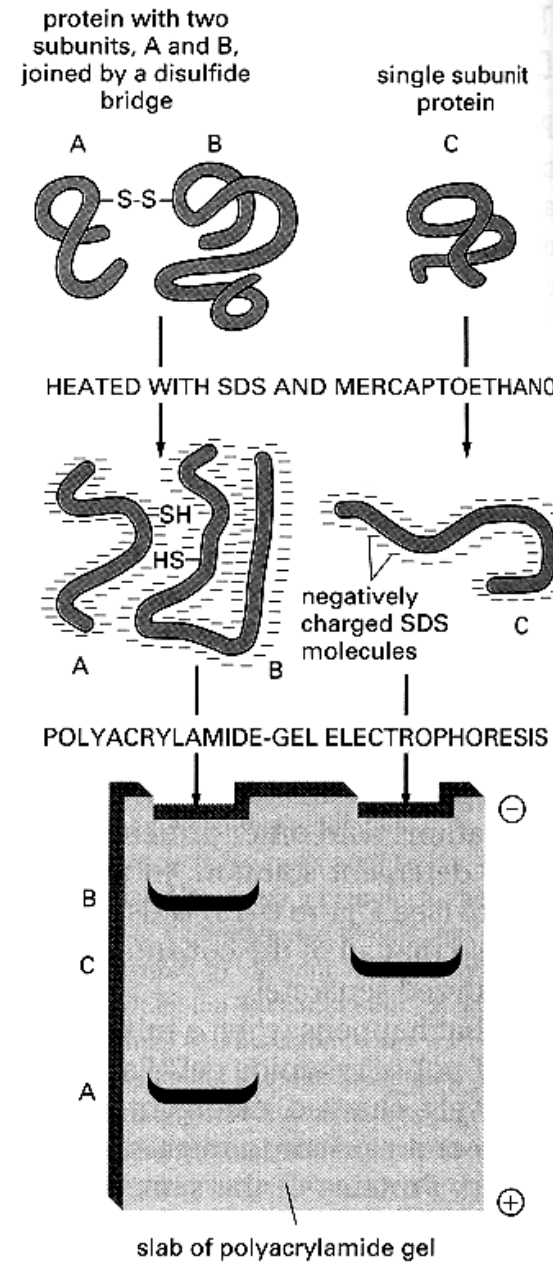
Electrophorèse en conditions dénaturantes

Température élevée : dénaturation
 β -mercaptoéthanol : élimination des ponts di-sulfures
SDS : charges négatives homogènes



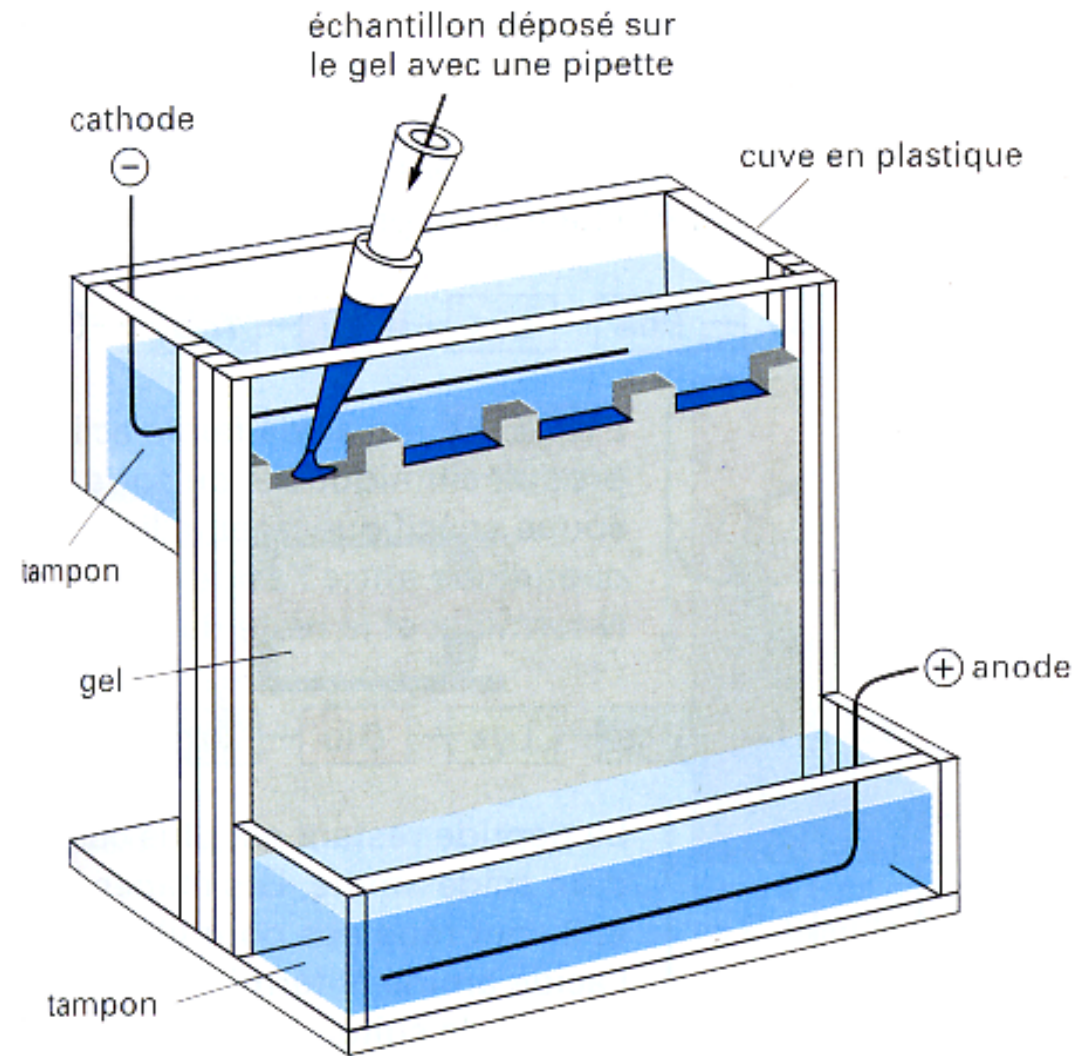


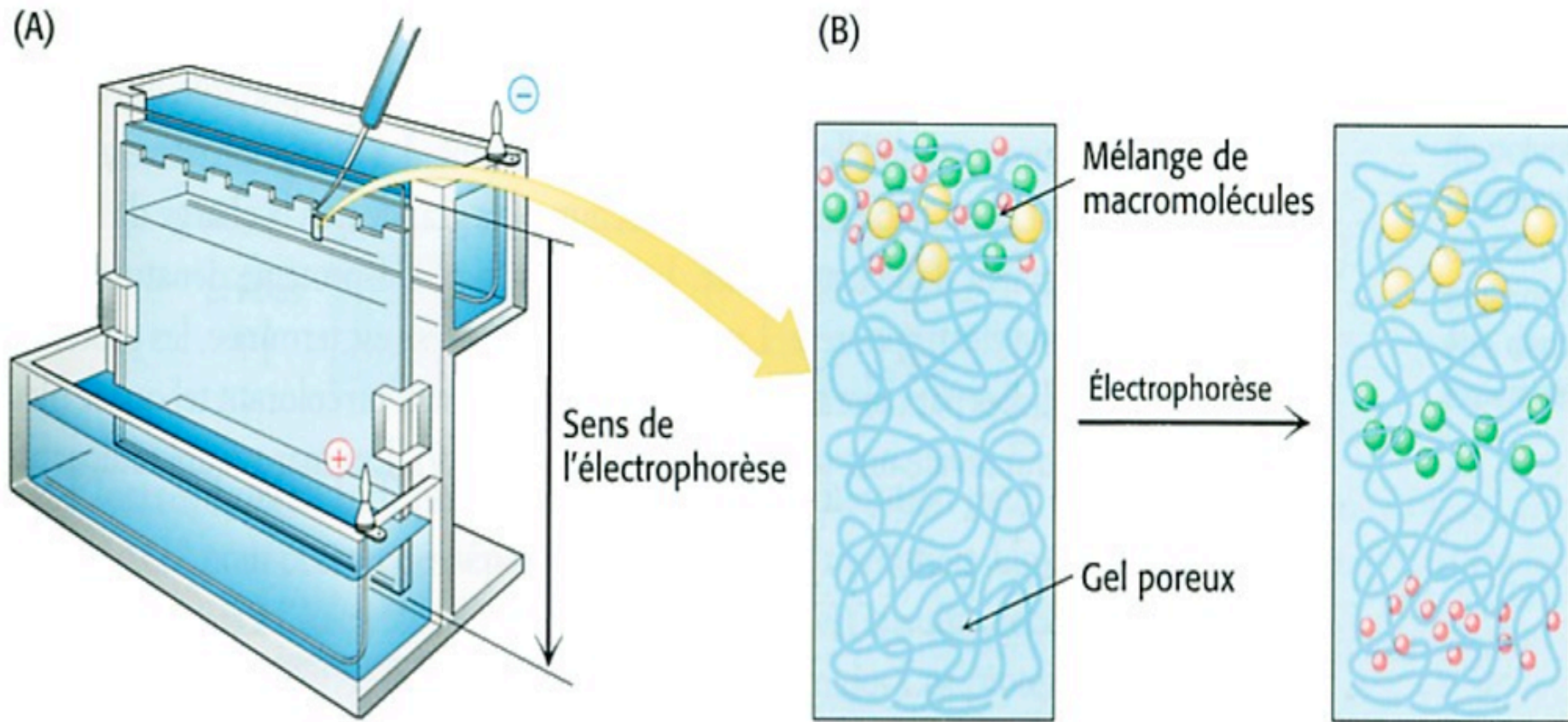
Relation logarithmique entre la masse moléculaire d'une protéine et sa mobilité électrophorétique relative en SDS-PAGE. Cette relation est portée en graphique pour 37 polypeptides allant de 11 à 70 kD. [D'après Weber, K. et Osborn, M., *J. Biol. Chem.* **244**, 4406 (1969)]



Electrophorèse en conditions dénaturantes

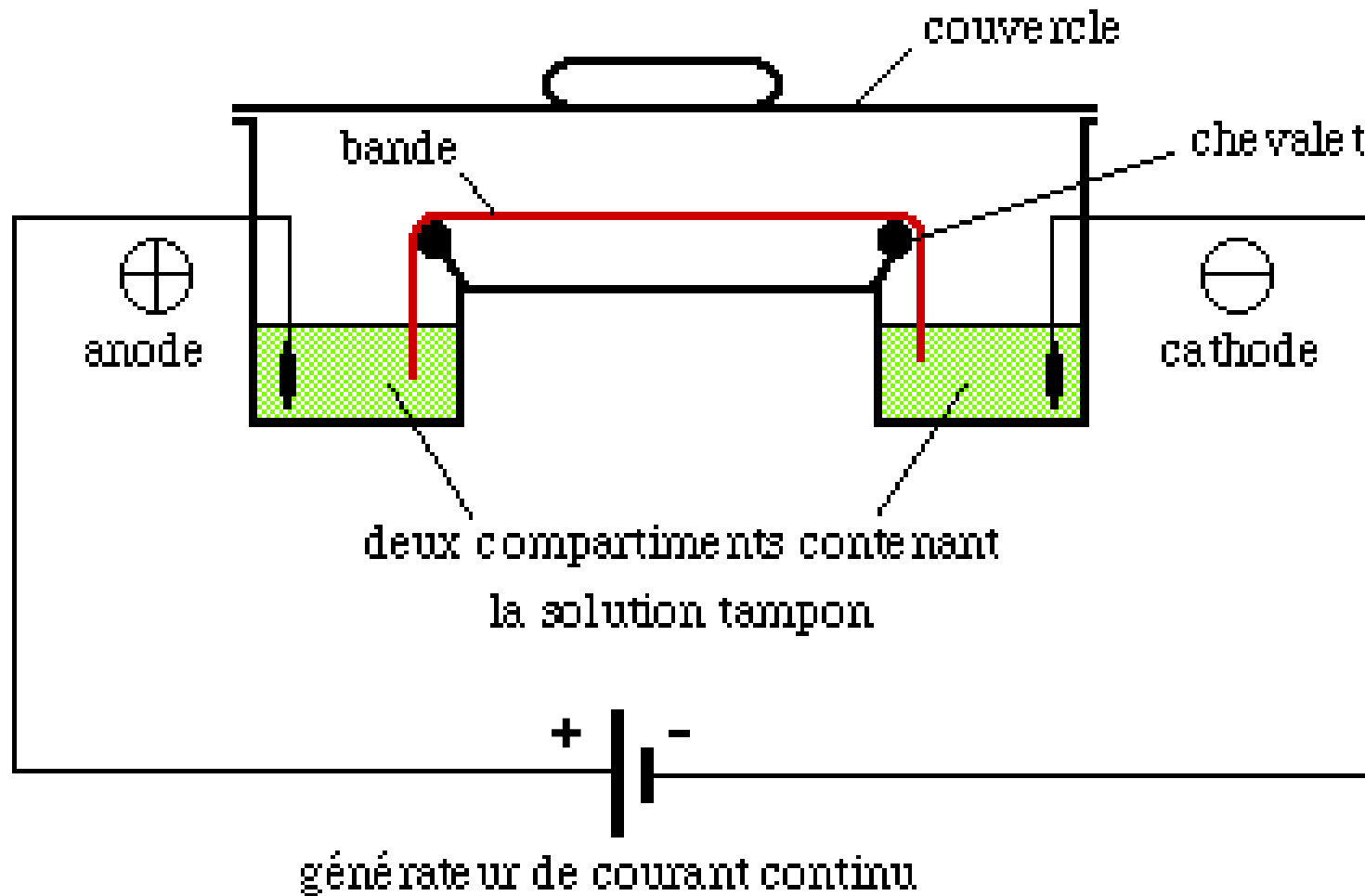
SDSpage

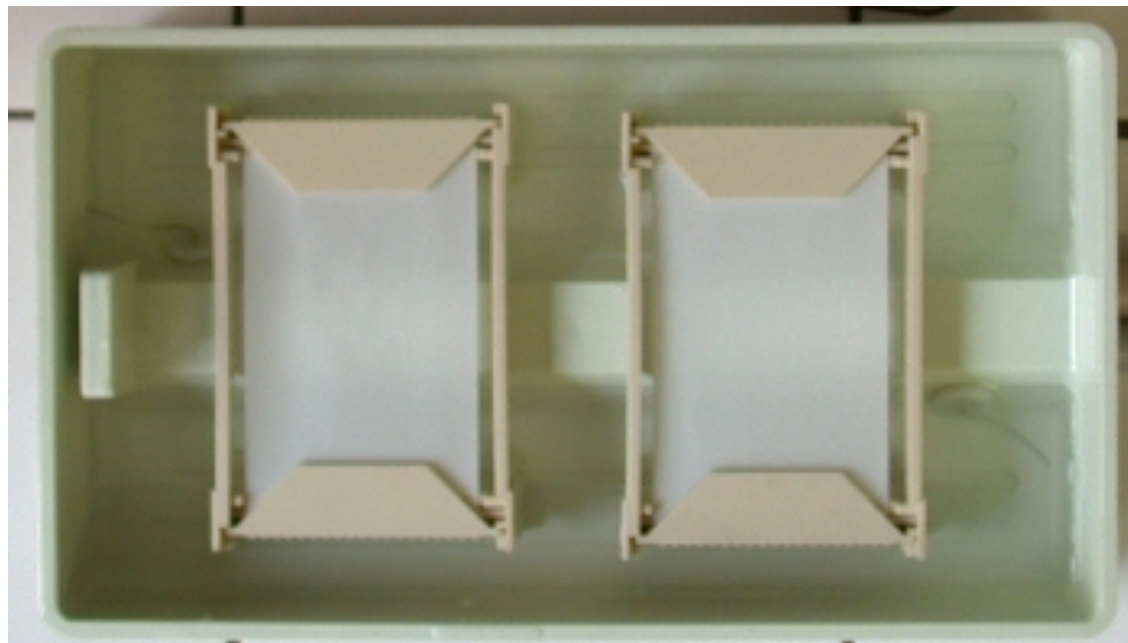




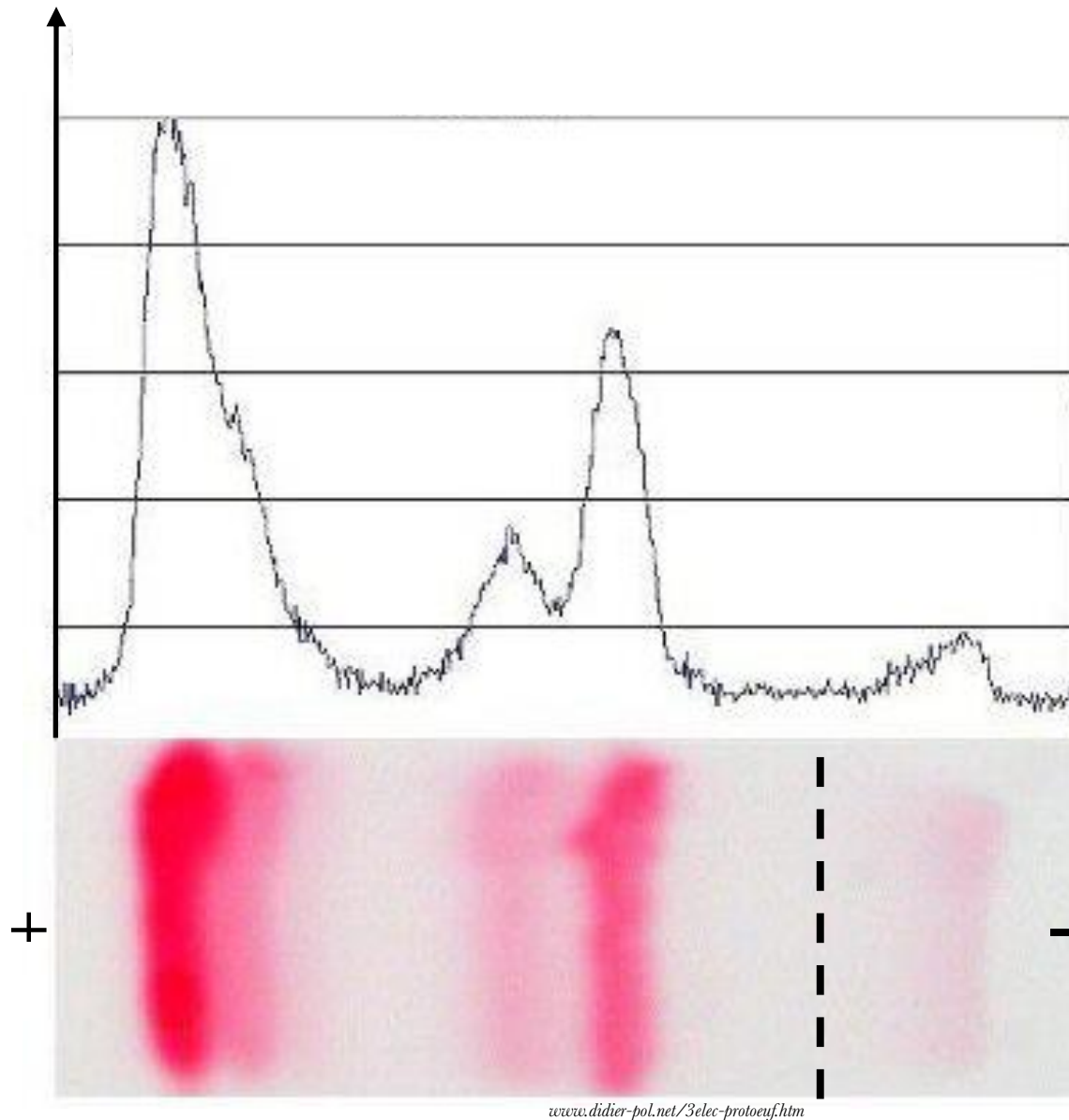
Électrophorèse sur gel de polyacrylamide. (A) Appareil d'électrophorèse sur gel. Typiquement, plusieurs échantillons sont soumis à électrophorèse sur une plaque de gel de polyacrylamide. Un pipette graduée en microlitres est utilisée pour déposer les solutions de protéine dans les puits de la plaque. Un couvercle est ensuite placé sur la chambre du gel et une différence de potentiel est appliquée. Les complexes SDS (sodium dodécyl sulfate)-protéine chargés négativement migrent vers l'anode située à la partie inférieure du gel. (B) L'action de tamisage du gel poreux de polyacrylamide sépare les protéines en fonction de leur taille ; les plus petites se déplacent le plus rapidement.

Electrophorèse en conditions natives sur bande





Document E – résultat de l'électrophorèse en conditions natives sur bande



Profil densitométrique de la bande
d'électrophorèse en conditions
natives

(effectuée avec le logiciel Mesurim)

Résultat de l'électrophorèse en
conditions natives après coloration
au Rouge Ponceau

Le trait en pointillés indique la ligne
de dépôt.

TP au concours agro : utilisation d'un pipetman

Ajustement du volume

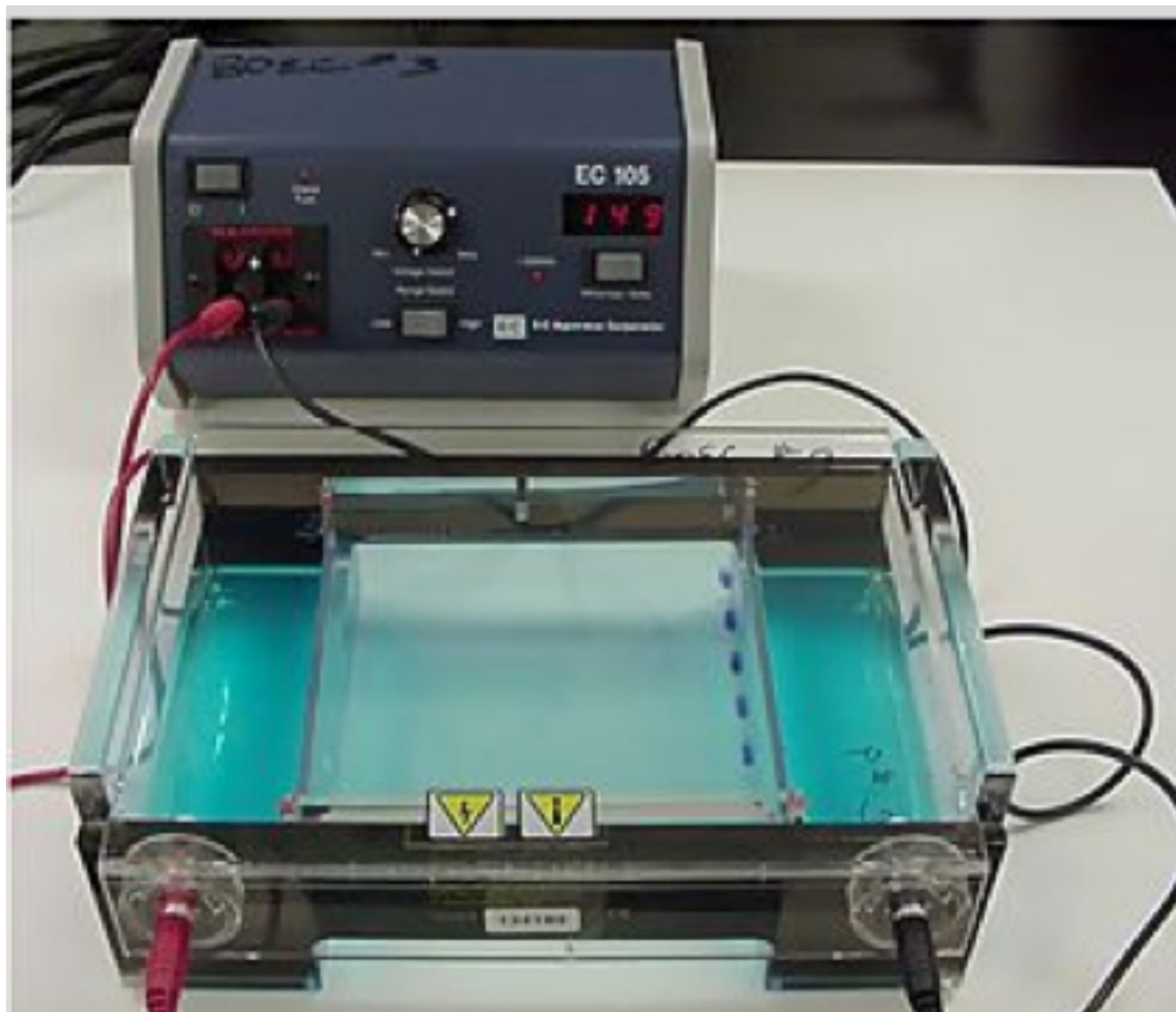


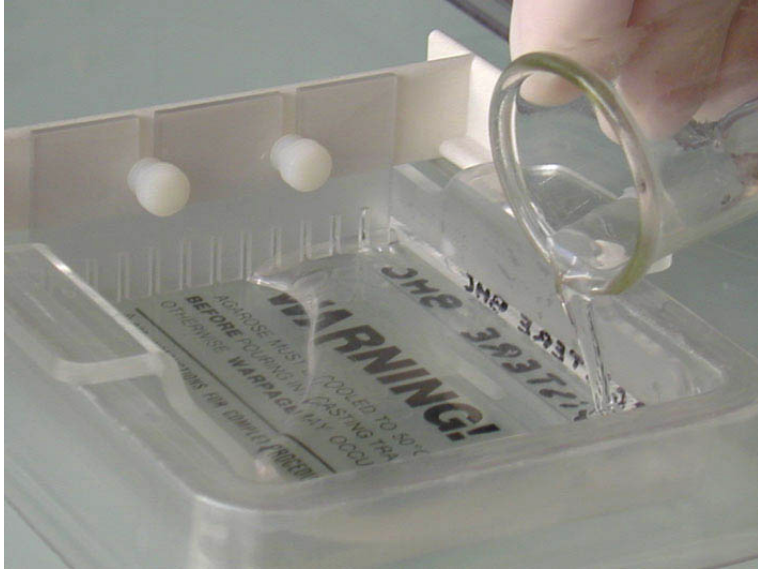
Bouton poussoir : 2 crans

Éjection du cône

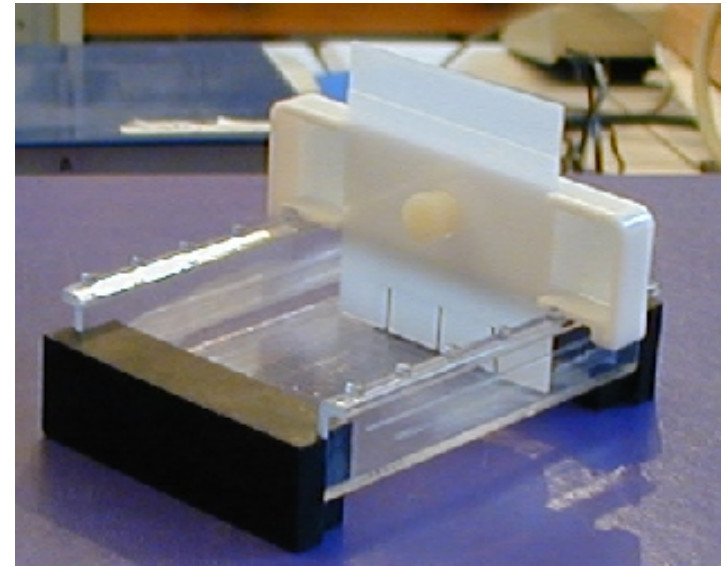
Pour prélever : appuyer jusqu' au premier cran

Pour déposer dans le puit : appuyer jusqu' au deuxième cran pour expulser toute la solution, sans expulser d' air.

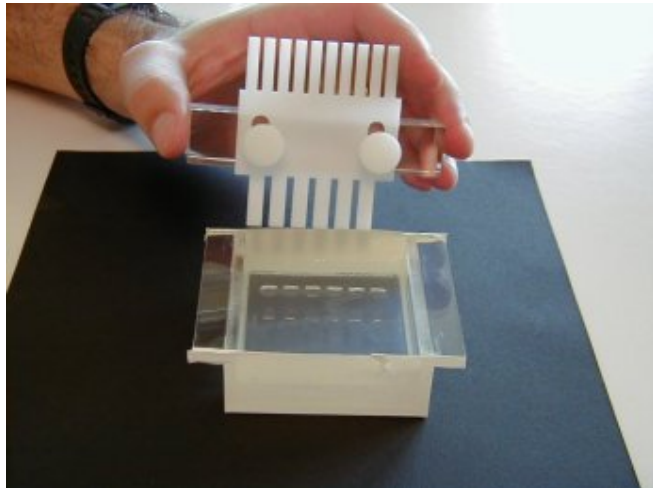




Univ-rouen



(Sny jussieu)

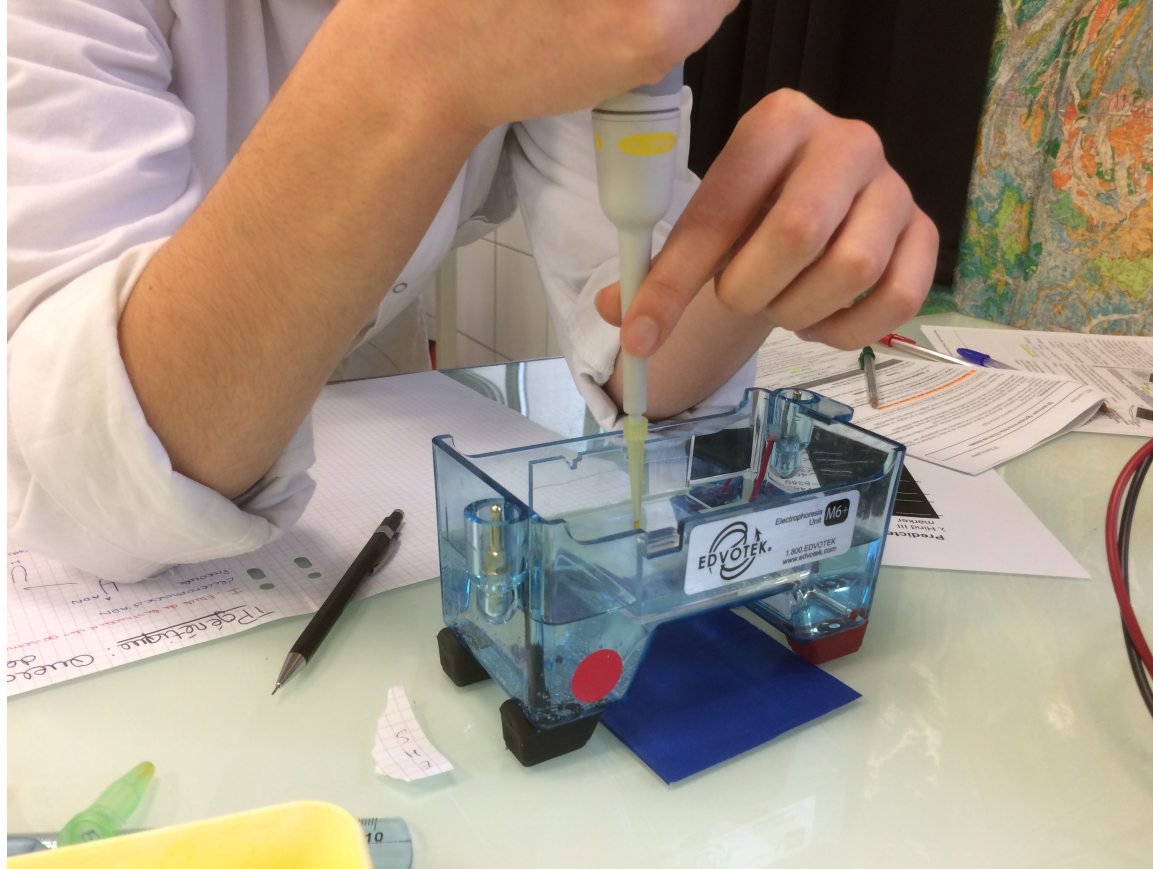


Ac-nancy

puits

TP au concours agro : dépôts dans les puits du gel

Coudes posés



canson noir sous le gel

Electrophorèse de blanc d'oeuf en conditions natives

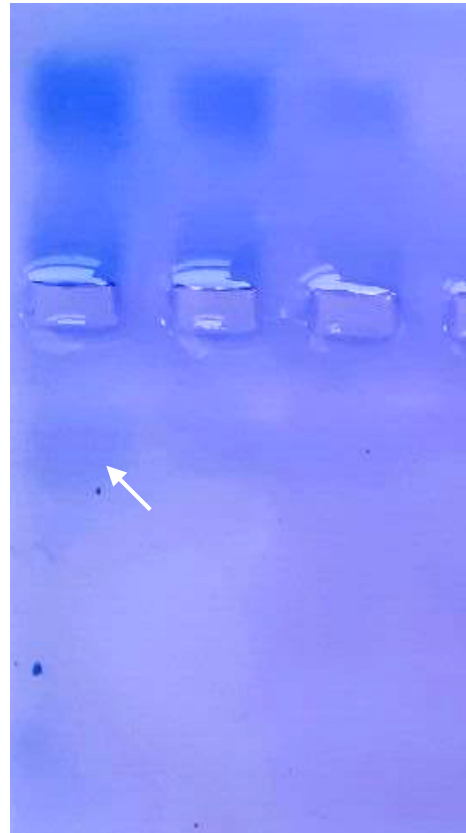
Dilutions

1

1/2

1/4

Borne +



Borne -

Identifier la protéine pointée d'une flèche blanche.

Electrophorèse de blanc d'oeuf en conditions dénaturantes

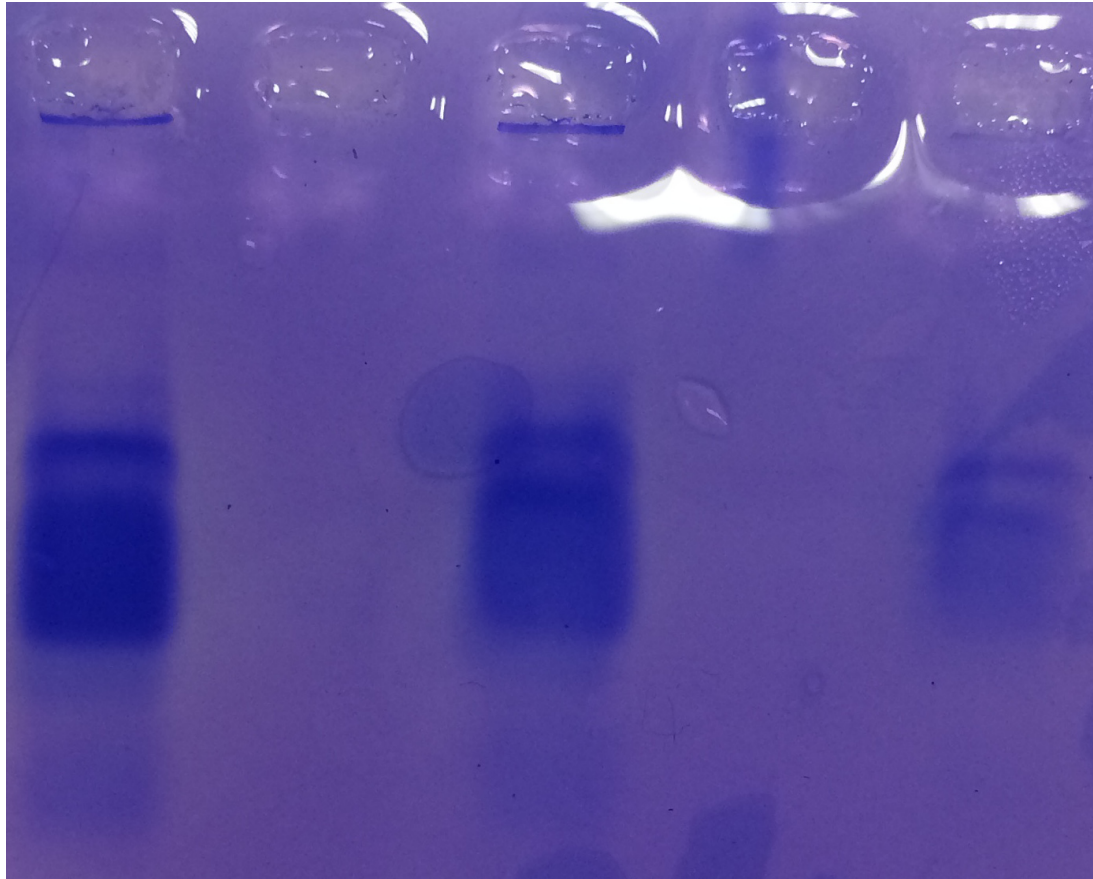
Dilutions

1

1/2

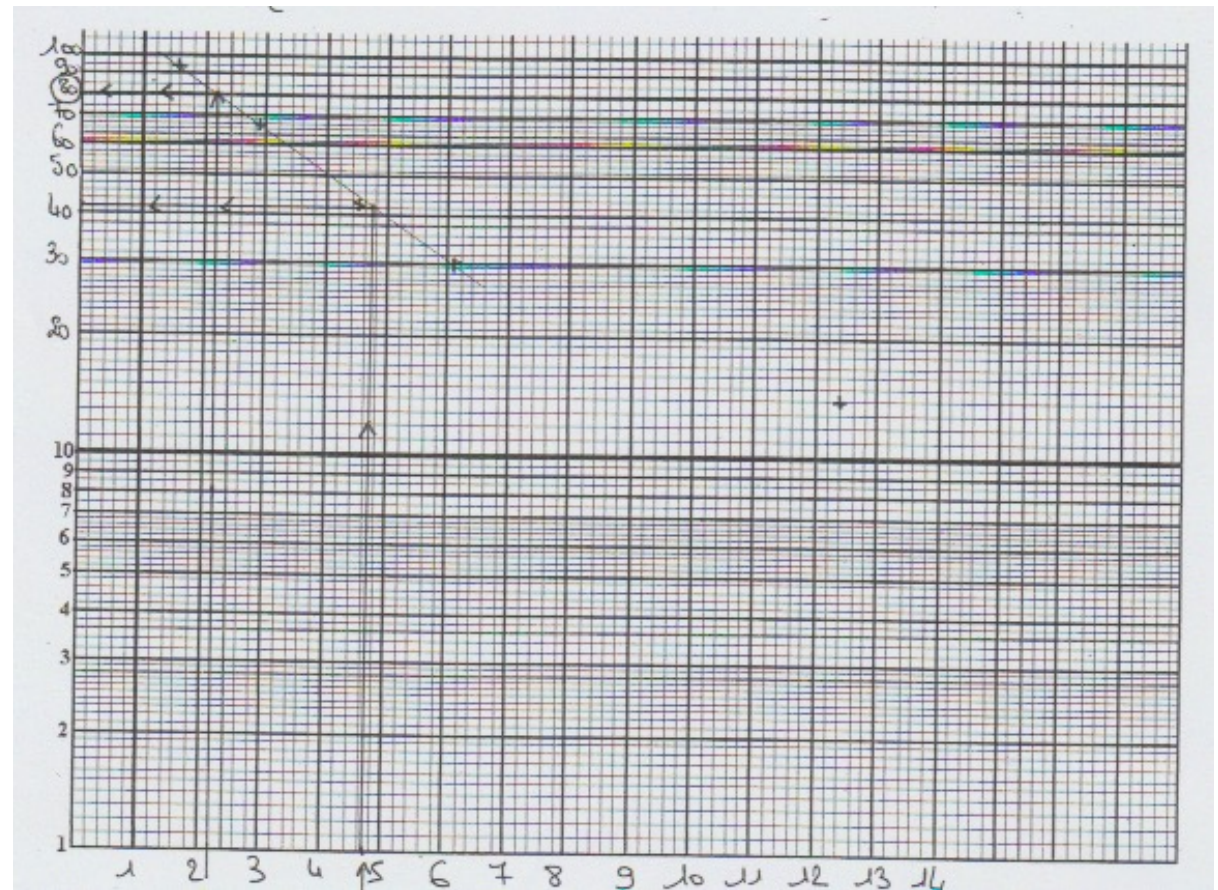
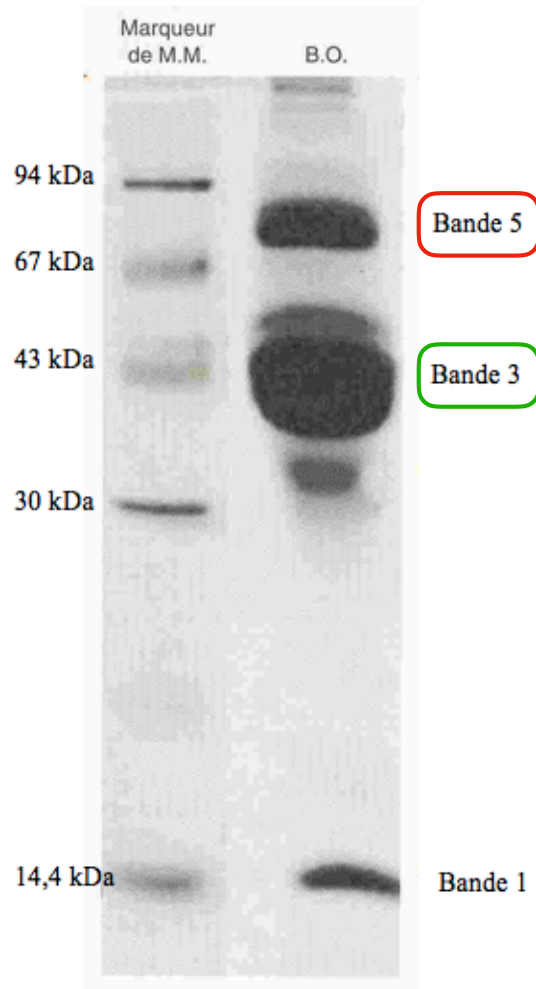
1/4

Borne -



Borne +

Masse moléculaire en kDa



Bande 5 : 2,2cm, $\pm$ 80 kDa

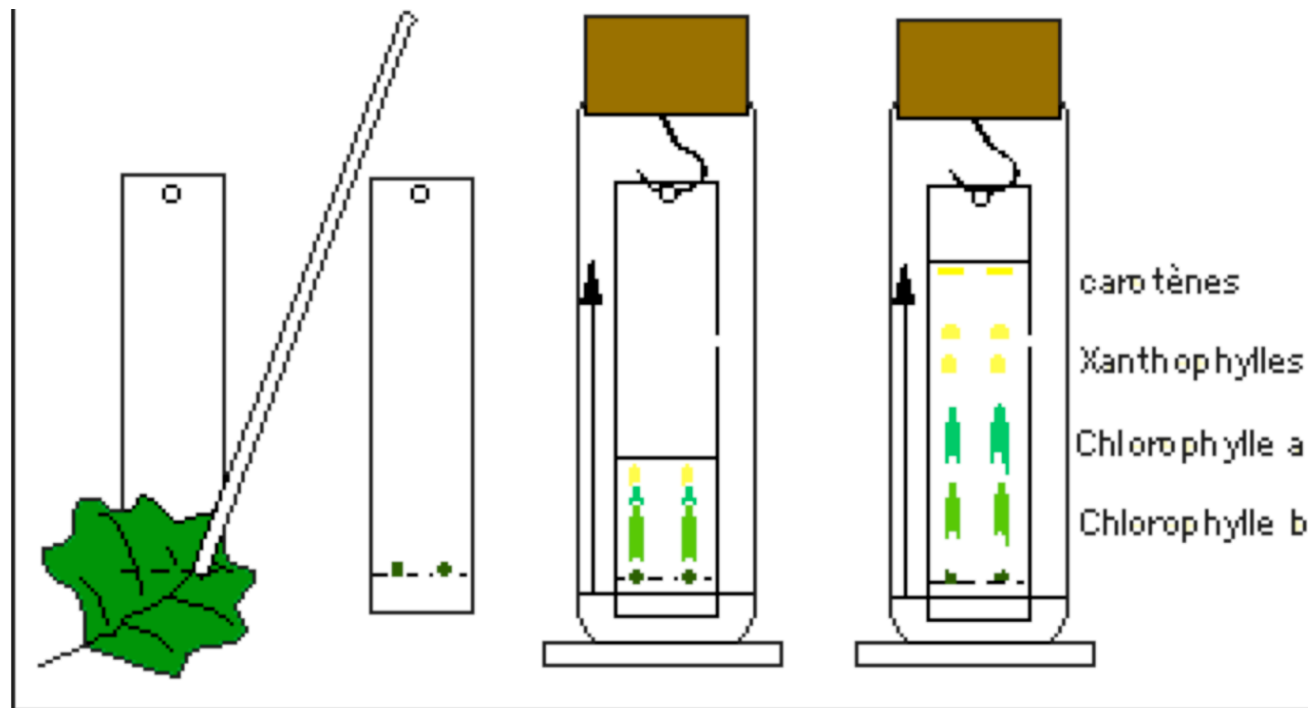
Bande 3 : 4,7cm, $\pm$ 42 kDa

**Distance de
migration en cm**

	Masse moléculaire (Da)	pH isoélectrique	Pourcentage massique de l'extrait sec	Fonction biologique
ovalbumine	46000	4,6	58%	Agent gélifiant Réserve d'acides aminés
ovotransferrine (conalbumine)	82000	6,5	14%	Complexe des ions métalliques Inhibiteur de bactéries
ovomucoïde	28000	5,6	11%	Inhibiteur de protéase (trypsine)
lysozyme	14300	11	7%	Hydrolyse du peptidoglycane de la paroi bactérienne => lyse des bactéries

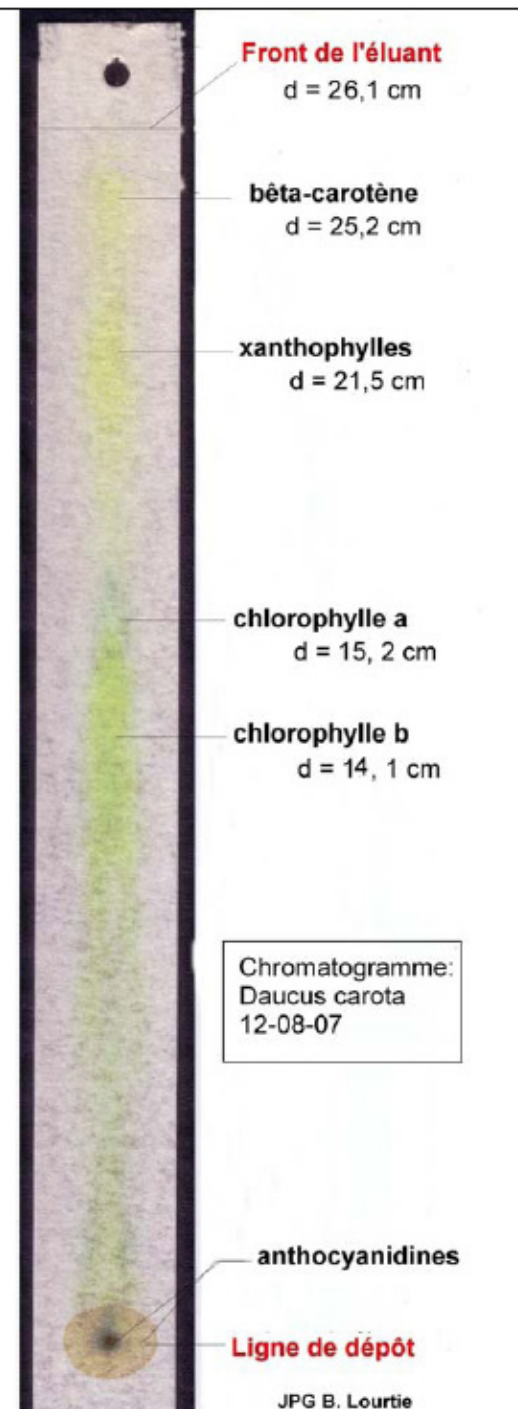
I. Chromatographie

Chromatographie sur papier



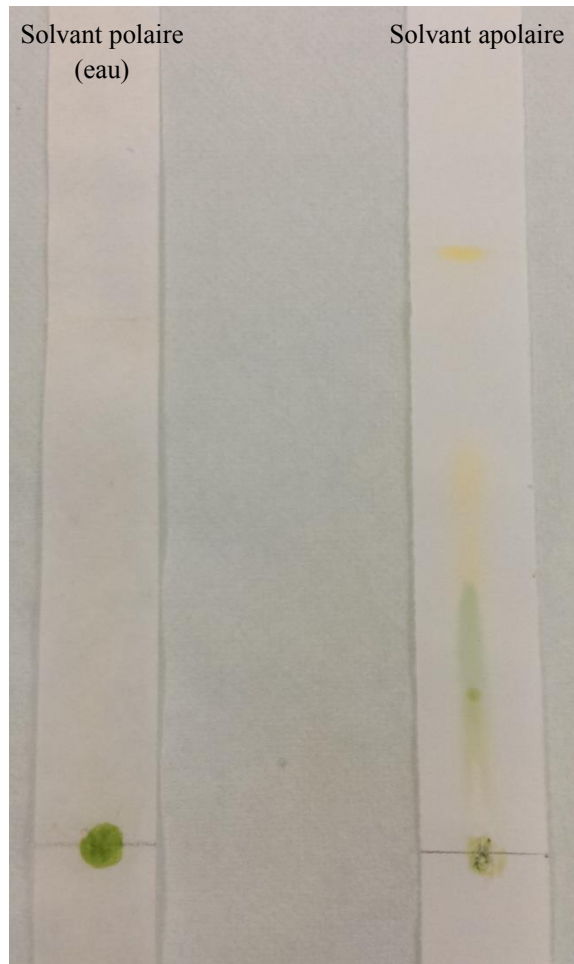
Chromatogramme

témoin : feuilles de carotte



Résultats des chromatographies

Chromatographie de pigments d'épinard

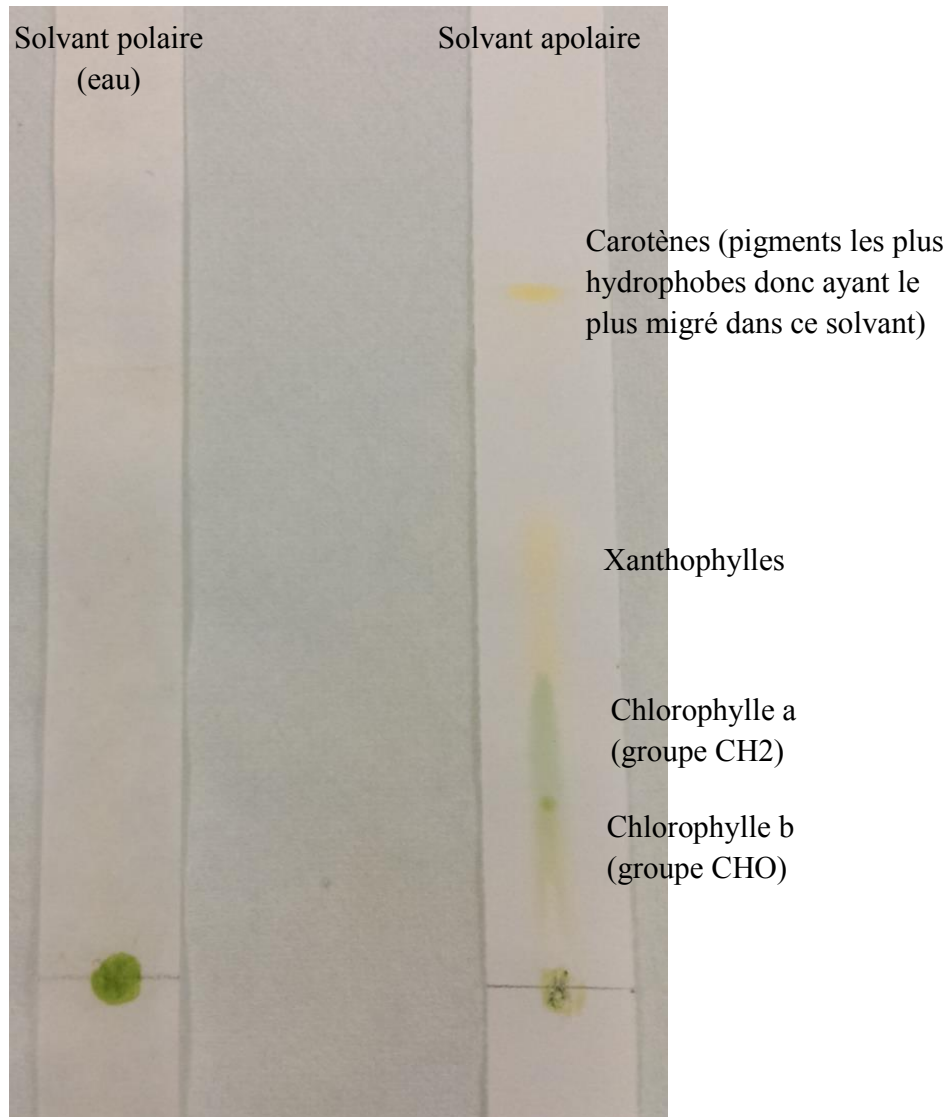


Chromatographie de pigments d'algue rouge (*Polysiphonia*)

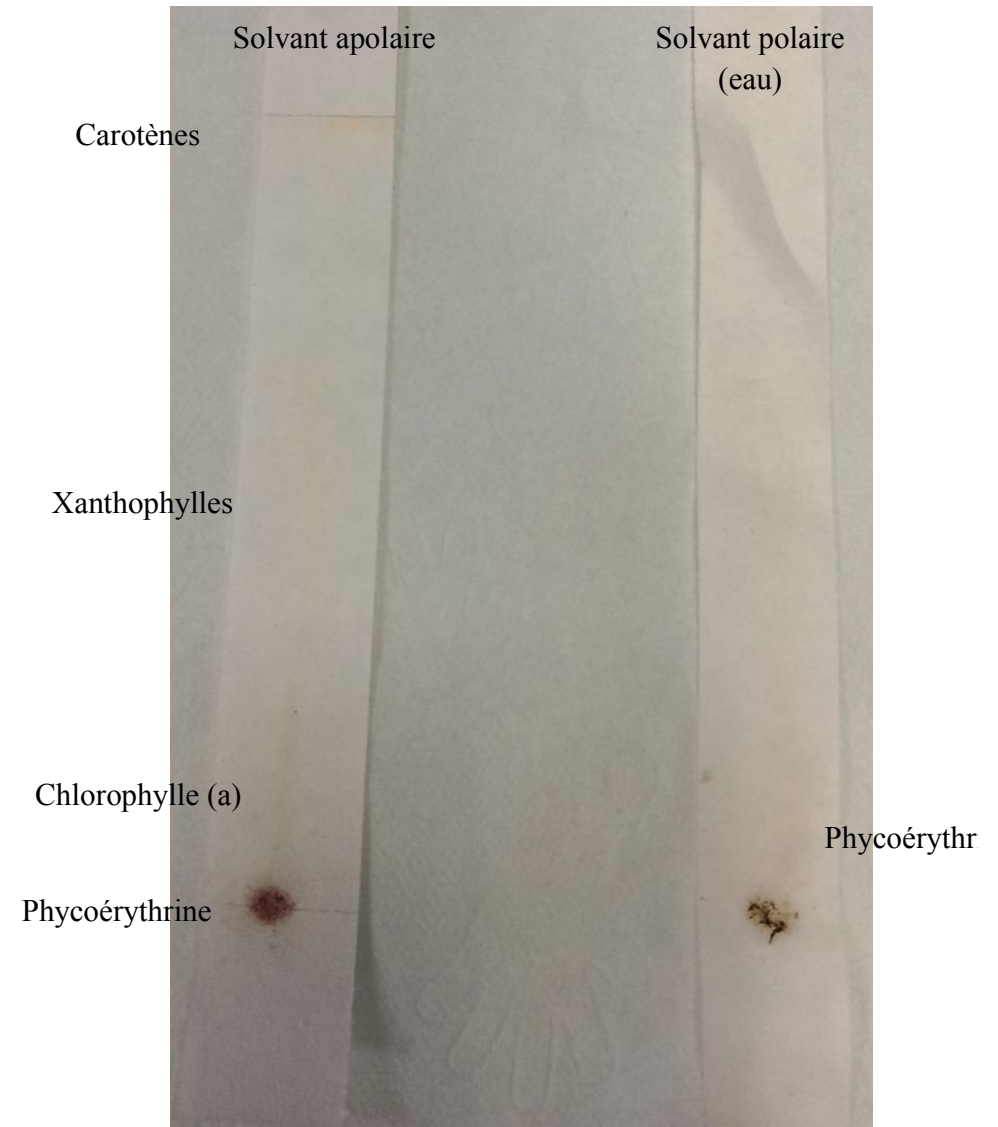


Identifier les pigments d'après leurs formules chimiques

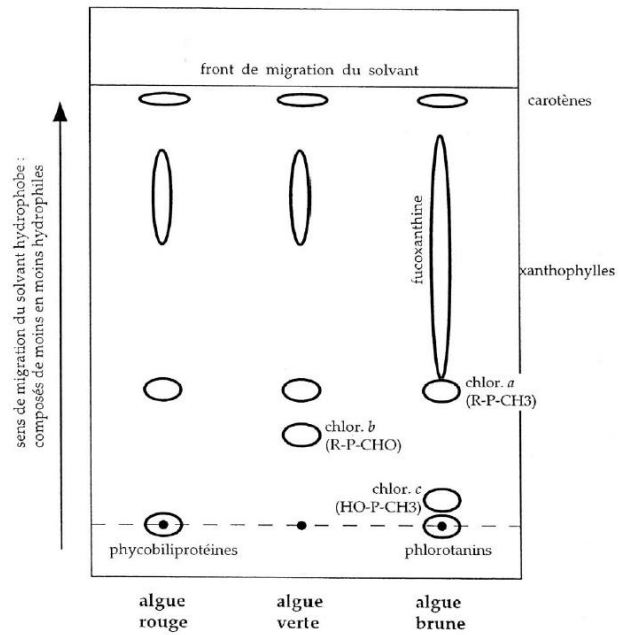
Chromatographie de pigments d'épinard



Chromatographie de pigments d'algue rouge (*Polysiphonia*)

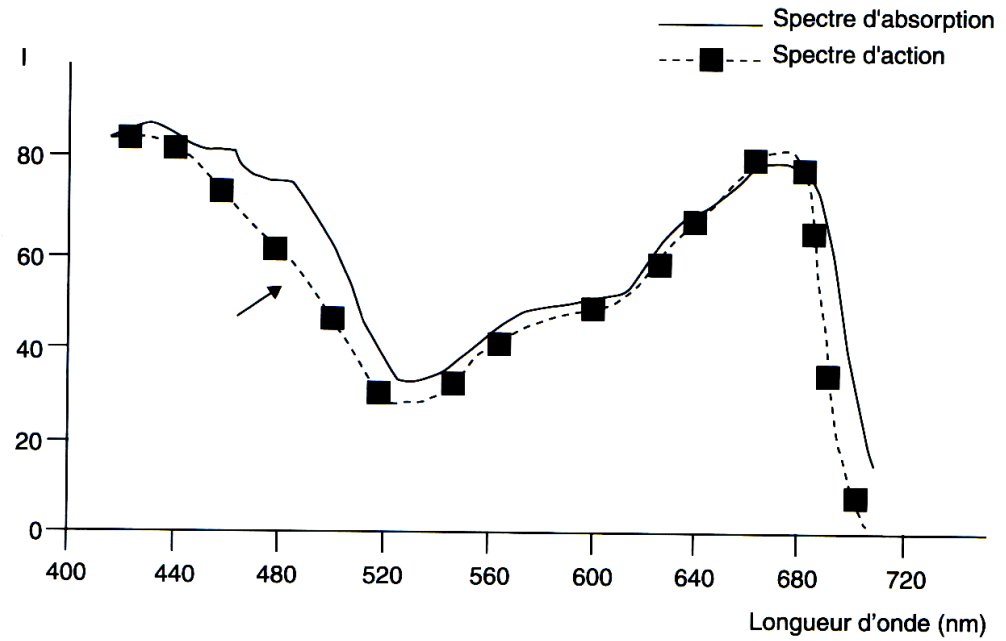
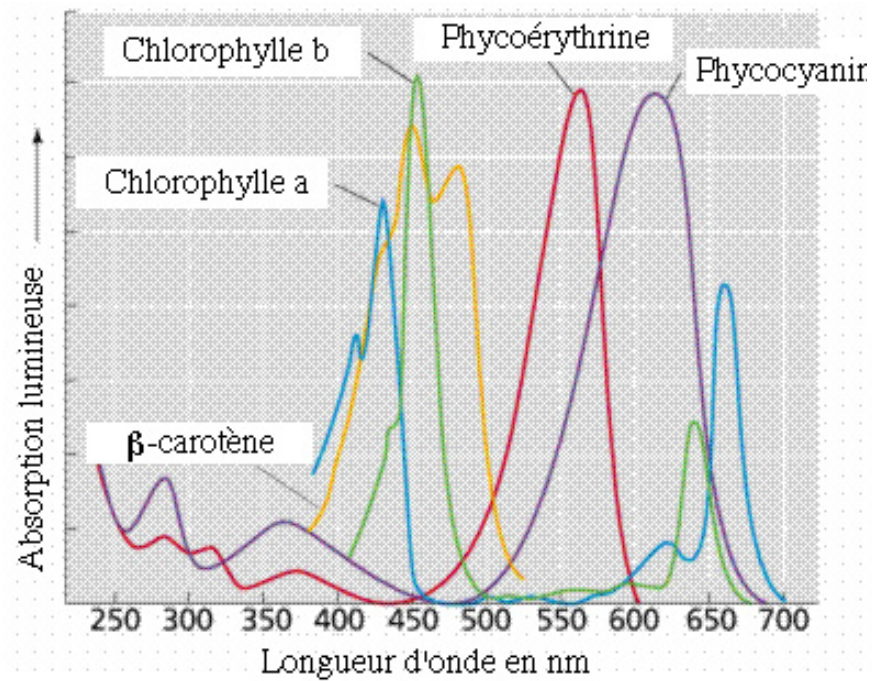


Résultats théoriques des chromatographies de partage des pigments végétaux

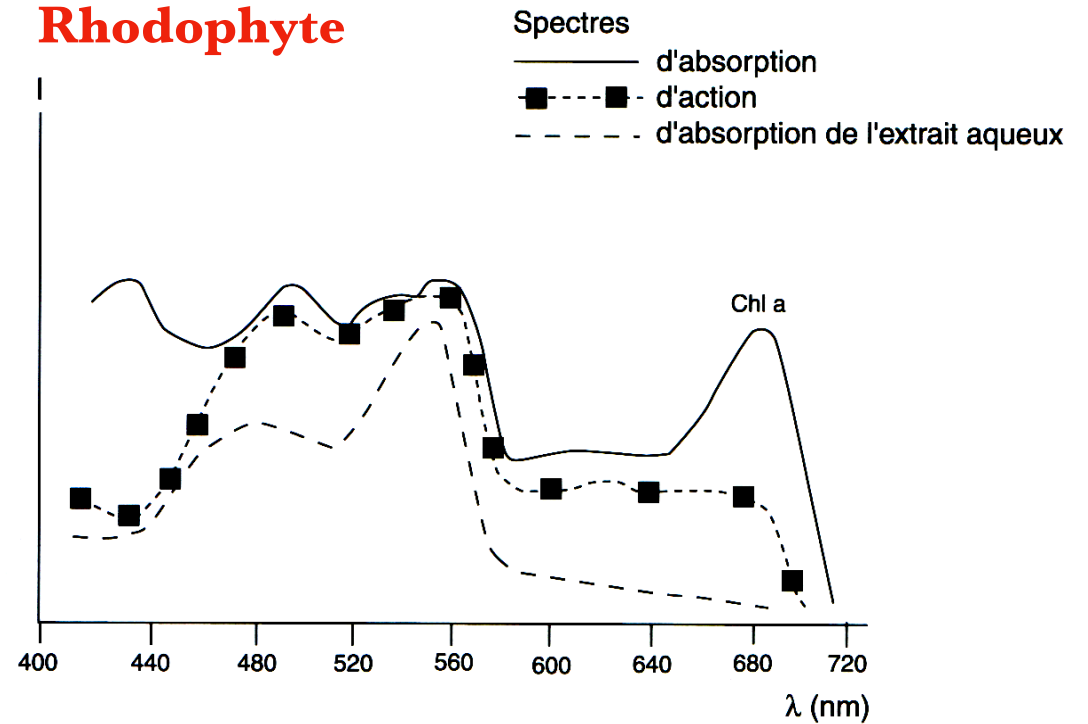


Selosse APBG 2000

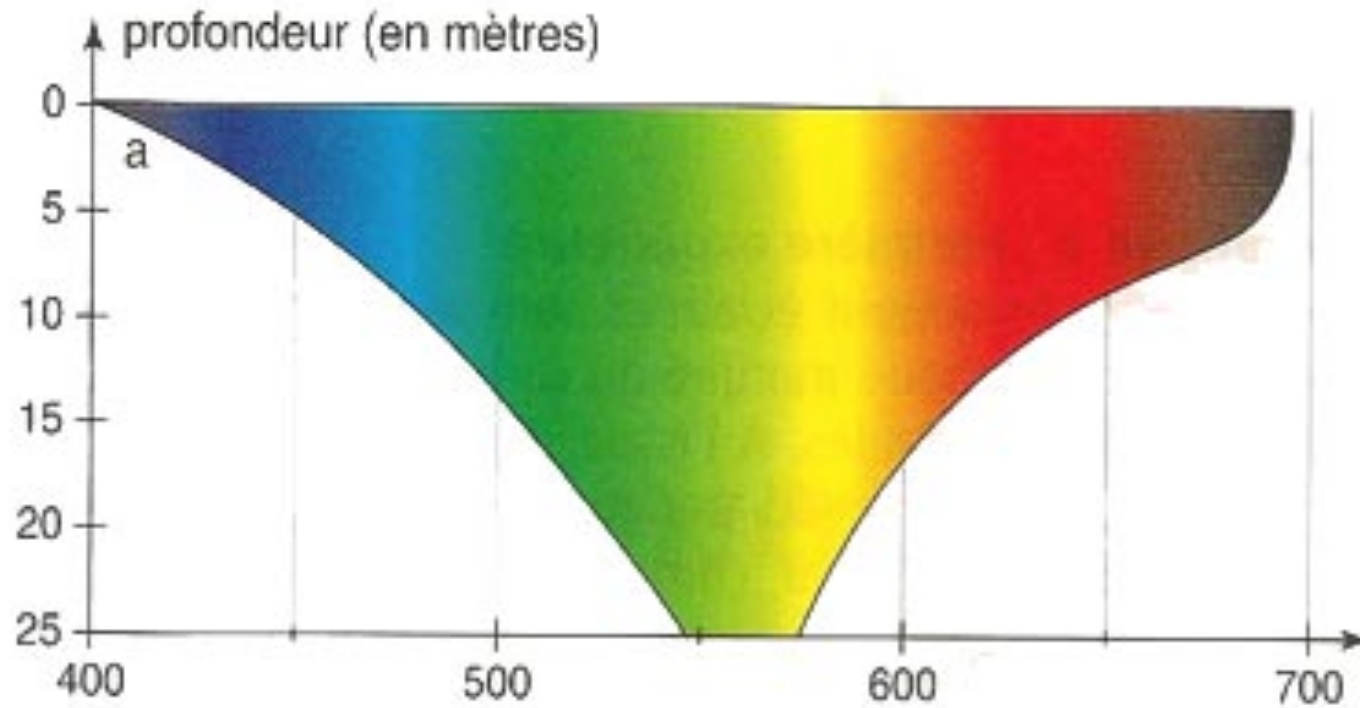
Chlorophyte



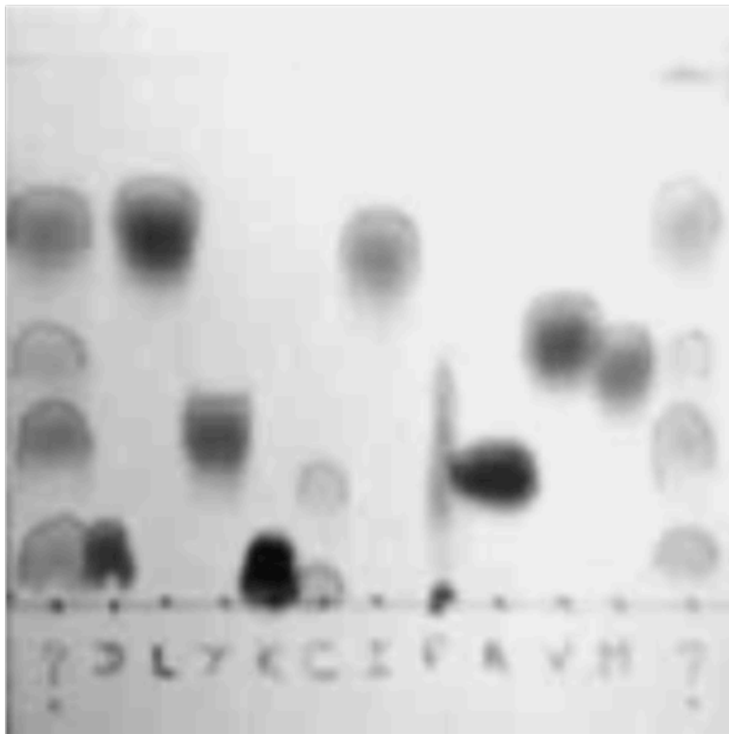
Rhodophyte



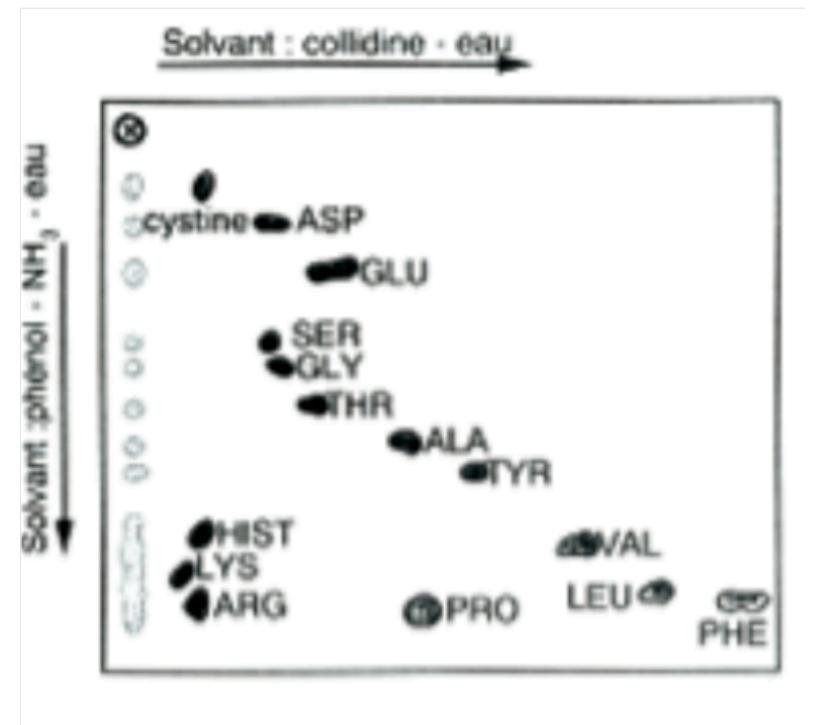
Le rayonnement solaire est absorbé par l'eau, mais cette absorption n'est pas égale pour toutes les longueurs d'onde.



Chromatographie sur papier d'acides aminés



unidimensionnelle



bidimensionnelle

Chromatographie sur colonne

