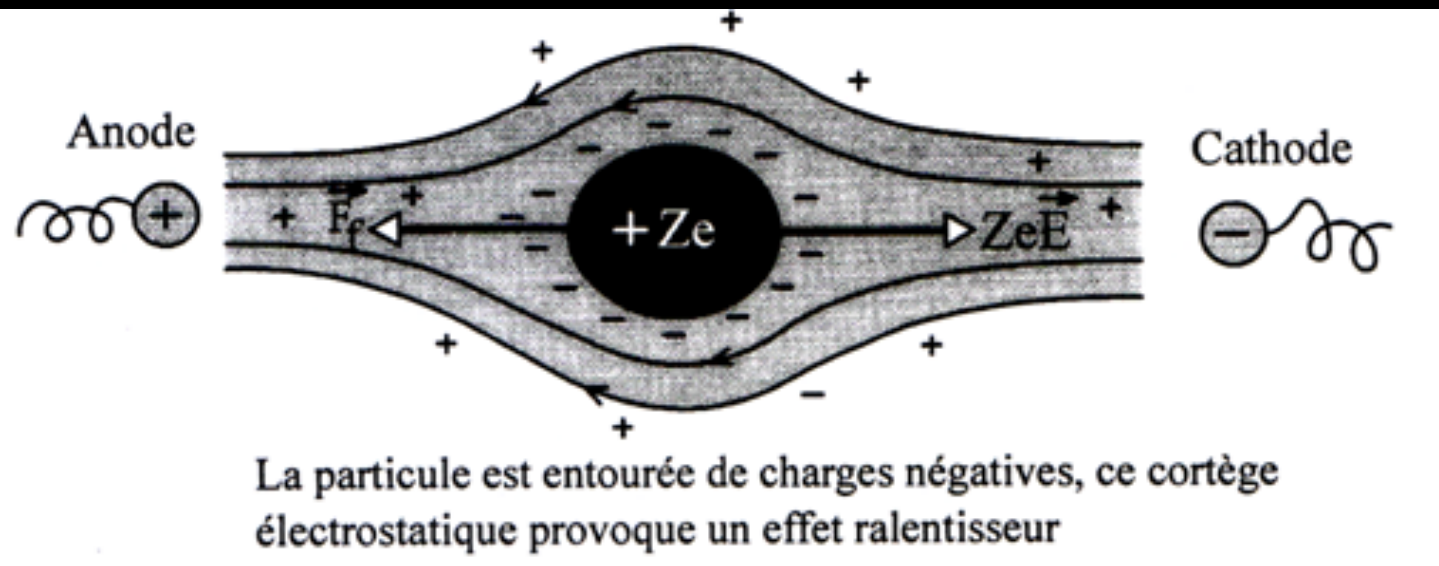


# Thème SV-D TP



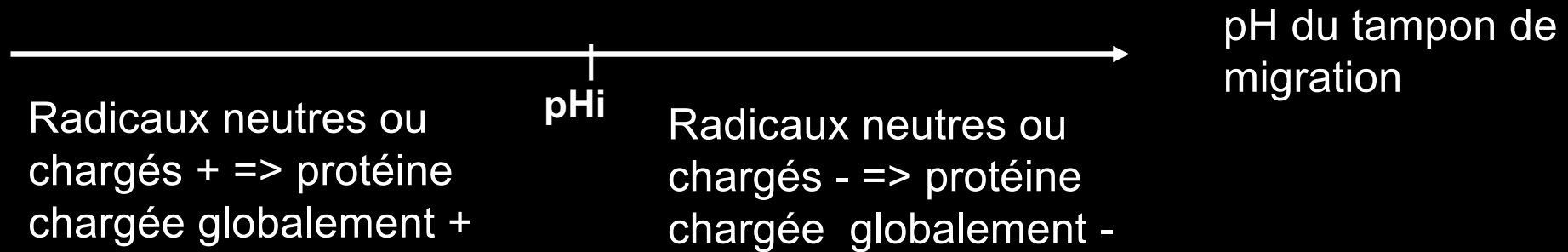
**Séparation de protéines du blanc  
d'oeuf par électrophorèses**

## Principe de l'électrophorèse

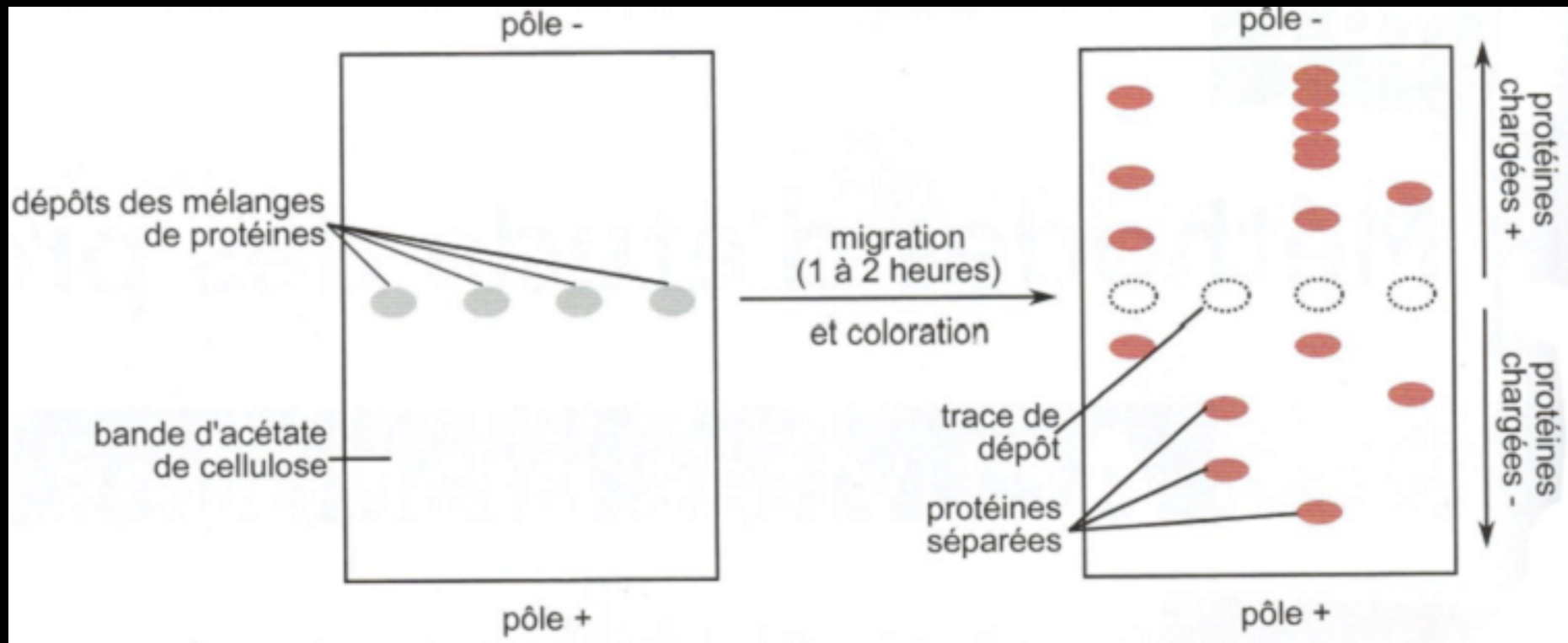


## *Electrophorèse en conditions natives*

**pH isoélectrique = pH auquel la charge globale de la protéine est nulle**

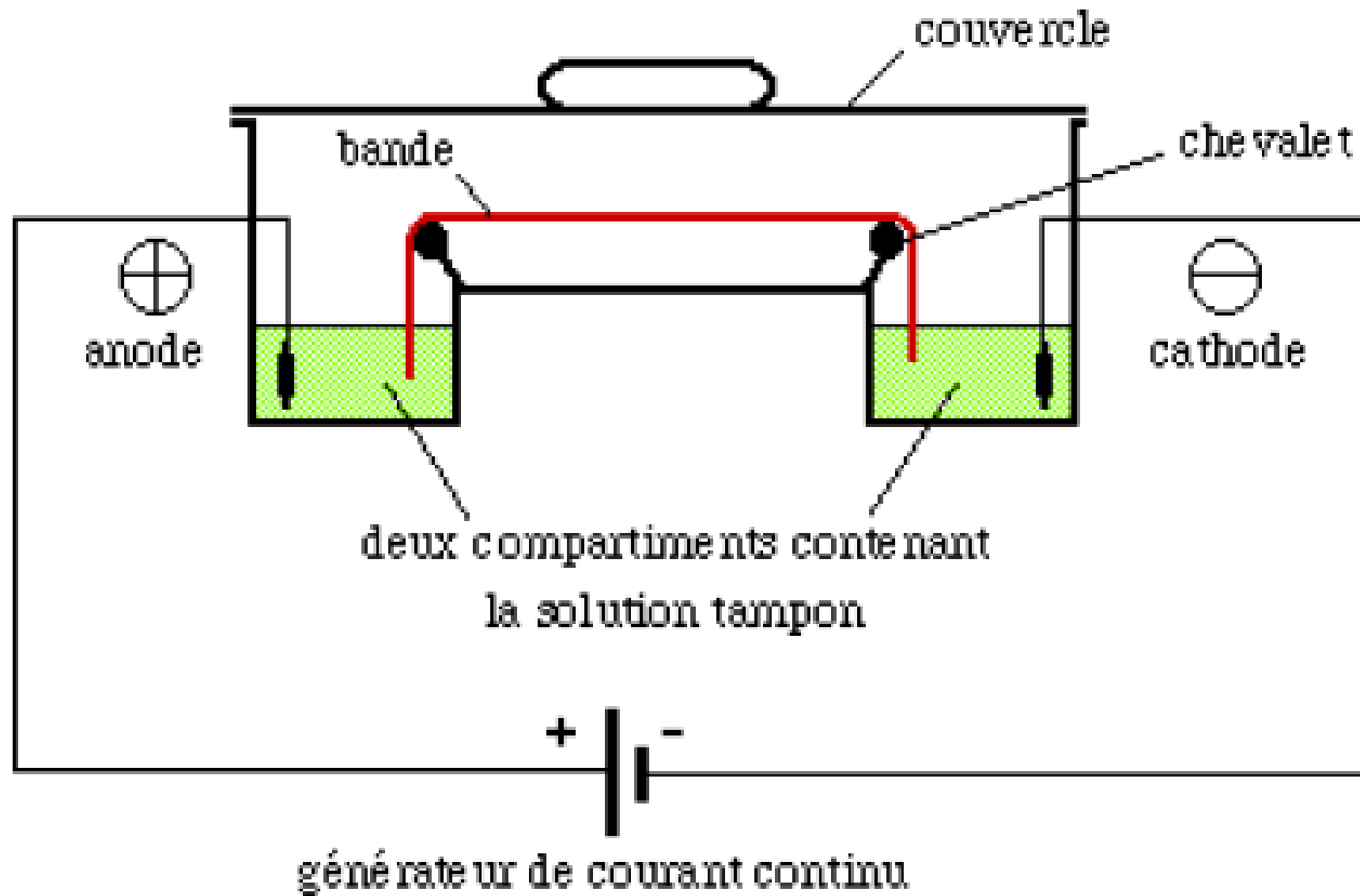


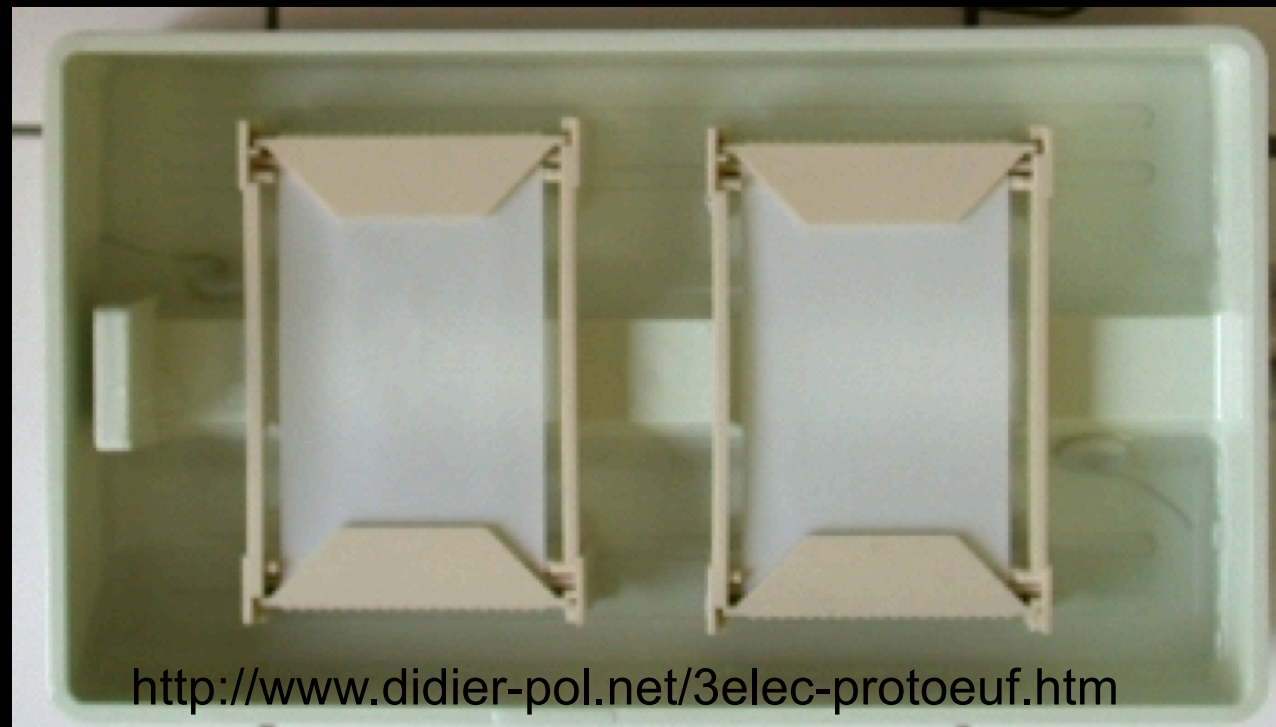
protéines	ovalbumine	ovotransferrine (conalbumine)	ovomucoïde	lysozyme
pH isoélectrique	4,6	6,5	5,6	11





*En conditions natives : sur bande*





<http://www.didier-pol.net/3elec-protocuf.htm>

## En conditions natives : sur gel

Etapes du protocole	Objectif de l'étape
Ajouter 200 $\mu$ L de tampon Laemmli dans un eppendorf contenant 10 $\mu$ L de blanc d'œuf. Agiter pendant 3 min.	<i>Extraction et solubilisation des protéines</i>
Prélever 40 $\mu$ L de ce mélange dans un nouvel eppendorf (dilution 1).  Dans 2 autres eppendorfs, effectuer des dilutions $\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{4}$ dans le tampon d'extraction (volume final de 40 $\mu$ L) à partir de l'eppendorf initial (= dilution 1).  Dans chacun de ces 3 eppendorfs, ajouter 10 $\mu$ L de bleu de bromophénol (colorant bleu dans du glycérol). Homogénéiser chaque tube à la main ou au vortex	<i>Réaliser différentes dilutions pour obtenir des dépôts de concentrations variées</i>  <i>Le glycérol facilite le dépôt dans le puits (plus dense, donc entraîne le dépôt au fonds du puits).</i>  <i>Le colorant bleu de bromophénol migre plus rapidement que les petites protéines ; il donne ainsi une indication de l'état d'avancement de l'électrophorèse</i>
Dans la cuve, recouvrir le gel de tampon TG (Tris-Glycine pH 8,3). Déposer 10 $\mu$ L de chaque échantillon sur le gel d'agarose : <b>les puits sont situés au milieu du gel</b> (approximativement). Lancer la migration à 75V pendant 35 à 45 min (à surveiller).	<i>Migration dans un champ électrique</i>
Lorsque la migration est terminée, prélever le gel et le déposer pendant 45 min dans une solution d'éthanol et d'acide acétique	<i>Précipitation et fixation des protéines dans le gel</i>
Puis disposer le gel dans une solution de bleu de Coomassie, colorant des protéines, pendant 1h minimum. Utiliser des gants.	<i>Coloration des protéines</i>
Disposer le gel dans un bain d'eau en le changeant régulièrement jusqu'à obtenir une bonne décoloration (au moins une nuit).	<i>Décoloration : seules les protéines restent colorées et apparaissent sous forme de bandes bleues</i>

Ajustement du volume

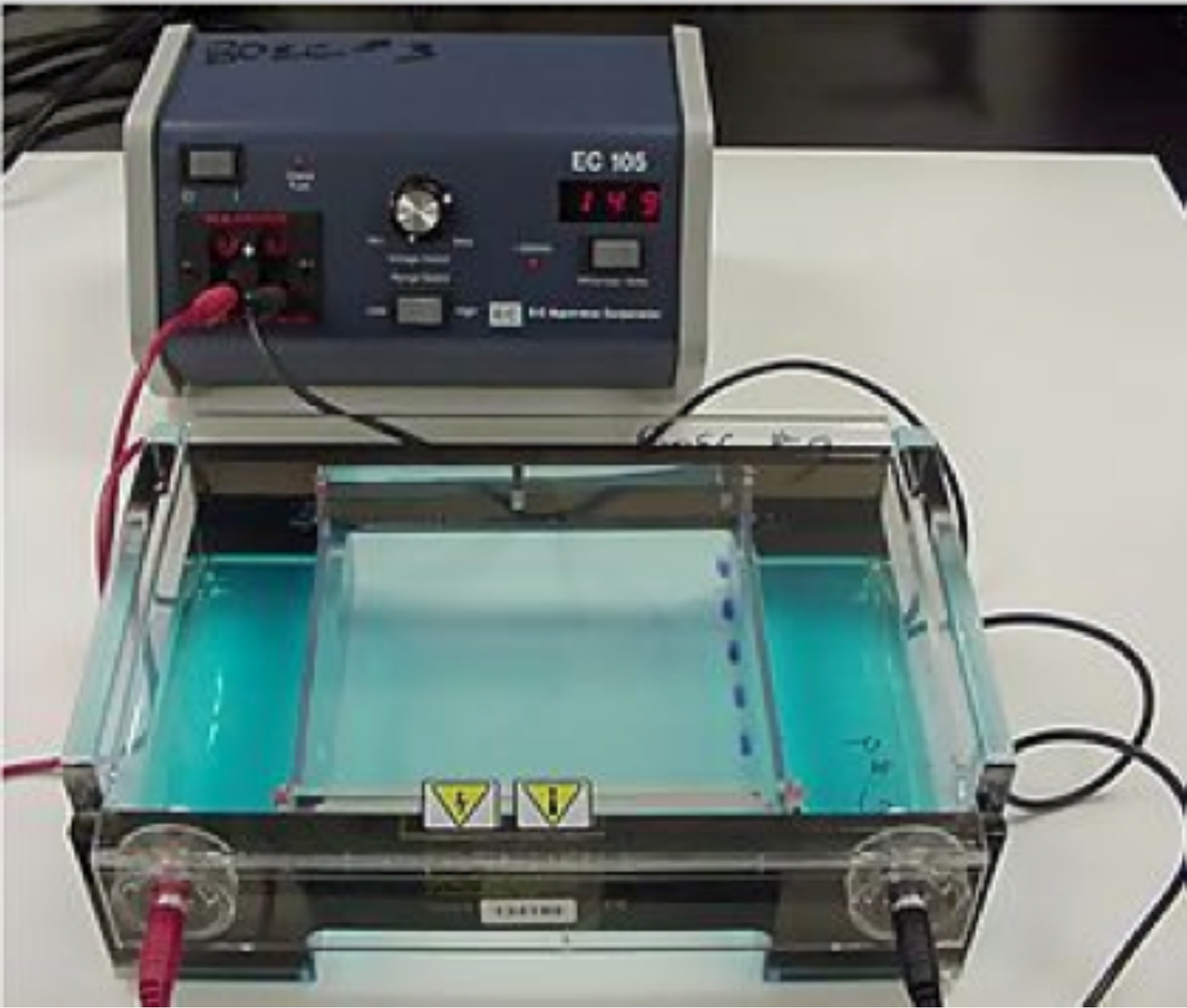
Pour prélever : appuyer jusqu' au premier cran

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

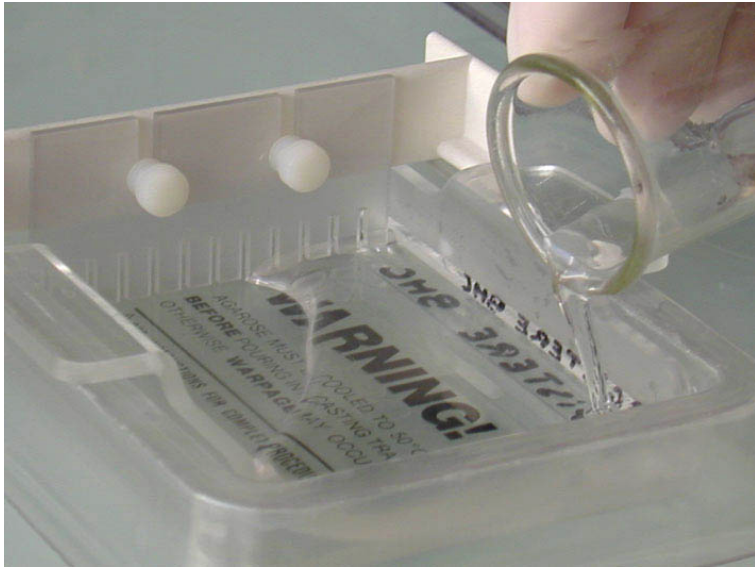


Bouton poussoir : 2 crans

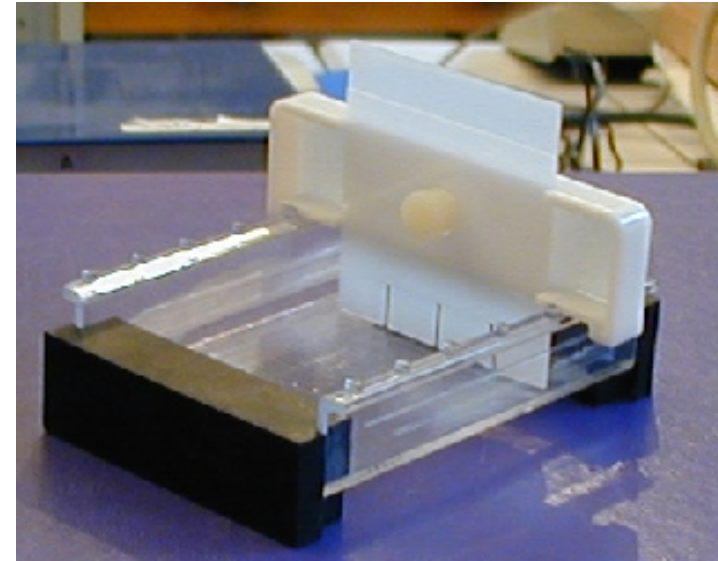
Éjection du cône



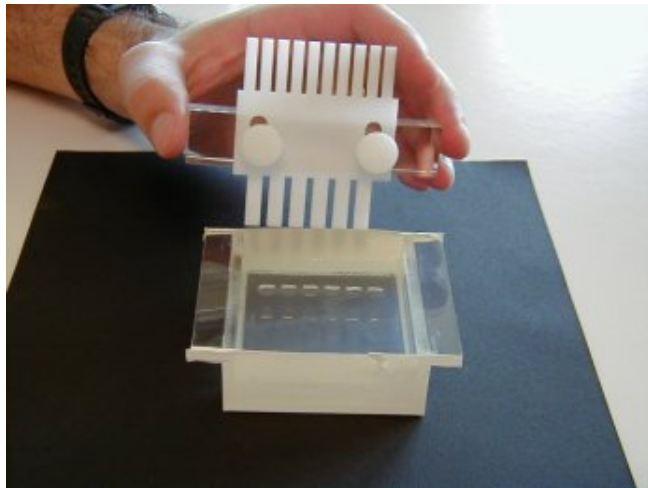




Univ-rouen



(Sny jussieu)

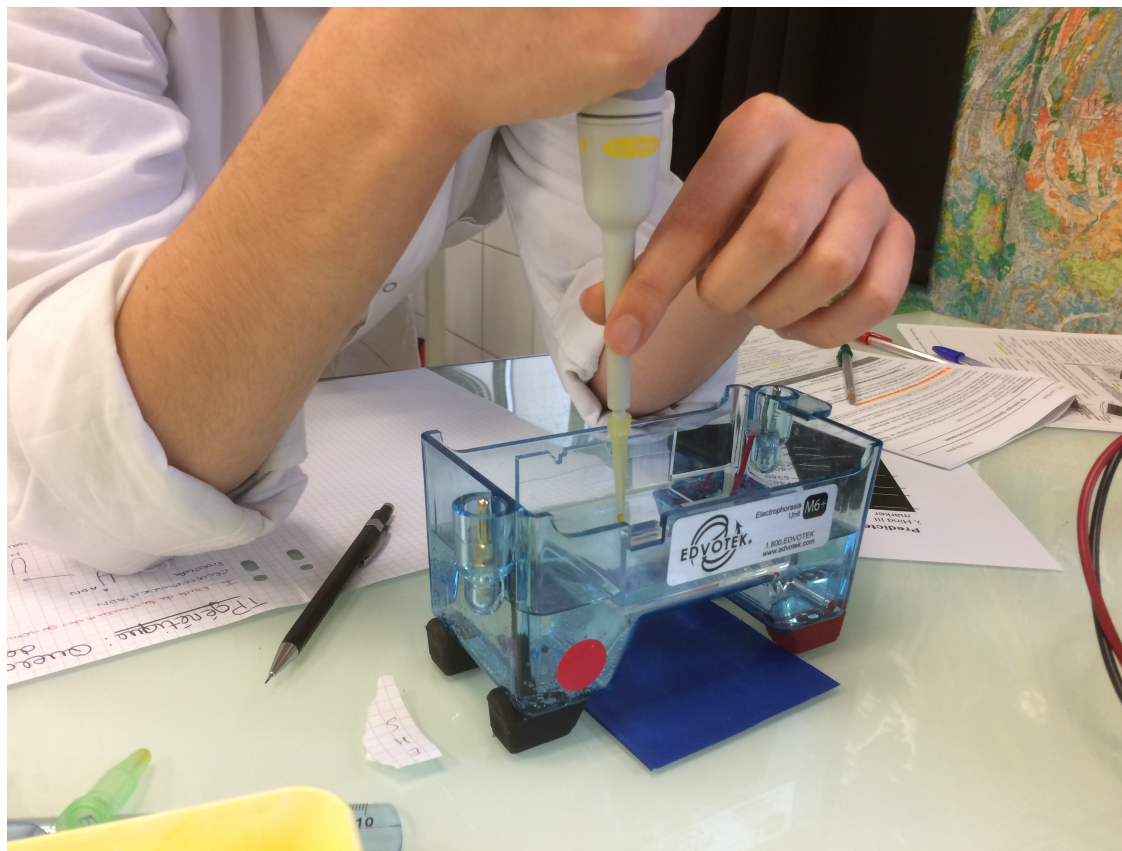


Ac-nancy

puits



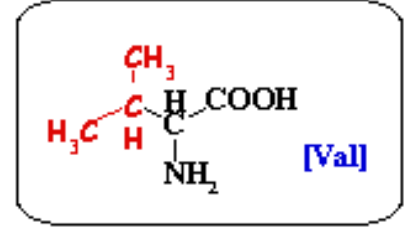
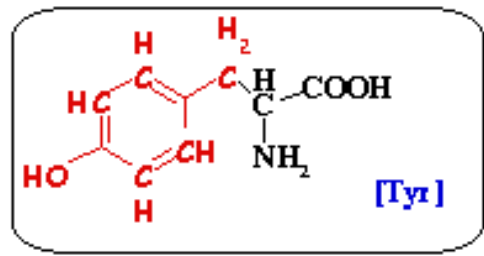
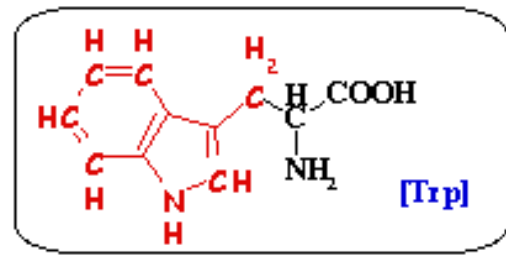
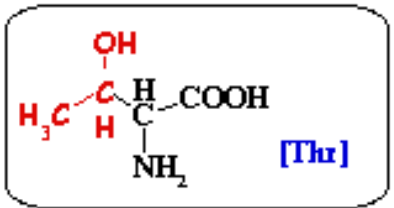
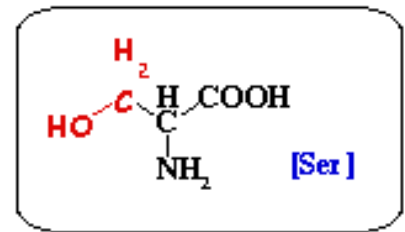
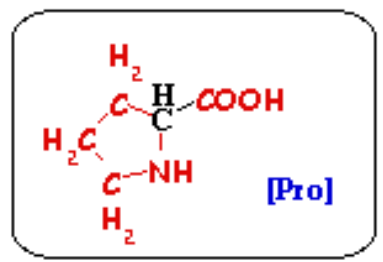
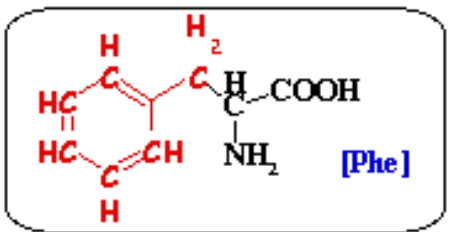
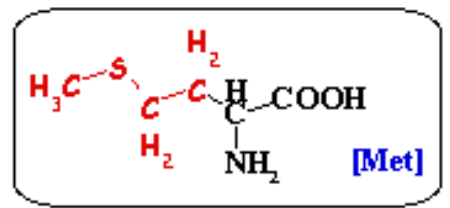
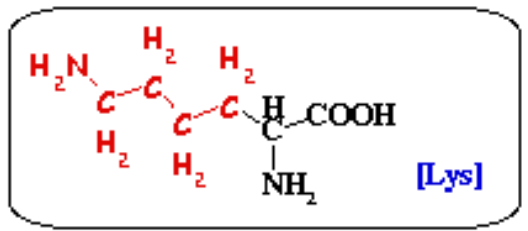
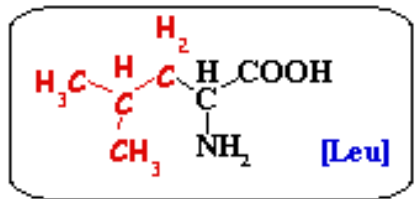
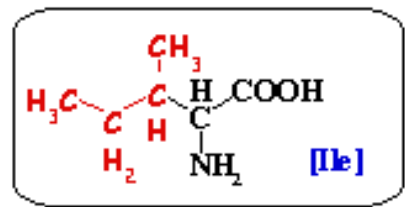
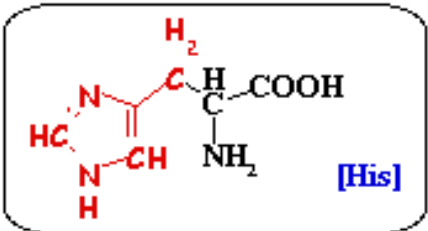
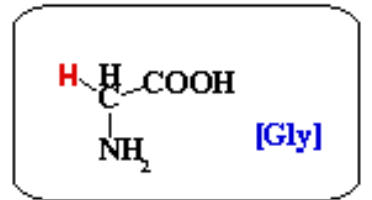
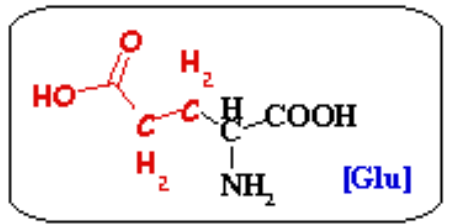
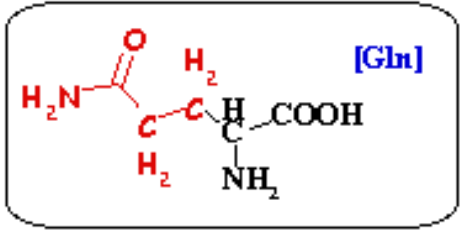
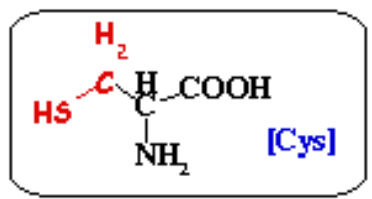
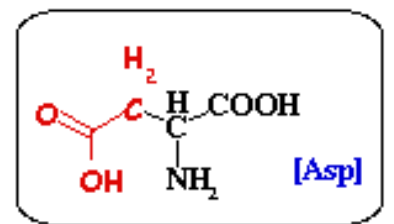
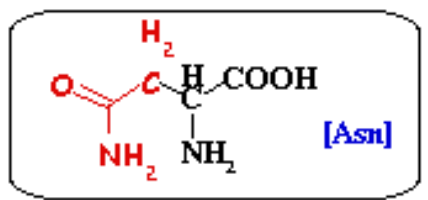
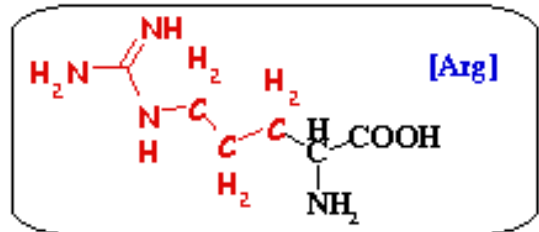
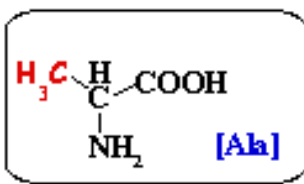
Coudes posés



canson noir sous le gel

## Analyse des résultats en conditions natives

Nom	Code		pKa du COOH	pKa du NH <sub>3</sub>	pKa de la chaîne latérale	Poids Moléculaire
Alanine	ALA	A	2,3	9,7	-	89,09
Arginine	ARG	R	2,2	9,0	12,5	174,20
Asparagine	ASN	N	2,0	8,8	-	132,12
Acide Aspartique	ASP	D	2,1	9,8	3,9	133,10
Cystéine	CYS	C	1,8	10,8	8,3	121,15
Glutamine	GLN	Q	2,2	9,1	-	146,15
Acide Glutamique	GLU	E	2,2	9,7	4,2	147,13
Glycine	GLY	G	2,3	9,6	-	75,07
Histidine	HIS	H	1,8	9,2	6,0	155,16
Isoleucine	ILE	I	2,4	9,7	-	131,17
Leucine	LEU	L	2,4	9,6	-	131,17
Lysine	LYS	K	2,2	9,0	10,0	146,19
Méthionine	MET	M	2,3	9,2	-	149,21
Phénylalanine	PHE	F	1,8	9,1	-	165,19
Proline	PRO	P	2,0	10,6	-	115,13
Sérine	SER	S	2,2	9,2	-	105,09
Thréonine	THR	T	2,6	10,4	-	119,12
Tryptophane	TRP	W	2,4	9,4	-	204,23
Tyrosine	TYR	Y	2,2	9,1	10,1	181,19
Valine	VAL	V	2,3	9,6	-	117,15



<u>Acide aminé</u>	<u>Couple acide / base</u>	<u>pK</u>
Aspartate (Asp)	COOH / COO <sup>-</sup>	3,8
Glutamate (Glu)	COOH / COO <sup>-</sup>	4,2
Lysine (Lys)	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> / NH <sub>2</sub>	10,6
Arginine (Arg)	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> / NH <sub>2</sub>	12,5

	<b>Lysozyme</b>	<b>Ovalbumine</b>
<b>Arginine</b>	11	15
<b>Lysine</b>	6	20
<b>Aspartate</b>	7	11
<b>Glutamate</b>	2	33
<b>Charge globale</b>		
<b>Sens de migration</b>		

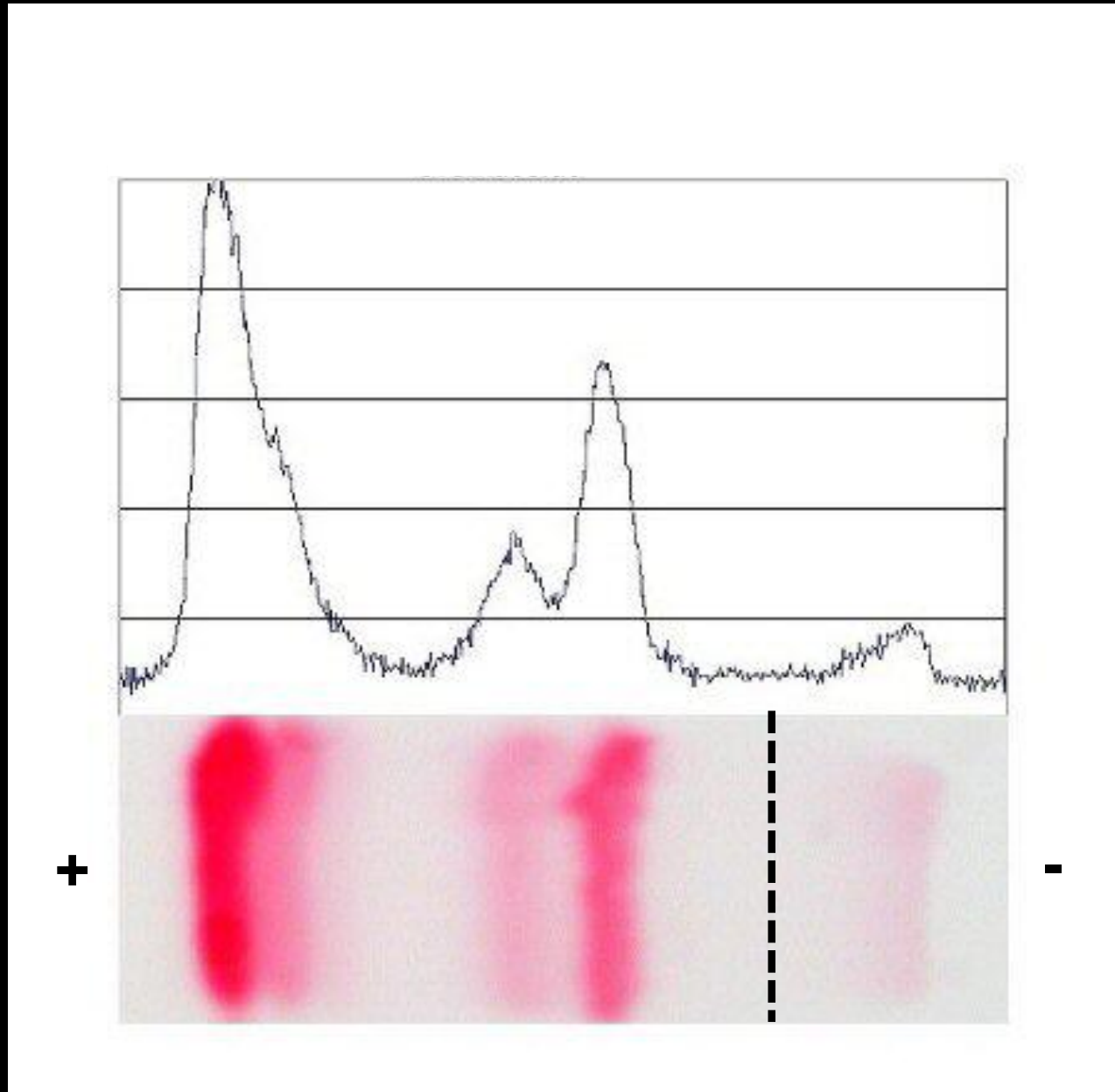
	<b>Lysozyme</b>	<b>Ovalbumine</b>
<b>Acides aminés chargés + au pH du tampon de migration</b>		
<b>Arginine</b>	11	15
<b>Lysine</b>	6	20
<b>Acides aminés chargés - au pH du tampon de migration</b>		
<b>Aspartate</b>	7	11
<b>Glutamate</b>	2	33
<b>Charge globale</b>	8 +	9-
<b>Sens de migration</b>	Vers le pôle – (cathode)	Vers le pôle + (anode)

	Masse moléculaire (Da)	pH isoélectrique	Pourcentage massique de l'extrait sec	Fonction biologique
ovalbumine	46000	4,6	58%	Agent gélifiant
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



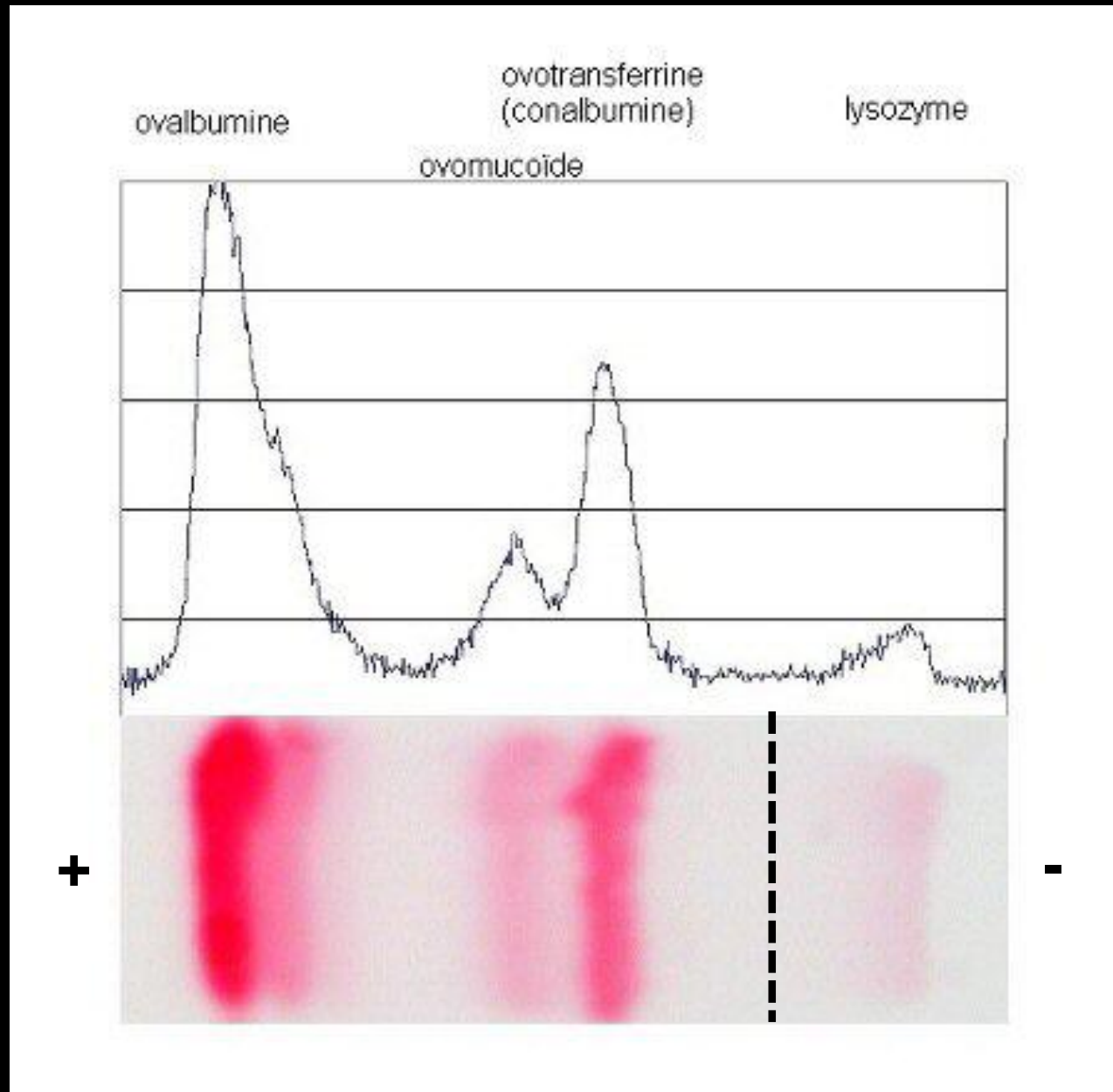
## *Electrophorèse en conditions natives sur bande*

L'analyse densitométrique permet de quantifier les différentes protéines du blanc d'œuf.



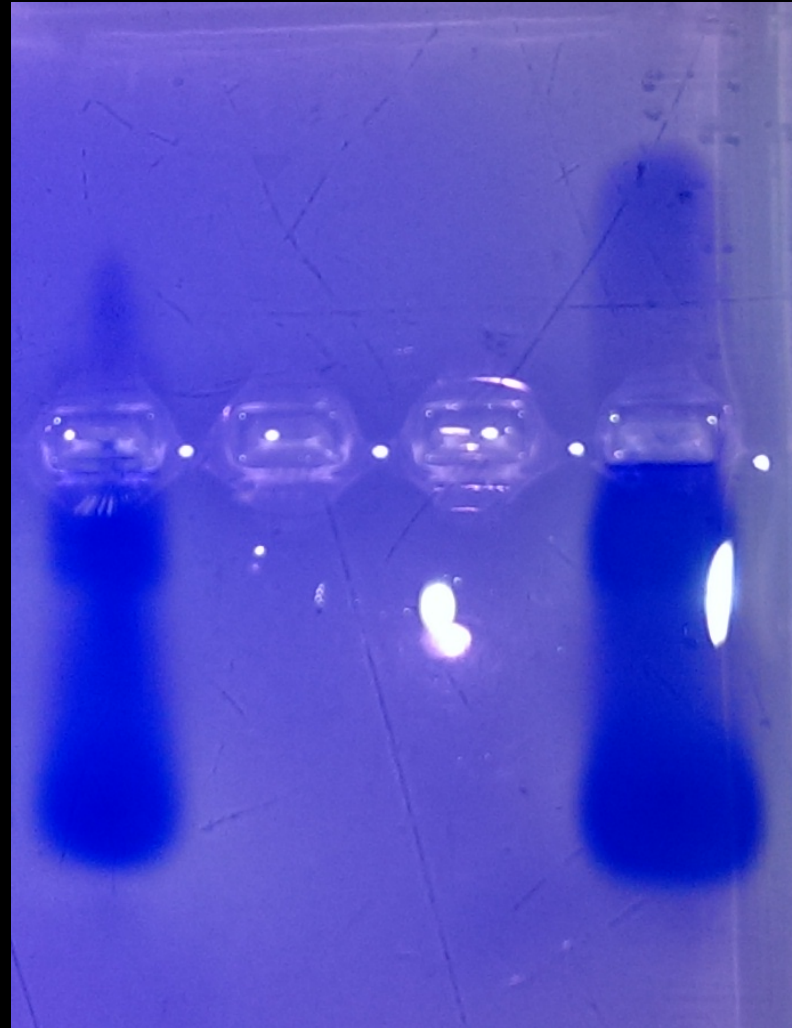
## *Electrophorèse en conditions natives sur bande*

L'analyse densitométrique permet de quantifier les différentes protéines du blanc d'œuf.



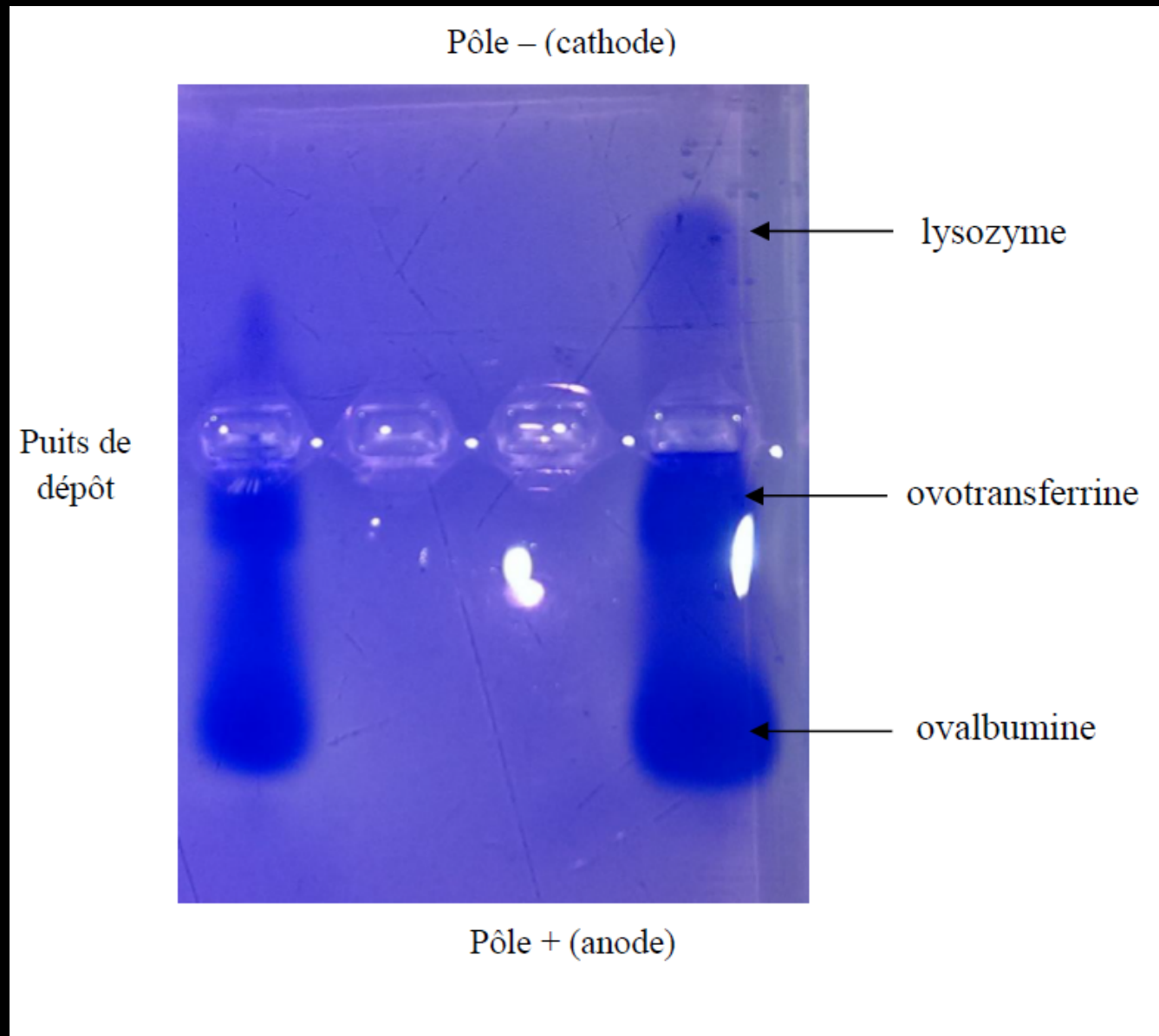
*Electrophorèse en conditions natives sur gel*

Pôle -



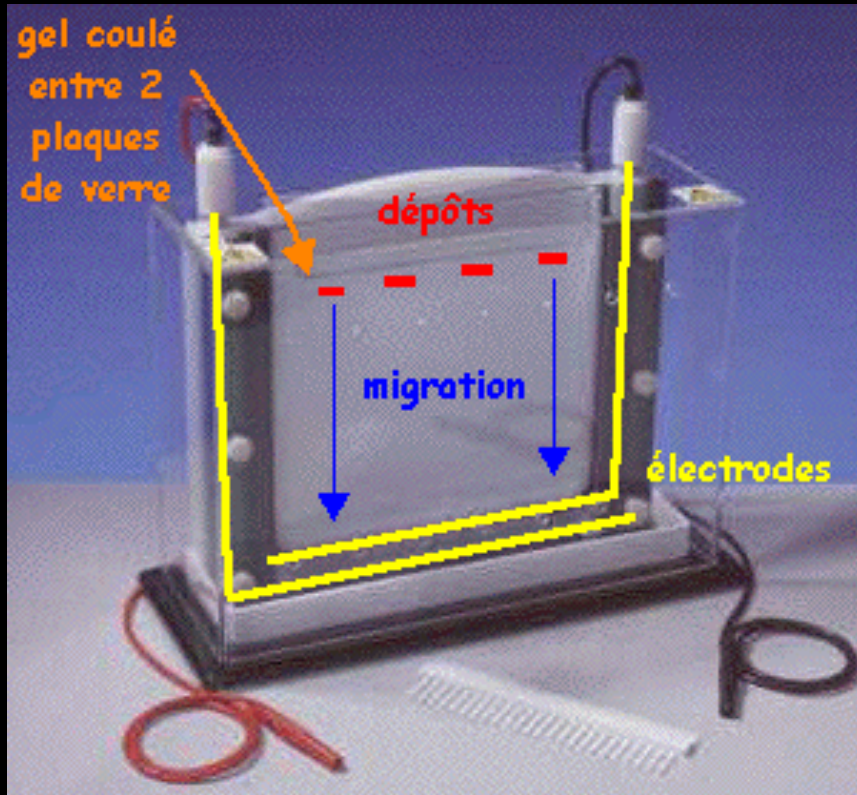
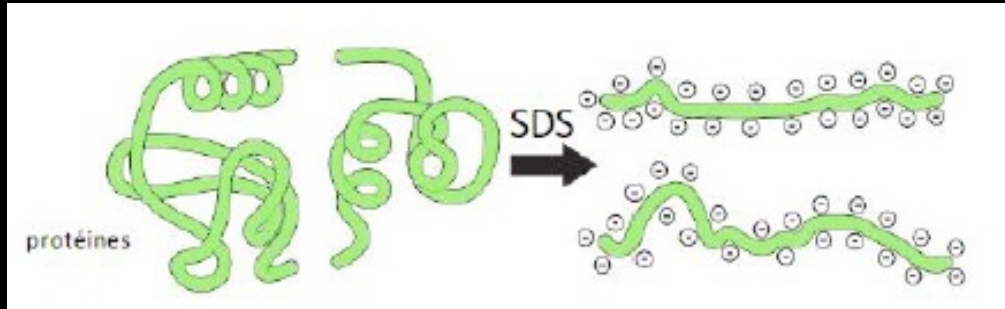
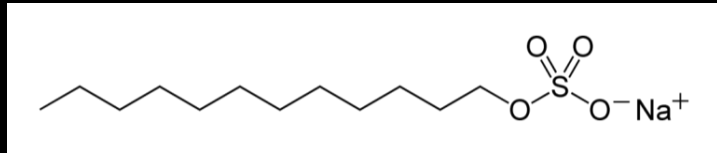
Pôle +

# *Electrophorèse en conditions natives sur gel*



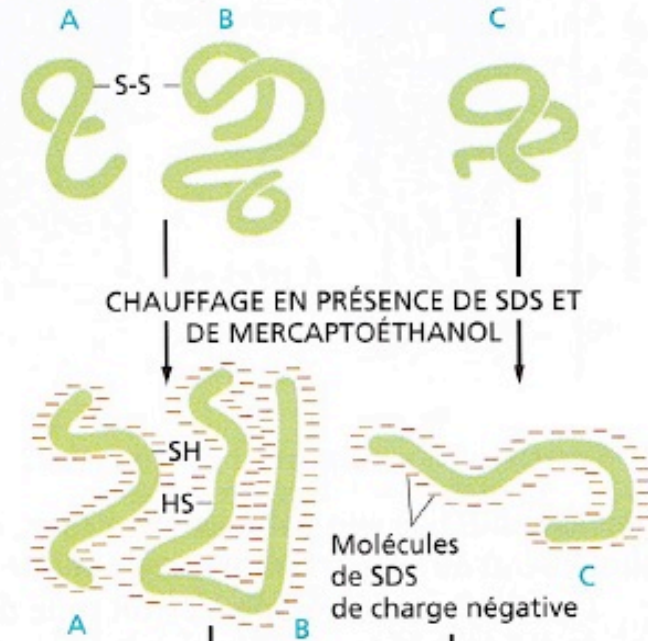


# Electrophorèse en conditions dénaturantes

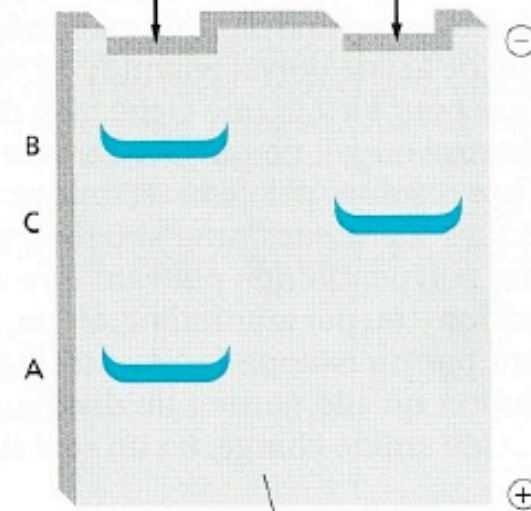


Protéine avec deux sous-unités, A et B, réunies par un pont disulfure

Sous-unité protéique seule



ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE



Plaque de gel de polyacrylamide

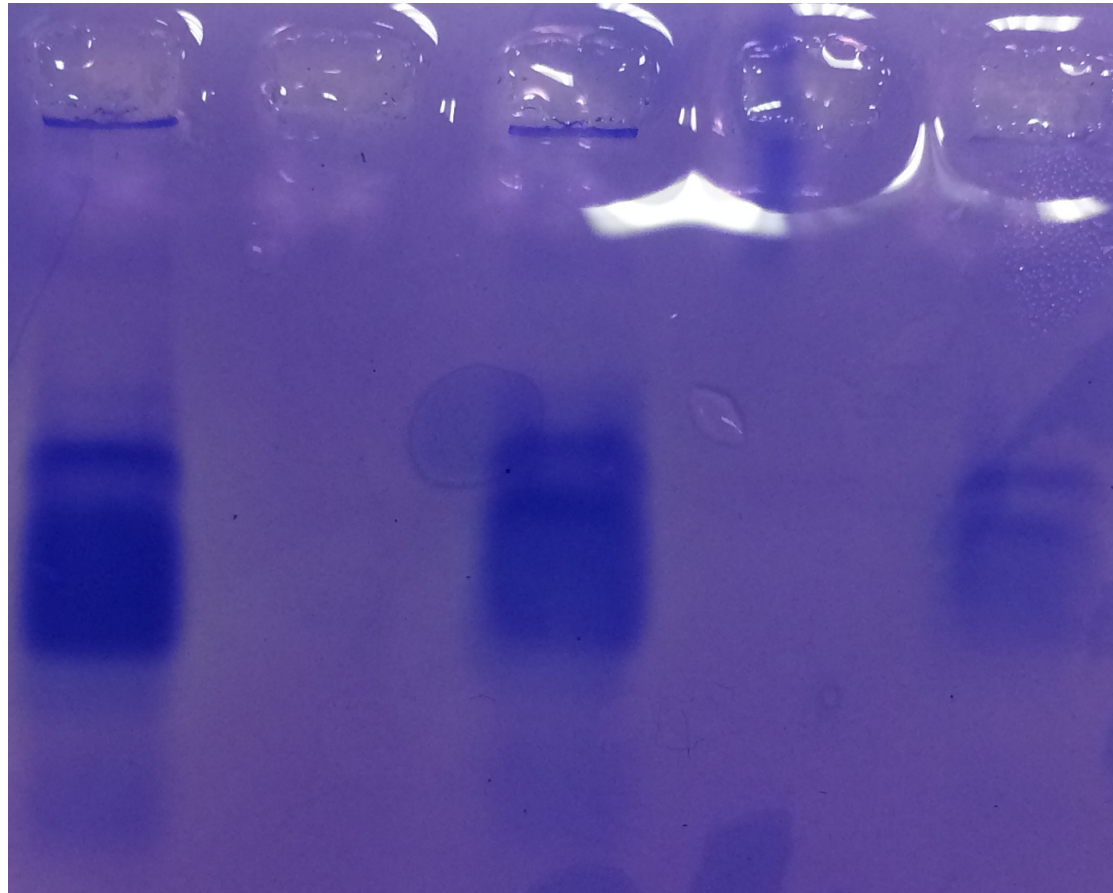
**Dilutions**

**1**

**1/2**

**1/4**

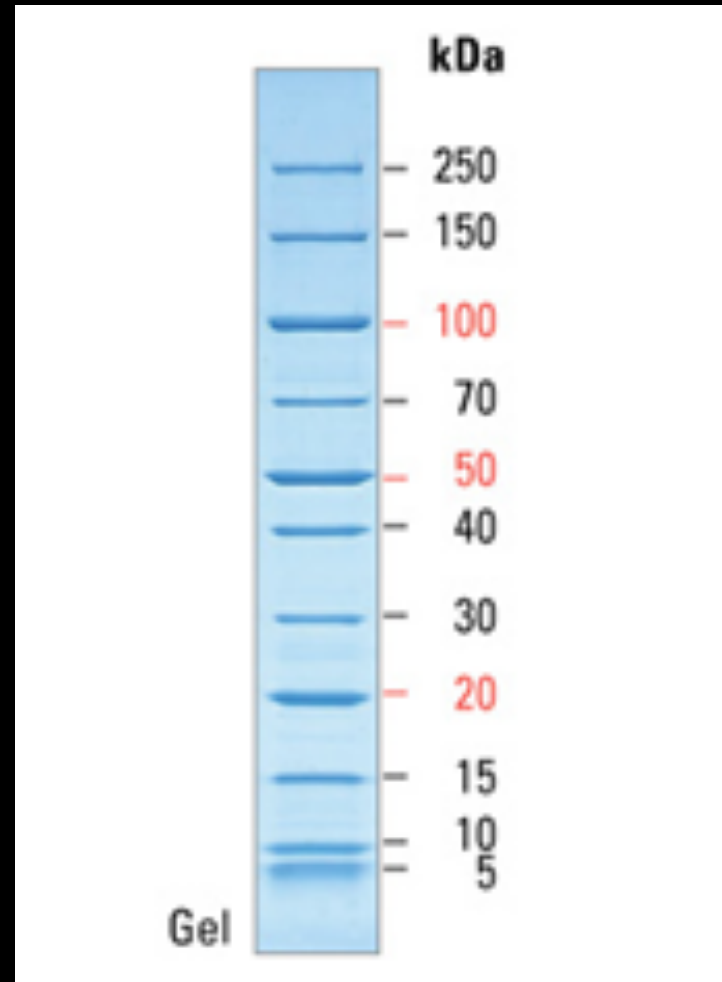
**Borne -**

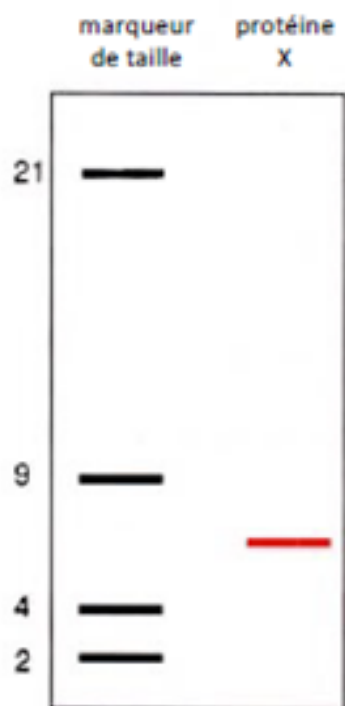


**Borne +**



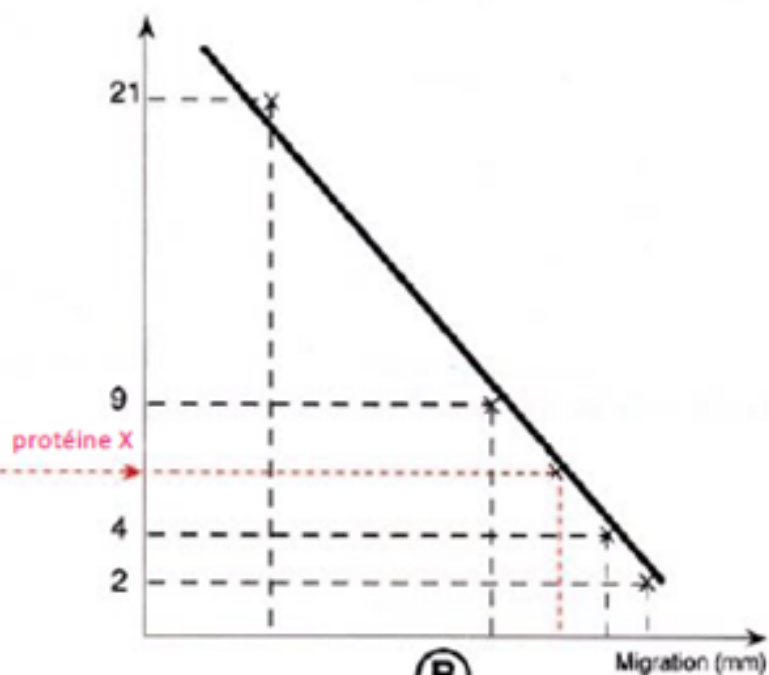
# Marqueur de masse moléculaire





(A)

Poids en kD  
(échelle log)



(B)

la masse des protéines et leur distance de migration suit une loi de type:  
 $\log(\text{masse}) = A - B(\text{distance de migration})$

# *Electrophorèse en conditions dénaturantes sur gel*

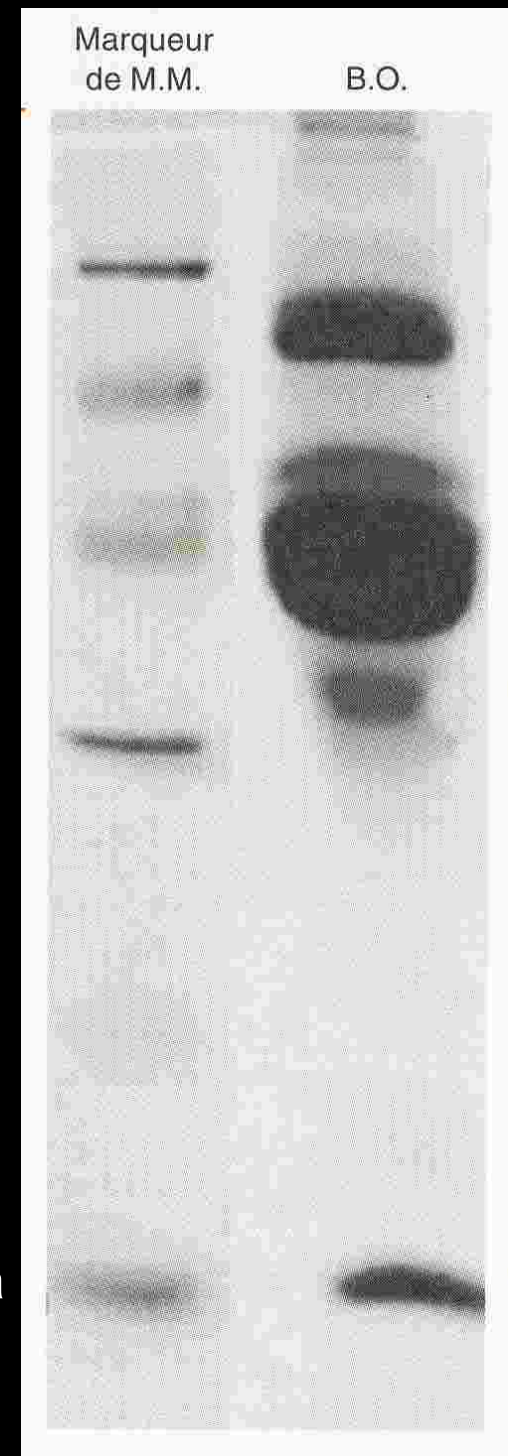
94 kDa

67 kDa

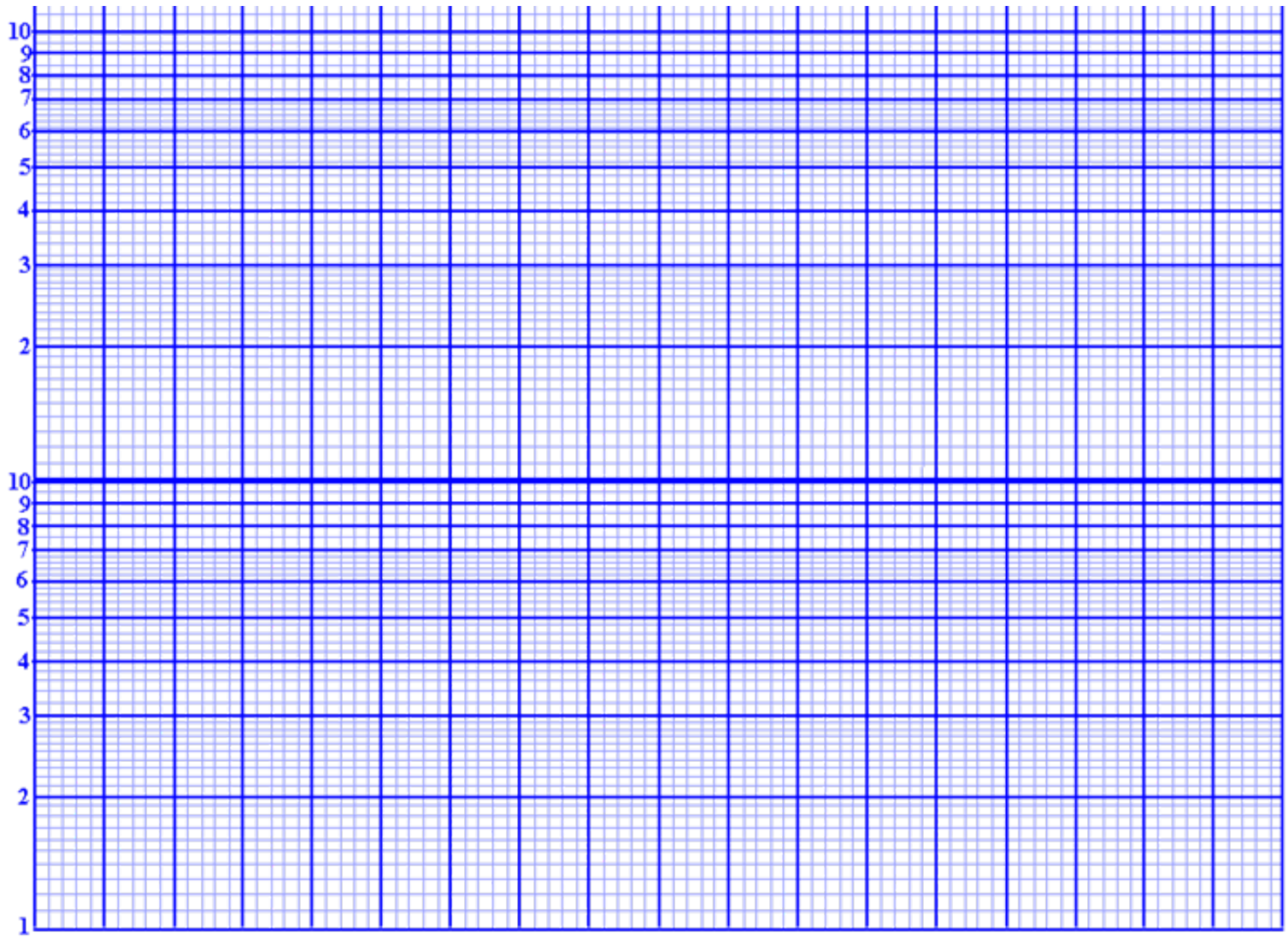
43 kDa

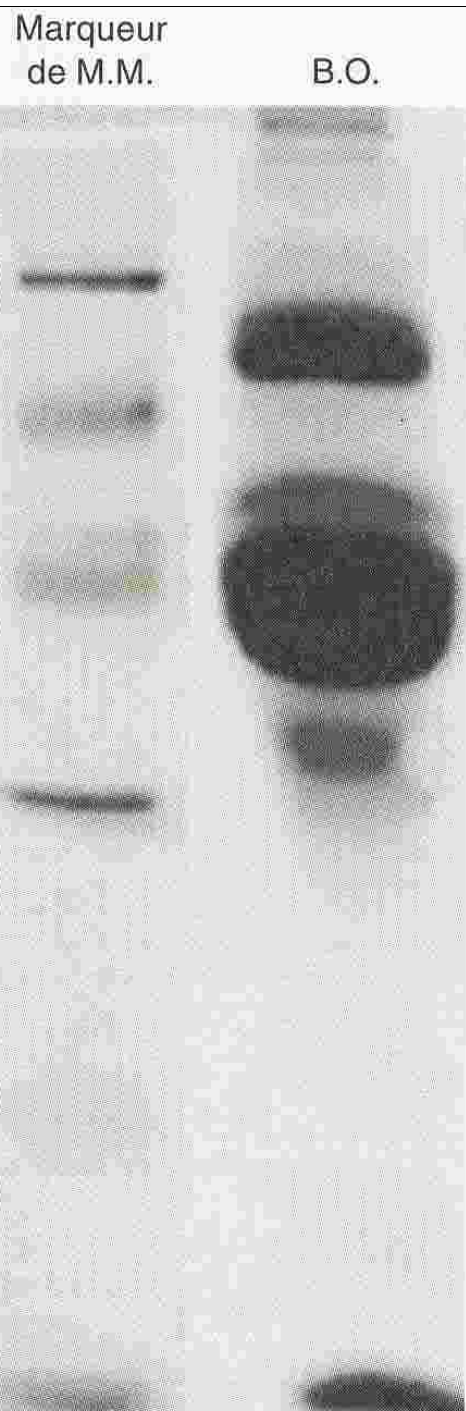
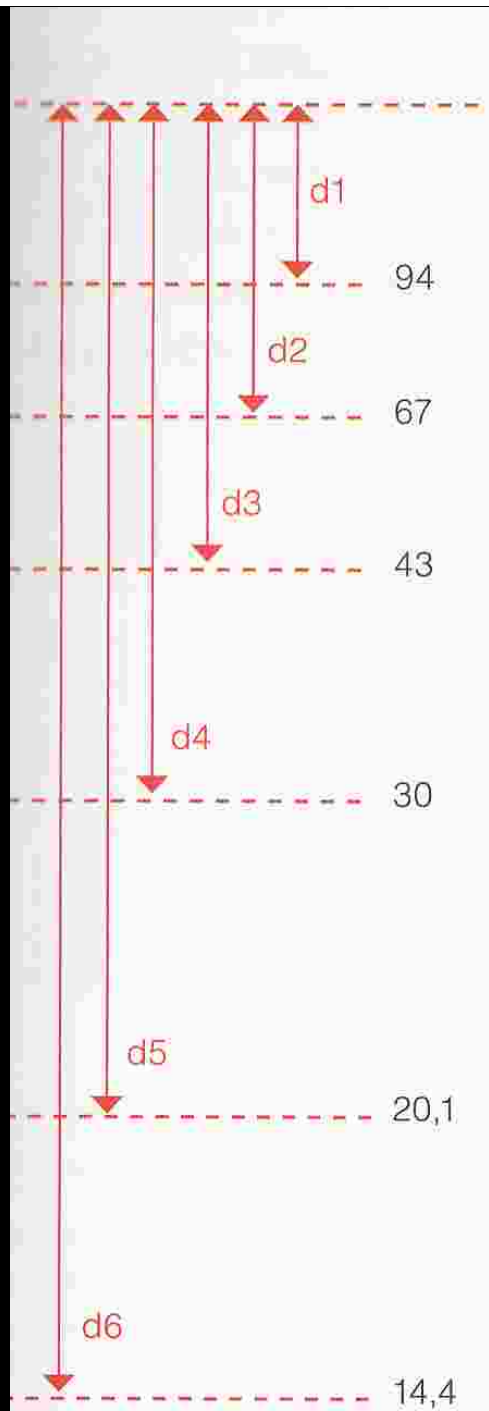
30 kDa

14,4 kDa



100  
40  
30  
20





Marqueur  
de M.M.

B.O.

94

67

43

30

20,1

14,4

d1

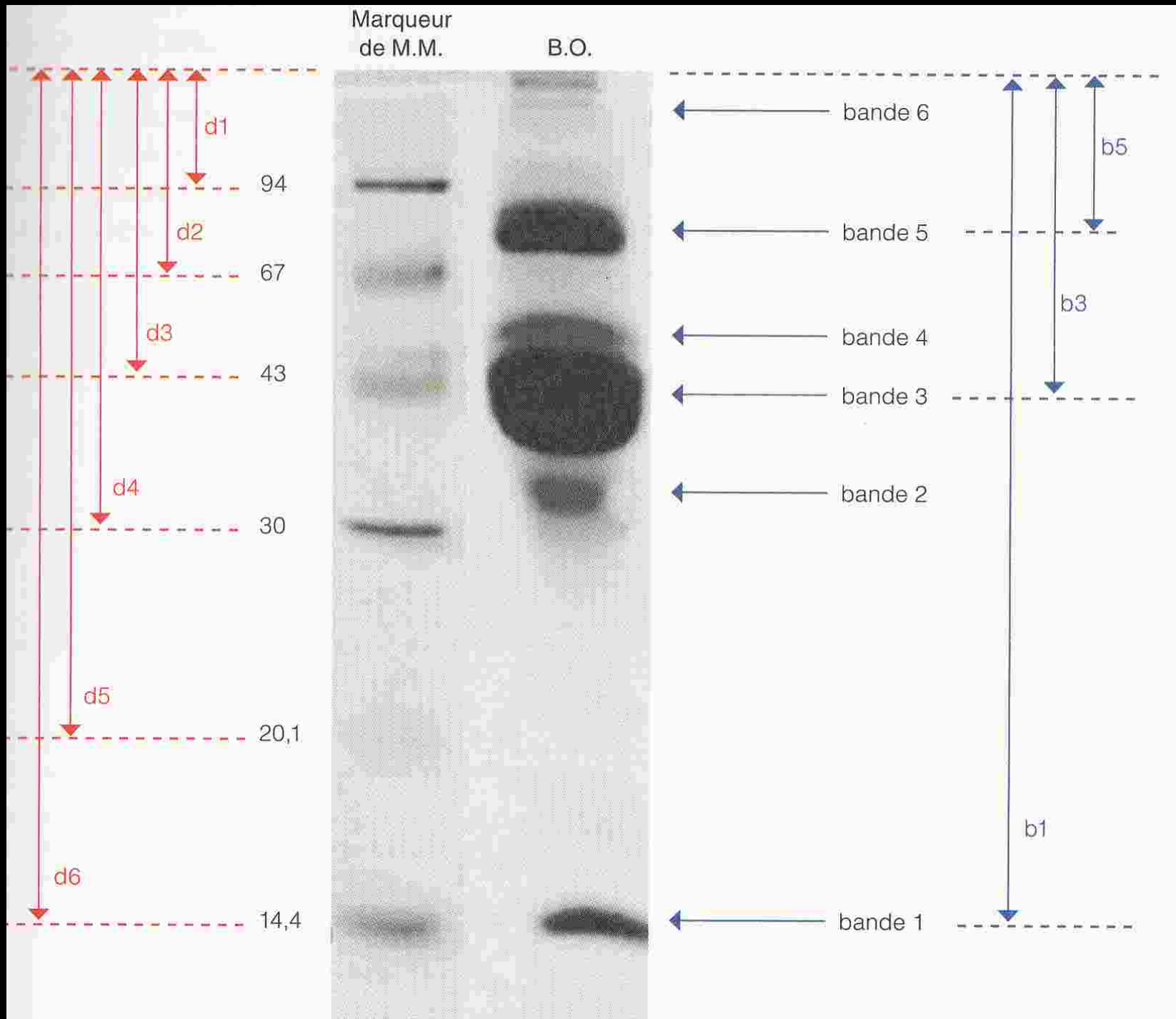
d2

d3

d4

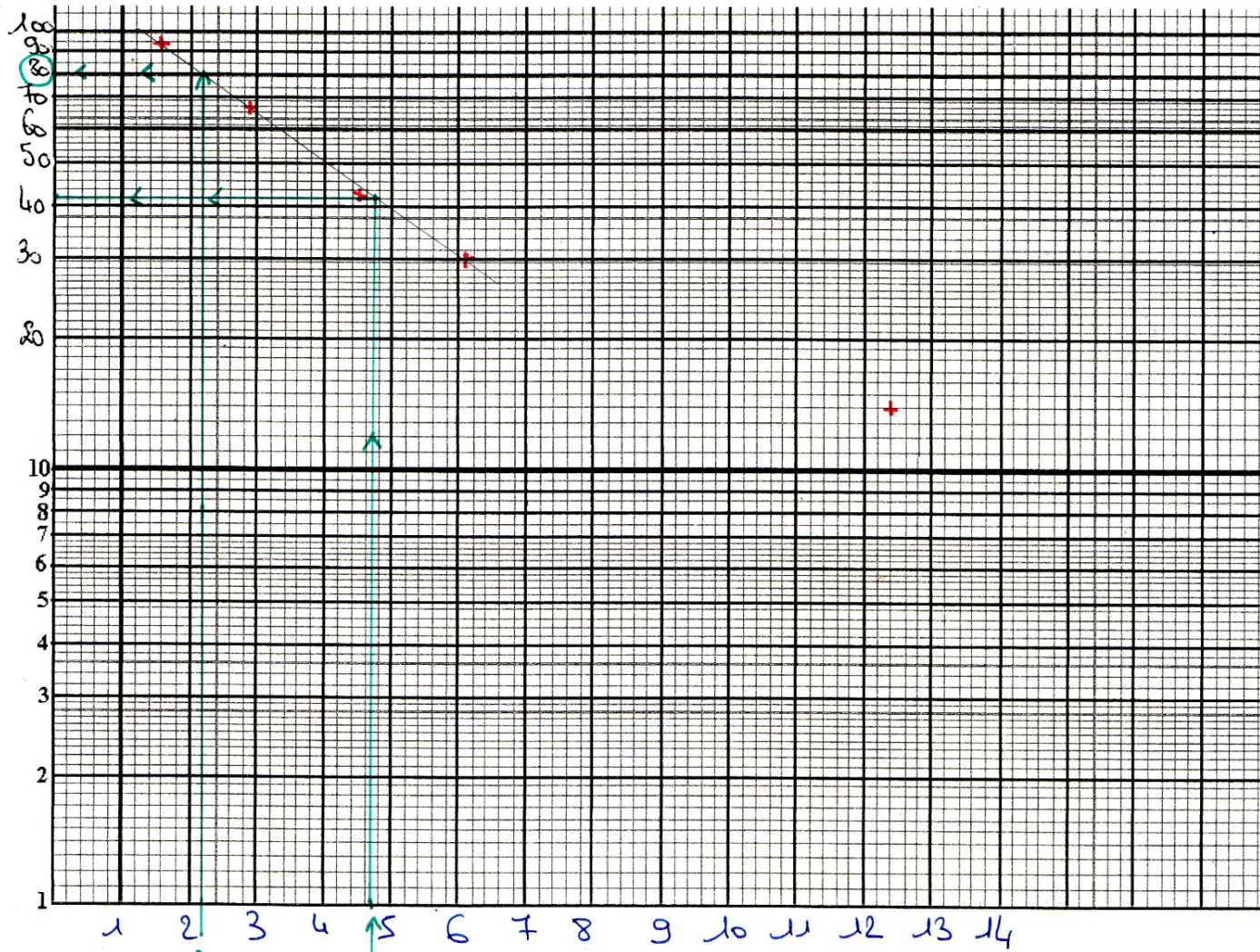
d5

d6





# masse moléculaire (kDa)

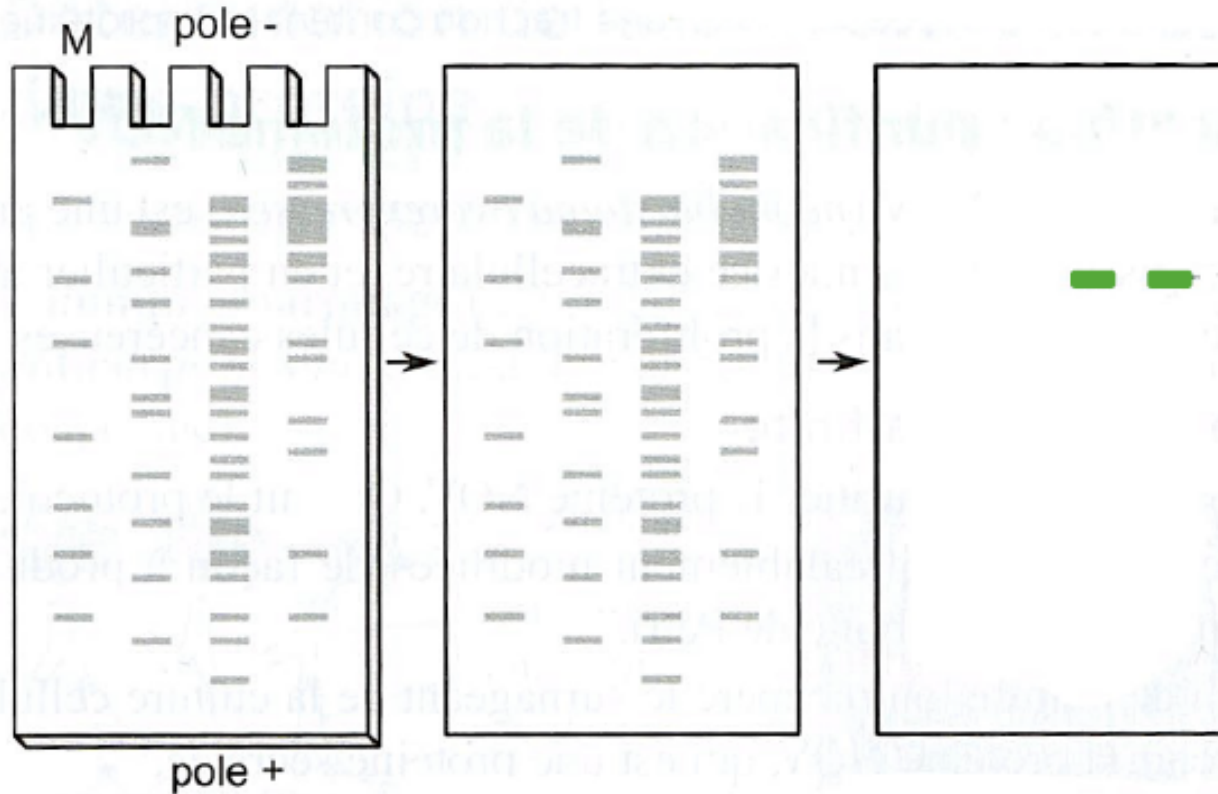


↑  
 distance de migration de la bande 5  
 2,2 cm  
 ⇒ masse moléculaire de la protéine 5 ~ 80 kDa

distance de migration de la bande 3 = 6,7 cm  
 ⇒ masse moléculaire de la protéine 3 ~ 62 kDa

Distance de migration (cm)

# Principe du Western Blot



1

Electrophorèse dénaturante  
SDS-PAGE

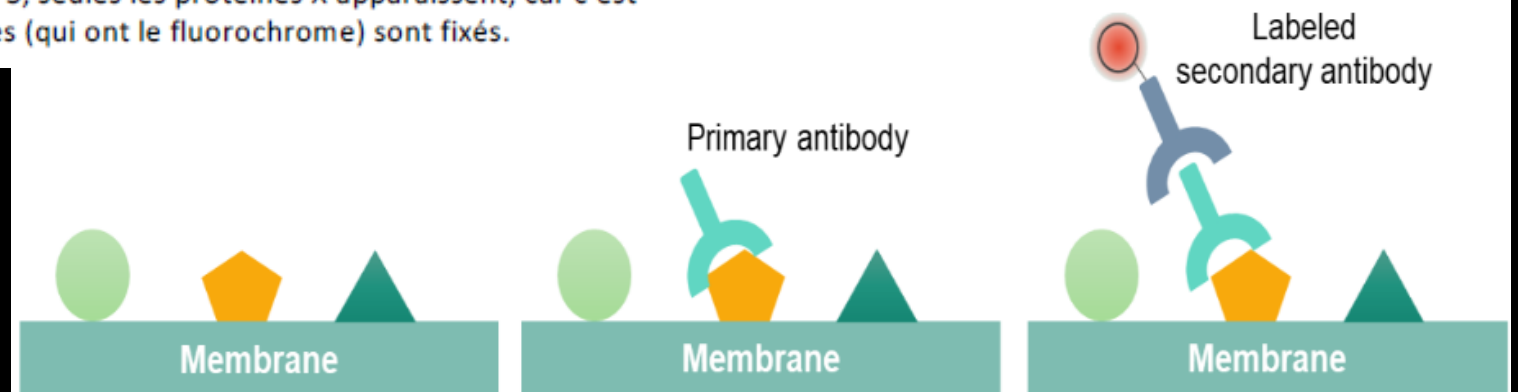
2

Transfert sur membrane

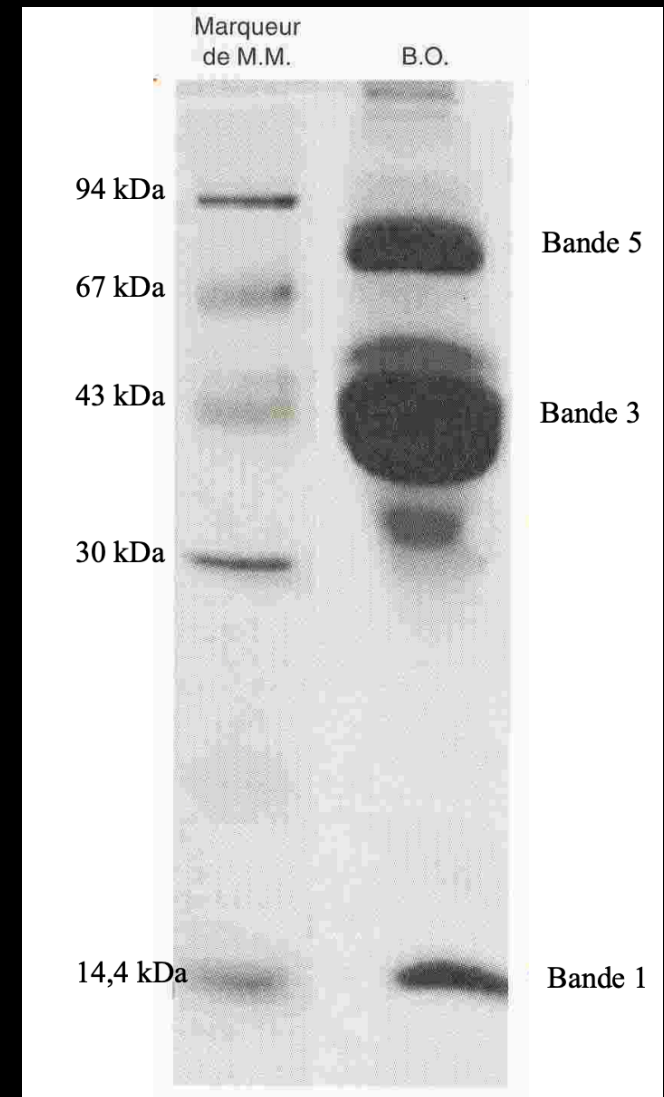
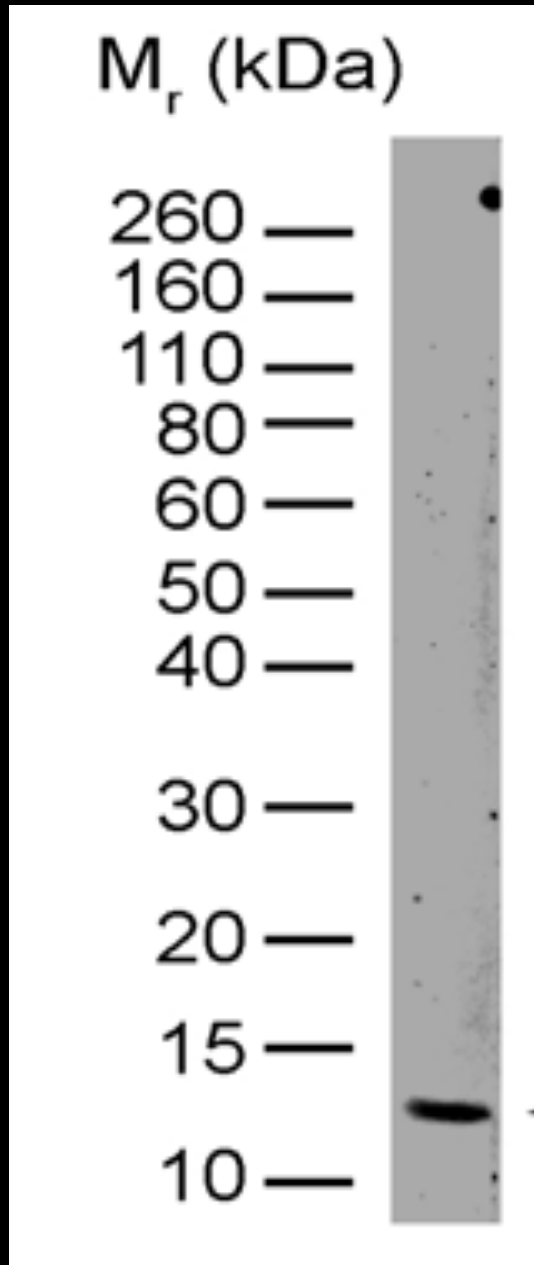
3

Incubation avec anticorps  
primaires puis secondaires

Remarque: sur le gel 1 et sur la membrane 2, aucune protéine n'est visible à l'œil (puisque pas de coloration). Les bandes grises représentent la localisation des protéines (présentes mais non visibles). Sur la membrane 3, seules les protéines X apparaissent, car c'est l'endroit où les anticorps secondaires (qui ont le fluorochrome) sont fixés.

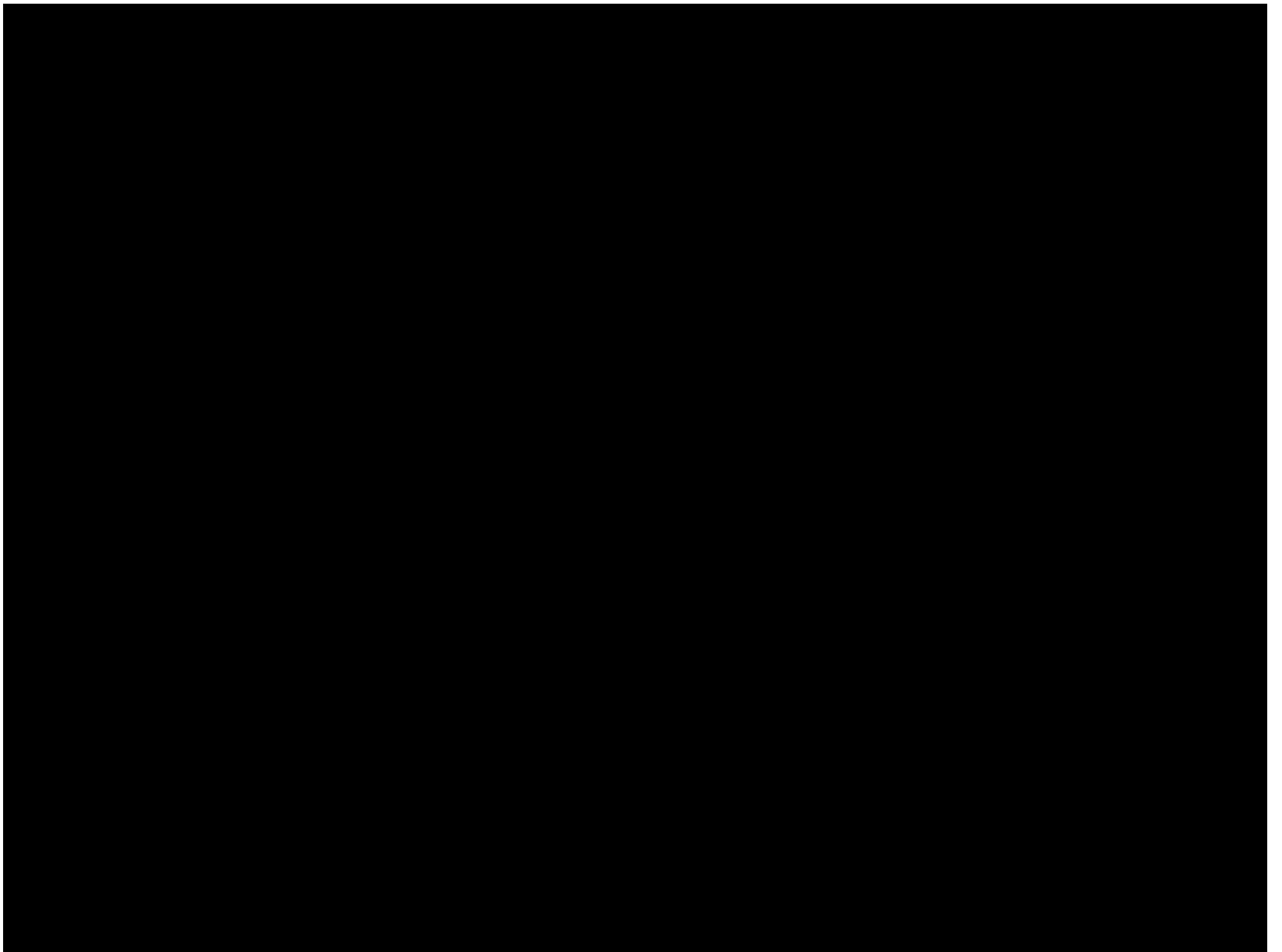


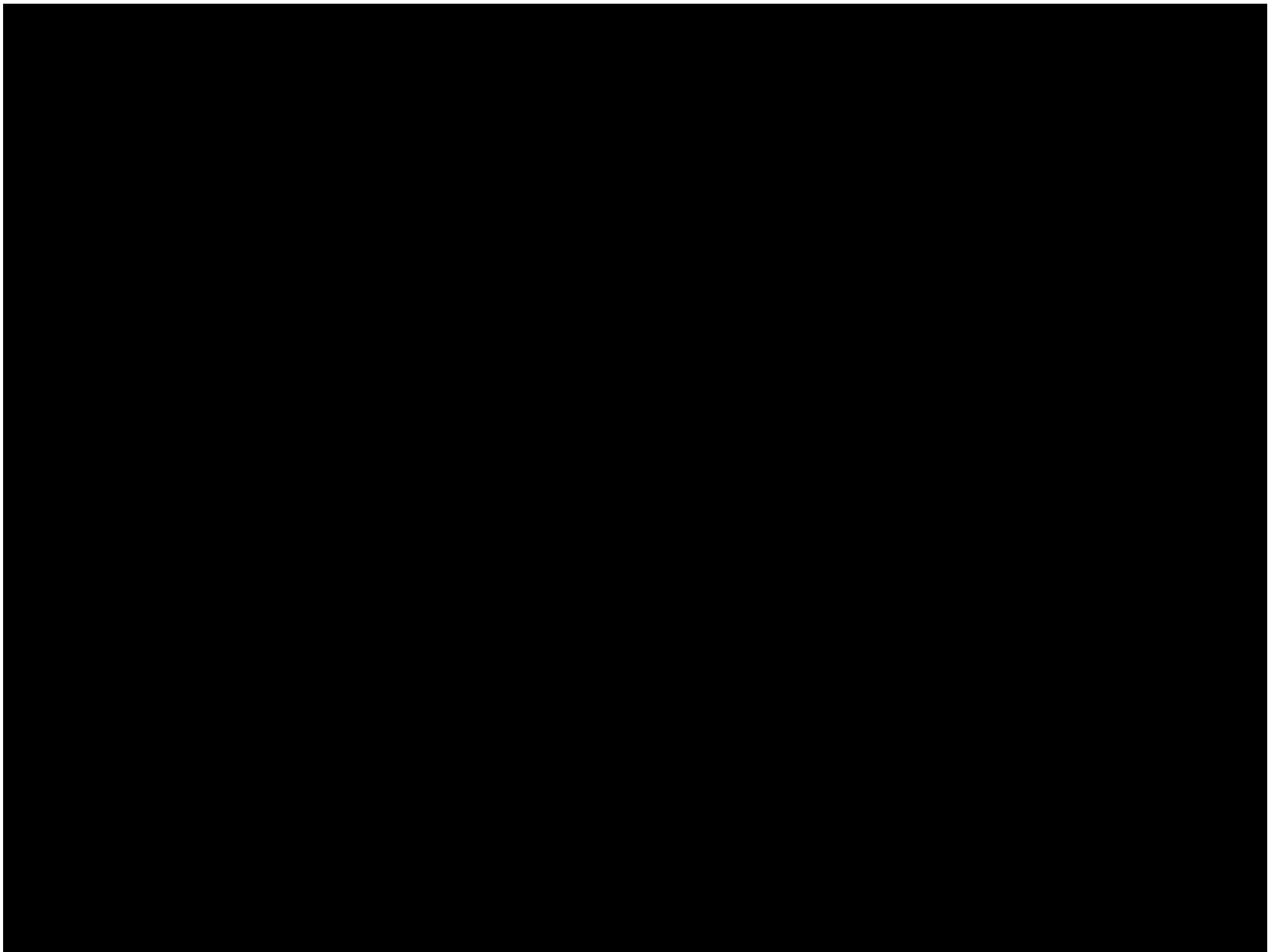
# Western Blot





	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







***Electrophorèse en conditions  
dénaturantes sur gel***

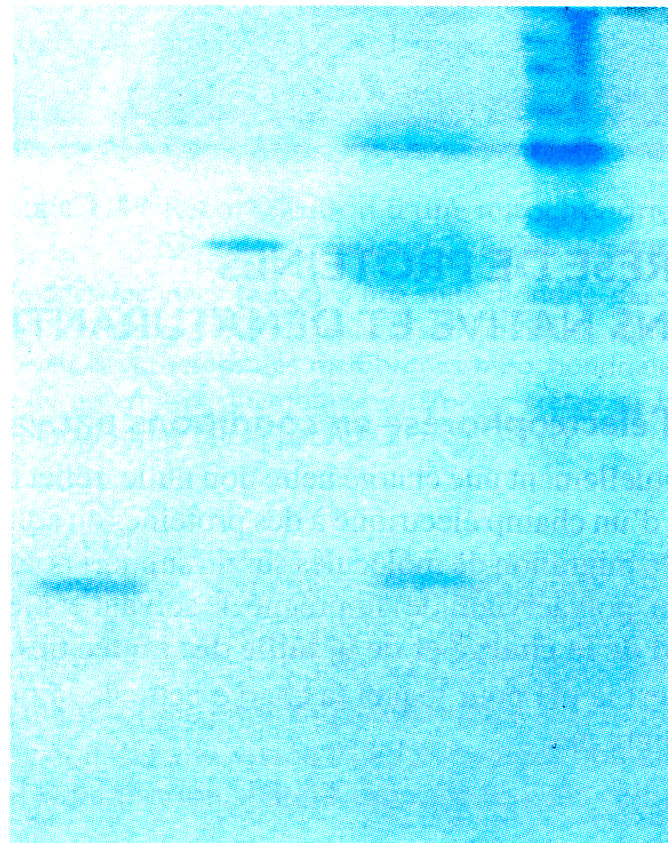


autres protéines

conalbumine

ovalbumine

lysozyme



← ligne des puits

250  
150  
100  
75

50  
37

**FIGURE TP2.1** Électrophorégramme de blanc d'œuf (SDS-PAGE).

Puits : 1 = lysozyme purifié ; 2 = ovalbumine de poule purifiée ; 3 = blanc d'œuf de poule ; 4 = marqueurs de masses moléculaires dont les valeurs sont indiquées à droite (kDa). Comme indiqué sur le document, la ligne des puits est au sommet du cliché.

1 2 3 4 (puits)

## Electrophorèse de protéines du blanc d'oeuf – résultats 2015

