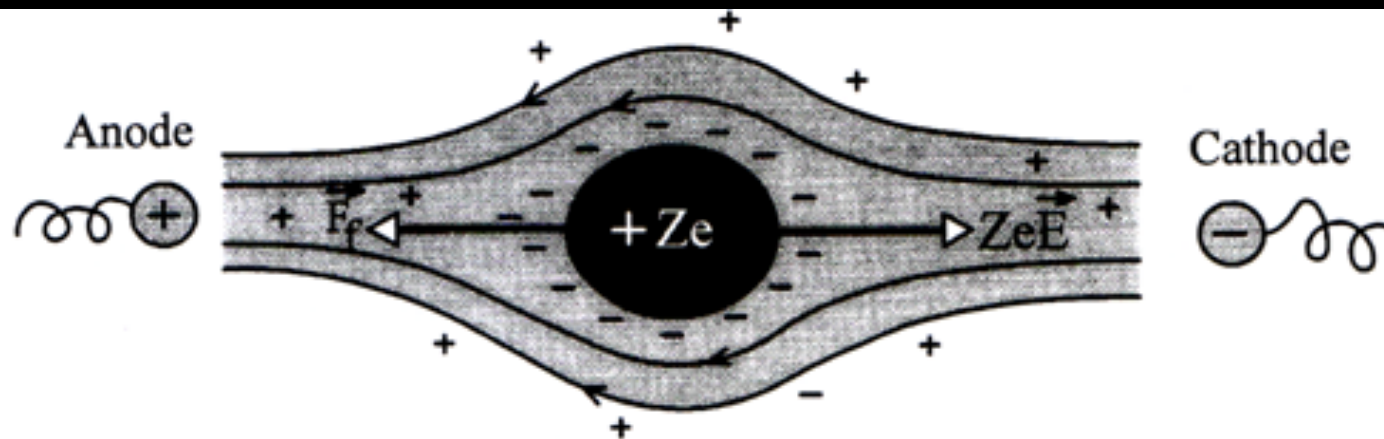


Thème SV-D TP



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

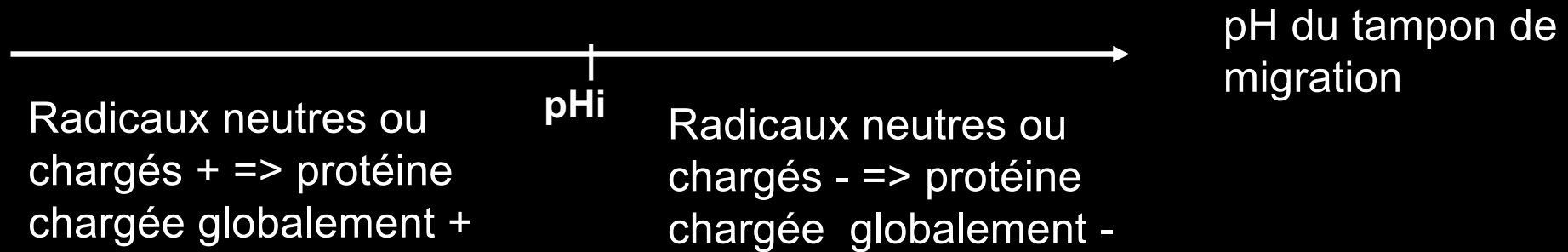
Principe de l'électrophorèse



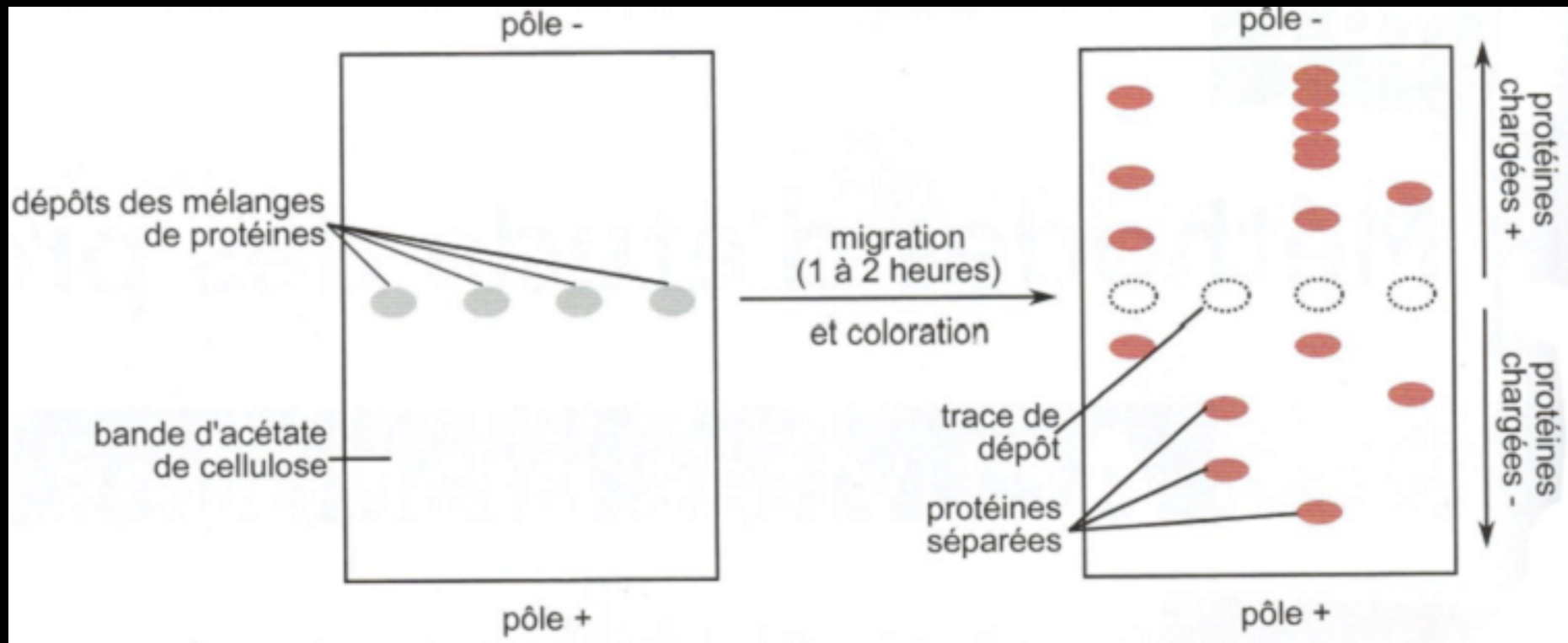
La particule est entourée de charges négatives, ce cortège électrostatique provoque un effet ralentisseur

Electrophorèse en conditions natives

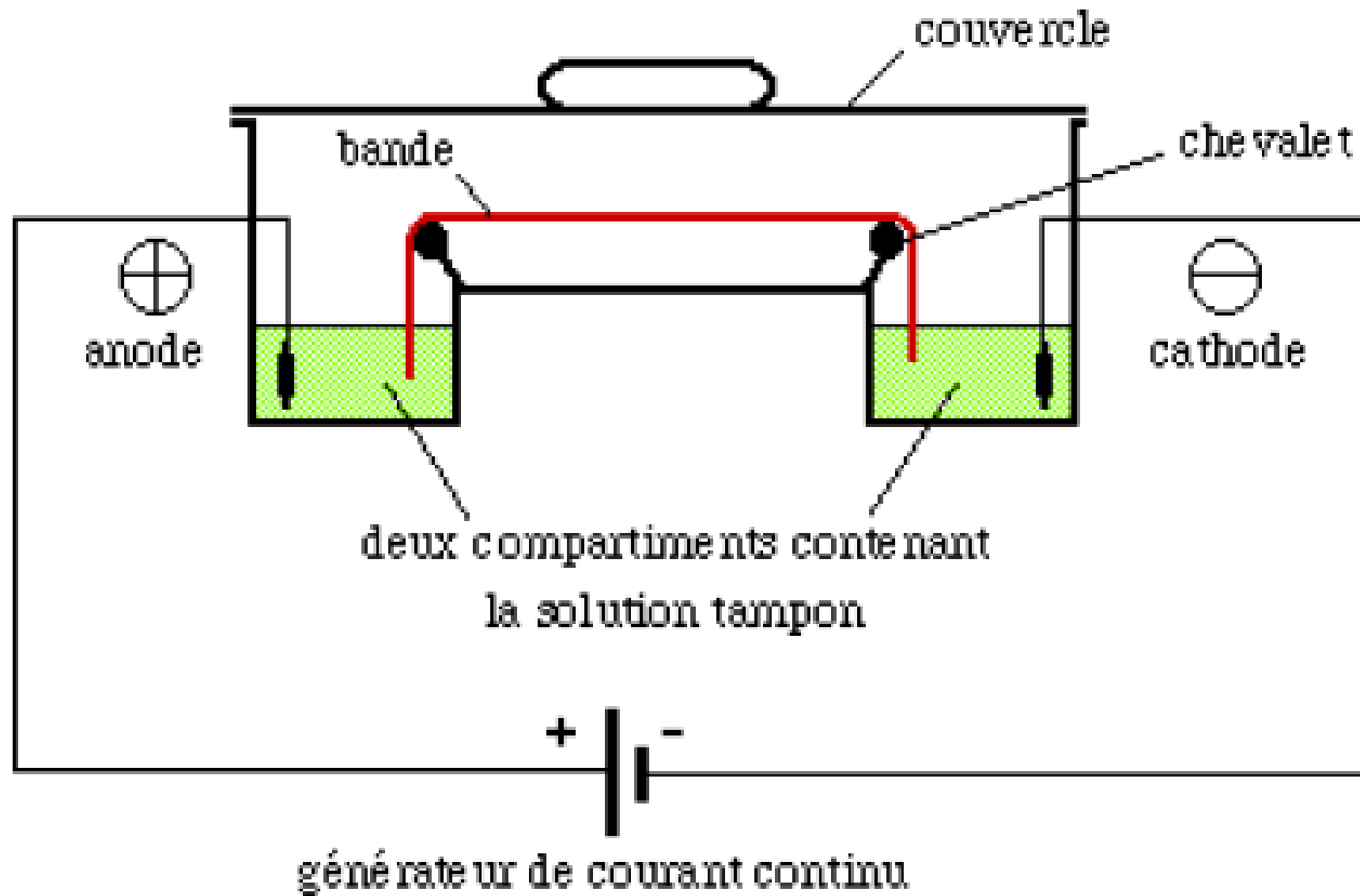
pH isoélectrique = pH auquel la charge globale de la protéine est nulle



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



En conditions natives : sur bande



Ajustement du volume

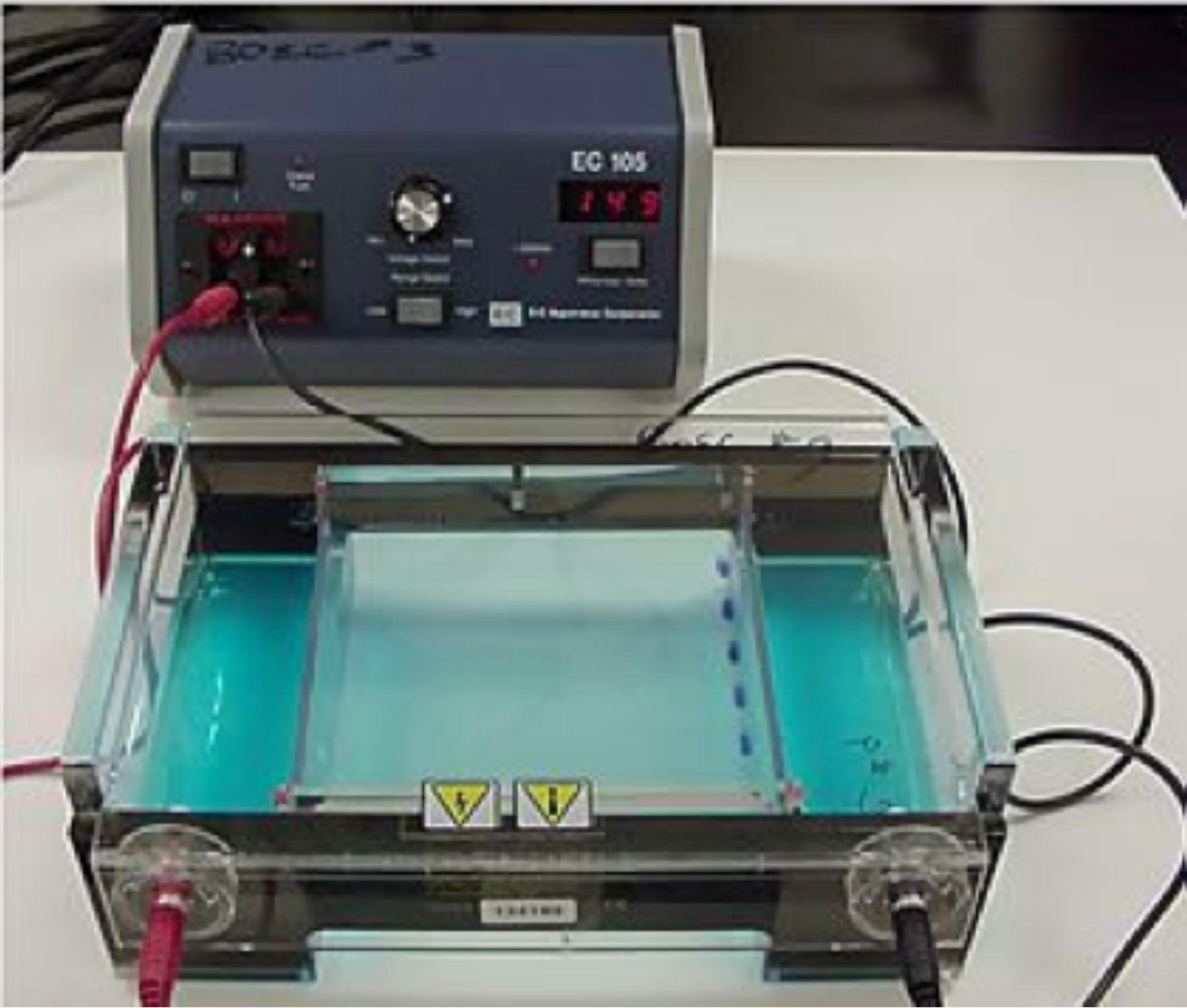
Pour prélever : appuyer jusqu' au premier cran

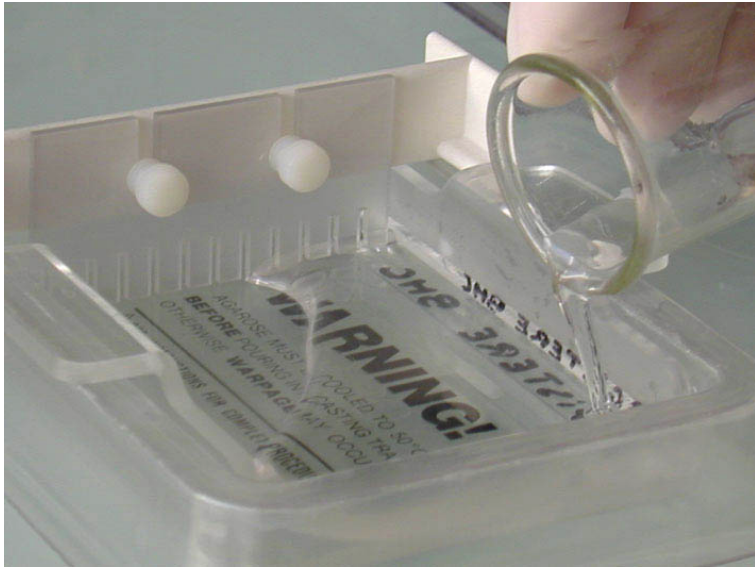
Pour déposer dans le puit : appuyer jusqu' au deuxième cran pour expulser toute la solution, sans expulser d' air.



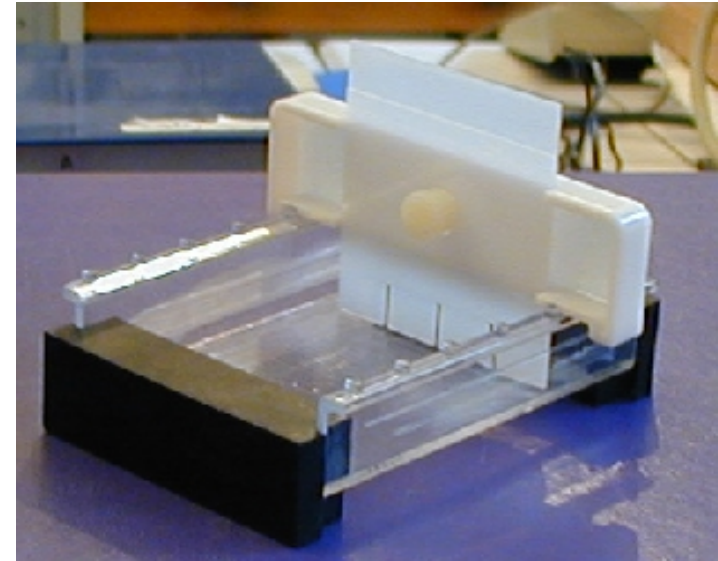
Bouton poussoir : 2 crans

Éjection du cône

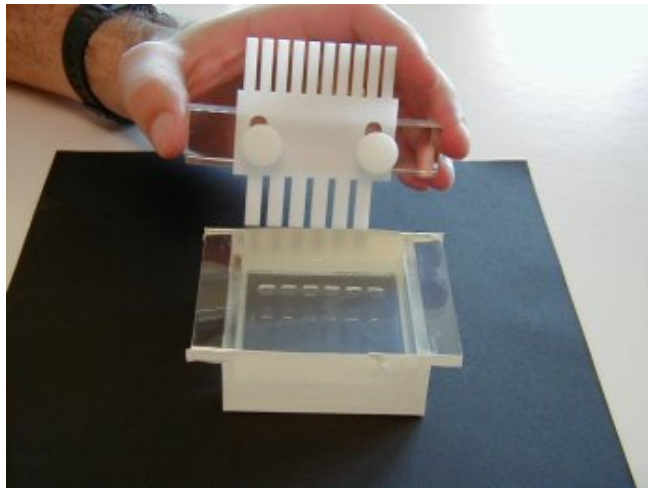




Univ-rouen



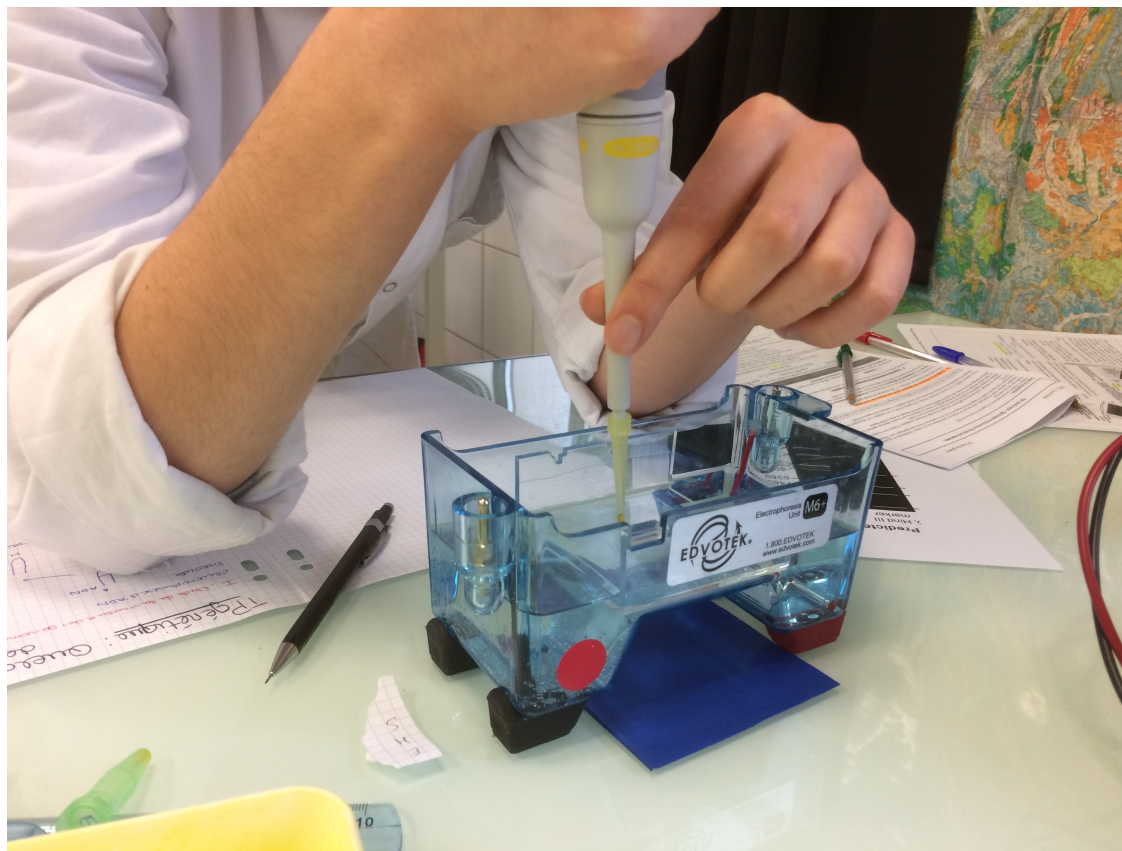
(Sny jussieu)



Ac-nancy

puits

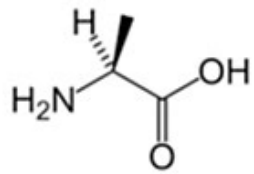
Coudes posés



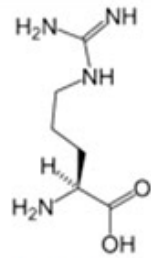
canson noir sous le gel

Analyse des résultats en conditions natives

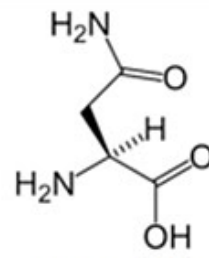
Nom	Code		pKa du COOH	pKa du NH ₃	pKa de la chaîne latérale	Poids Moléculaire
Alanine	ALA	A	2,3	9,7	-	89,09
Arginine	ARG	R	2,2	9,0	12,5	174,20
Asparagine	ASN	N	2,0	8,8	-	132,12
Acide Aspartique	ASP	D	2,1	9,8	3,9	133,10
Cystéine	CYS	C	1,8	10,8	8,3	121,15
Glutamine	GLN	Q	2,2	9,1	-	146,15
Acide Glutamique	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



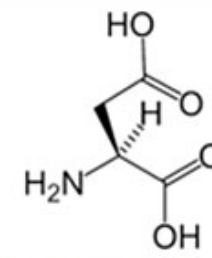
Alanine



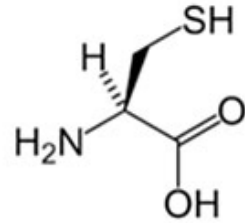
Arginine



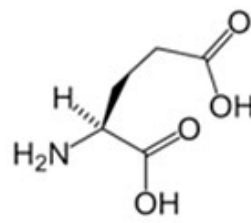
Asparagine



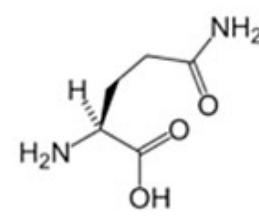
Acide aspartique



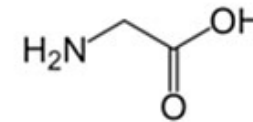
Cystéine



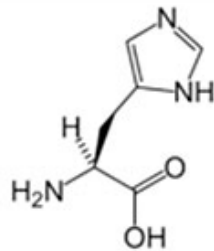
Acide glutamique



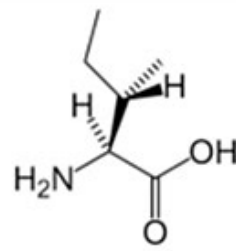
Glutamine



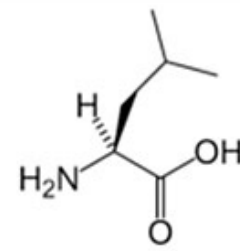
Glycine



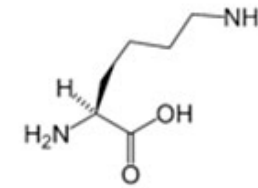
Histidine



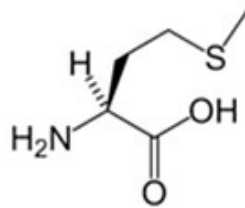
Isoleucine



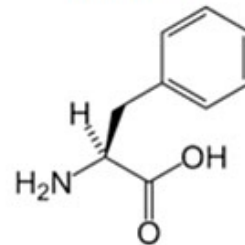
Leucine



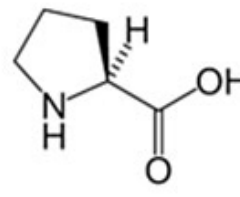
Lysine



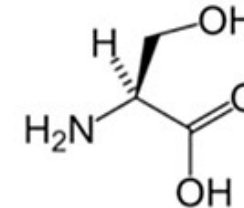
Méthionine



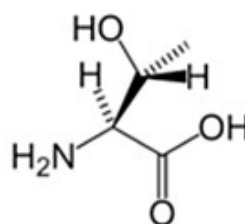
Phénylalanine



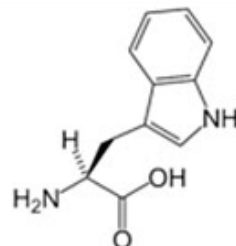
Proline



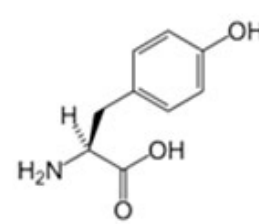
Sérine



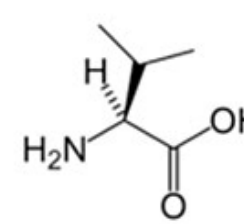
Thréonine



Tryptophane



Tyrosine



Valine

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

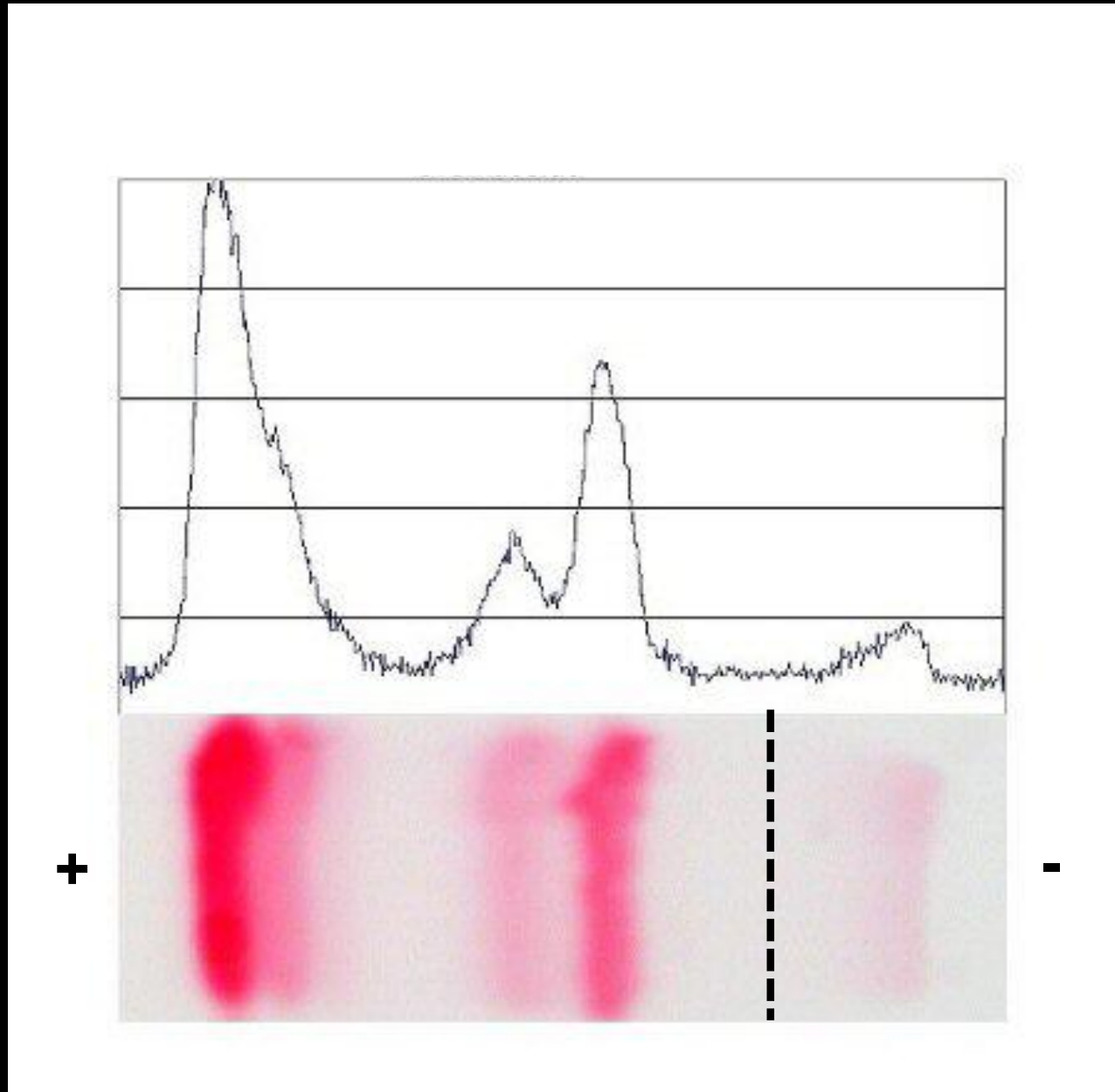
	Lysozyme	Ovalbumine
Arginine	11	15
Lysine	6	20
Aspartate	7	11
Glutamate	2	33
Charge globale		
Sens de migration		

	Lysozyme	Ovalbumine
Acides aminés chargés + au pH du tampon de migration		
Arginine	11	15
Lysine	6	20
Acides aminés chargés - au pH du tampon de migration		
Aspartate	7	11
Glutamate	2	33
Charge globale	8 +	9-
Sens de migration	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

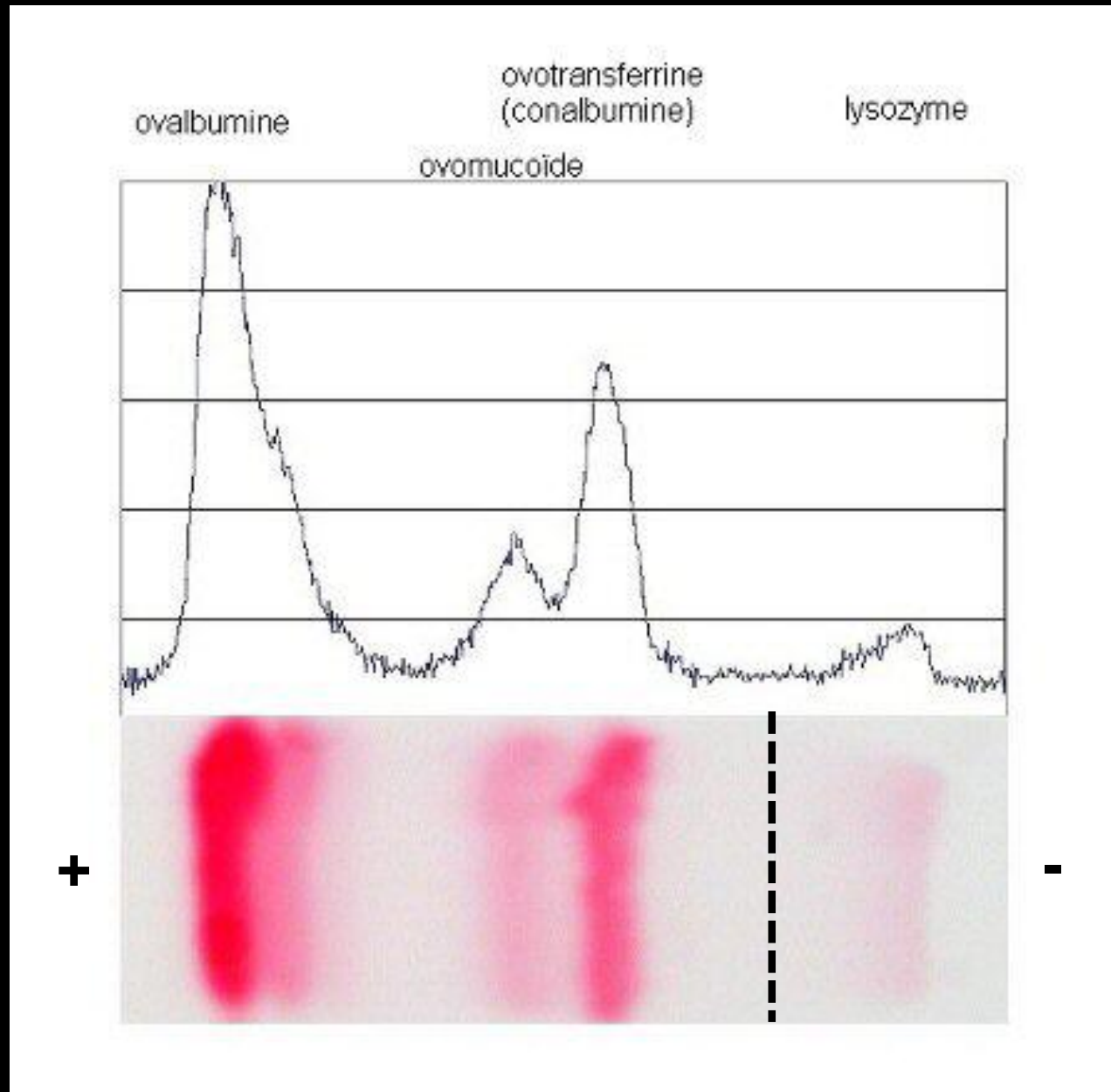
Electrophorèse en conditions natives sur bande

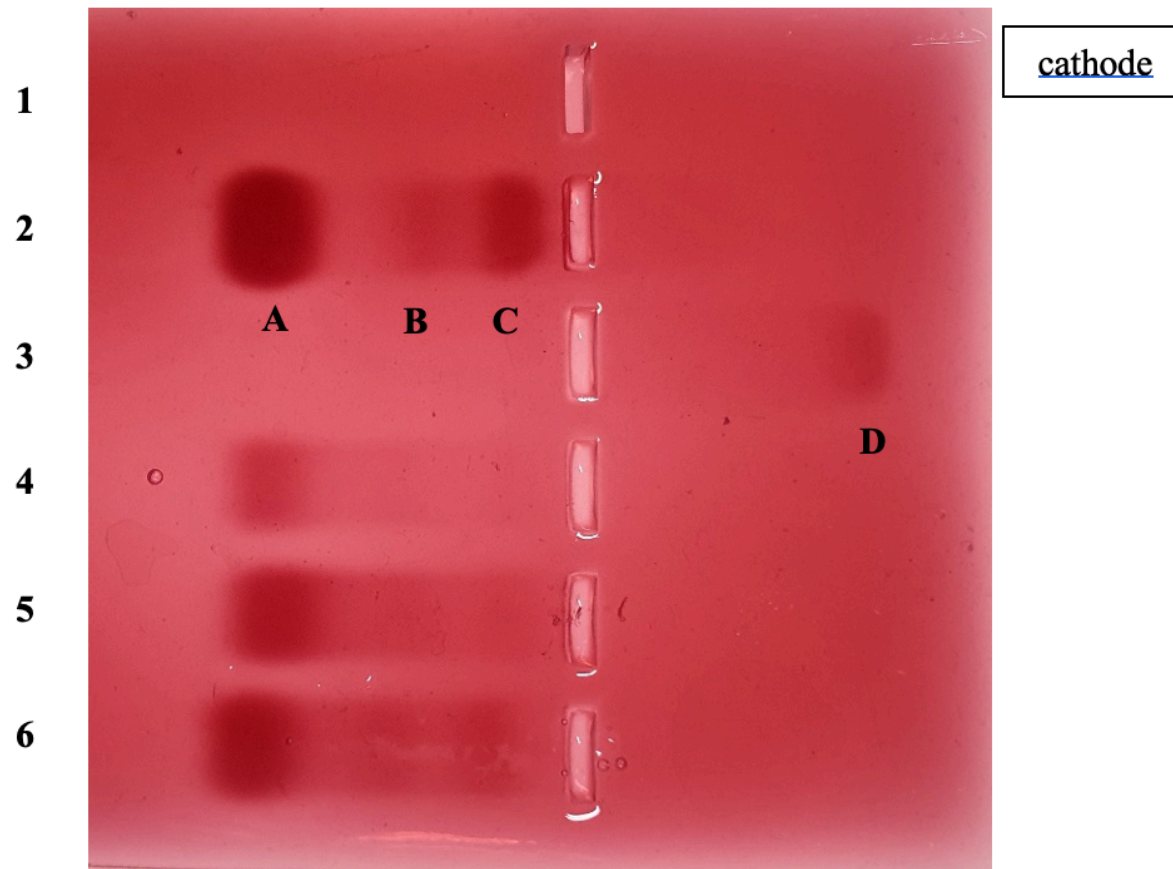
L'analyse densitométrique permet de quantifier les différentes protéines du blanc d'œuf.



Electrophorèse en conditions natives sur bande

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



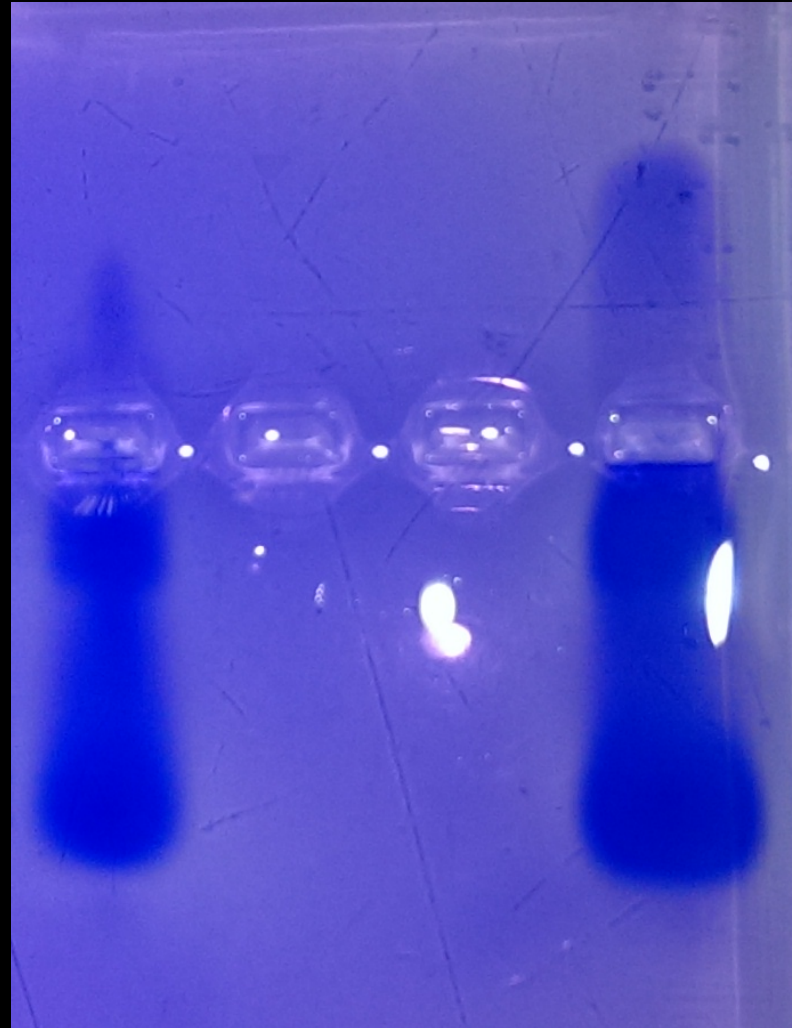


- A- Ovalumine
- B- Ovomucoïde ?
- C- Ovotransferrine
- D : Lysozyme

Avec des dépôts de 20 μ L, après 40 min de migration et 24 h de décoloration.
 Rq : Le lysozyme du blanc d'œuf se voit légèrement à l'œil nu mais pas sur la photographie.

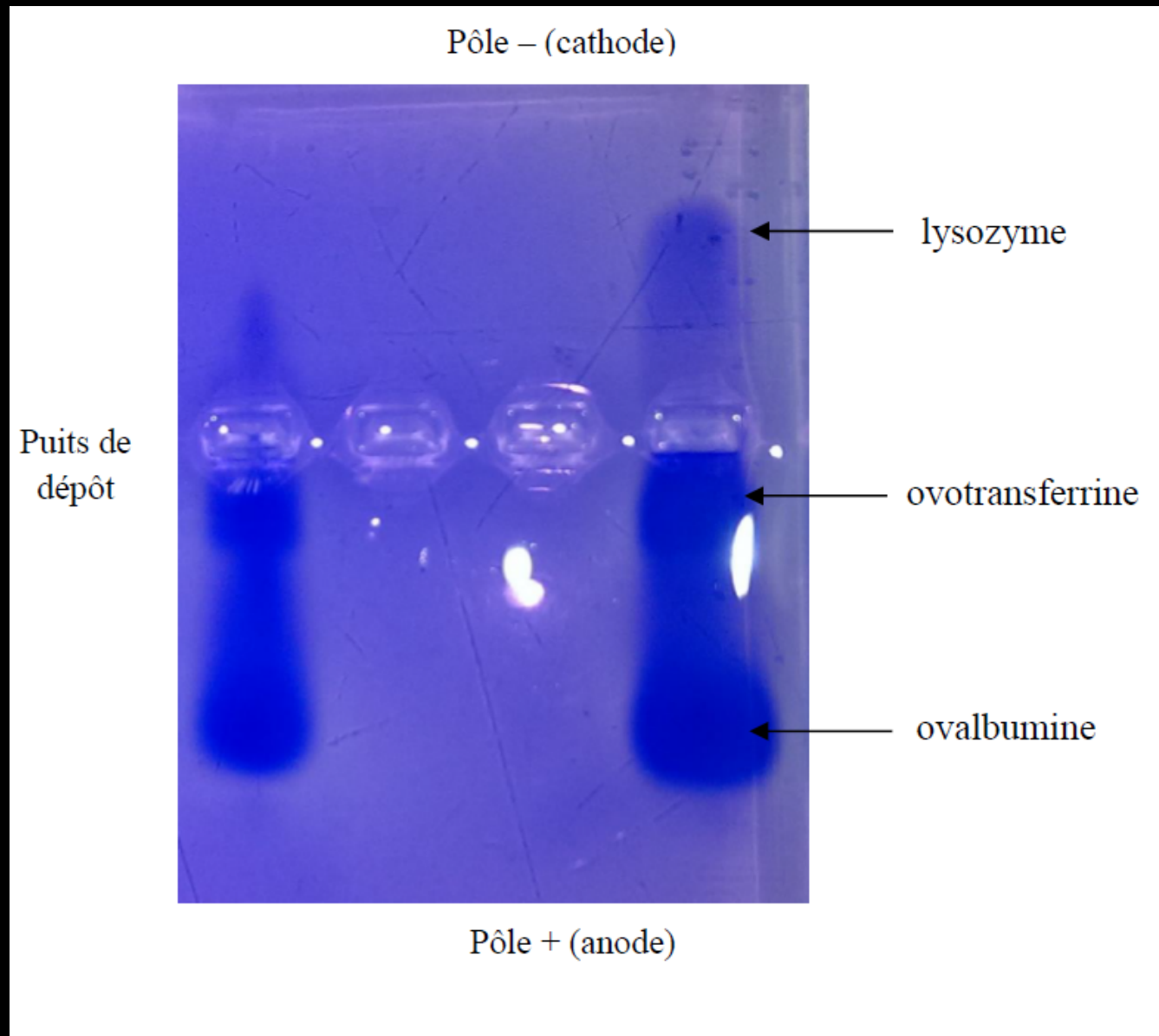
Electrophorèse en conditions natives sur gel

Pôle -

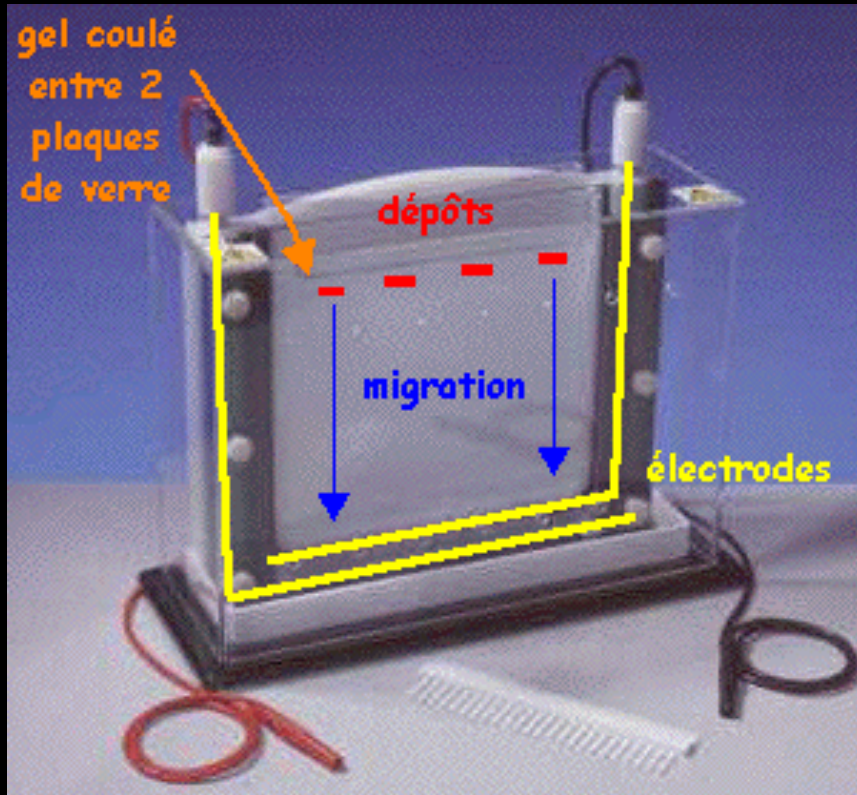
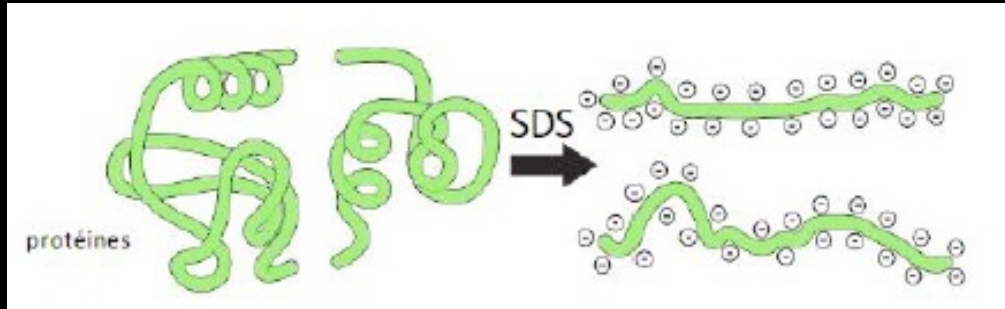
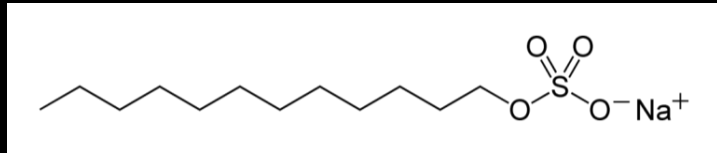


Pôle +

Electrophorèse en conditions natives sur gel

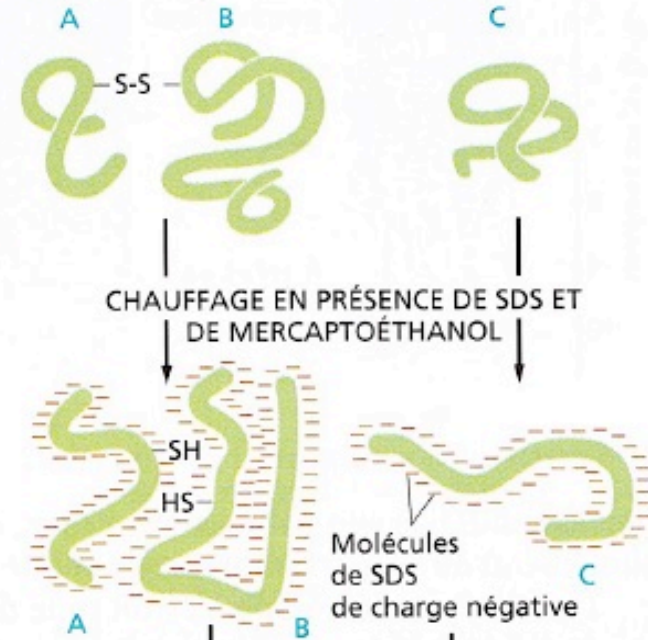


Electrophorèse en conditions dénaturantes

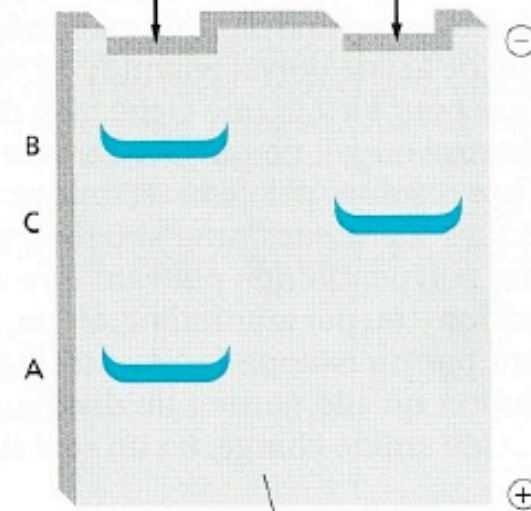


Protéine avec deux sous-unités, A et B, réunies par un pont disulfure

Sous-unité protéique seule



ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE



Plaque de gel de polyacrylamide

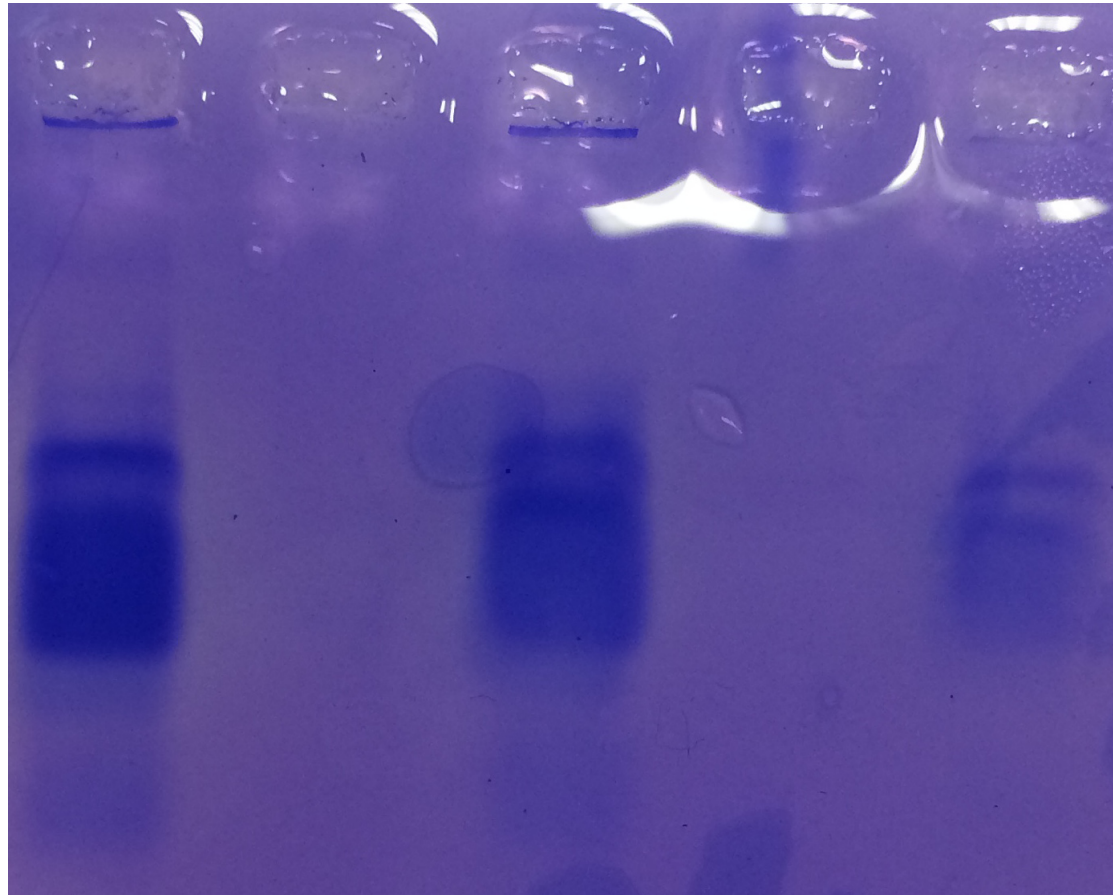
Dilutions

1

1/2

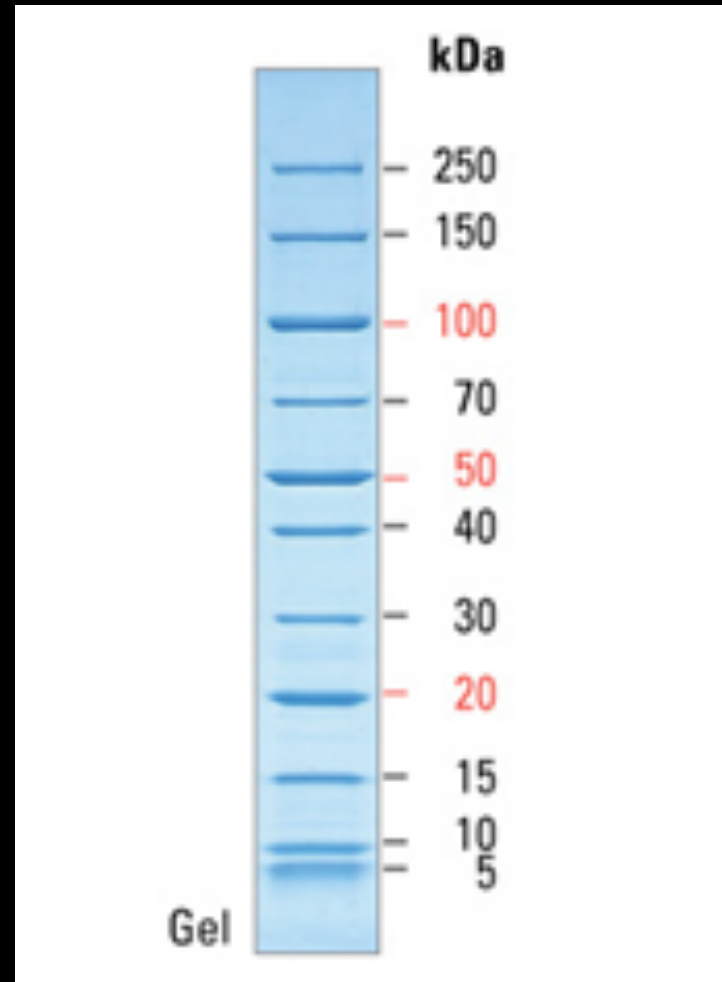
1/4

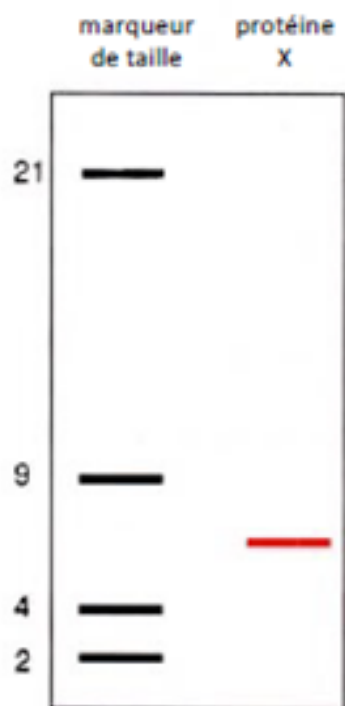
Borne -



Borne +

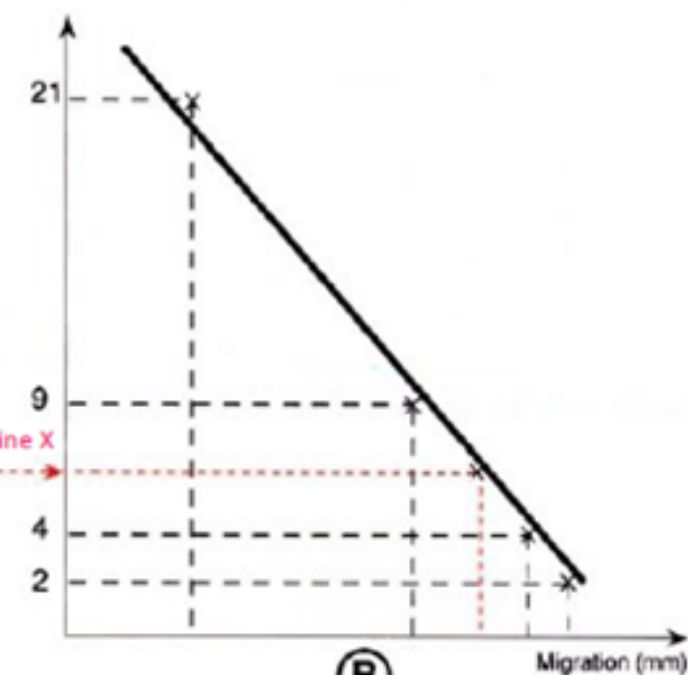
Marqueur de masse moléculaire





(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

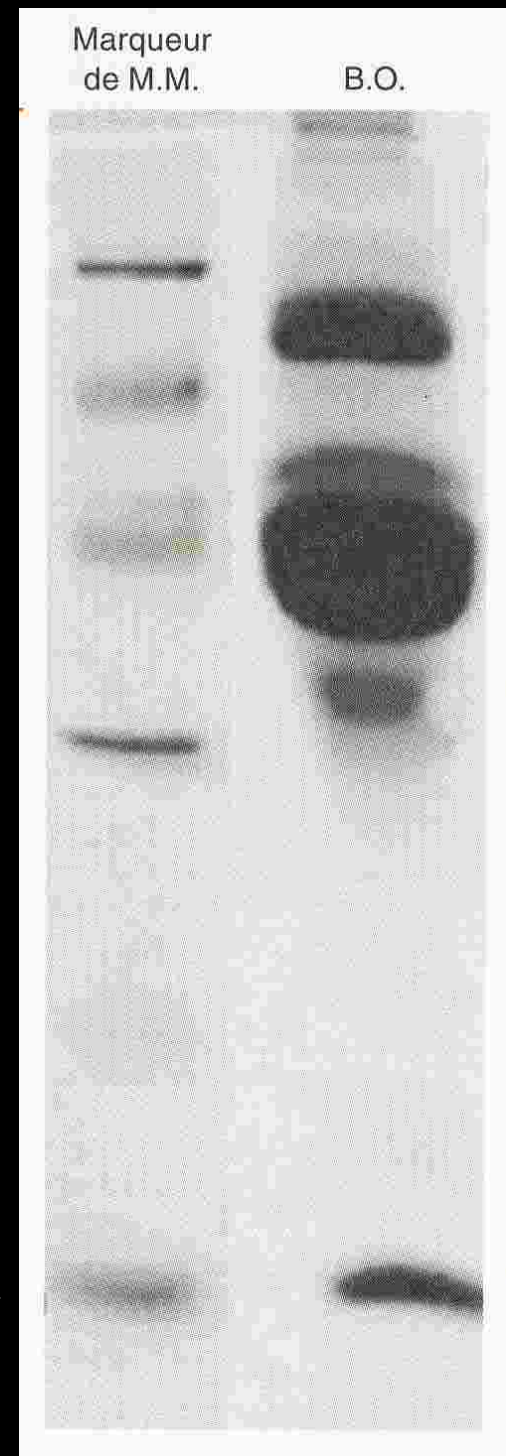
94 kDa

67 kDa

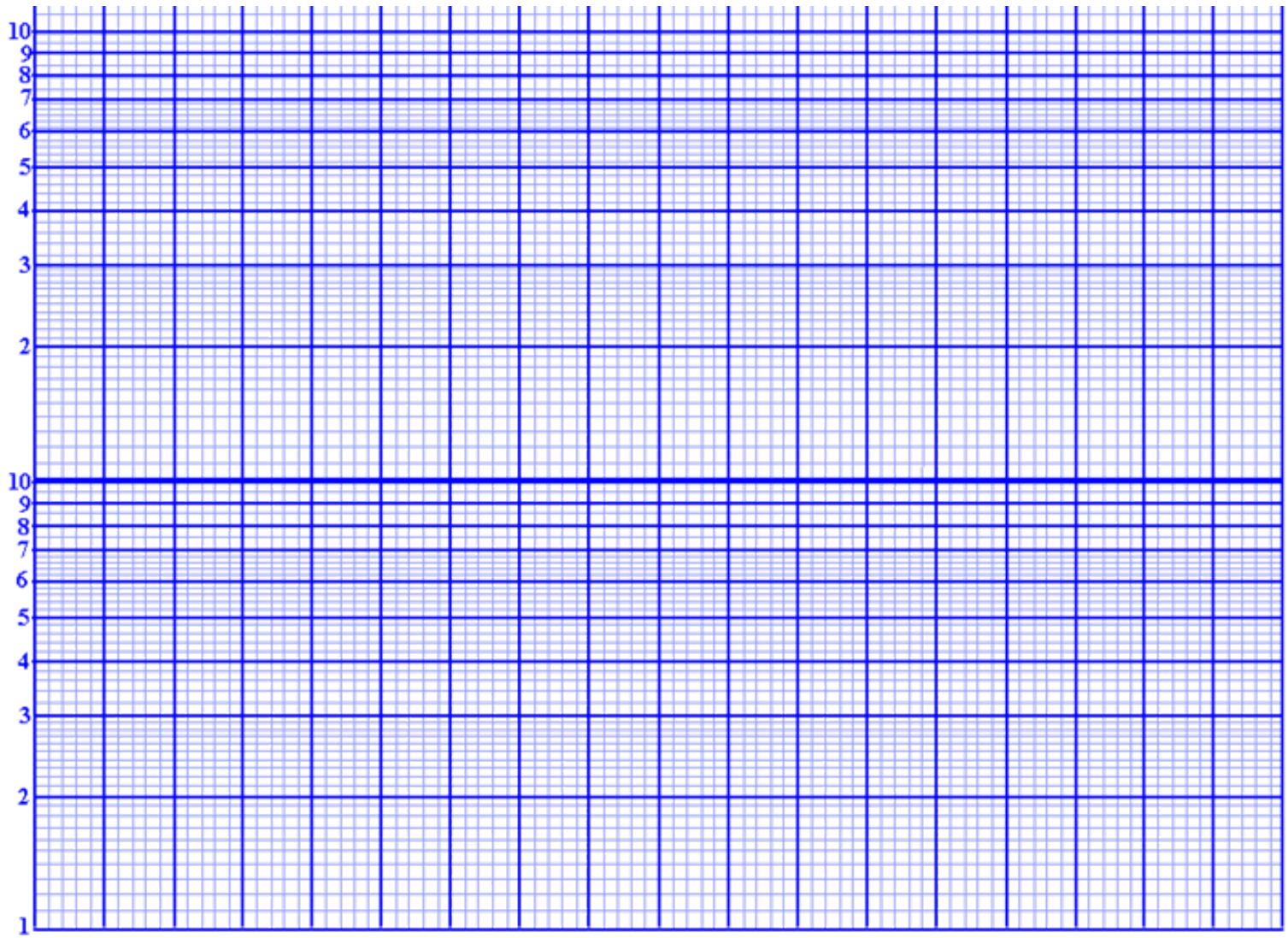
43 kDa

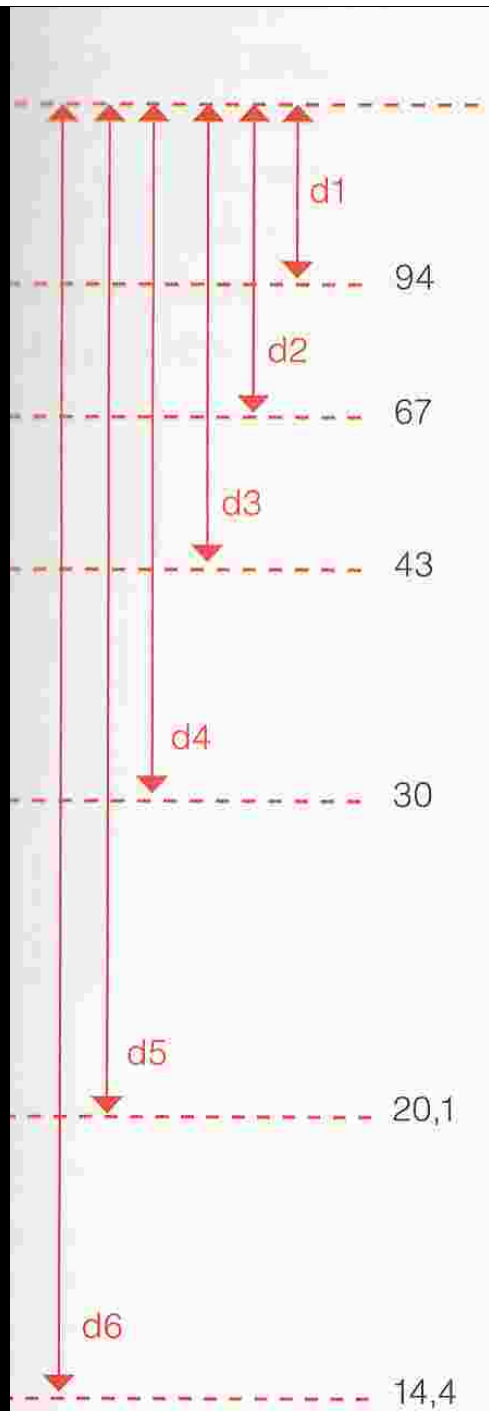
30 kDa

14,4 kDa



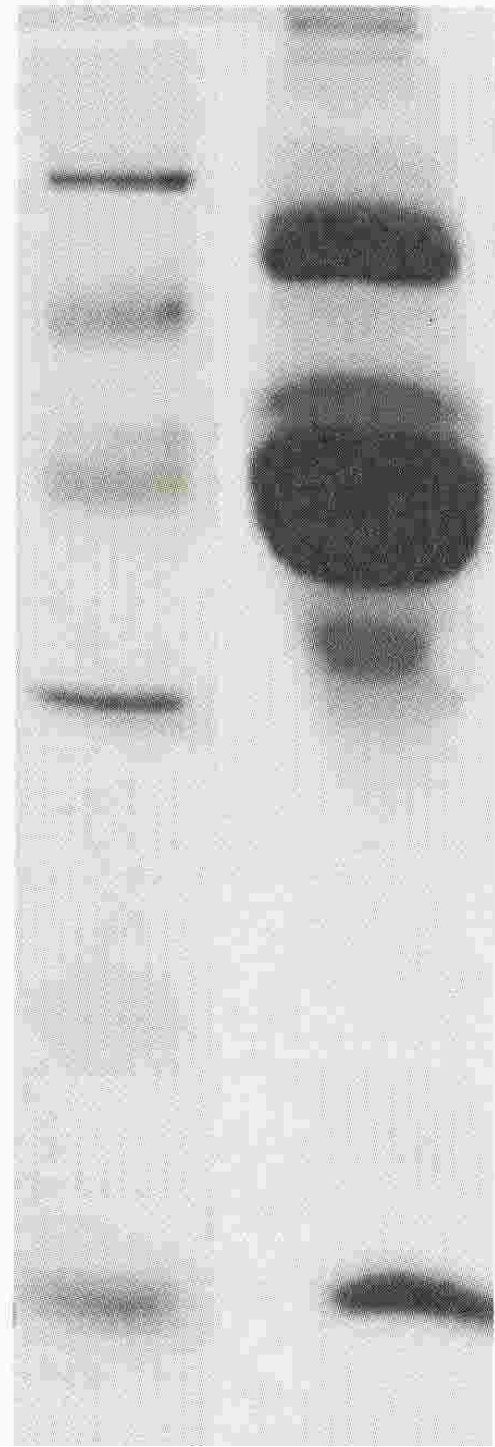
100
40
30
20

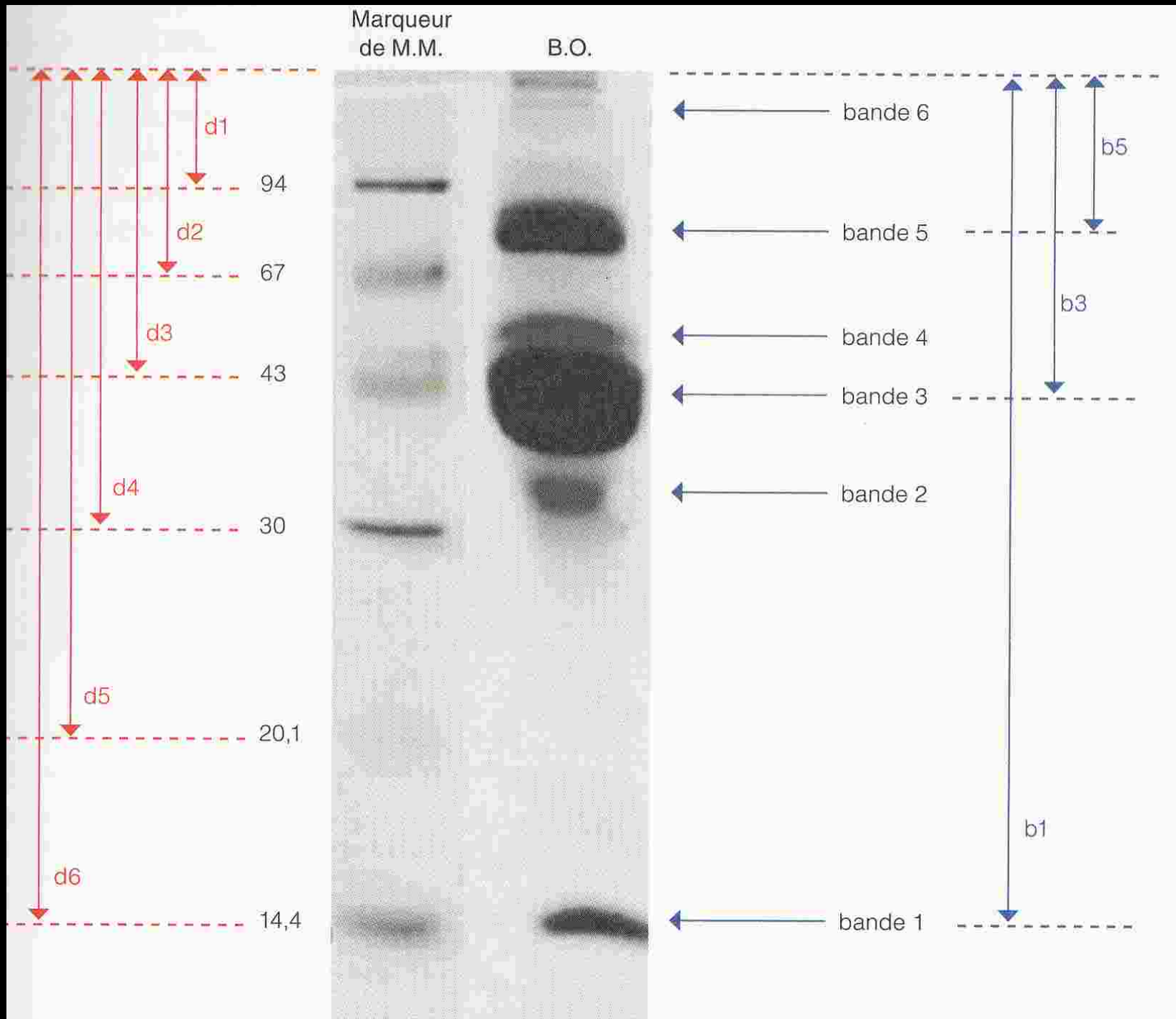




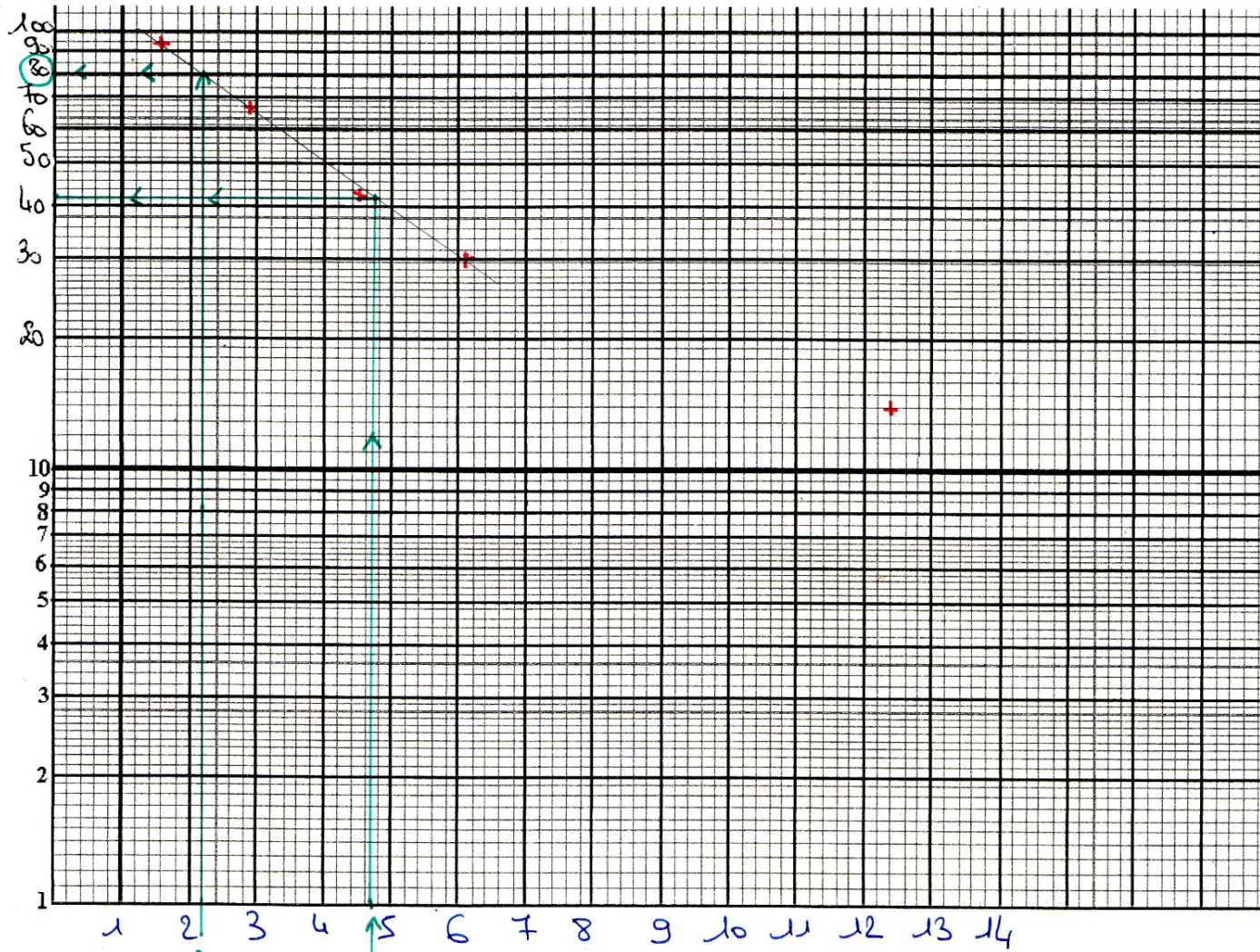
Marqueur
de M.M.

B.O.





masse moléculaire (kDa)

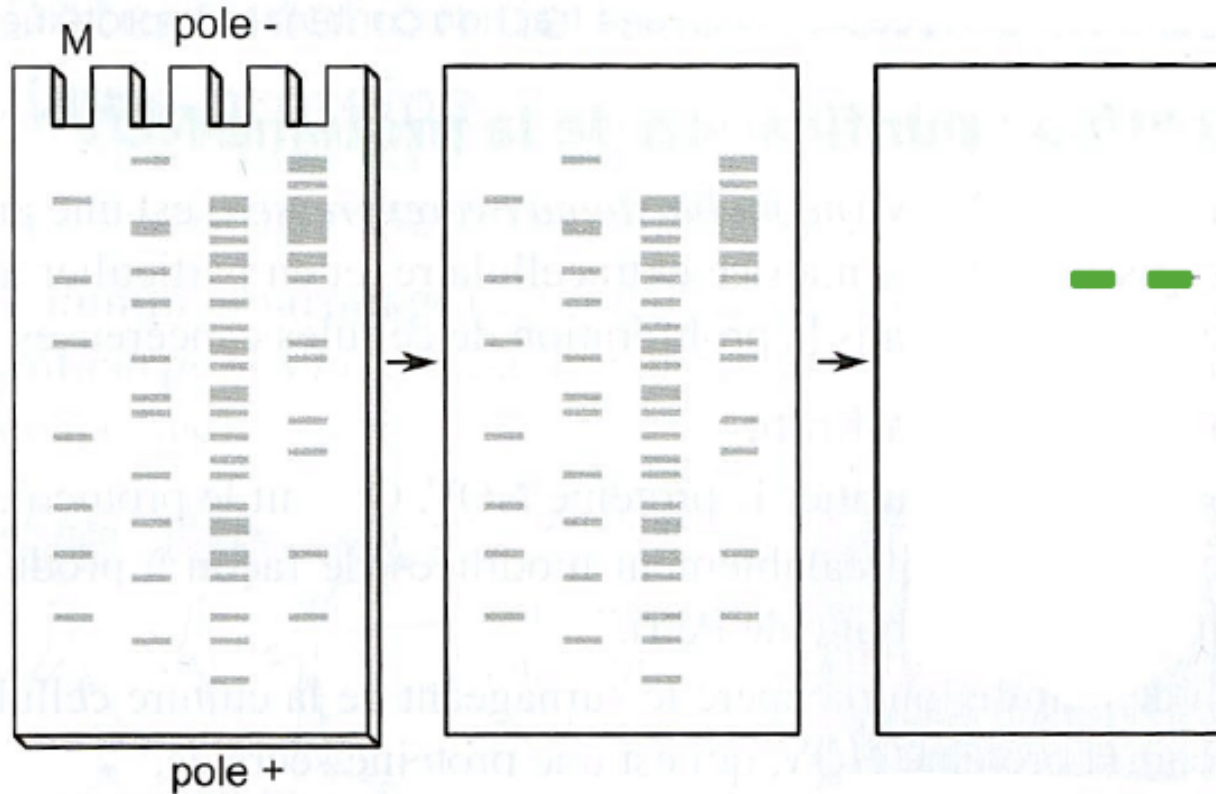


↑
 distance de migration de la bande 5
 2,2 cm
 ⇒ masse moléculaire de la protéine 5 ~ 80 kDa

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

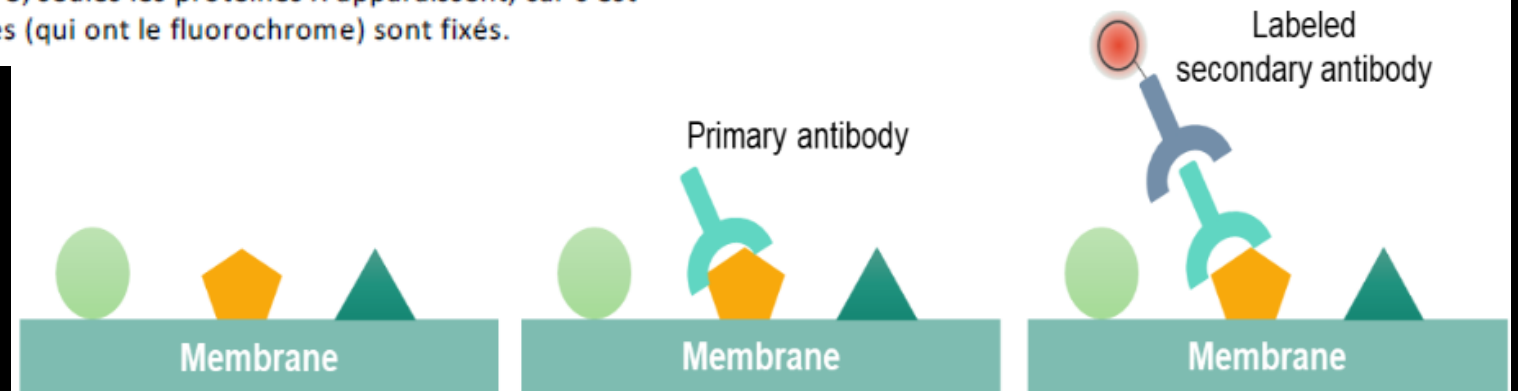
2

Transfert sur membrane

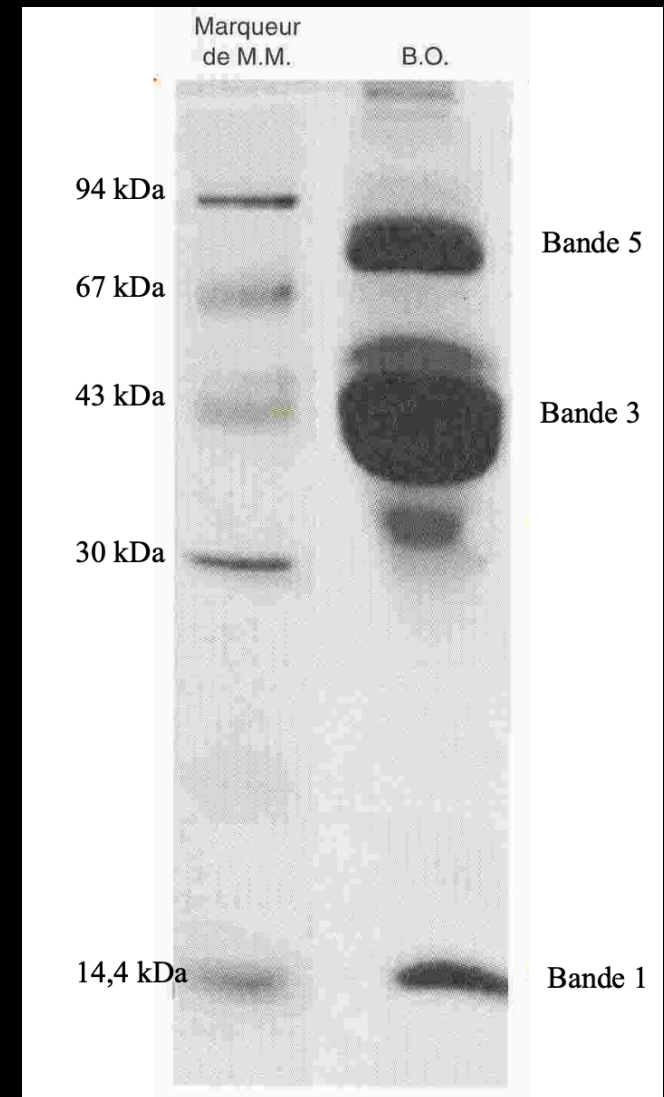
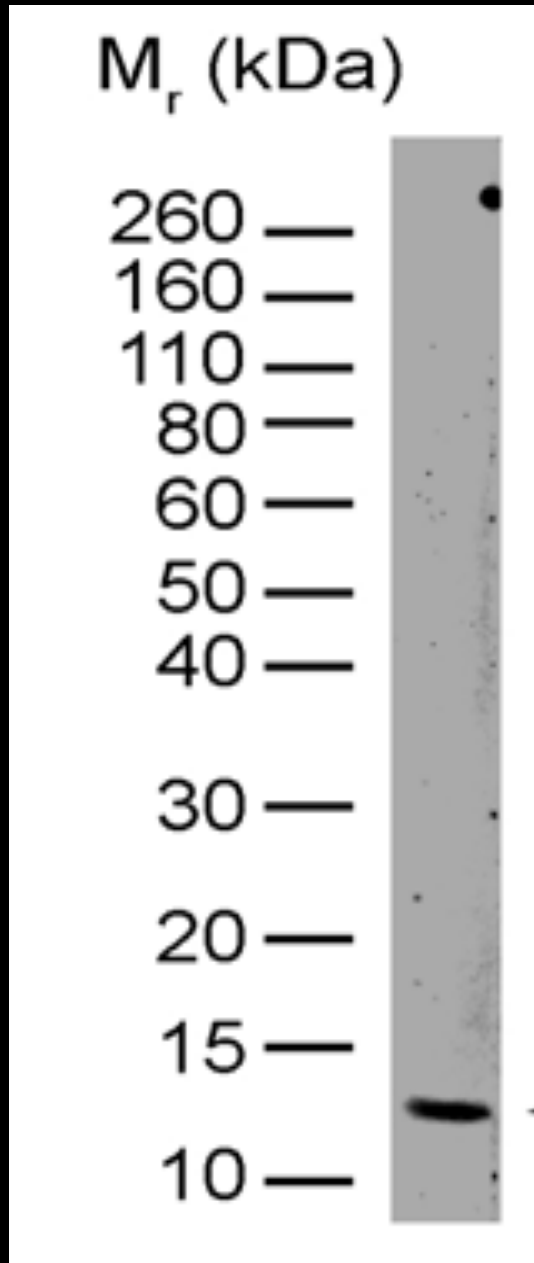
3

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