

ÉLECTROPHORÈSE DE L'ADN DE BACTÉRIOPHAGE λ

Carte de restriction

ADN

E

H

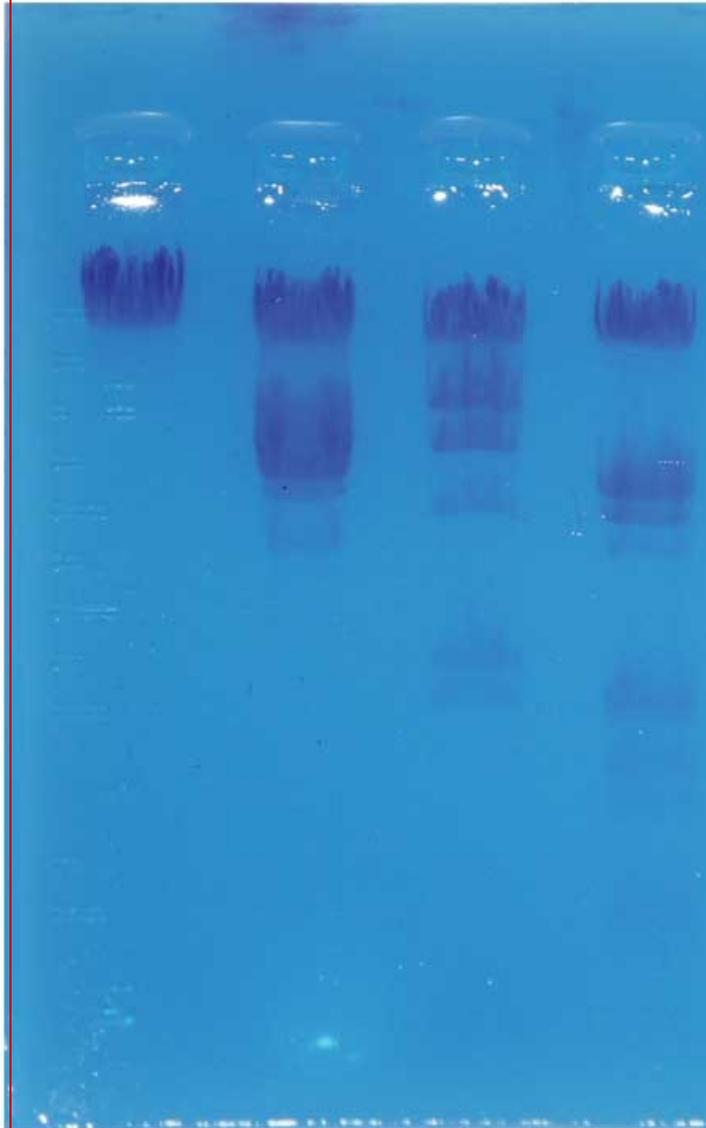
E+H

ADN

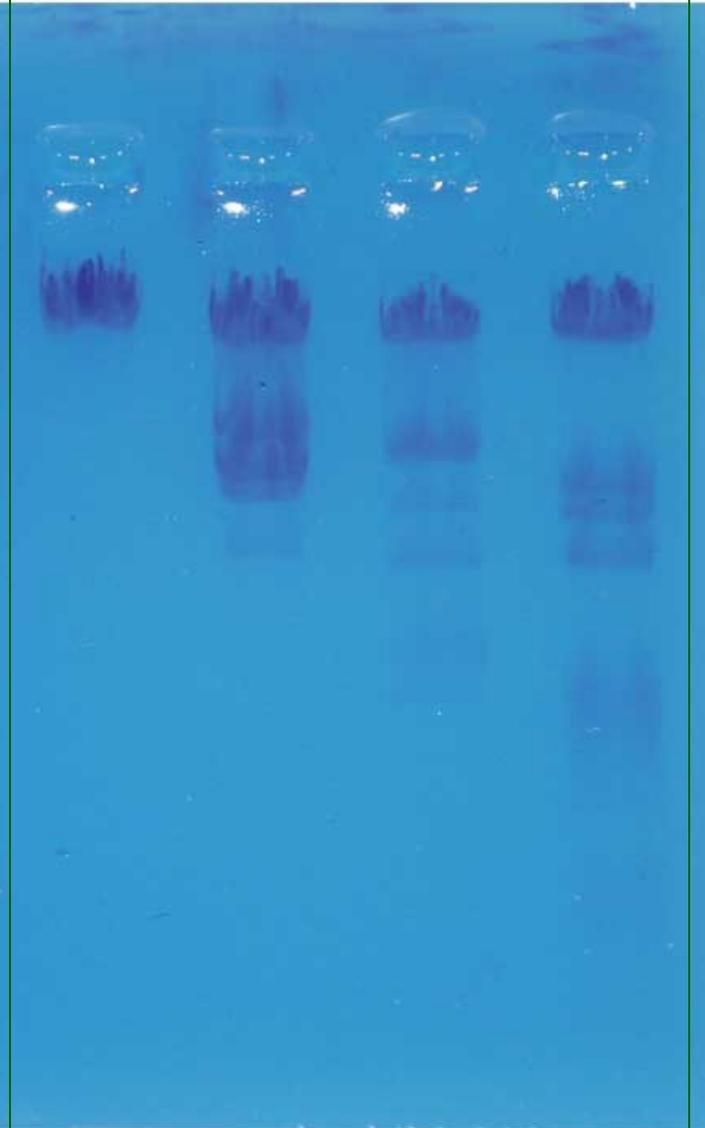
E

H

E+H



Phage λ sauvage



Phage λ muté

Migration de l'ADN du phage non muté

48 502	21 226	23130	21226
	7 421	9416	
	5 804	6682	
	5 643		5148
	4 878		4973
		4361	
	3 530		4268
			3530
		2322	
		2027	2027
			1904
			1584 (1375) (947) (831) (564)
ADN de phage λ	Digéré par EcoRI	Digéré par HindIII	Double digéré par EcoRI et HindIII

Migration de l'ADN du phage muté

48 502	21 226	23130	21226
	7 421	6682	
	5 804	6019	
	5 643		5148
	4 878		4973
		4361	
	3 530		4268
			3530
		3397	3397
		2322	
		2027	2027
			1904
			1751
			1584 (1375) (947) (831) (564)
ADN de phage λ muté	Digéré par EcoRI	Digéré par HindIII	Double digéré par EcoRI et HindIII

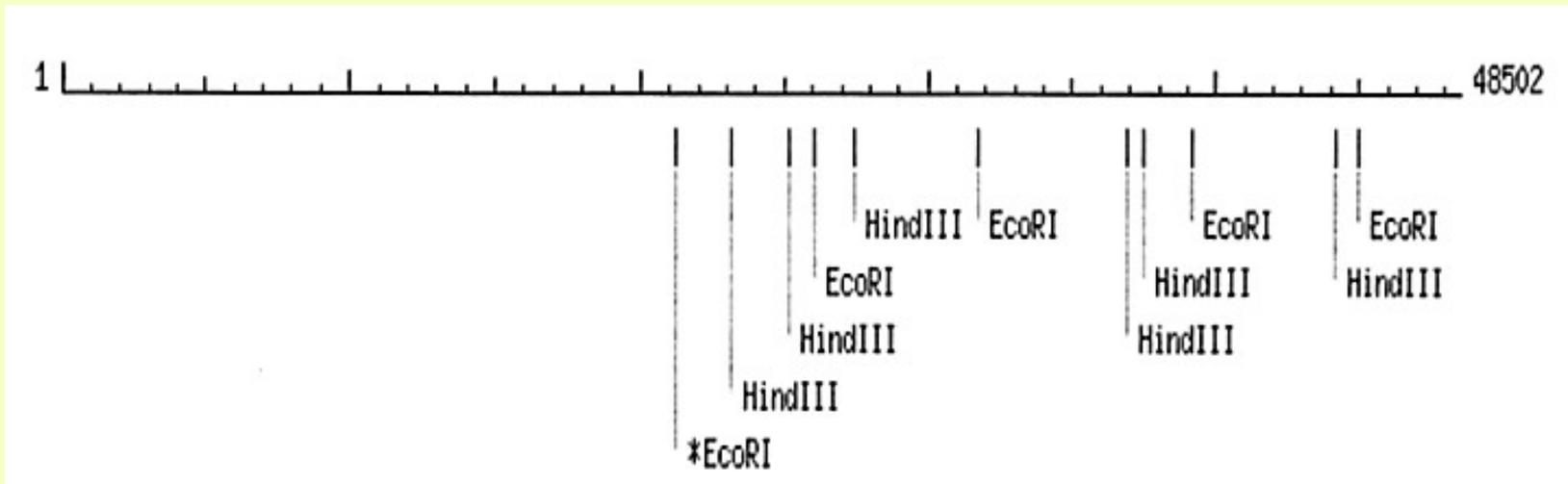
Migration de l'ADN du phage non muté

<input type="checkbox"/> 48 502	<input type="checkbox"/> 21 226 <input type="checkbox"/> 7 421 <input type="checkbox"/> 5 804 <input type="checkbox"/> 5 643 <input type="checkbox"/> 4 878 <input type="checkbox"/> 3 530	<input type="checkbox"/> 23130 <input type="checkbox"/> 9416 <input type="checkbox"/> 6682 <input type="checkbox"/> 4361 <input type="checkbox"/> 2322 <input type="checkbox"/> 2027 (564)	<input type="checkbox"/> 21226 <input type="checkbox"/> 5148 <input type="checkbox"/> 4973 <input type="checkbox"/> 4268 <input type="checkbox"/> 3530 <input type="checkbox"/> 2027 <input type="checkbox"/> 1904 <input type="checkbox"/> 1584 (1375) (947) (831) (564)
ADN de phage λ	Digéré par EcoRI	Digéré par HindIII	Double digéré par EcoRI et HindIII

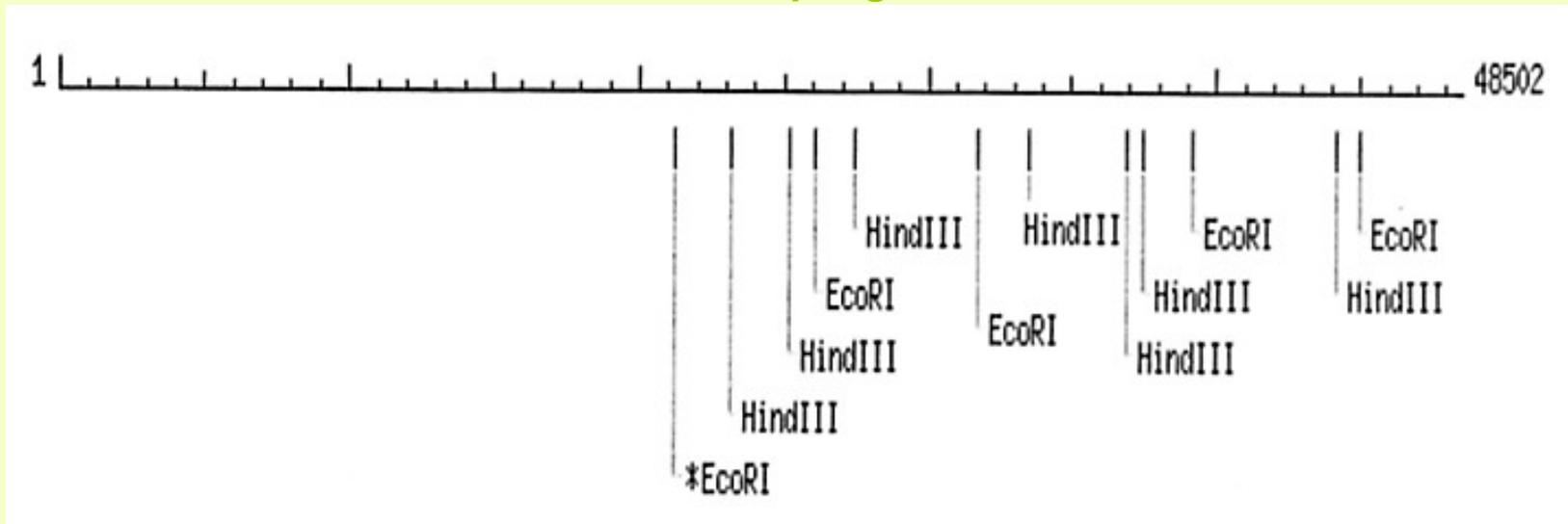
Migration de l'ADN du phage muté

<input type="text" value="48 502"/>	<input type="text" value="21 226"/>	<input type="text" value="23130"/>	<input type="text" value="21226"/>
	<input type="text" value="7 421"/>	<input type="text" value="6682"/>	
	<input type="text" value="5 804"/>	<input type="text" value="6019"/>	
	<input type="text" value="5 643"/>		<input type="text" value="5148"/>
	<input type="text" value="4 878"/>		<input type="text" value="4973"/>
		<input type="text" value="4361"/>	
	<input type="text" value="3 530"/>	<input type="text" value="3397"/>	<input type="text" value="4268"/>
			<input type="text" value="3530"/>
			<input type="text" value="3397"/>
		<input type="text" value="2322"/>	
		<input type="text" value="2027"/>	<input type="text" value="2027"/>
			<input type="text" value="1904"/>
			<input type="text" value="1751"/>
			<input type="text" value="1584"/>
			(1375)
			(947)
			(831)
		(564)	(564)
ADN de phage λ muté	Digéré par EcoRI	Digéré par HindIII	Double digéré par EcoRI et HindIII

Carte de restriction du phage non muté

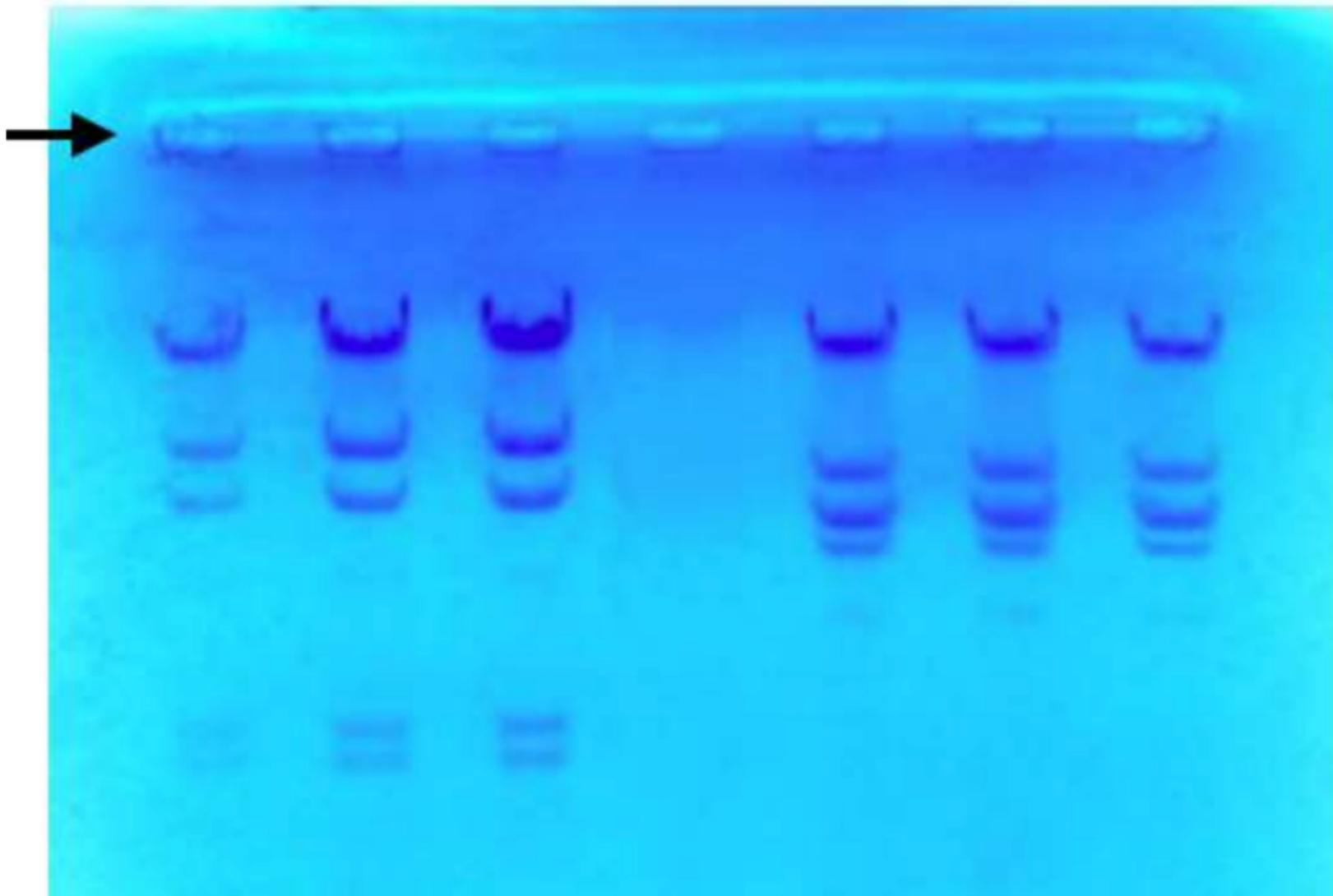


Carte de restriction du phage muté



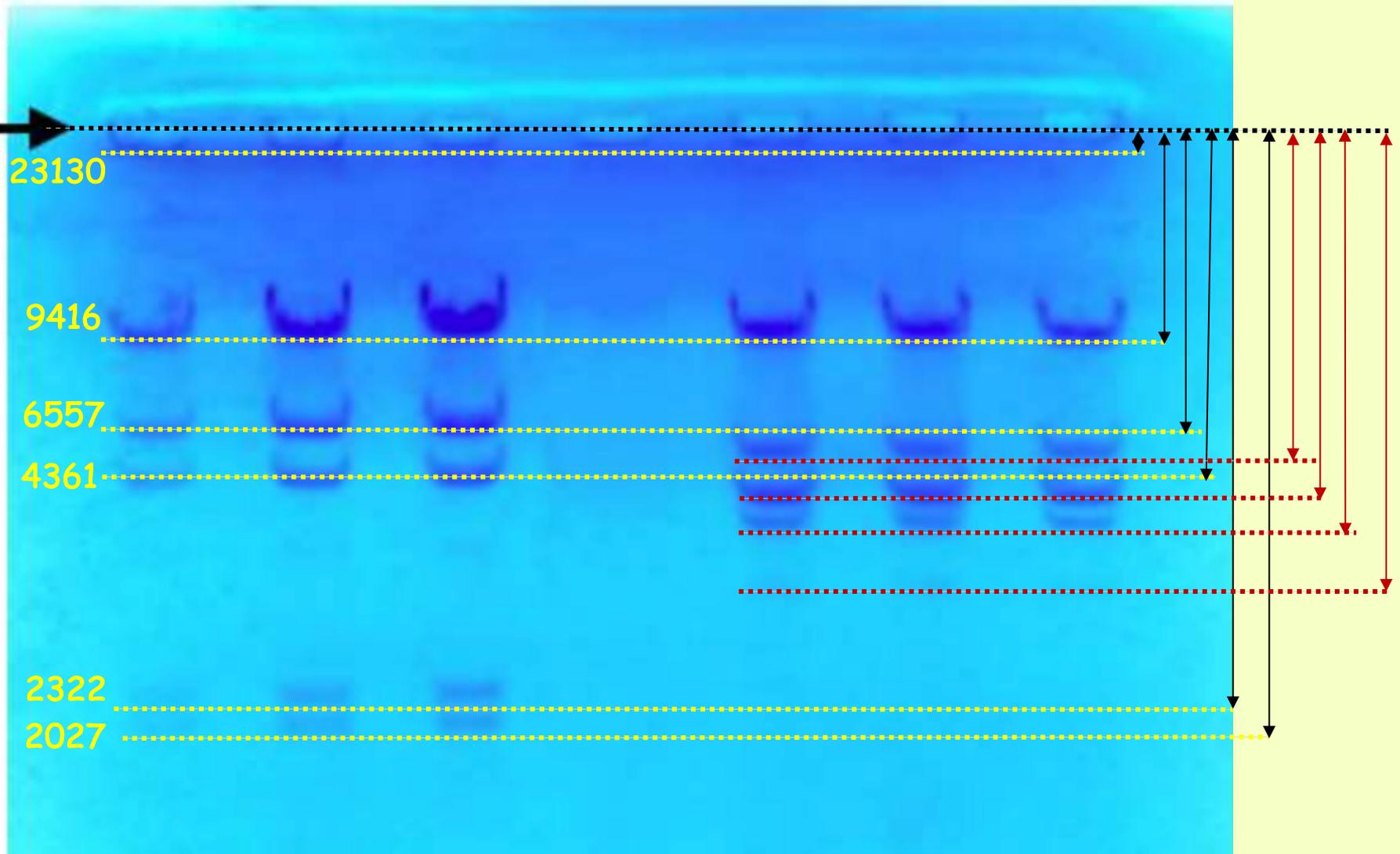
ADN digéré par HindIII

ADN digéré par EcoRI



ADN digéré par HindIII

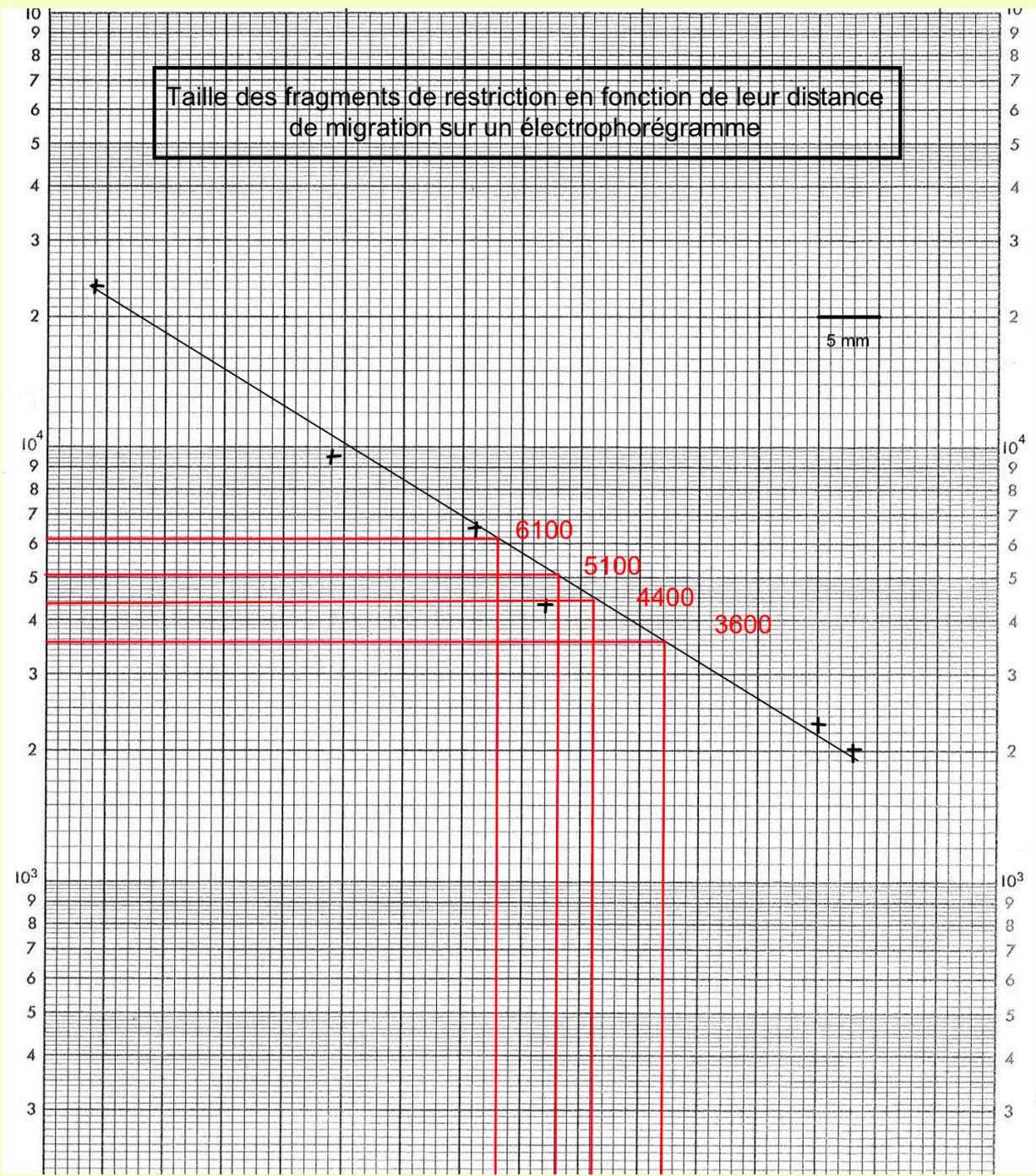
ADN digéré par EcoRI



Taille T du fragment d'ADN (pb)	23 130	9 416	6 557	4 361	2 322	2 027
Distance d de migration sur le gel (mm)	4	24	36	42	65	68

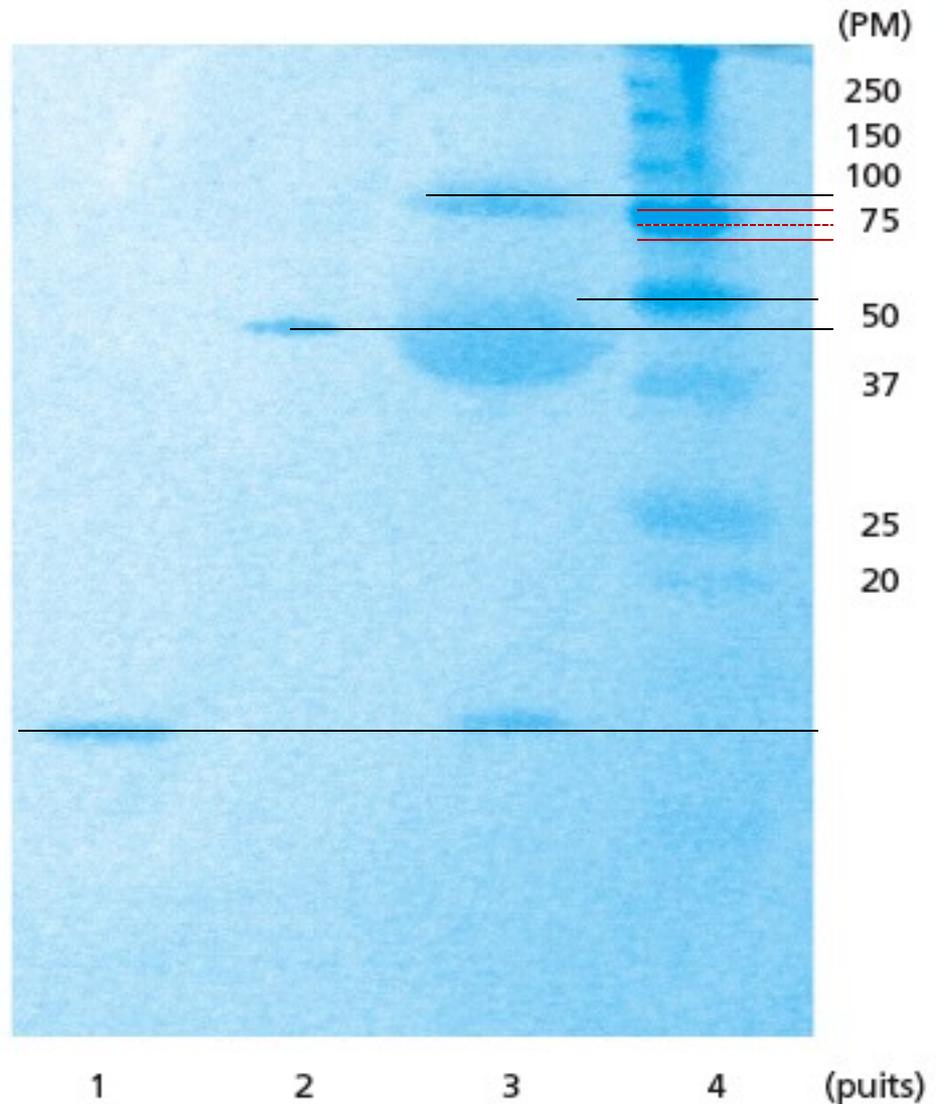
Distance d de migration sur le gel (mm)	4	24	38	43	46	52
Taille T du fragment d'ADN (pb)	?	?				

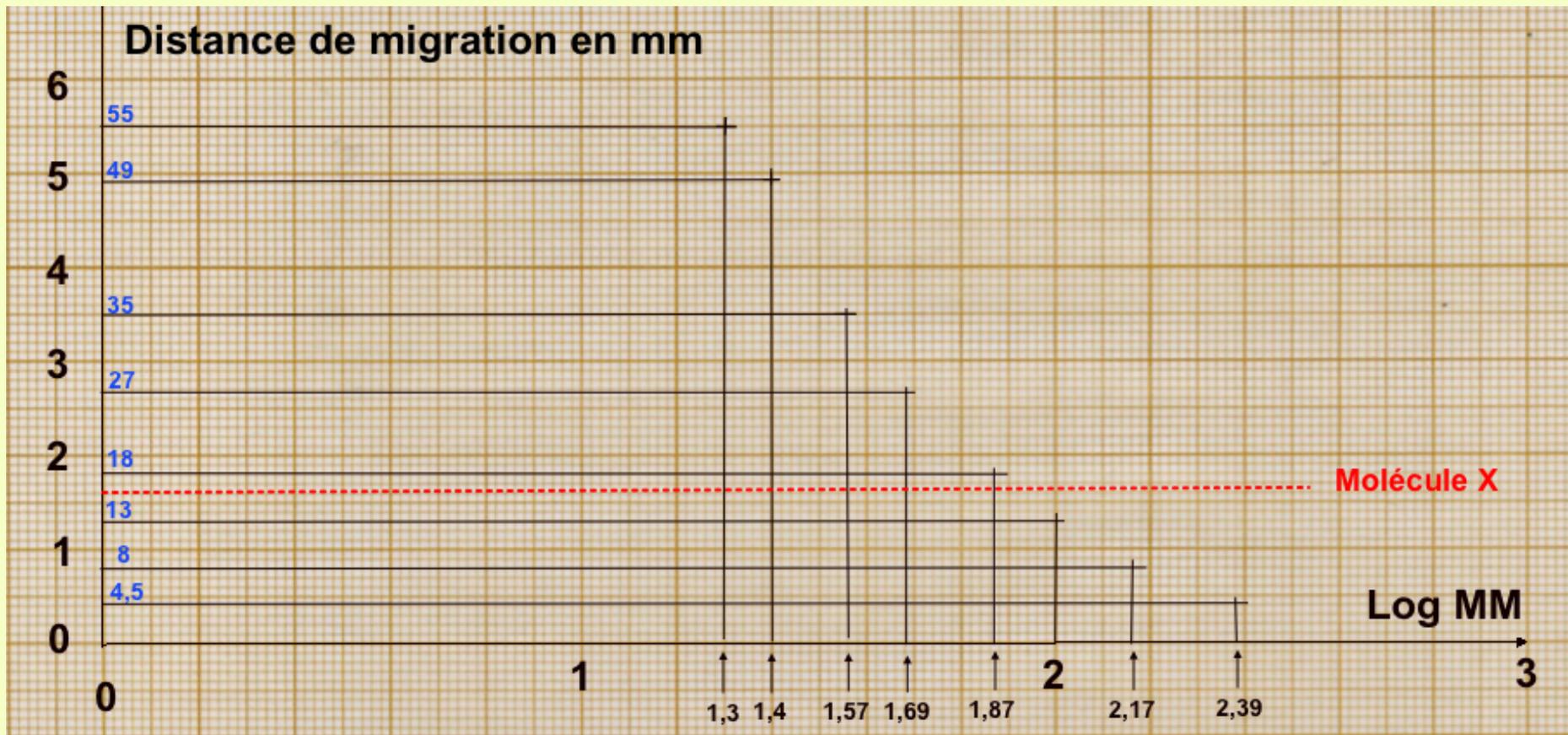
Taille des fragments de restriction en fonction de leur distance de migration sur un électrophorégramme



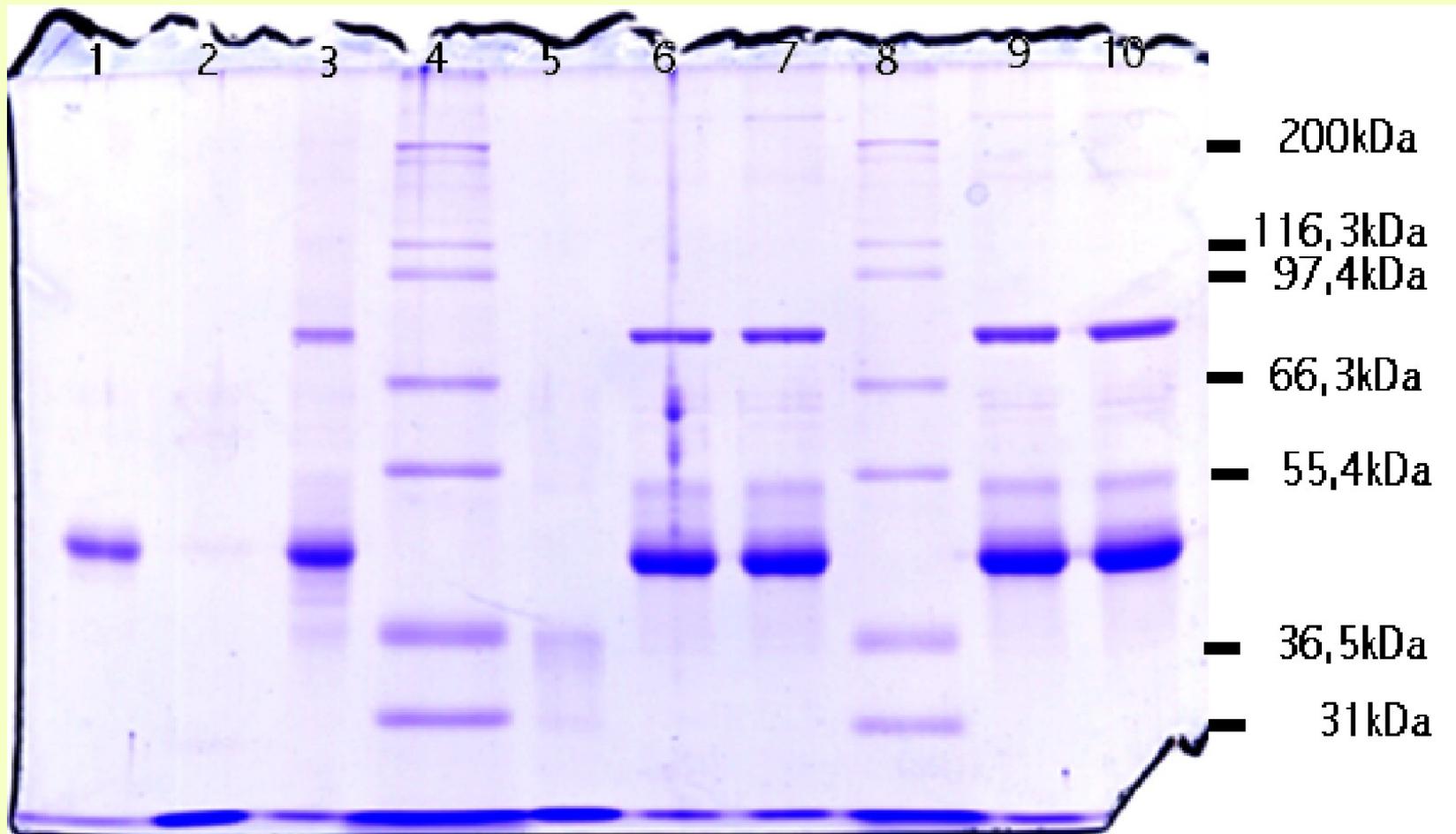
Electrophorégramme de blanc d'œuf (SDS-PAGE).

Puits 1 : lysozyme purifié ; puits 2 : ovalbumine de poule purifiée ; puits 3 : blanc d'œuf de poule ; puits 4 : marqueurs de masses moléculaires dont les valeurs sont indiquées à droite en kDalton. Le sommet de la photo correspond à la ligne de dépôt des échantillons.





Gel polyacrilamide à 9%



1 : OA pure 10 μ l (2 μ g)

2 : Lysozyme 10 μ l (2 μ g)

3 : OA crude 10 μ l (5 μ g)

4 : Mark 12 15 μ l (1,5 μ g/bande)

5 : Myoglobine 10 μ l (2 μ g)

6 : blanc frais 10 μ l (5 μ g)

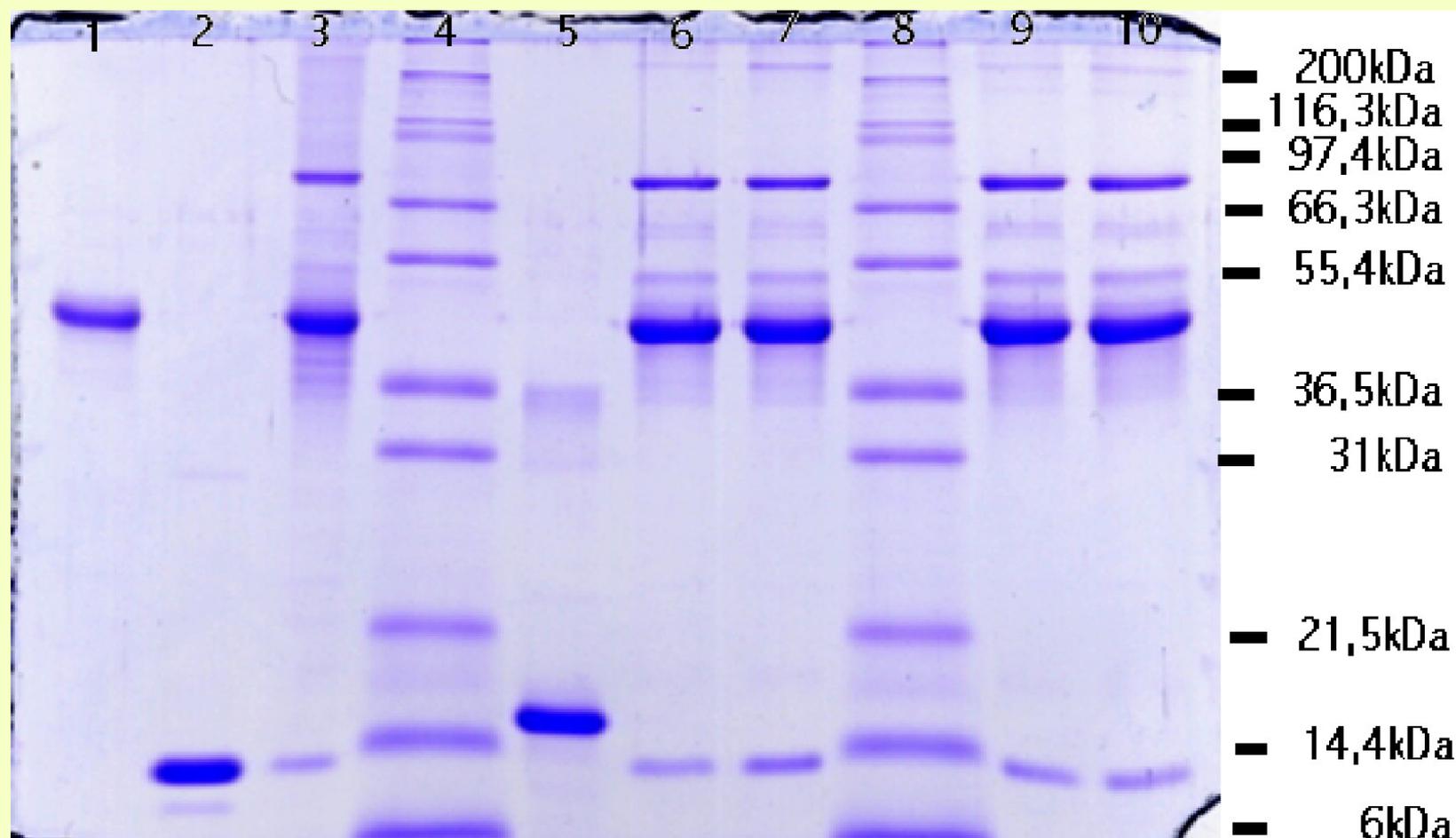
7 : blanc frais collé au jaune 10 μ l (5 μ g)

8 : Mark 12 15 μ l (1,5 μ g/bande)

9 : blanc vieux 10 μ l (5 μ g)

10 : blanc vieux collé au jaune 10 μ l (5 μ g)

Gel polyacrilamide à 13%



1 : OA pure 10 μ l (2 μ g)

2 : Lysozyme 10 μ l (2 μ g)

3 : OA crude 10 μ l (5 μ g)

4 : Mark 12 15 μ l (1,5 μ g/bande)

5 : Myoglobine 10 μ l (2 μ g)

6 : blanc frais 10 μ l (5 μ g)

7 : blanc frais collé au jaune 10 μ l (5 μ g)

8 : Mark 12 15 μ l (1,5 μ g/bande)

9 : blanc vieux 10 μ l (5 μ g)

10 : blanc vieux collé au jaune 10 μ l (5 μ g)

CHROMATOGRAPHIE

Le mot chromatographie vient du grec *Khrôma* qui signifie couleur. En effet, à l'origine, cette technique servait à séparer des espèces chimiques végétales colorées (pigments) contenues dans un mélange.

Actuellement, la chromatographie regroupe toutes les méthodes de séparation des constituants d'un mélange (en phase liquide ou gazeuse) lors de leur cheminement sur un support fixe. Les constituants du mélange sont entraînés, à des vitesses différentes, par une phase mobile appelée éluant ou solvant.

La chromatographie est utilisée pour identifier ou séparer tout type d'espèces chimiques contenues dans un mélange *homogène (gazeux ou liquide)*.

Lorsqu'on réalise une chromatographie, que ce soit sur papier, sur couche mince ou sur colonne, il faut préciser :

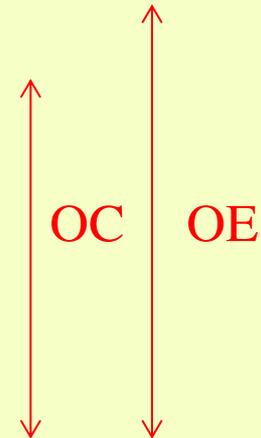
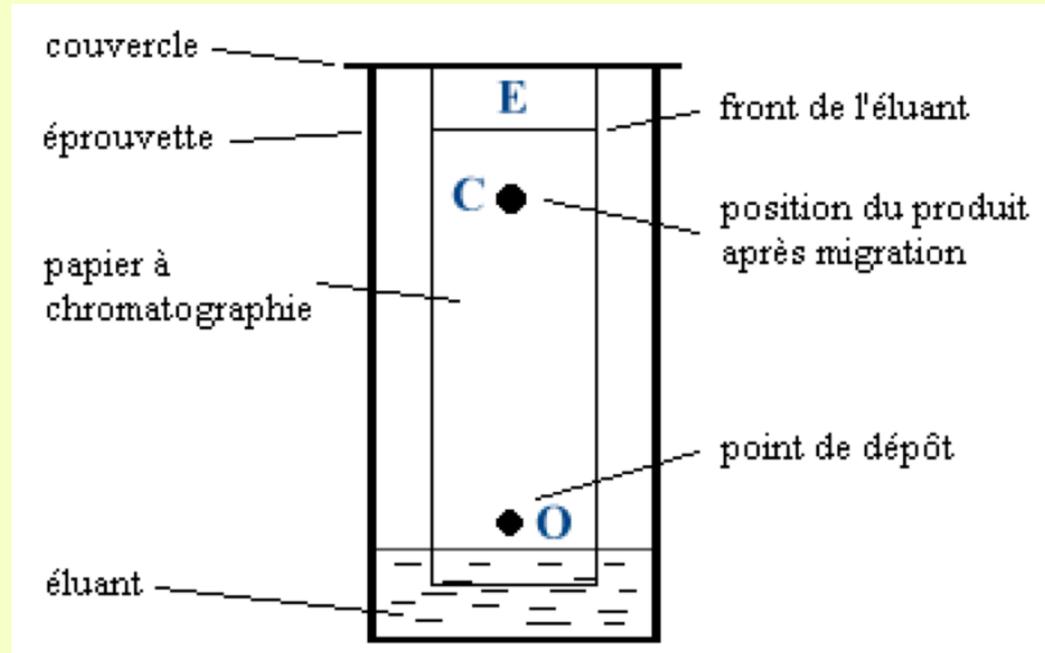
le support ou phase stationnaire ;

l'éluant ou phase mobile ;

la technique de révélation si les espèces chimiques étudiées sont incolores.

1. Chromatographie sur papier

Cette chromatographie permet la séparation des espèces chimiques uniquement par différence de solubilité de ces dernières dans l'éluant. La phase stationnaire est formée par l'éluant lié aux molécules de cellulose du papier. Ainsi les espèces chimiques analysées sont partagées entre l'éluant qui migre et celui lié au papier. On parle de chromatographie de partage



Le solvant se déplace par capillarité à la vitesse : $u = OE / t$

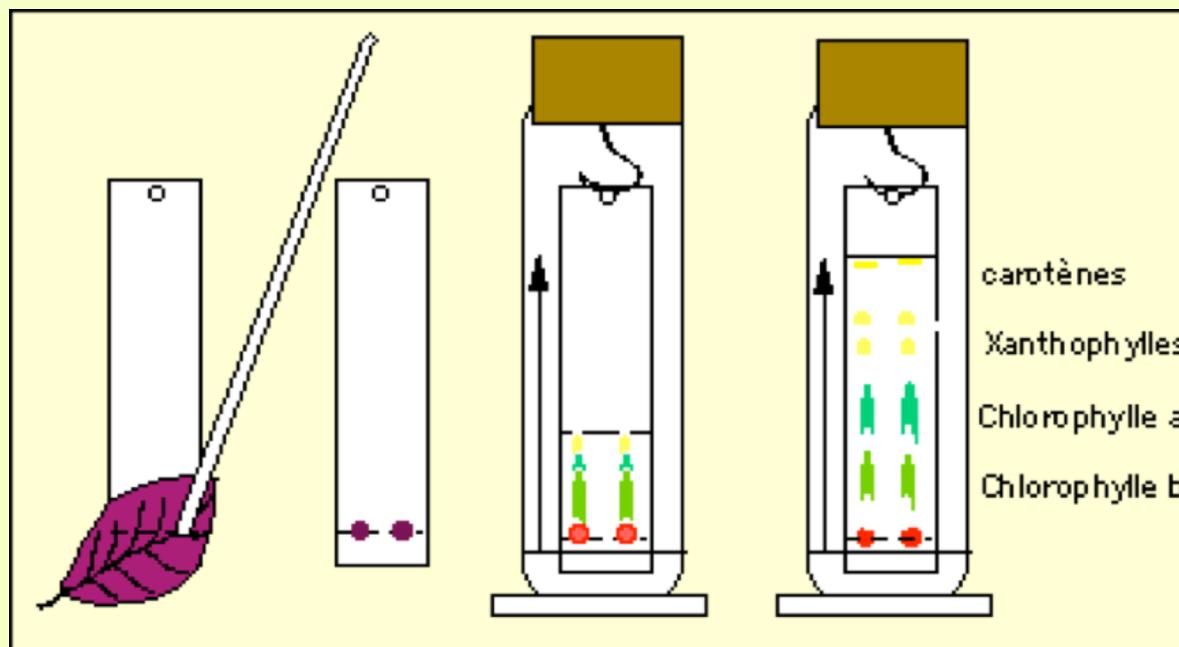
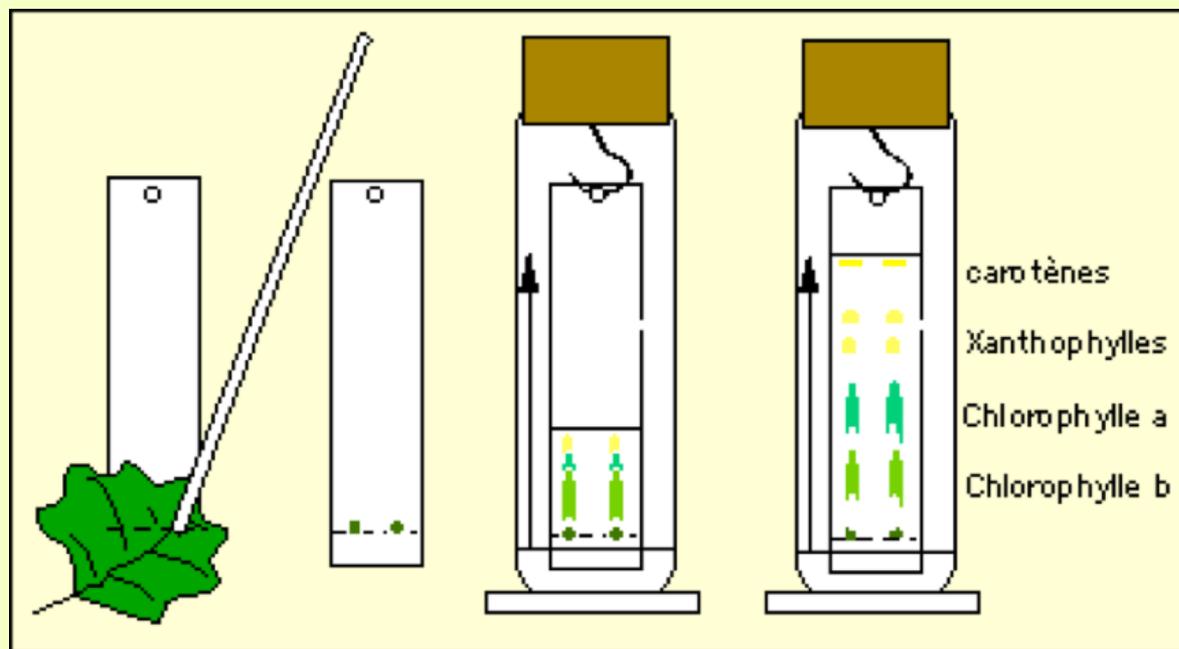
Il entraîne le colorant à la vitesse : $v = OC / t$

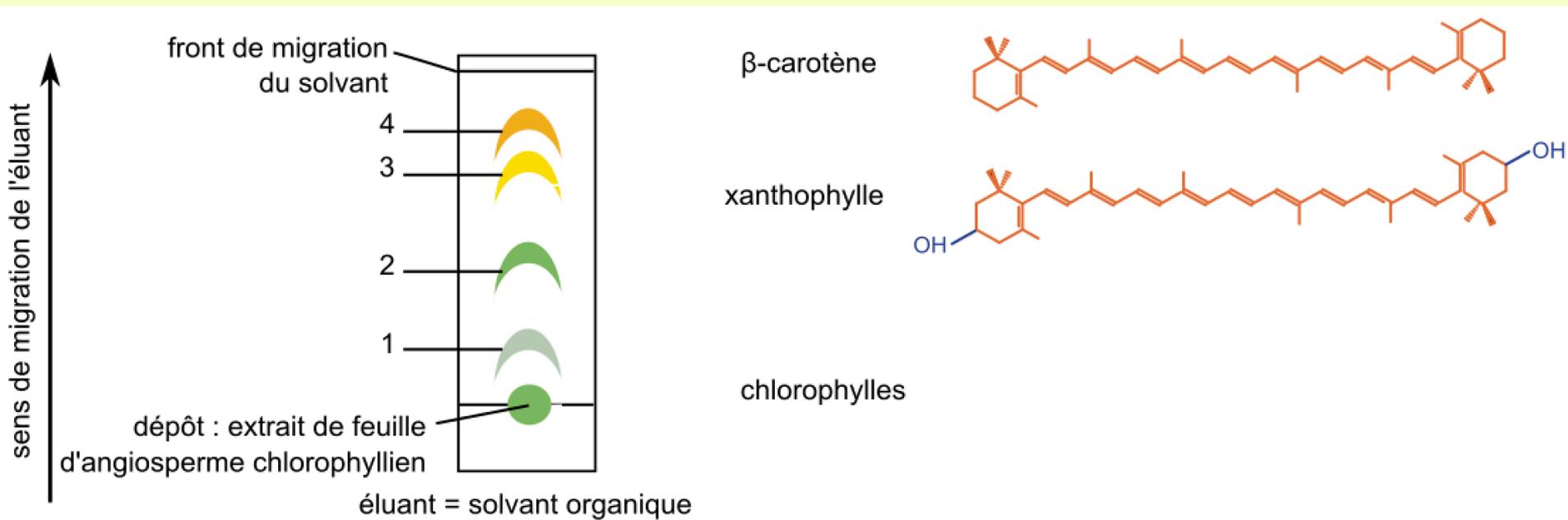
Cette vitesse dépend de l'affinité du solvant pour le colorant.

On définit le coefficient de Rétention frontale $R_f = v / u$ de fait : $R_f = OC / OE$

Le R_f caractérise le produit.

La taille de la tache est proportionnelle à la quantité de substance.





Puisque le solvant est apolaire, la migration des pigments est d'autant plus importante qu'ils sont plus hydrophobes.

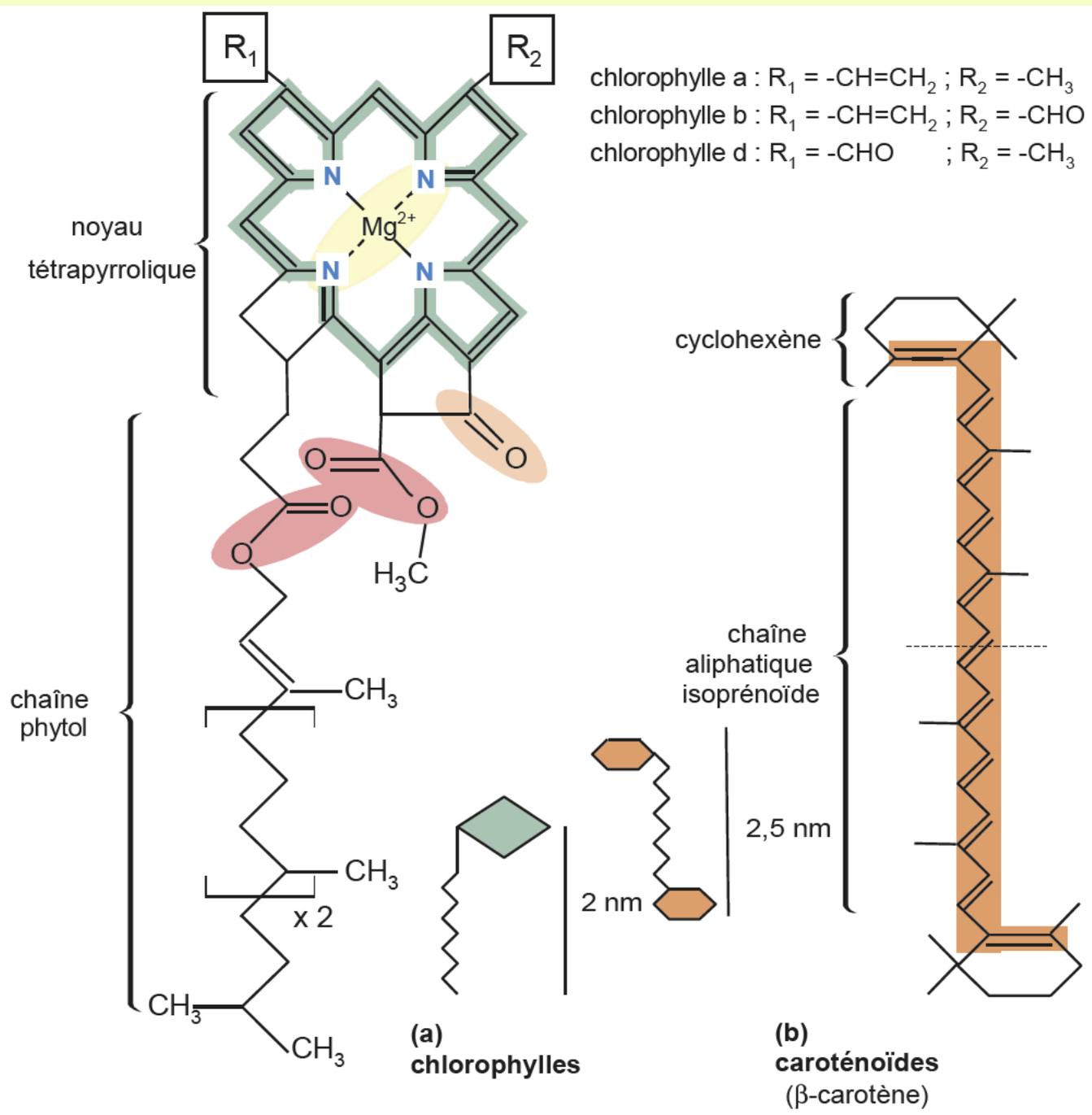
Le β -carotène (tache 4) migre le plus loin (chaîne aliphatique et cyclohexènes) ;

les xanthophylles (tache 3) migrent un peu moins loin (même structure que le β -carotène, avec deux fonctions alcools).

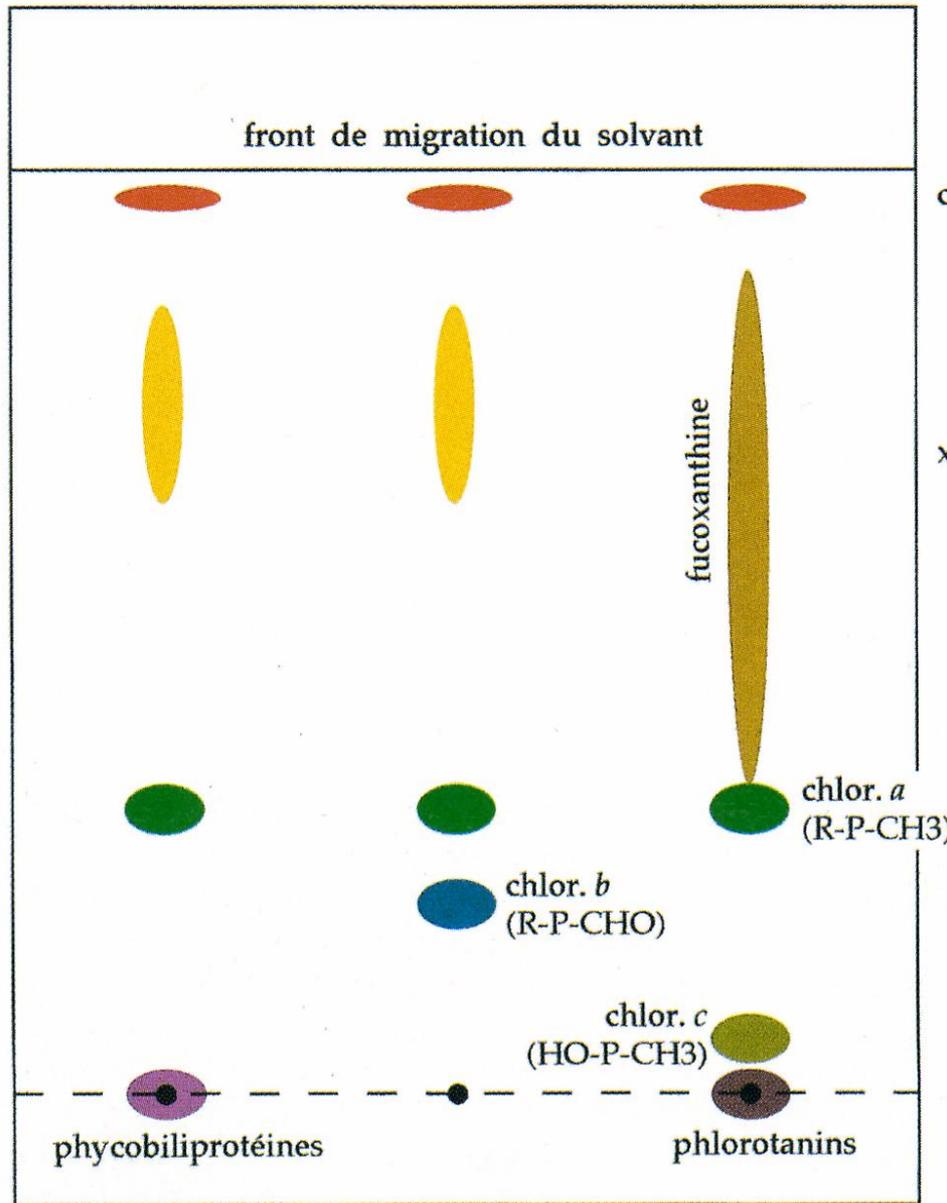
Les chlorophylles sont des molécules polaires (Mg^{2+} , 2 fonctions esters, 2 azotes à doublet libre) ;

la chlorophylle b a en plus une fonction aldéhyde ; c'est elle qui migre le moins (tache 1) ;

la tache 2 est constituée de chlorophylle a.



sens de migration du solvant hydrophobe :
composés de moins en moins hydrophiles



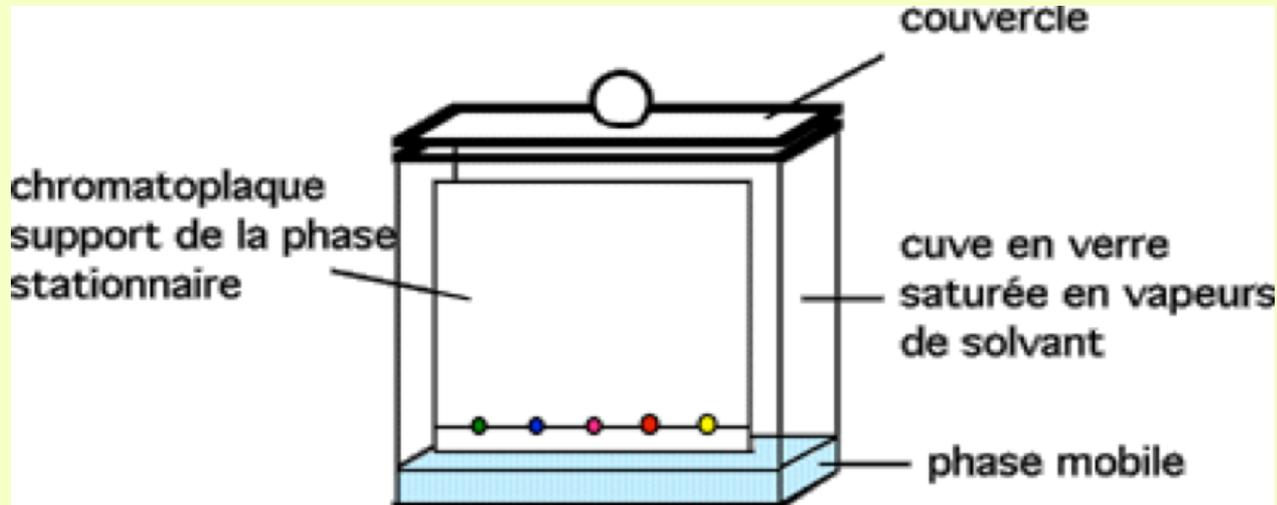
algue
rouge

algue
verte

algue
brune

2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

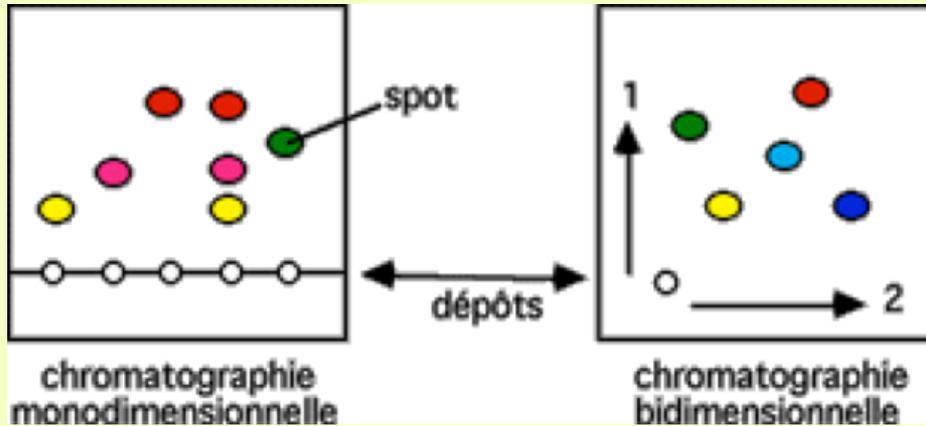
Le principe est le même que sur papier mais le support change. On utilise une plaque rigide (aluminium ou plastique) sur laquelle est déposé un film de silice qui représente la phase stationnaire. La migration de l'éluant va entraîner la migration des produits déposés en fonction de leur solubilité mais aussi en fonction de leur interaction avec la phase stationnaire. Ces interactions sont dues ici essentiellement à des liaisons hydrogène. On parle de chromatographie d'adsorption. La plaque peut être basculée à 90° et introduite dans un second éluant afin de réaliser une chromatographie bidimensionnelle.



Dans le cas de solutés incolores, il est nécessaire de visualiser les spots par une réaction colorée (qui peut être générale ou spécifique) ou par fluorescence; c'est la révélation.

2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

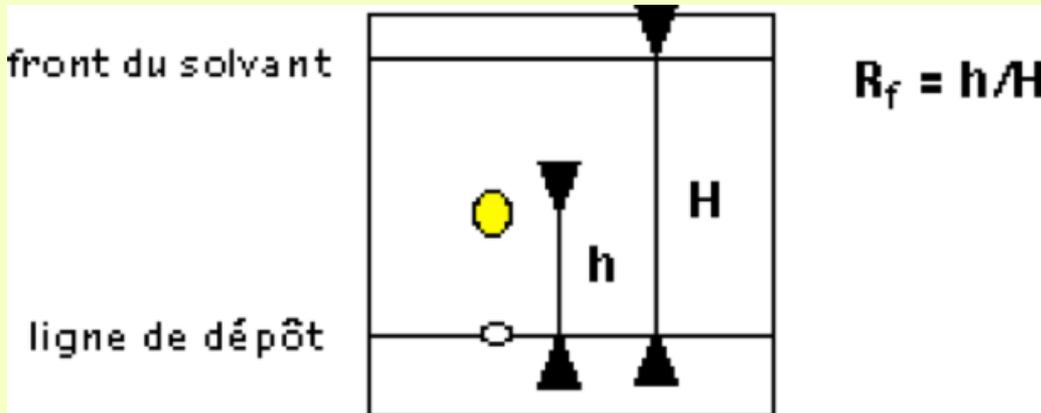
L'identification des constituants du mélange se fait par comparaison avec des témoins, en calculant le R_f de chaque soluté, ou encore le R_t (rapport à un témoin) lorsque le solvant a dépassé le niveau supérieur de la plaque. Résultats obtenus après développement et révélation :



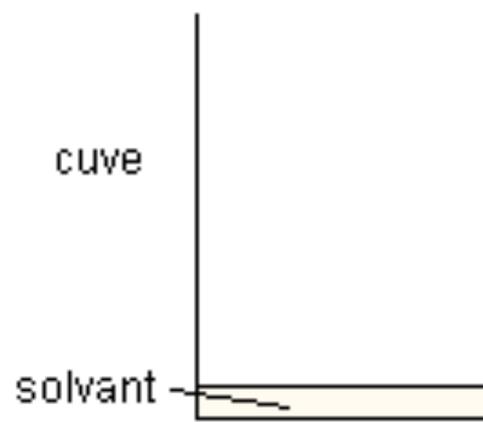
Calcul du coefficient de rétention frontale (R_f ou "reference front") :

On peut également effectuer une analyse quantitative des spots par :

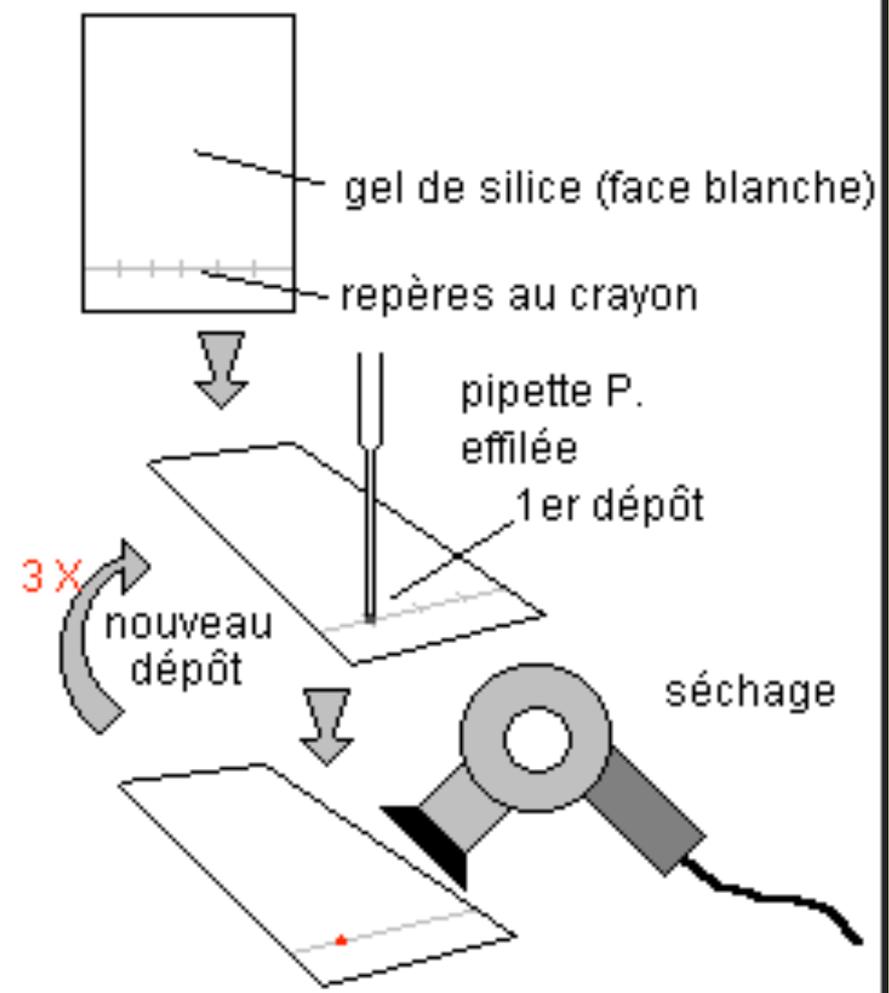
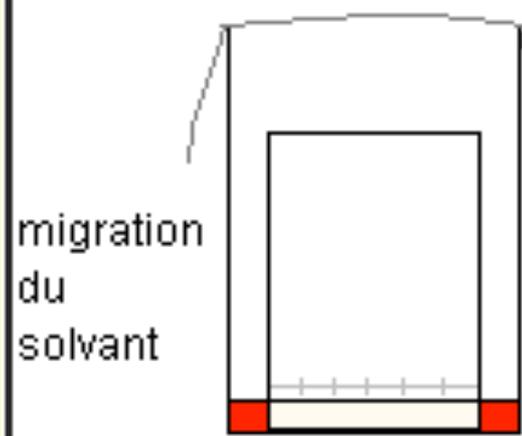
- Planimétrie (évaluation de la surface du spot, dont le log est proportionnel à la quantité de soluté),
- Elution (découpage ou grattage puis mise en solution dans un solvant approprié et dosage colorimétrique),
- Densitométrie (mesure directe de l'absorbance du spot sur la plaque par des appareillages plus ou moins automatisés).

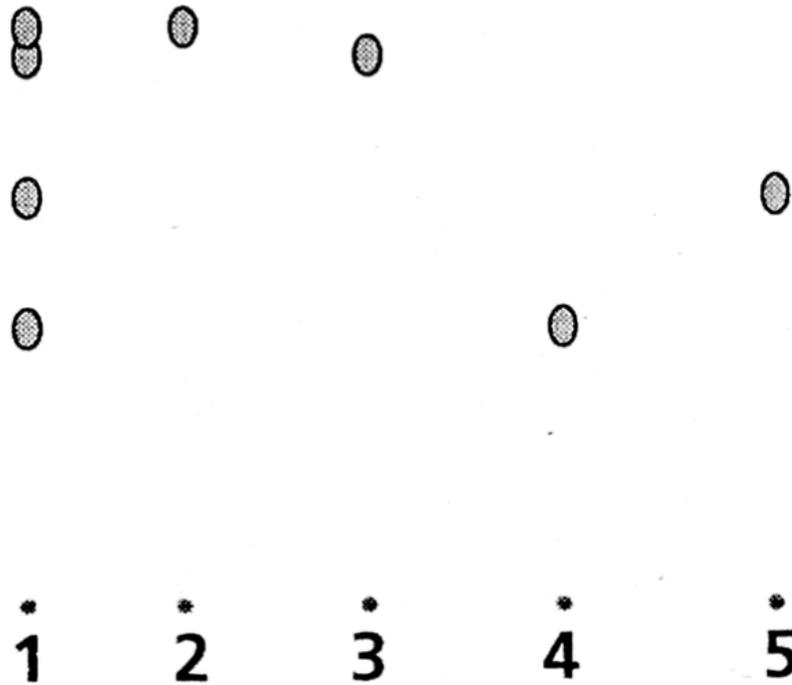


chromatographie



mise en route





1 = mélange lactose,
glucose, fructose,
saccharose

2 = glucose

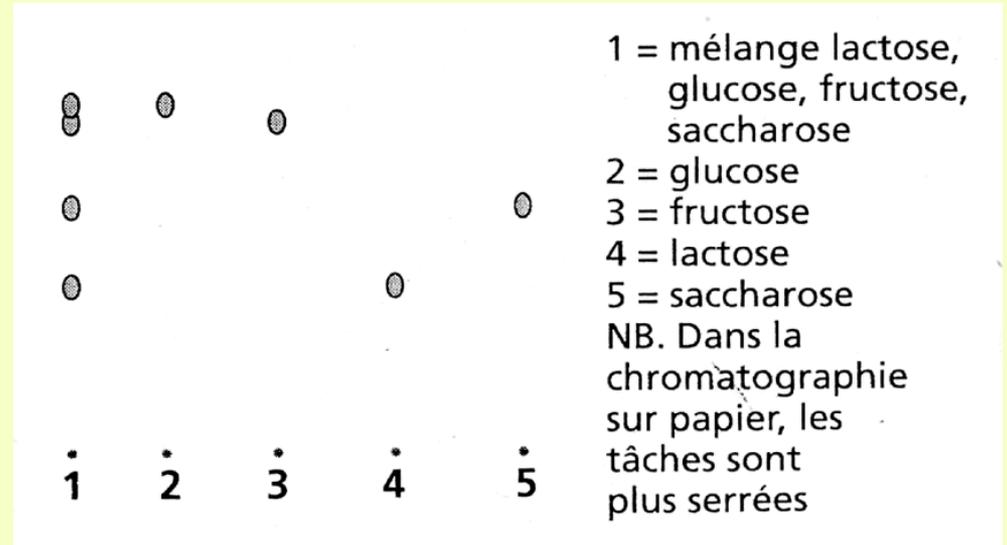
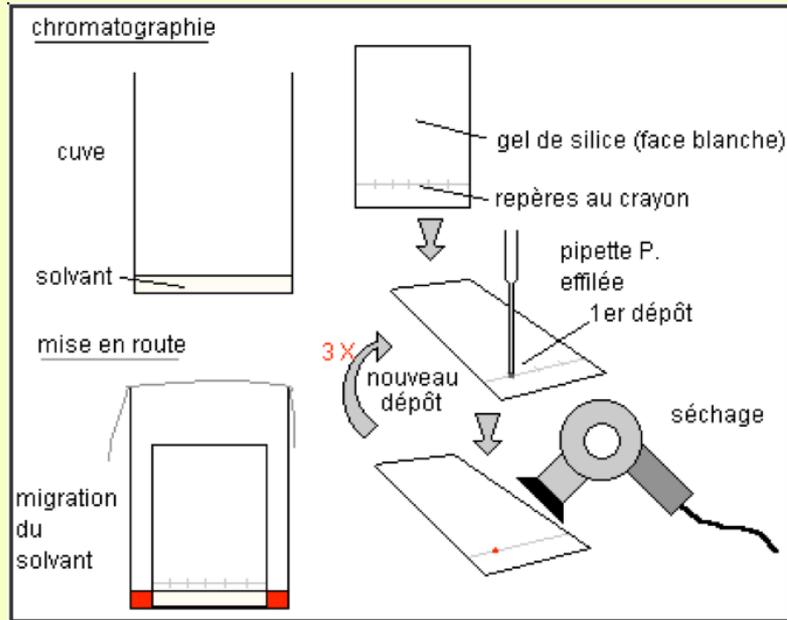
3 = fructose

4 = lactose

5 = saccharose

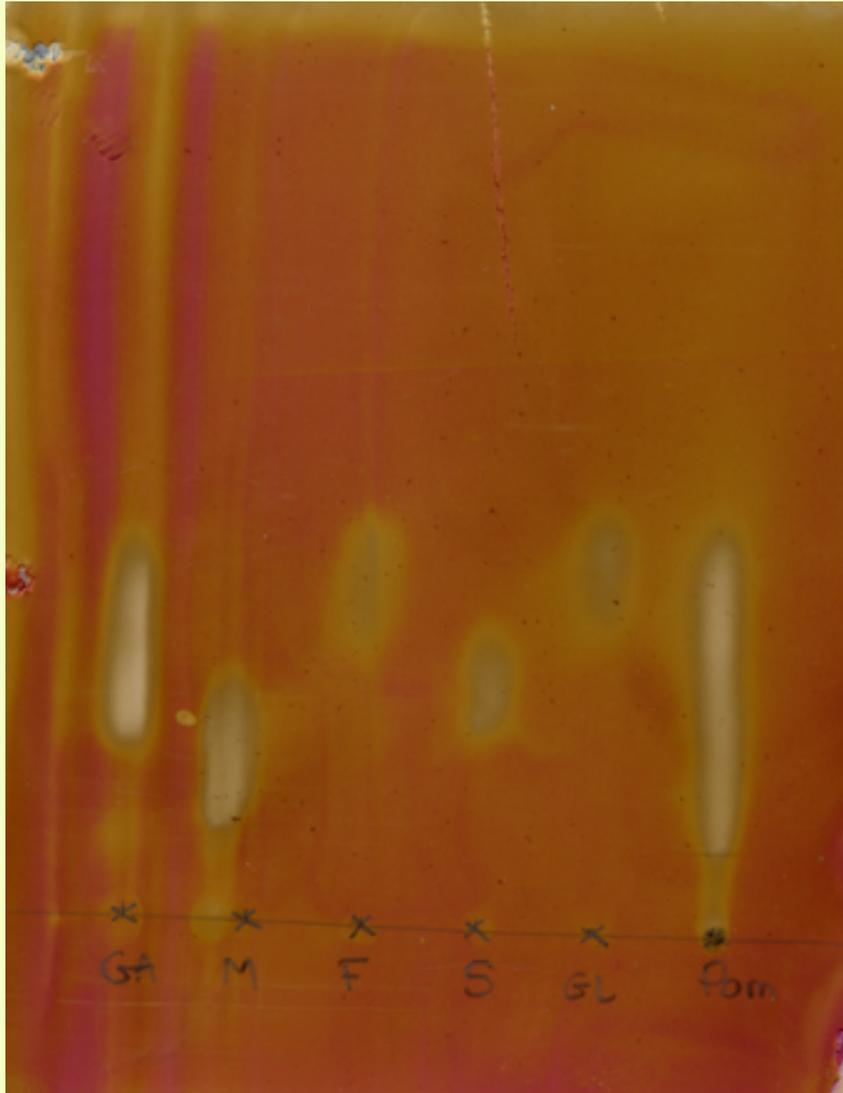
NB. Dans la
chromatographie
sur papier, les
tâches sont
plus serrées

Un exemple de résultat



CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM) PAR MIGRATION ASCENDANTE

Jus de Pomme



Gal	Mal	Fuc	Sacch	Glu	Pomme
-----	-----	-----	-------	-----	-------

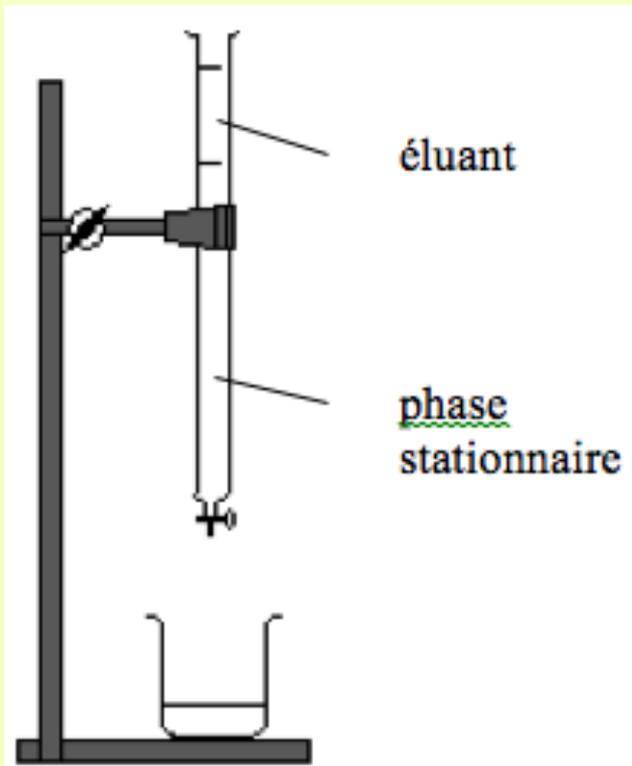
Sève élaborée de Courgette



Gal	Mal	Fuc	Sacch	Glu	Pomme
-----	-----	-----	-------	-----	-------

3. Chromatographie sur colonne

Nous venons d'identifier les pigments présents dans les feuilles et nous désirons maintenant les séparer, pour les étudier individuellement. Pour cela nous allons utiliser la chromatographie sur colonne dont le principe est le même que la C.C.M., c'est à dire que les espèces chimiques à séparer sont plus ou moins entraînées par l'éluant selon leur solubilité dans ce dernier et leur affinité avec la phase stationnaire (ou leur adsorption sur la phase stationnaire). On parle de chromatographie d'adsorption. La phase stationnaire est un solide, généralement de la silice ou de l'alumine.



Séparation des pigments sur colonne

Diluer la solution de chlorophylle brute avec le cyclohexane dans un rapport 70/30.

Déposer au sommet de la colonne, à l'aide d'une pipette Pasteur, 2ml de la solution précédemment diluée.

Garder une partie de cette solution (à l'abri de la lumière) pour l'étude de son spectre.

Ouvrir le robinet de la colonne et laisser s'écouler le solvant. Lorsque la hauteur de la colonne commence à s'assécher, fermer le robinet. A l'aide d'une pipette Pasteur, ajouter quelques ml du mélange éther diéthylique/cyclohexane pour rincer les parois de la colonne.

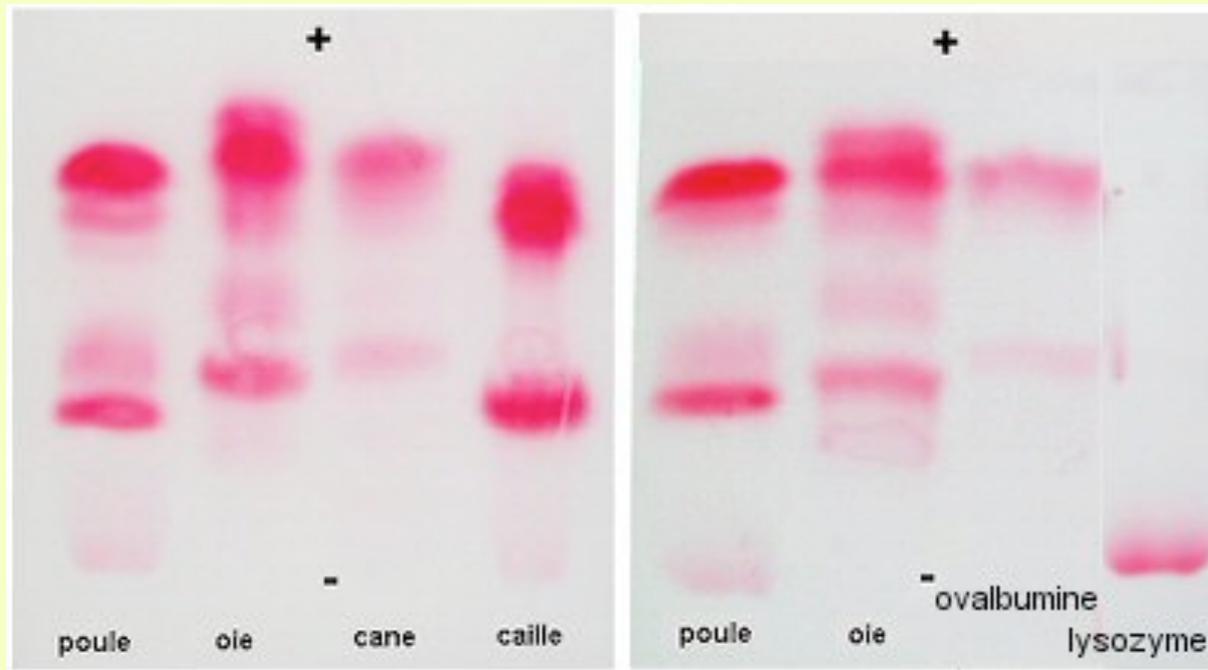
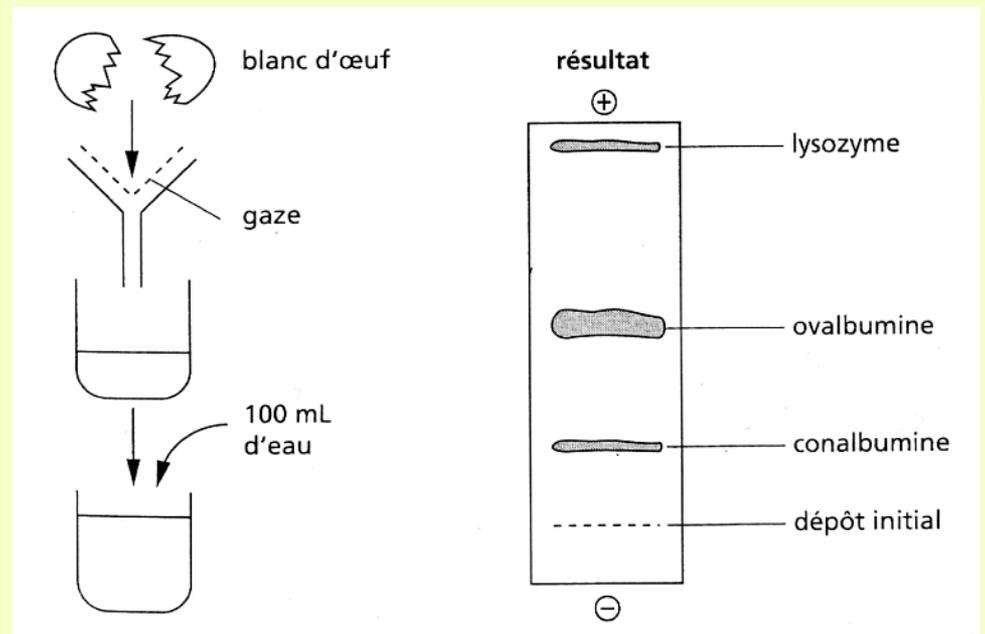
Éluer par le mélange éther éthylique/cyclohexane, par fraction de 5 ml.

Recueillir les différentes fractions dans des éprouvettes graduées et numérotées.

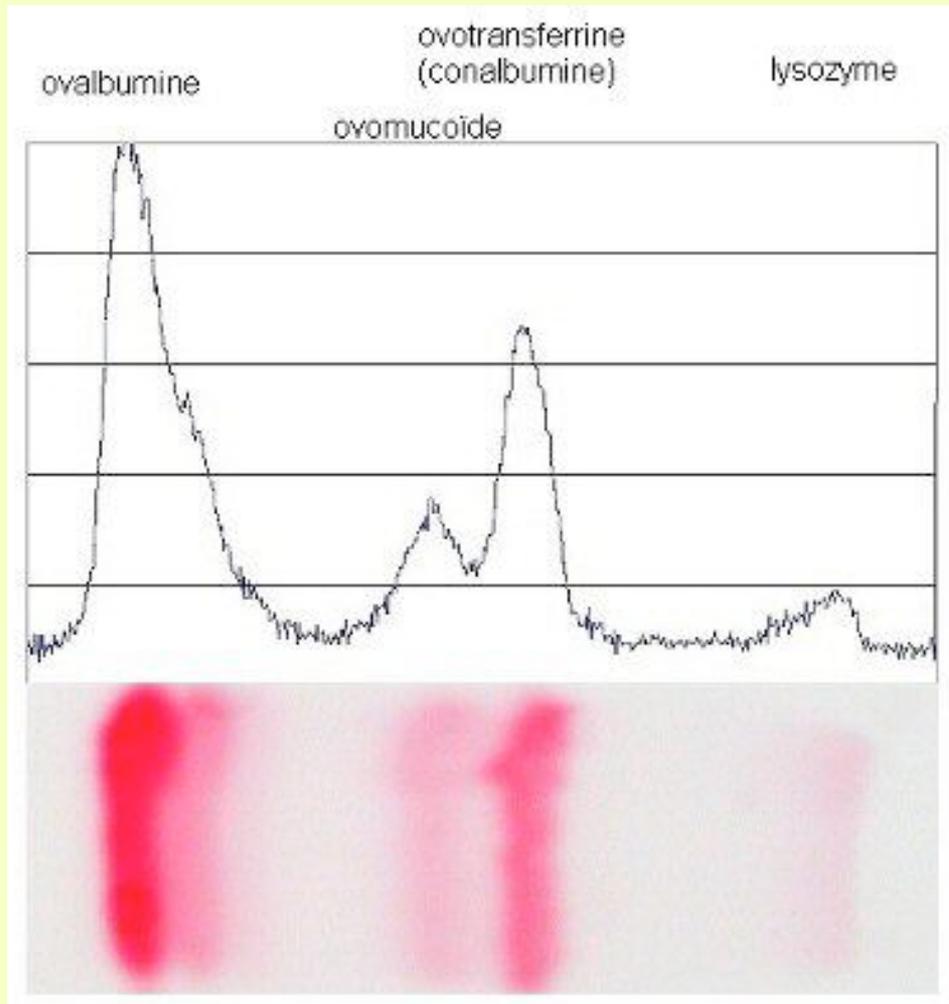
ÉLECTROPHORÈSE DES PROTÉINES

L'électrophorèse (électro = électrique et phorésie = déplacement) est une technique d'analyse et de séparation basées sur les critères de la charge électrique et la taille des molécules. L'électrophorèse consiste à placer des molécules dans un champ électrique constant pour séparer celles-ci en fonction de leurs charges.

Electrophorèse des protéines du blanc d'œuf de différents oiseaux ovalbumine et lysozyme de poule servent de référence (in Didier Pol)



Profil densitométrique des protéines du blanc d'oeuf de poule (coloration par le rouge Ponceau)



Le blanc d'œuf de poule contient :
Ovalbumine (MM 45 000). C'est la principale protéine du blanc d'œuf (60-69 %).

Conalbumine (MM 76 000). Appelée aussi ovotransferrine, elle fixe le fer et les flavoprotéines ce qui lui confère une action antimicrobienne (9-17 %).

Ovomucoïdes (MM 27 000). Ils donnent son aspect gélatineux au blanc d'œuf et inhibent la trypsine (9-14 %).

Lysozyme (MM 14 500). Le lysozyme ou muramidase est une enzyme qui présente une activité antibactérienne contre les bactéries gram-positives car elle détruit leur paroi ce qui entraîne la lyse des cellules (2-4 %).

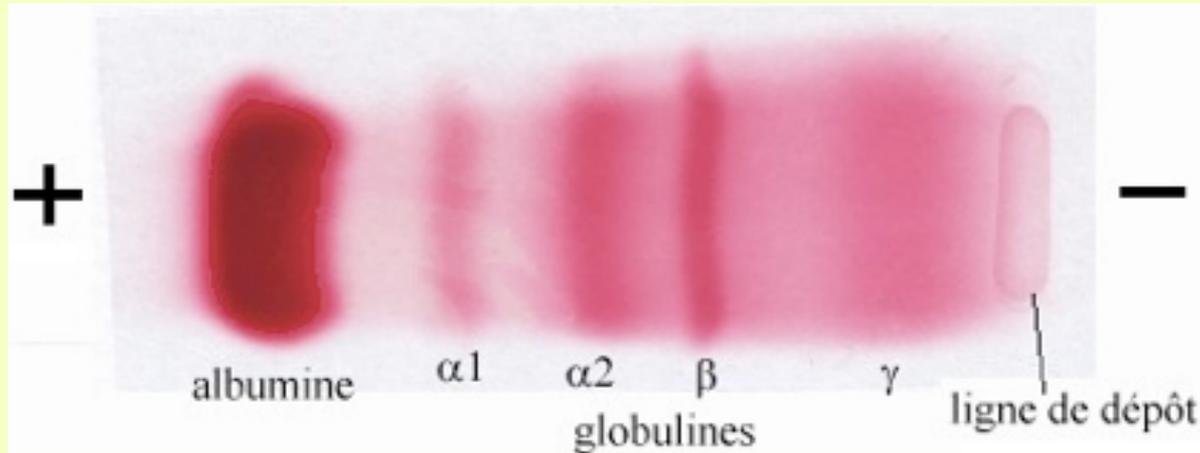
Autres protéines

L'avidine est une protéine capable de se lier à la biotine sous forme de complexe avidine-biotine.

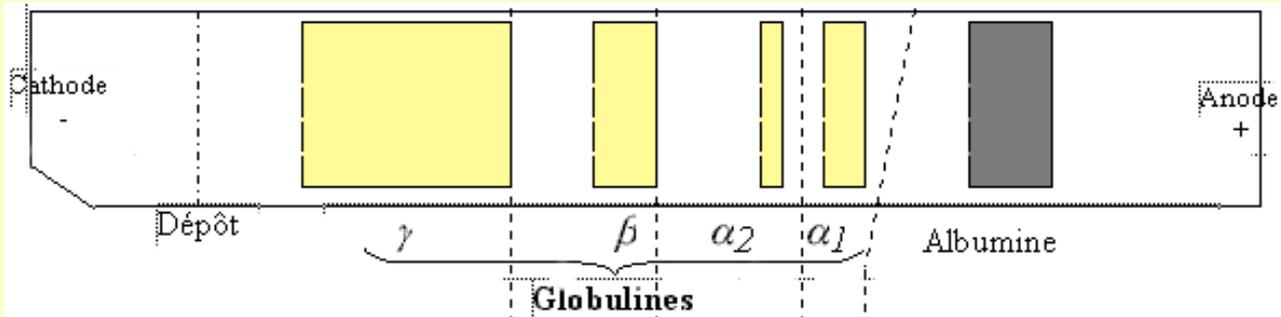
La cystatine est un inhibiteur des protéases à cystéine.

(in Didier Pol)

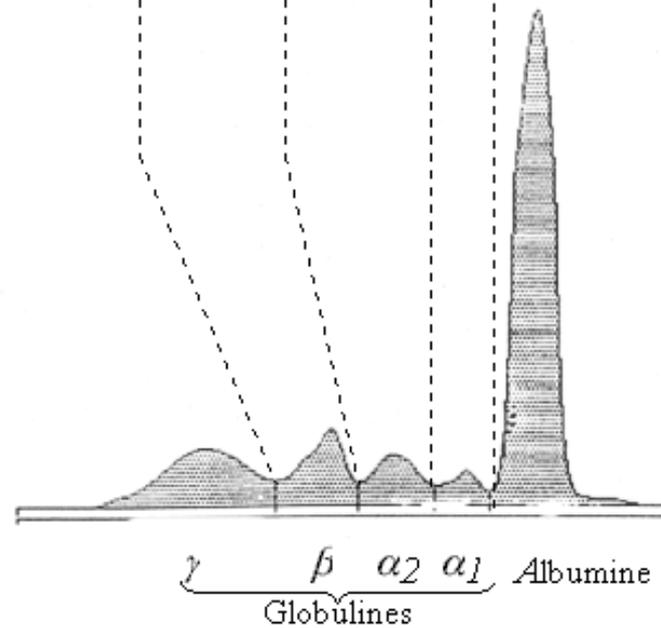
Electrophorèse du sérum sanguin



<i>Familles de protéines sériques</i>	γ	β	$\alpha 2$	$\alpha 1$	<i>albumine</i>	<i>protéines totales</i>
<i>% relatif des fractions protéiques</i>	16 à 23 %	10 à 14 %	7 à 10 %	3 à 5 %	50 à 60 %	100 %
<i>Concentration en g.l-1.</i>	12 à 17	7 à 10	5 à 7	2 à 4	36 à 44	73
<i>pHi</i>	6,8-7,3	5,12	5	5	4,8	///
<i>Poids moléculaire</i> <i>(ou masse molaire g.l⁻¹)</i>	150 10 ₃	125 10 ₃	200 10 ₃	130 10 ₃	69 10 ₃	///



Electrophorégramme obtenu après migration et coloration au rouge ponceau.



La Rubisco (d'après concours ENS Lyon et Cachan 1997)

La Rubisco, ou Ribulose 1-5 Biphosphate Carboxylase Oxygénase, est une enzyme présente dans le stroma des chloroplastes qui permet la fixation du CO_2 sur une molécule organique le ribulose 1-5 biphosphate lors de la photosynthèse. Elle est constituée de deux chaînes polypeptidiques différentes, une chaîne légère S (123 acides aminés) et une chaîne lourde L (475 acides aminés). Ces deux chaînes forment un dimère qui est la forme minimale de la protéine possédant l'activité Rubisco. On cherche à déterminer le nombre de dimères S-L formant la Rubisco active. Pour cela l'enzyme native purifiée à partir de chloroplastes est chromatographiée sur une colonne de filtration sur gel. Cette colonne est auparavant calibrée par la séparation de protéines de masses moléculaires connues. On mesure pour chacune le temps de rétention dans la colonne, c'est à dire le temps de passage. Les résultats sont donnés sur le tableau ci-dessous.

Calibration		Essai	
Masse moléculaire (daltons)	Rétention (mn)	Enzyme native	Rétention (mn)
699000	10,2	Rubisco	10,8
440000	11		
150000	13		
81000	14,1		
43000	15,5		
17600	17		

