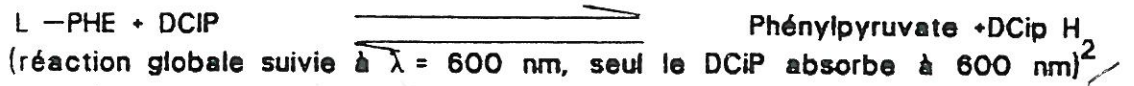
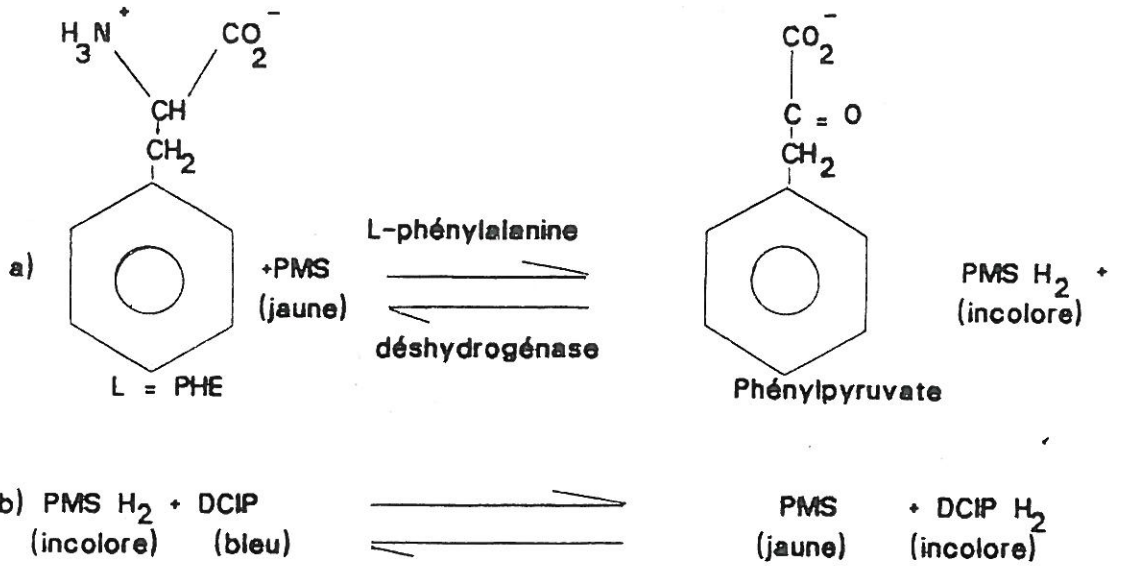


Exercice 3

A) On mesure l'activité de la L-phénylalanine déshydrogénase par la réduction du DCiP (dichlorophénol indophénol) en présence de l'enzyme (le DCiP est un accepteur artificiel d'électrons). La réaction est suivie par la diminution d'absorbance à 600 nm :



Le mélange réactionnel contient :

- 0,5 ml de L-phénylalanine M/10
- 0,44 ml de tampon Tris - maléate $2 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,5 additionné du sel Mg Cl₂ 10^{-2} M
- 50 μ l de PMS (phénazine méthosulfate) 5 mg.ml⁻¹
- 10 μ l de DCiP 2 mg.ml⁻¹

le poids moléculaire du PMS est PM = 306, celui du DCiP PM = 290

$$v_T = \ln P$$

1°) Calculer les quantités de PMS et de DCiP présentes dans le milieu réactionnel ainsi que leurs concentrations finales respectives.

2°) La réaction enzymatique est démarrée par addition de 1 μ l de L- Phénylalanine déshydrogénase diluée au 1/400e. Sachant que le coefficient d'extinction du DCiP à 600 nm est de $16000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, calculer l'activité de 1 ml d'enzyme non diluée, lorsque l'absorbance, suivie pendant 2 minutes, décroît de 0,8 à 0,52.

Purification des protéines

modèle M57

Projet de cours

B) On dépose 14 ml d'un mélange enzymatique complexe contenant de la L-Phénylalanine déshydrogénase sur une colonne de DEAE-sépharose (colonne échangeuse d'anions). La fraction déposée a une concentration en protéines de $0,095 \text{ mg. ml}^{-1}$. L'activité de la L-Phénylalanine déshydrogénase mesurée sur $25 \mu\text{l}$ donne une variation d'absorbance à 600 nm, de 0,065 par minute. Cette enzyme est élue spécifiquement par un gradient de force ionique croissante (KCl), on récupère 13 ml de L-Phénylalanine déshydrogénase de concentration en protéine égale à $0,03 \text{ mg. ml}^{-1}$, l'activité, dosée sur $15 \mu\text{l}$, donne une variation d'absorbance à 600 nm de 0,040 par minute.

1°) Calculer la quantité totale de protéines et l'activité enzymatique de la L-Phénylalanine déshydrogénase :

a) dans la fraction déposée sur la colonne (14 ml)

b) dans la fraction récupérée après élution (13 ml)

2°) Calculer l'activité spécifique avant et après chromatographie, en déduire un facteur d'enrichissement en L-Phénylalanine déshydrogénase qui est le "facteur de purification".

Purification des protéines

module M57