

## Purification de l'isoenzyme LDH5 à partir du foie

Vous purifiez la LDH5 à partir d'un broyat de foie traité pour dénaturer l'enzyme (rupture de la structure quaternaire), de volume 200 ml, de concentration en protéines totales 9.968 g/L et de concentration catalytique 9270.7 U/L. Deux étapes successives sont réalisées, la première est une chromatographie d'affinité et la seconde une isofocalisation :

Chromatographie d'affinité : volume obtenu 40 mL, [protéines tot]= 0.0148 g/L, AE = 5476 U/L

isofocalisation : volume obtenu 8 mL, [protéines tot]= 0.0082 g/L, AE = 3760 U/L

- 1) Calculer le rendement et le degré de purification à chacune des deux étapes.

Pour la mesure de l'activité enzymatique de la LDH après l'étape d'isofocalisation 100  $\mu$ L de l'extrait final sont dilués dans une cuve réactionnelle par 350  $\mu$ L une solution tamponnée (pH 7.4) contenant un excès de NADH. Ce mélange est préincubé 5 minutes à 37°C, la réaction est ensuite déclenchée par l'ajout de 50  $\mu$ L d'une solution de pyruvate.

- 2) Sachant que selon le même procédé mais dans les conditions de vitesse maximale, l'extrait obtenu après isofocalisation à une concentration catalytique de 5640 U/L et que le  $K_m$  de l'enzyme pour le pyruvate est de 400  $\mu$ M en déduire la concentration de solution de pyruvate utilisée pour déclencher la réaction.
- 3) L'extrait final est analysé en PAGE SDS en condition dénaturante. Après coloration du gel par le bleu de coumassie une seule bande de masse moléculaire apparente 140 kDa est observée. Interpréter ce résultat et calculer le turn over (constante catalytique) de l'enzyme.