

Vous purifiez une enzyme michaelienne à partir d'une culture de bactérie. Le  $K_m$  de l'enzyme pour son substrat est de  $1 \cdot 10^{-4}$  M. Les concentrations catalytiques obtenues dans les conditions conventionnelles de saturation de l'enzyme sont mesurée en ajoutant 1 mL de solution d'enzyme à 2 mL d'un tampon approprié et 1 mL de substrat. Deux étapes de purification vous donnent les résultats suivants :

	Volume (mL)	Protéines totales (mg)	Concentration catalytique (U/L)
Lysat de bactéries	2 800	70 000	2 700
<b>(A)</b> précipitation par le sulfate d' $\text{NH}_4^+$	3 000	16 500	1 980
<b>(B)</b> chromatographie d'affinité	500	470	1 350

- 1) Calculer pour le rendement et l'indice de purification à chaque étape (A et B)
- 2) Un échantillon de la solution B est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et révèle une bande unique de masse moléculaire apparente de 48 kDa. Déterminer la constante catalytique de l'enzyme.
- 3) calculez la vitesse initiale d'un échantillon de la solution B si vous ajoutiez 1 mL de solution B diluée au 1/5 à 2 mL de tampon (le même et dans les mêmes conditions que précédemment) mais avec 1 mL de substrat de concentration initiale de 2mM. (pour vous aider calculez la concentration en substrat dans le mélange final)

1)

Donner les formules : quantité catalytique totale = concentration catalytique x volume (en U)

Activité spécifique = Qtté catal/Qtte protéine totale (en U/g)

Rendement = (qtte catal finale/qtte catal initiale) x100 (en %)

Indice de purification = AS finale/AS initiale (sans unité)

Ce qui donne :

	Vol (mL)	Prot tot. (mg)	CC (U/L)	Qtte catal (U)	AS (U/g)	Rendement (%)	Indice purification
lysate	2 800	70 000	2 700	<b>7 560</b>	<b>108</b>	-	-
A	3 000	16 500	1 980	<b>5 940</b>	<b>360</b>	<b>78.6</b>	<b>3.3</b>
B	500	470	1 350	<b>675</b>	<b>1436.2</b>	<b>8.9</b>	<b>13.3</b>

2) On déduit de l'électrophorèse que l'enzyme est constituée d'une protéine de Masse Moléculaire apparente de 48 000 g/mol

concentration massique en prot tot de la solution B =  $0,47/0,5 = 0,94$  g/L

Conc molaire en prot tot =  $0,94/48\,000 = 1,96 \cdot 10^{-5}$  M

$K_{cat} = V_{max} \times [E_{tot}] \rightarrow K_{cat} = V_m/[E_{tot}] = 1350 \cdot 10^{-6}/1,96 \cdot 10^{-5}$  **attention bien exprimer la vitesse en mol/L/min**

$K_{cat} = 68,9 \text{ min}^{-1}$

3)calcul de  $V_o$  :

**Remarquer que les conditions sont identiques mais l'enzyme est diluée au 1/5 donc la  $V_{max}$  sera 5 fois plus petite et le substrat n'est plus saturant mais égal à 2mM initialement soit 2/4 dans la cuve (dilution dans le mélange réactionnel) = 500  $\mu$ M soit 5  $K_m$**

Selon HMM :

$V_o = V_{max} \times ([S]/(K_m+[S]))$  donc  $V_o=5/6 V_{max}$  avec une  $V_{max}$  dans ces nouvelles conditions qui est égale à  $1/5 \times 1350 = 270$  U/L

$V_o = 225$  U/L ou  $225 \mu\text{mol/L/min}$