

Une enzyme X est purifiée à partir d'un broyat de foie de rat.

Le broyat d'un volume de 100 mL contient 1,22 g de protéines totales et une quantité catalytique de 8 300 U. Ce broyat est soumis à une précipitation par le sulfate d'ammonium suivi d'une chromatographie d'exclusion sur gel (CEG). Après CEG vous obtenez 10 ml d'une solution A contenant 0,55 mg de protéines totales et une quantité catalytique de 20 U (erreur je voulais mettre 200 U)

- 1) Calculez les activités spécifiques dans le broyat et après CEG puis le rendement et le degré de purification après CEG (solution A). Commentez.

Non satisfait de ce résultat vous effectuez une étape supplémentaire de purification par chromatographie d'affinité et étudiez le produit obtenu: 1 ml de solution B contenant 0,03 mg de protéine totale. La solution B est analysée par SDS-PAGE. Pour cela 10  $\mu$ L de solution B sont déposés pour électrophorèse. Après électrophorèse vous obtenez une bande unique de masse moléculaire apparente de 30 000 Da.

Vous découpez le gel afin de récupérer la bande correspondante à votre enzyme X et l'élué dans 200  $\mu$ L de NaCl 0.9%. L'activité enzymatique de l'enzyme X dans cet éluat est mesurée en mélangeant 20  $\mu$ L d'éluat avec 180  $\mu$ L d'un tampon adapté et 20  $\mu$ L d'une solution de substrat en très large excès (concentration finale du substrat > 20.Km). La mesure de la concentration du produit formé en fonction du temps donne les résultats suivants :

Temps (secondes)	[P] en $\mu$ mol/L
30	33
60	66
120	110
240	140
360	145

- 2) Calculez la concentration catalytique de la solution B.
- 3) Calculez la constante catalytique de l'enzyme X

Propositions de correction avec un barème sur 20 points

1) Notée sur 10 points

Donner les formules brutes de l'AS du rendement et du degré de purification puis donnez les résultats (tableau plus simple et rapide pour les résultats chiffrés)

AS = qtté catalytique / qtté de protéines totales ou le rapport de leur concentration dans la même unité

Rendement = (qtté catalytique finale / qtté catalytique initiale) \* 100 (en %)

Degré de purifi = Act Spécif finale / Act spécif initiale (sans unité)

	Volume (ml)	Qtté prot. (mg)	Qtté catal. (U)	Conc prot (mg/ml)	Conc catal. (U/ml)	Act. Spécif. (U/mg)	Rendement (%)	Degré de purification
broyat	100	1220	8300	12,2	83	6.8	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
CEG	10	0,55	20	0,055	2	36,366 ou 3,64 selon si calcul avec Qtté catal ou Conc catl (les deux ont été comptés comme bon pour la correction)	0,24	5,35 ou 0,535 selon le calcul fait pour l'AS (les deux ont été comptés comme bon pour la correction)

Sans mon erreur cela aurait donné :

	Volume (ml)	Qtté prot. (mg)	Qtté catal. (U)	Conc prot (mg/ml)	Conc catal. (U/ml)	Act. Spécif. (U/mg)	Rendement (%)	Degré de purification
broyat	100	1220	8300	12.2	83	6.8	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
CEG	10	0,55	200	0.055	20	363,66	2,4	53,5

Le rendement est très mauvais (0,24%, donc énormément de perte) et le degré de purification est également très mauvais (5.35 ou 0.535).

Sans mon erreur c'est également mauvais pour le rendement 2,4 % et le degré de purification aurait été moyen à 53.5

**ATTENTION, beaucoup n'ont pas signalé leurs unités, elles sont libres pour les activités spécifiques U/g ou U/mg..., sans unité pour le degré de purification et le rendement est un %**

2) Notée sur 4 points

La vitesse n'est linéaire que pendant 1 minute elle est de 66  $\mu\text{mol/L/min}$ . La concentration catalytique dans la cuve =  $d[P]/dt$  pendant la phase linéaire est donc de 66 U/L.

Dans l'éluat :

Concentration catalytique éluat =  $66 \times 220/20 \times 200/10 = 14\,520$  U/L

**ATTENTION :**

- la pente ne se calcule que sur la partie linéaire
- il fallait tenir compte des deux dilutions celle faite dans la cuve (220/20) et celle induite par l'éluat de la bande d'électrophorèse pour laquelle on considère que toutes les protéines contenues dans les 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon déposé sur le gel se retrouvent dans les 200  $\mu\text{L}$  d'éluat (200/10). Je vous avais invité à faire le sujet d'annales de l'internat de 2014 avec une question similaire sur laquelle beaucoup d'entre vous ont buté.

### 3) Notée sur 6 points

$K_{cat}$  ?

$V_{max} = K_{cat} \times [E]_{tot}$

Je déduis du PAGE SDS que le produit de ma purification après chromatographie d'affinité est pure (1 seule bande à la révélation) donc la concentration en protéine (0.3mg/ml) correspond à la concentration de X. Par ailleurs, sa masse moléculaire apparente est de 30 kDa, je peux donc calculer  $[E]_{tot}$  :

$[E]_{tot} = 0,03/30\,000 = 1 \cdot 10^{-6}$  M

En calcul approximatif on peut dire :

$K_{cat} = 14\,520 \cdot 10^{-6}/1 \cdot 10^{-6} = 14\,500 \text{ min}^{-1}$  ou  $242 \text{ s}^{-1}$

**La concentration catalytique trouvée à la question 2 s'apparente à la concentration catalytique maximale puisque nous sommes > 20 Km (21 ou 50 Km on ne sait pas...) mais si l'on veut être rigoureux, nous devons dire que  $V_{max}$  sera > 14 500  $\mu\text{mol/L/min}$  et donc le résultat de  $K_{cat}$  > 14 500  $\text{min}^{-1}$  (je n'en ai pas tenu compte dans ma correction mais il faudrait en toute rigueur)**

**Comme on ne connaît pas exactement la concentration en substrat ceux qui ont considéré que  $V_{max}$  était 21/20 de la valeur calculée au 2 n'ont pas tout à fait bon dans leur raisonnement (je n'en ai pas tenue compte dans ma correction).**