



Méthodes d'observation

Agents dénaturants

→ cassent les liaisons faibles

Par le pH → modifient les charges

Par la température

Solvants miscibles

- Alcools
- Acétone

Agents chaotropiques

- Urée
- Guanidium

Détergents → font un manteau autour des monomères (qui ne peuvent pas se replier correctement)

- SDS
- Triton
- Sarkosyl (vu en ED)

Agents réducteurs

→ cassent les ponts disulfures (donc apporte 2H)

- β mercaptoéthanol

Précipitation

Sels

- NH_2
- SO_4

Solvants organiques

- Ethanol

pH et température

Hydrolyse acide

→ les acides deviennent des bases
car clivage des OH

W détruit

N → D

Q → E

Chromatographies

De partage

Sur colonne

- Ionique (charge) → coloration à la ninhydrine
 - Anionique

DEAE positif

Ordre d'éluion par pHi décroissants

- Cationique

Groupements carboxyliques négatifs

Ordre d'éluion par pHi croissants

- D'exclusion (taille, forme)
- Hydrophobe (polarité)
- D'affinité (épitope)

Liquide hautes performances (HPLC)

Dosages

Par méthodes spectrophotométriques

Absorption d'UV

(dosage par méthode spectro-photométrique)

Liaison peptidique 210 nm

Tous les aa < 230 nm ; certains entre 250 et 300 nm ; W Y F 280 nm

Protéines pic à 280 nm

Acide nucléique pic à 260 nm

Complexe Cu^{2+} + azote 540-550 nm

Biuret & Lowry

Complexes de Cu^{2+} absorbant à 540-550 nm

(100x plus efficace avec ajout de réactif de Follin)

BCA (aussi sensible mais moins sujet aux interférences)

Observation structures proteiques

- Structure II
 - Dichroïsme circulaire (polarité)

Absorption de la lumière polarisée

- Spectrométrie IR

- Structure III

- RMN (< 100 kDa : non dit cette année)
- Cristallographie ++

Diffraction de rayons X

- Dénaturation

- Structure IV

- Dialyse

Passage au travers d'une membrane

- Centrifugation
- Lyophilisation
- Filtration

Electrophorèses

Sur papier (charge)

Western Blot

Electrophorèse + transfert + révélation

Bidimensionnelle

IEF puis électrophorèse dans des conditions dénaturantes (SDS + agent réducteur)

Coloration au bleu de coomassie ou nitrate d'argent

Cartographie par spectrométrie de masse

Clivage puis électrophorèse

Spectrométrie de masse en temps de vol

Toutes les méthodes permettent une purification, sauf la lyophilisation et l'ultracentrifugation

Il y a toujours concentration sauf pour la dialyse

Formules

Dosages

Poids moléculaire (en Da) $\text{g.L}^{-1} = 1 \text{ mol.L}^{-1}$
ex. pour la glycine (PM = 75 Da), $75 \text{ g.L}^{-1} = 1 \text{ mol.L}^{-1}$

a % = a x 10 g.L^{-1}
ex. une solution à 10% de sérine = 100 g.L^{-1}

Fonction acide

$$\% \text{ forme ionique} = \frac{10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)}}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)}}$$

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left[\frac{[\text{COO}^-]}{[\text{COOH}]} \right] = \text{pK}_a \text{ à la } \frac{1}{2} \text{ dissociation}$$

Fonction basique

$$\% \text{ forme ionique} = \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_b)}}$$

$$\text{pH} = \text{pK}_b + \log \left[\frac{[\text{NH}_2]}{[\text{NH}_3^+]} \right] = \text{pK}_b \text{ à la } \frac{1}{2} \text{ dissociation}$$

$$\text{pH}_i = \frac{(\text{pK}_a + \text{pK}_b)}{2} \text{ ou } \frac{(\text{pK}_a + \text{pK}_f)}{2} \text{ ou } \frac{(\text{pK}_b + \text{pK}_f)}{2}$$

$$\text{K}_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$$