

TD de Biochimie 4 : **Electrophorèse.**

Synthèse de l'expérience 1

- ❖ Les questions posées durant l'expérience 1

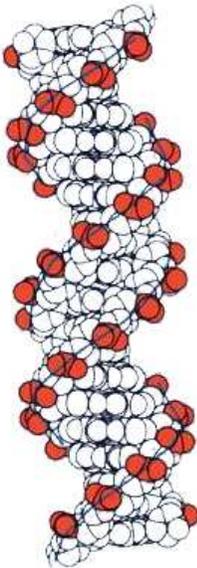
- ❖ Exposé sur les méthodes de séparation des molécules :
 - Paramètres de séparation
 - Méthodes : l'électrophorèse (et les autres).

Questions

- Quel est l'effet de la variation de la concentration d'agarose ou d'acrylamide sur la résolution d'un gel d'électrophorèse ?
- A quoi sert le préchauffage d'un gel dénaturant, pour les acides nucléiques ?
- Quelle est la direction de la migration des protéines dans un courant électrique ?

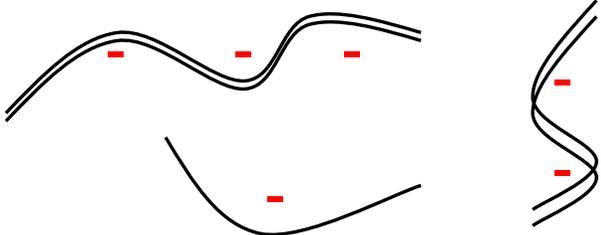
Rappel : Structure des acides nucléiques

ADN



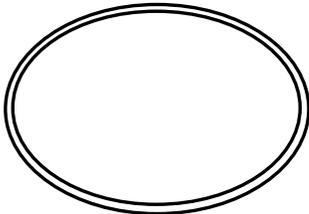
Chargés négativement
(groupes phosphates)

1 ou 2 brins

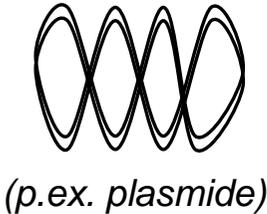


Le nombre de charges est proportionnel au poids moléculaire (~longueur) des fragments.

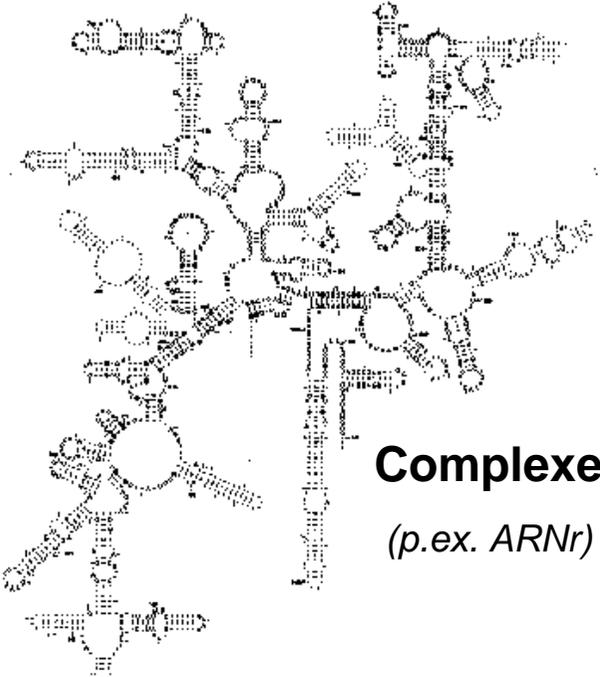
Linéaire



Circulaire



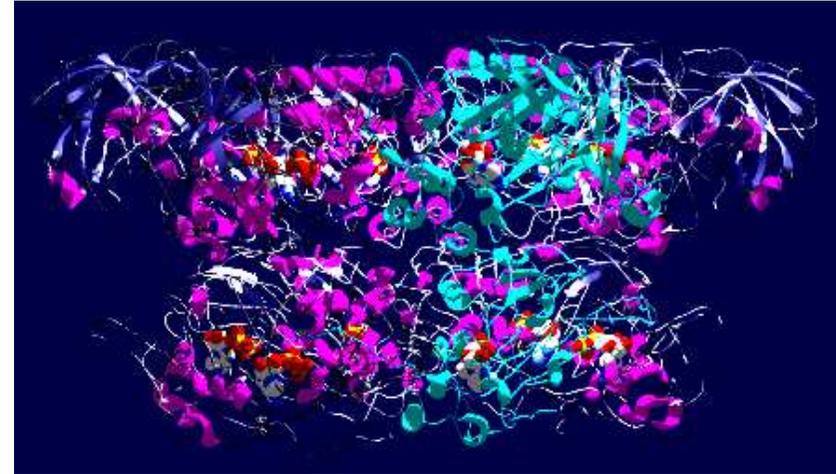
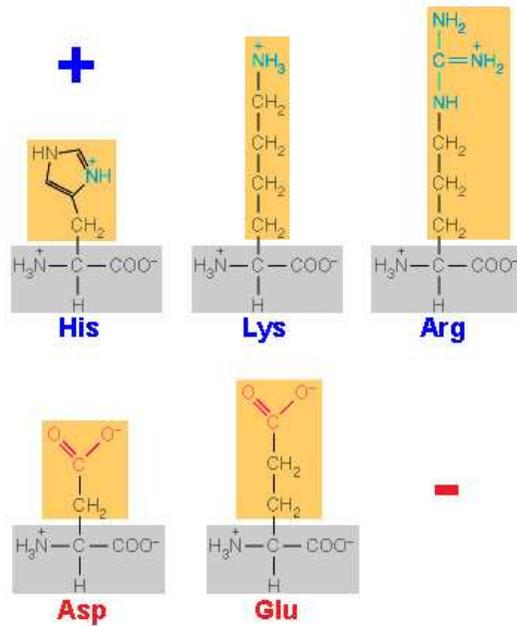
(p.ex. fragment de restriction)



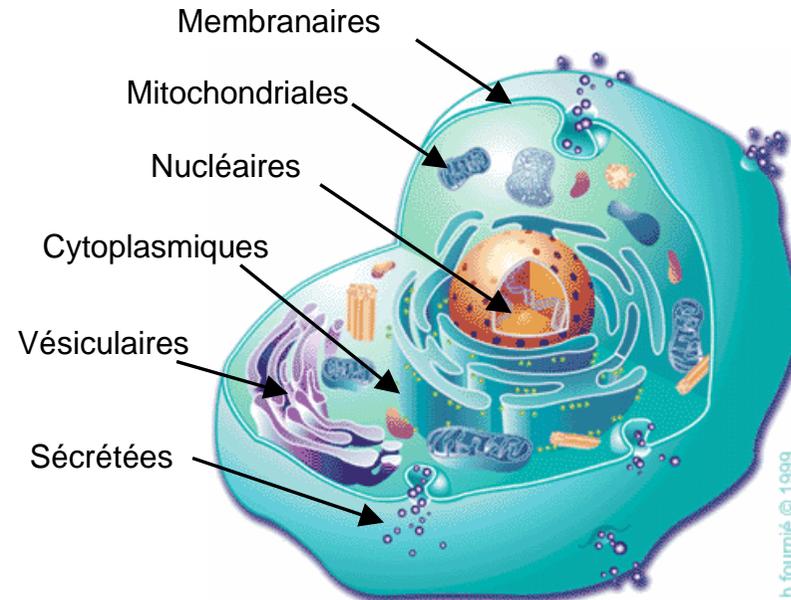
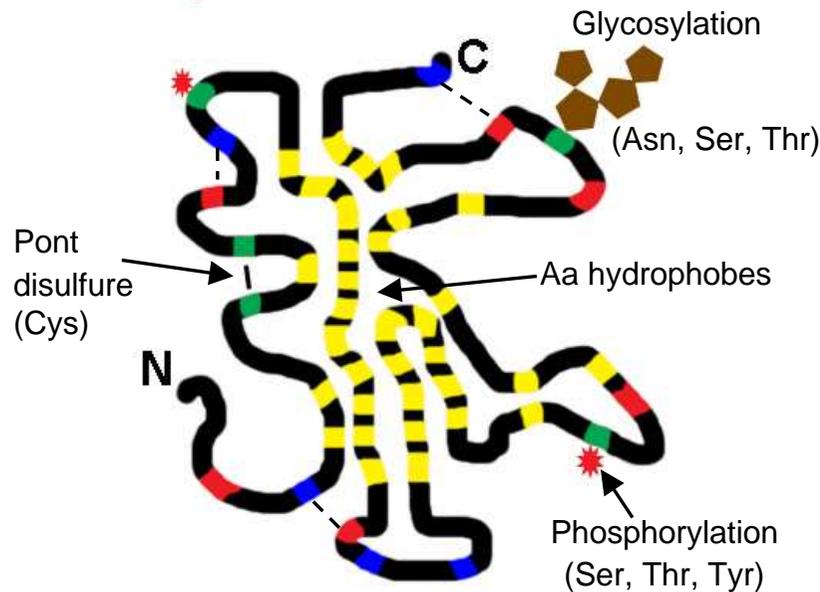
Complexe

(p.ex. ARNr)

(Rappel :) Structure des protéines



Oligomerisation



Principaux paramètres de séparation des molécules :

- **Charge**
- **Poids moléculaire et Forme**
 - ⇒ **Densité**
- **Solubilité**
- **Affinité**

Paramètre de séparation: *Charge*

Protéines :

Dépend des a.a. chargés et des modifications :

⇒ charge nette et densité de charge



Peut varier en fonction du pH

Méthodes :

Electrophorèse “native”

Isoelectrofocalisation

Chromatographie d'échange d'ions

ADN/ARN :

Toujours négative et densité de charge équivalente.

⇒ Pas de séparation selon la charge

Paramètre de séparation:

Poids moléculaire et Forme ⇒ *Densité*

Ces 3 paramètres sont intimement liés.



**Electrophorèse
“dénaturante”**

**Electrophorèse
“native”**

(Ultra)centrifugation

Chromatographie
par filtration

Paramètre de séparation:

Solubilité

Quelques paramètres influençant la solubilité d'une molécule dans un solvant :

Polarité, Hydrophobicité, multimérisation, domaine trans-membranaire, PM, etc.

Méthodes :

Chromatographie

Précipitation de certaines molécules après modification de certains paramètres (*p.ex : la force ionique, la concentration ou l'osmolarité, le pH, la température, le solvant, etc.*)

Paramètre de séparation: *Affinité*

Les protéines peuvent avoir des affinités particulières pour de petites molécules, d'autres protéines ou pour des acides nucléiques.

Ces interactions permettent une purification spécifique de certaines molécules.

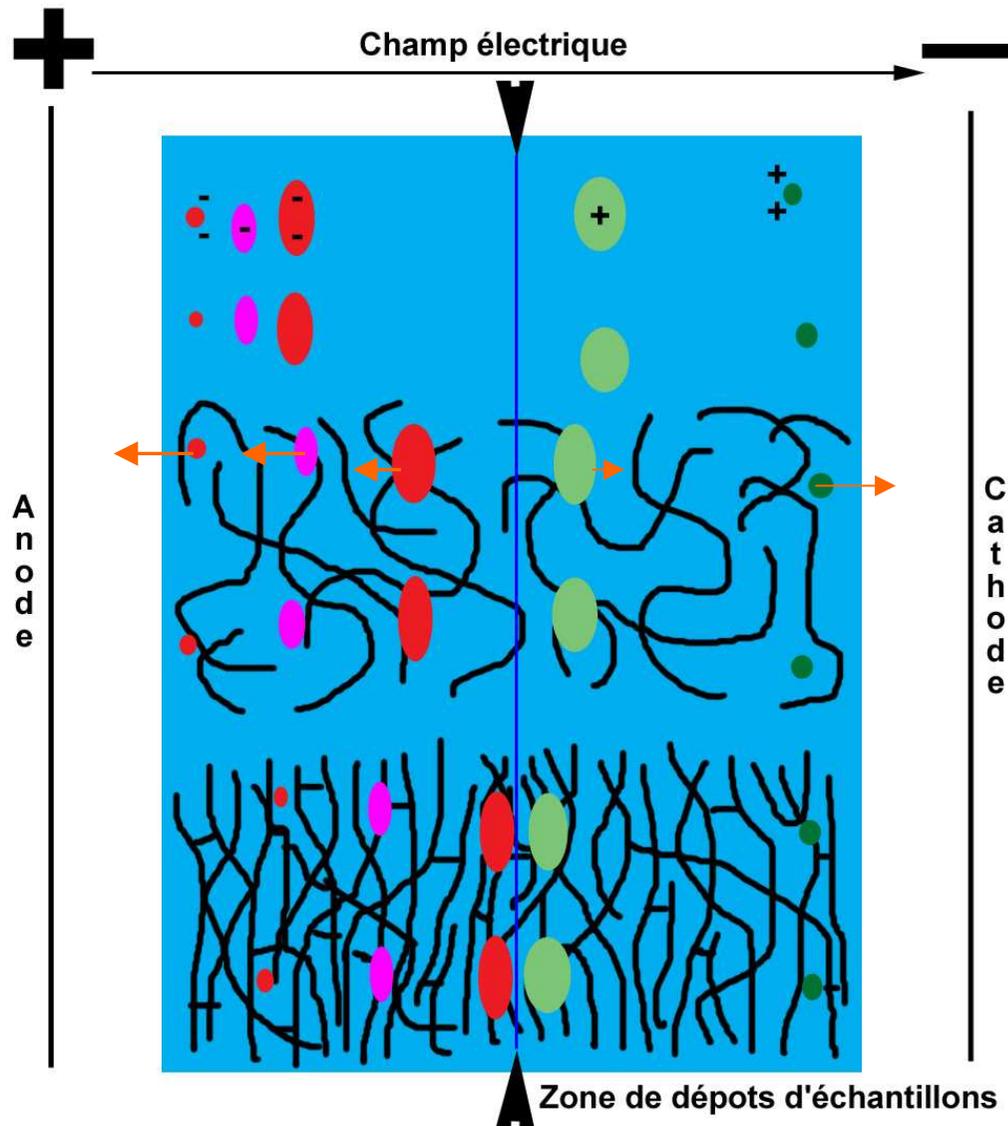
Méthodes :

Chromatographie d'affinité (*p.ex avec des fragments d'ADN pour purifier les facteurs de transcription*)

Immunoprécipitation (à l'aide d'un anticorps spécifique pour la protéine devant être purifiée)

Electrophorèse:

Introduction



L'électrophorèse, c'est la migration de molécules chargées dans un champ électrique.

La vitesse de migration est proportionnelle au nombre de charge et au PM de la molécule (\Rightarrow densité de charge).

Si le gel contient de petites mailles, celles-ci vont ralentir les grosses molécules (\Rightarrow forme).

Electrophorèse: *Composition du gel*

Agarose ou polyacrylamide ?

La composition et la concentration du gel influencent la taille des mailles.

Agarose = grandes mailles

**Séparation de “grands”
acides nucléiques**
(basse résolution)

Séparation de protéines
selon leur charge

Polyacrylamide = petites mailles

Séparation de “petits”
acides nucléiques *(haute
résolution)*

**Séparation de protéines
selon leur PM (si SDS).**

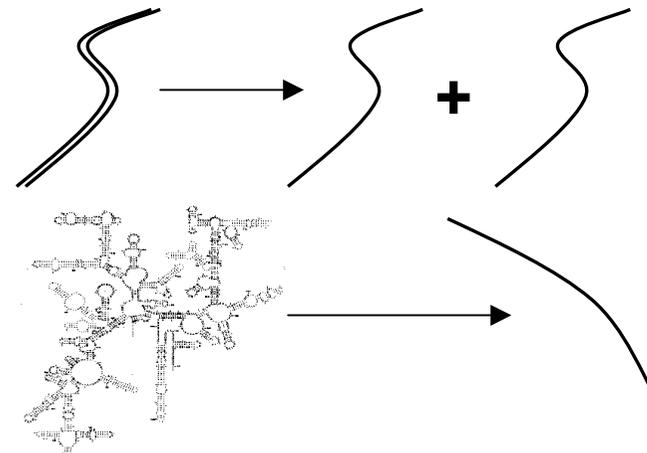
Electrophorèse: *Agents dénaturants*

La dénaturation...

...permet de diminuer l'importance de la *Forme* et/ou de la *Charge*.

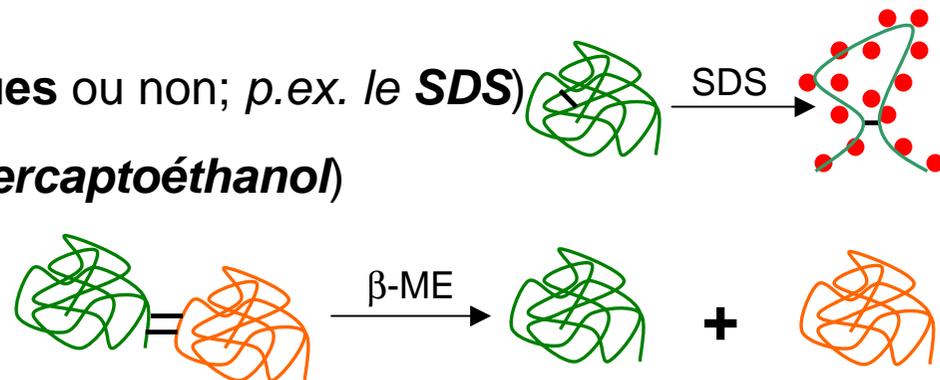
Dénaturer les acides nucléiques :

- Augmenter la force ionique (*p.ex. NaOH*)
- Haute Température.

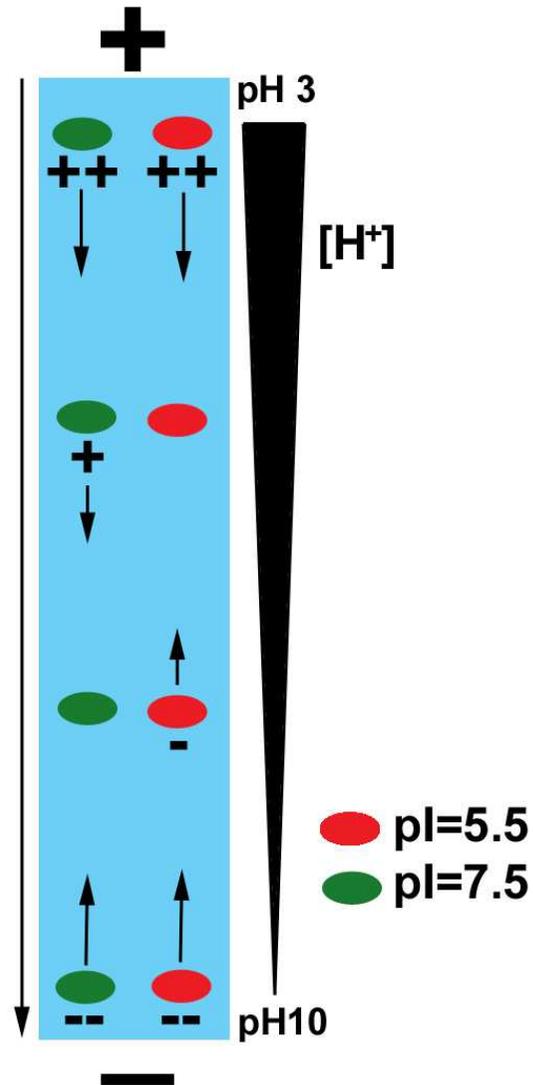


Dénaturer les protéines :

- **Agents chaotropiques** (ioniques ou non; *p.ex. le SDS*)
- **Agents réducteurs** (*p.ex. β -mercaptoéthanol*)
- Haute Température



Electrophorèse: *Isoélectrofocalisation*



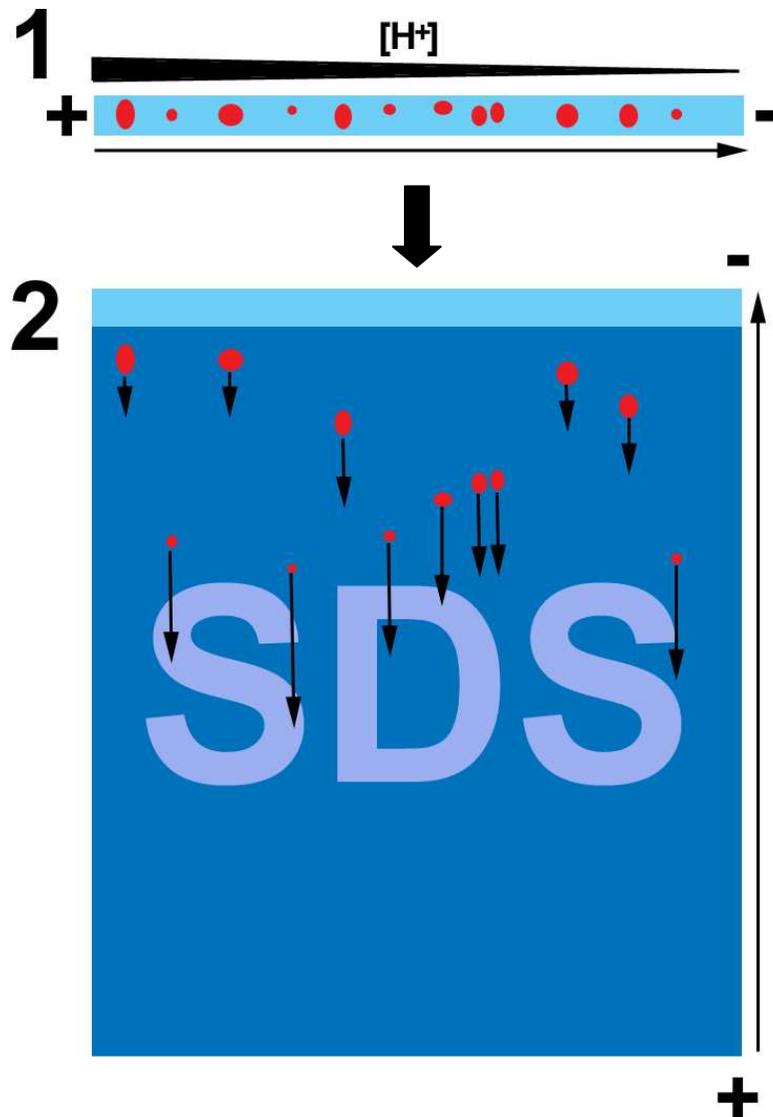
La séparation se fait selon le point isoélectrique (\Rightarrow pH pour lequel la protéine est globalement neutre).

Gel de polyacrylamide (faible concentration) avec **gradient de pH stabilisé**.

$\text{pH} < \text{pI}$	+	Migre vers -
$\text{pH} = \text{pI}$	neutre	Pas de migration
$\text{pH} > \text{pI}$	-	Migre vers +

Electrophorèse:

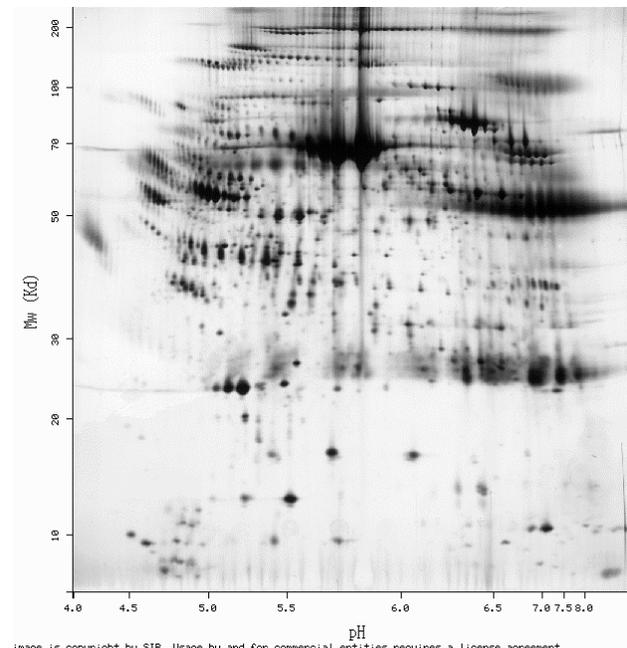
2D



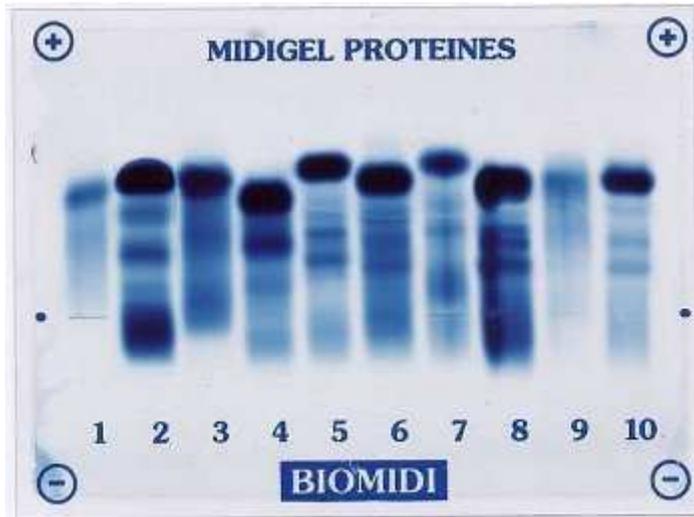
Première électrophorèse de type **isoélectrofocalisation**.

Rotation à 90° du champ électrique et seconde électrophorèse en **présence de SDS**.

Donc première séparation des protéines selon leur pI et deuxième séparation selon leur PM .



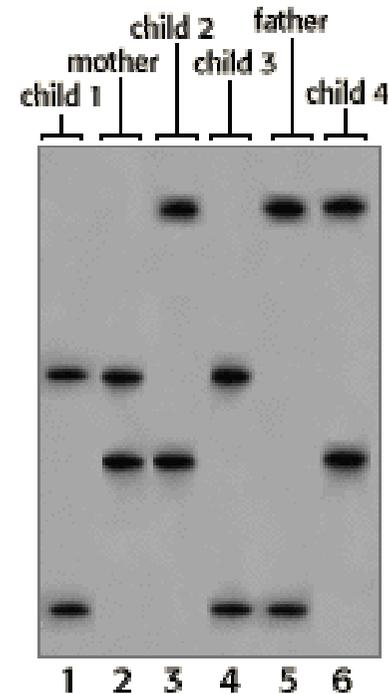
L'électrophorèse dans l'analyse médicale



Electrophorèse du sérum

Séparation selon charge (4 groupes : $\alpha 1$, $\alpha 2$, β et γ globulines)

Analyse générique rapide et bon marché.



Electrophorèse après PCR

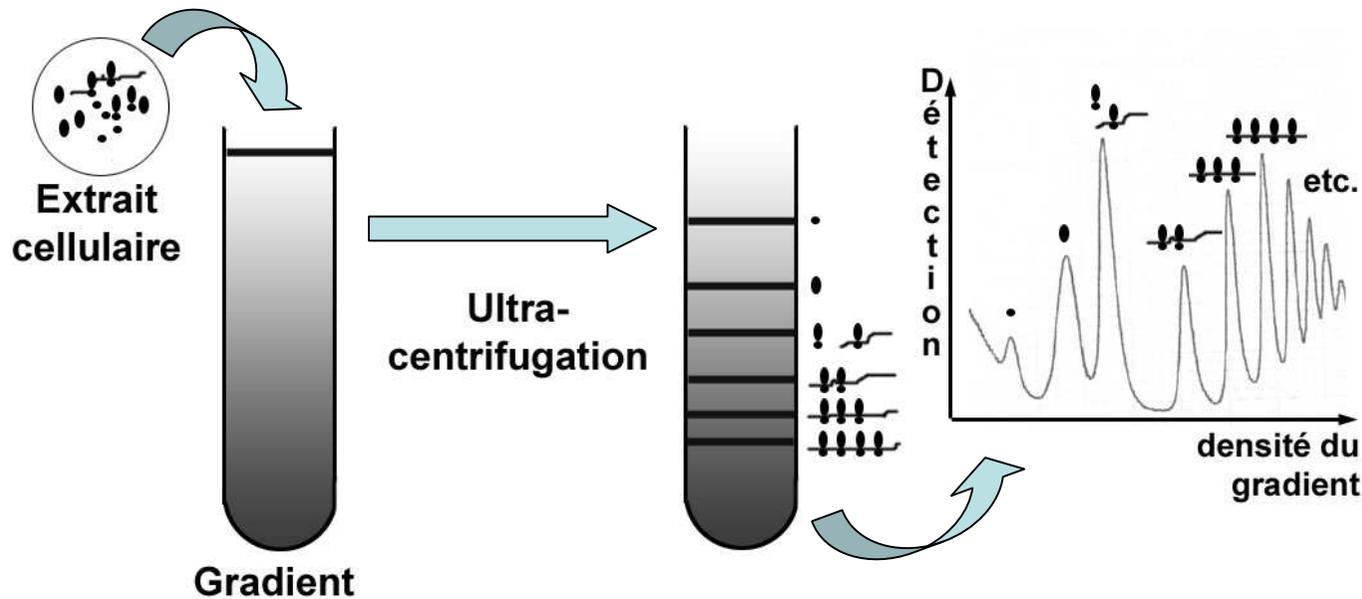
Maladie génétique

Recherche de paternité.

Méthode: *(ultra)centrifugation*

Les molécules sont séparées selon leur densité/sédimentation (~PM)

P.ex.: séparation d'unités de traduction



Exemple médical :

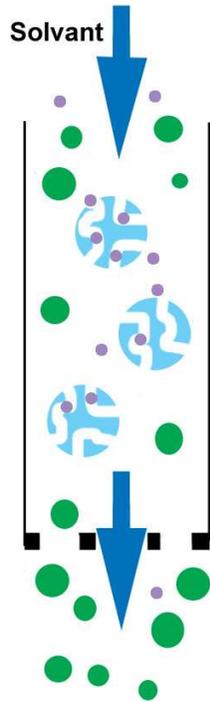
Séparation des macrocomposants du sang (*sérum, globules, etc*) par centrifugation.

Méthode:

Chromatographie

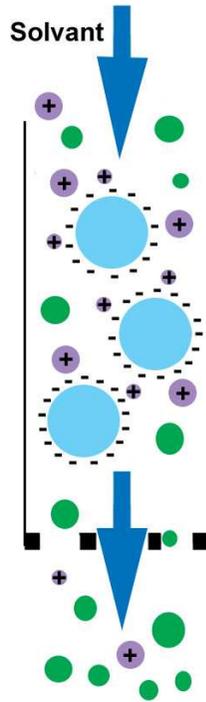
Séparation selon :

Forme (~PM)



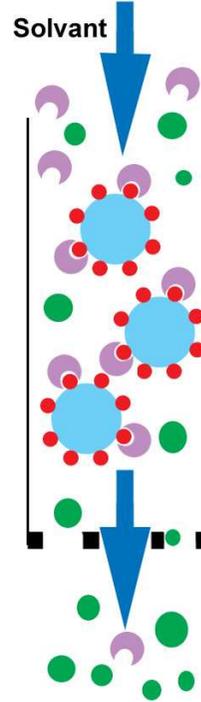
Filtration
(Séphadex)

Charge



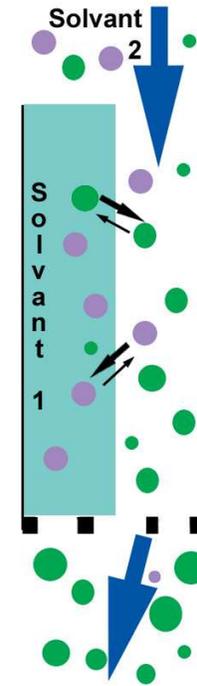
Echange
d'ions

Affinité



Affinité

Solubilité



gaz/liquide
liquide/liquide

Exemple médical :

Analyse/dosage de certaines substances chimiques dans le sang.