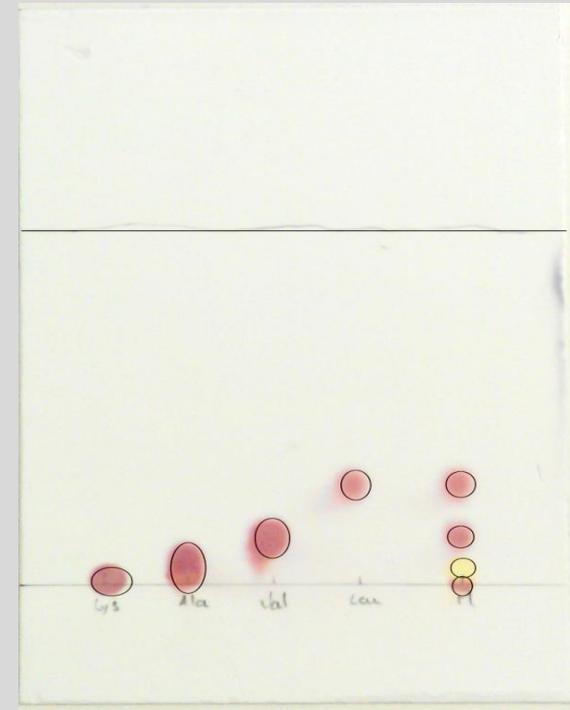
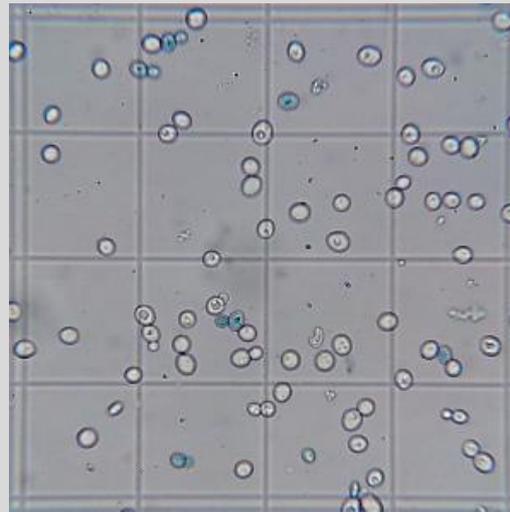
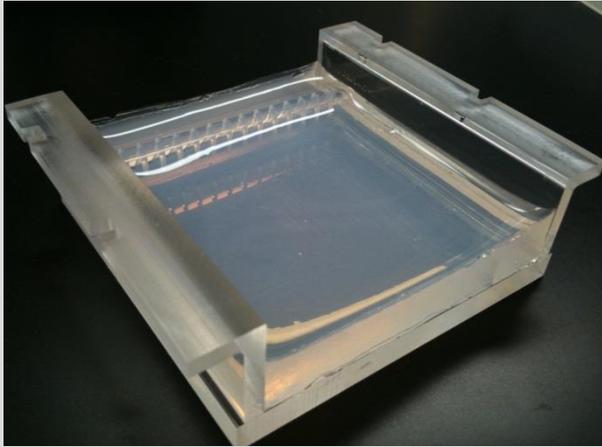


Révisions TP Biologie Séance « 4 »

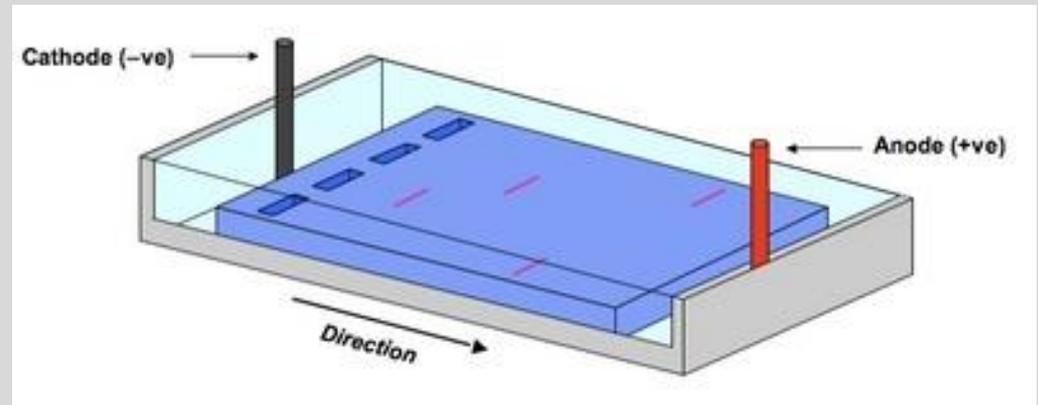
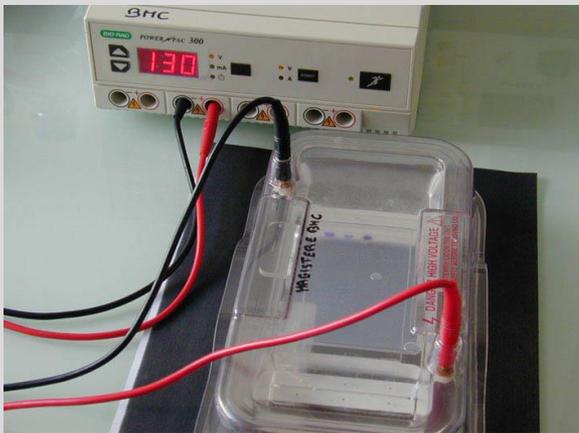


Electrophorèse de protéines dénaturées et non dénaturées sur agarose : dispositif expérimental



A gauche :
le support = gel
d'agarose

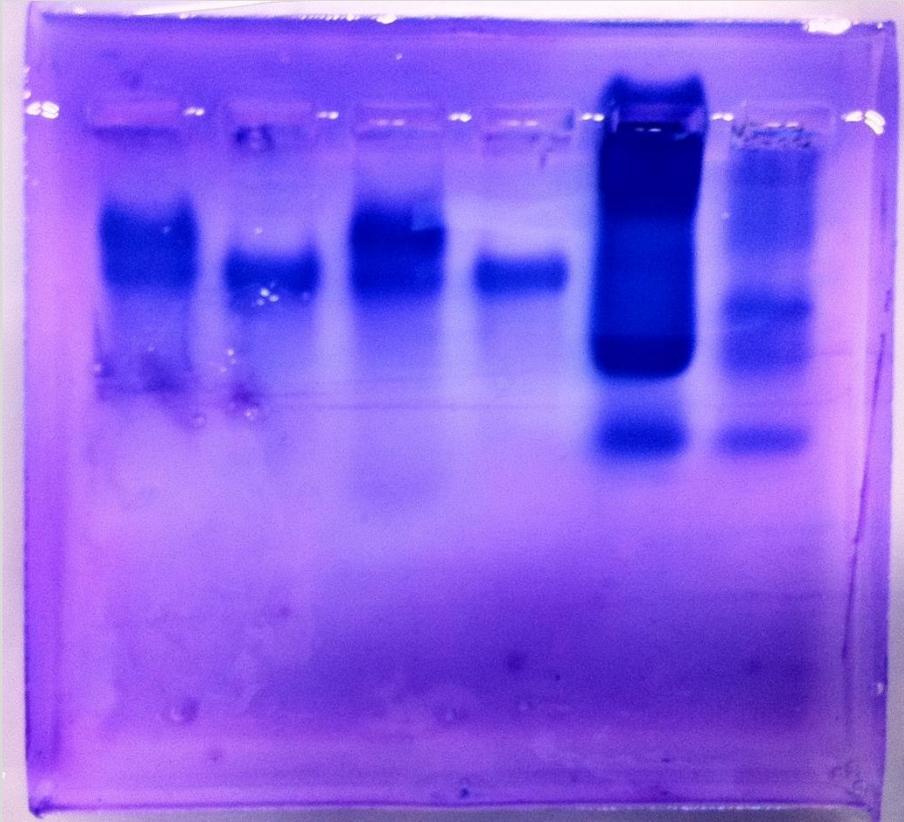
A droite : réalisation
des dépôts dans les
puits



Le générateur permet d'appliquer une tension aux bornes de la plaque d'agarose.
Les protéines chargées - (en raison du tampon utilisé) migrent vers l'anode chargée +.

Electrophorèse de protéines dénaturées et non dénaturées sur agarose : résultats

A B C D E F



A et C : glucose oxydase non dénaturée

→ *Nb bandes?*

B et D : glucose oxydase dénaturée

→ *Nb bandes ?*

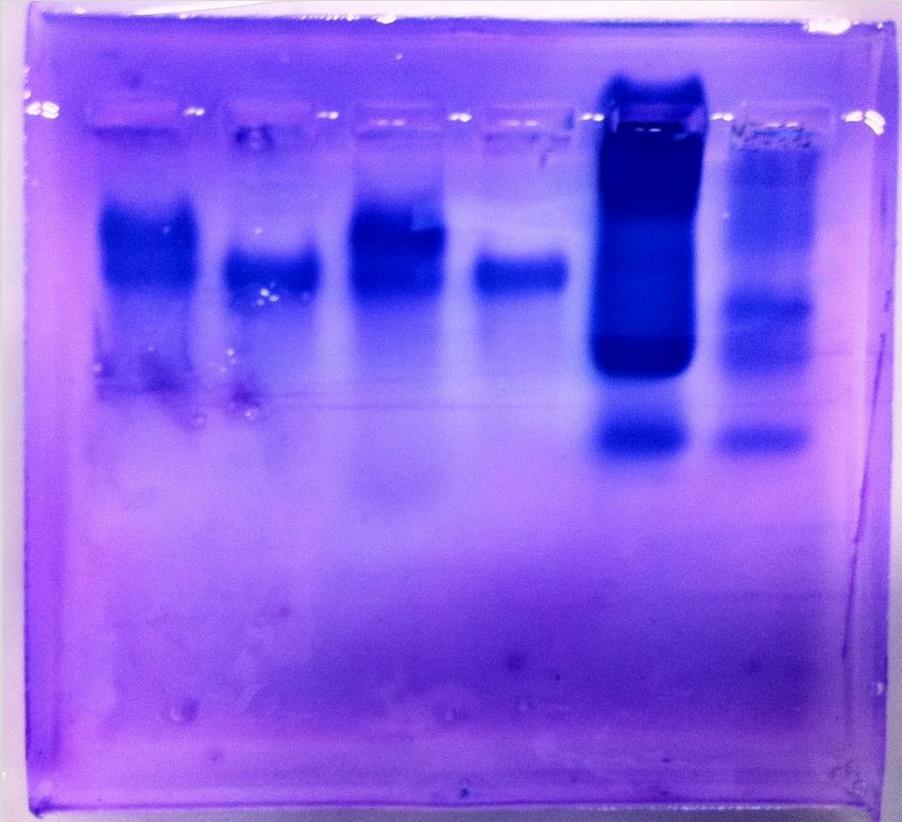
Ccl : ???

E : sérum de cheval non dénaturé

F : sérum de cheval dénaturé

Electrophorèse de protéines dénaturées et non dénaturées sur agarose : résultats

A B C D E F



A et C : glucose oxydase non dénaturée

→ *deux bandes*

B et D : glucose oxydase dénaturée

→ *une seule bande*

Ccl : protéine à structure quaternaire, avec sous-unités de même masse.

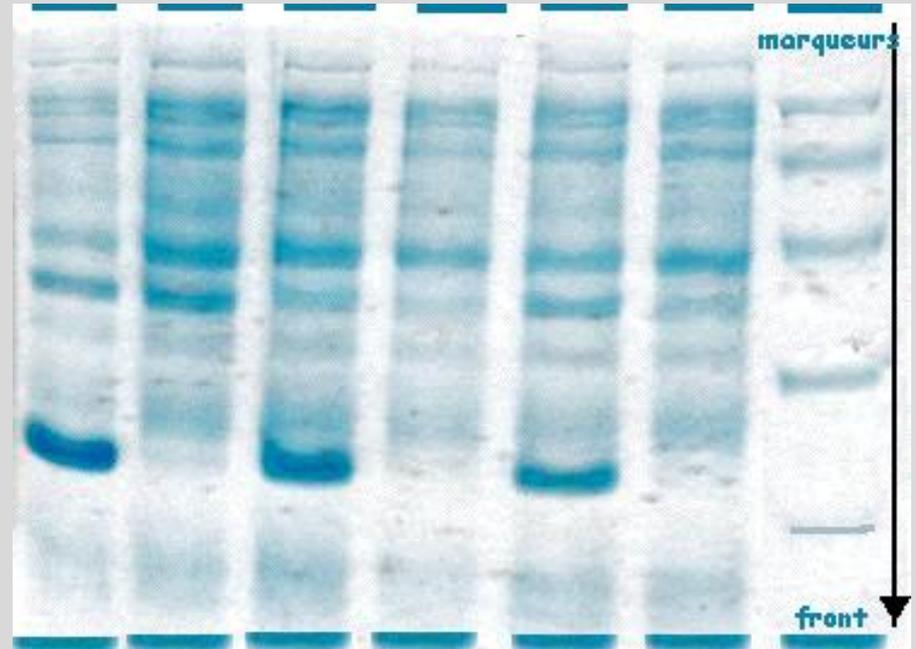
La 2^e bande obtenue en conditions non dénaturantes est un « artefact » (protéine partiellement dénaturée, bien qu'il n'y ait pas eu de traitement dénaturant)

E : sérum de cheval non dénaturé

F : sérum de cheval dénaturé

Détermination de la masse molaire d'une protéine

On obtient différentes bandes pour chaque piste de la figure ci-contre (la flèche indique le sens de migration). La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues (piste de droite).



Exemple de marqueurs :

- myosine (205 kDa)
- β galactosidase (116 kDa)
- phosphorylase β (97,4 kDa)
- albumine (66 kDa)
- ovalbumine (45 kDa)
- anhydrase carbonic (29 kDa)

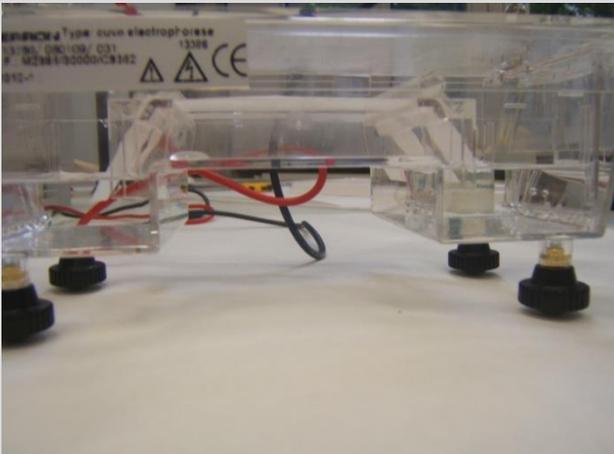
Exemple de résultats d'une électrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Source : E. Jaspard (2004)

Electrophorèse de protéines sur bande d'acétate de cellulose



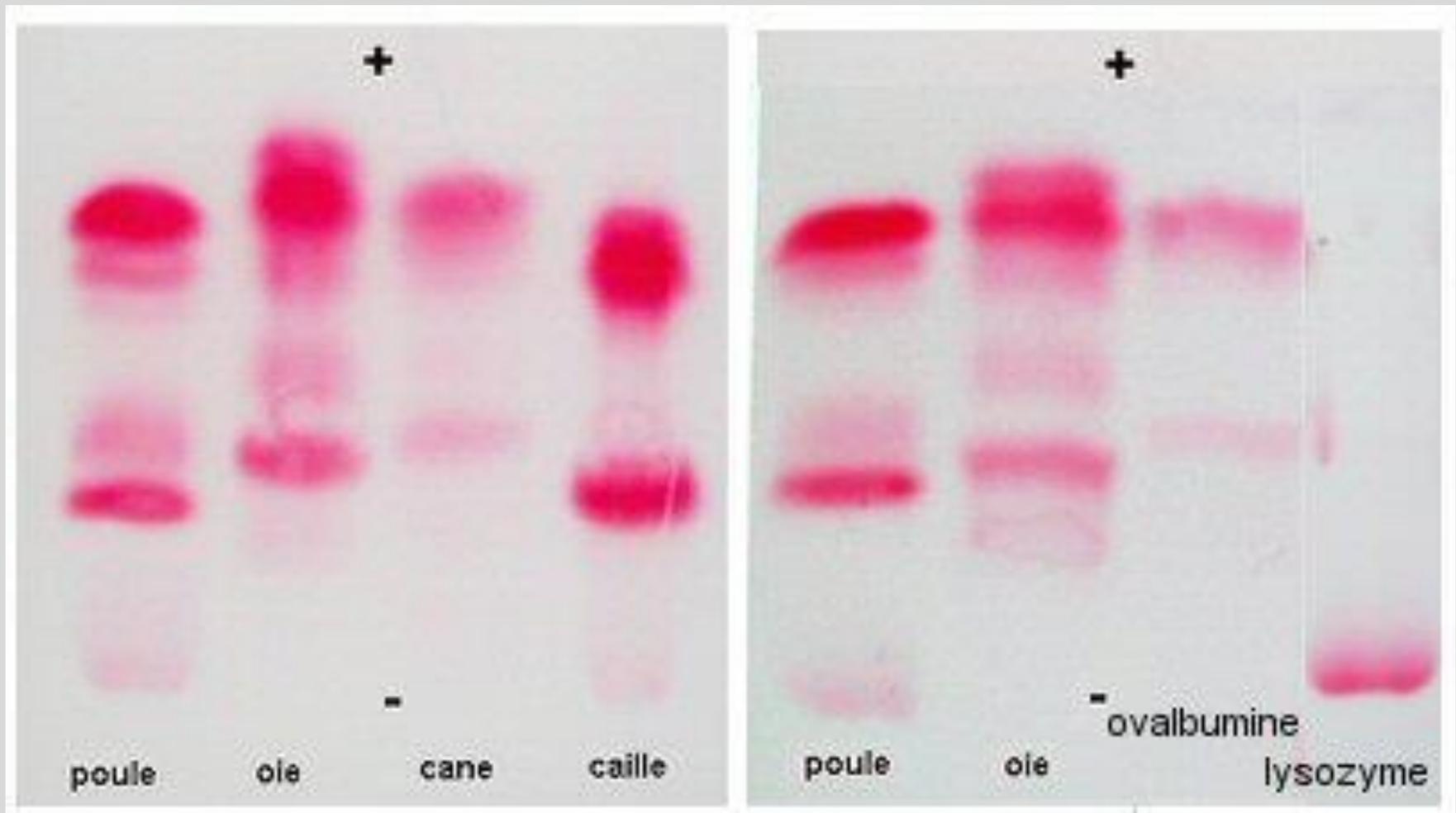
Positionnement des bandes dans la cuve après le dépôt



**Migration dans un champ électrique
Les bandes trempent dans le tampon véronal**

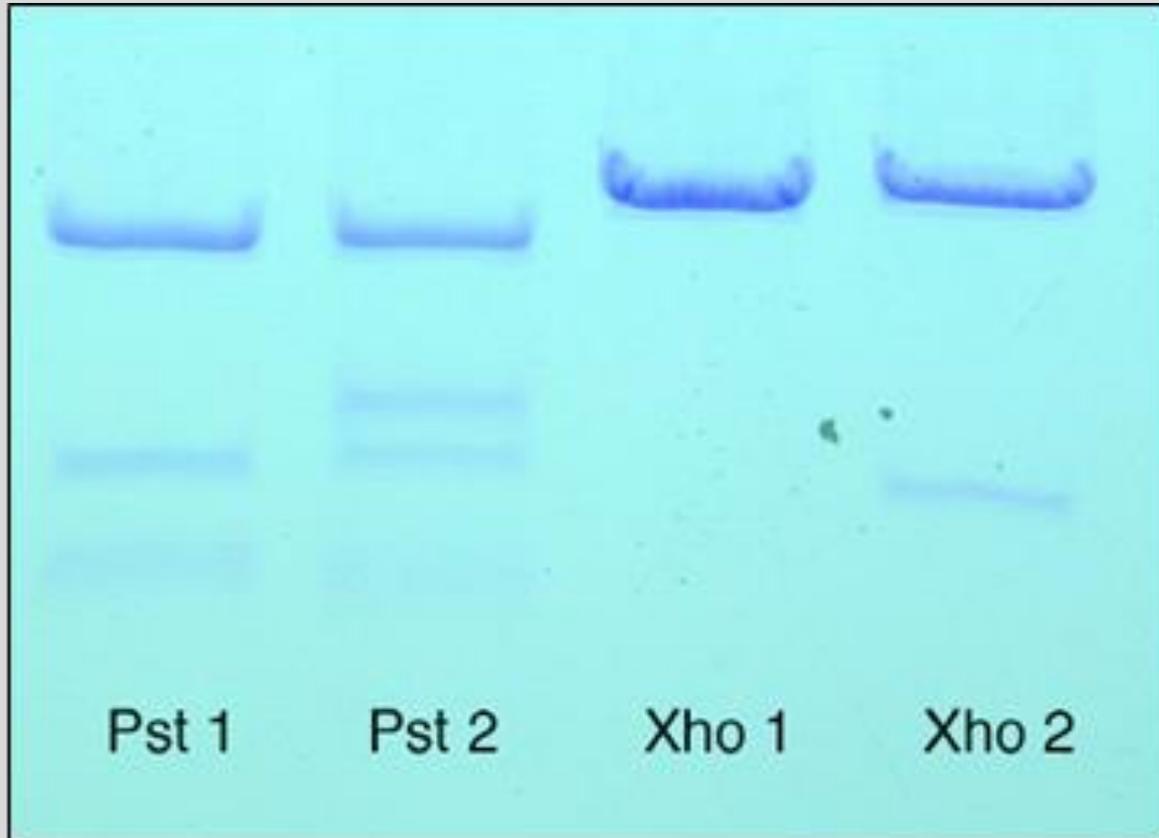


Révélation: bains successifs dans l'acide acétique après la coloration au rouge Ponceau



Séparation électrophorétique sur acétate de cellulose des protéines du blanc d'œuf d'espèces différentes d'oiseaux.

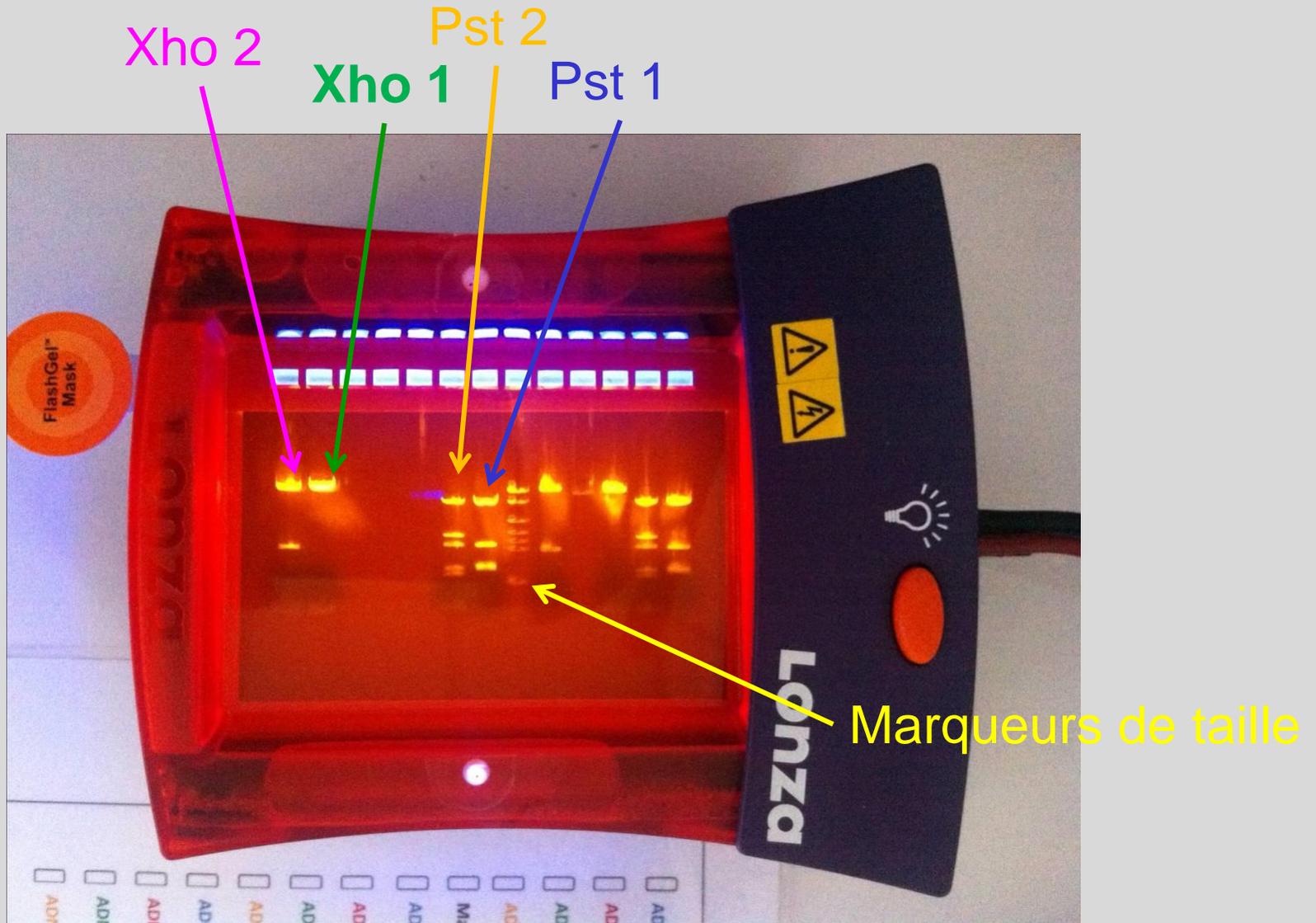
Exemple de résultats



Résultats obtenus. L'indice 1 ou 2 fait référence à l'ADN testé (ADN1 ou ADN2).

Résultats obtenus

L'indice 1 ou 2 fait référence à l'ADN testé (ADN1 ou ADN2).

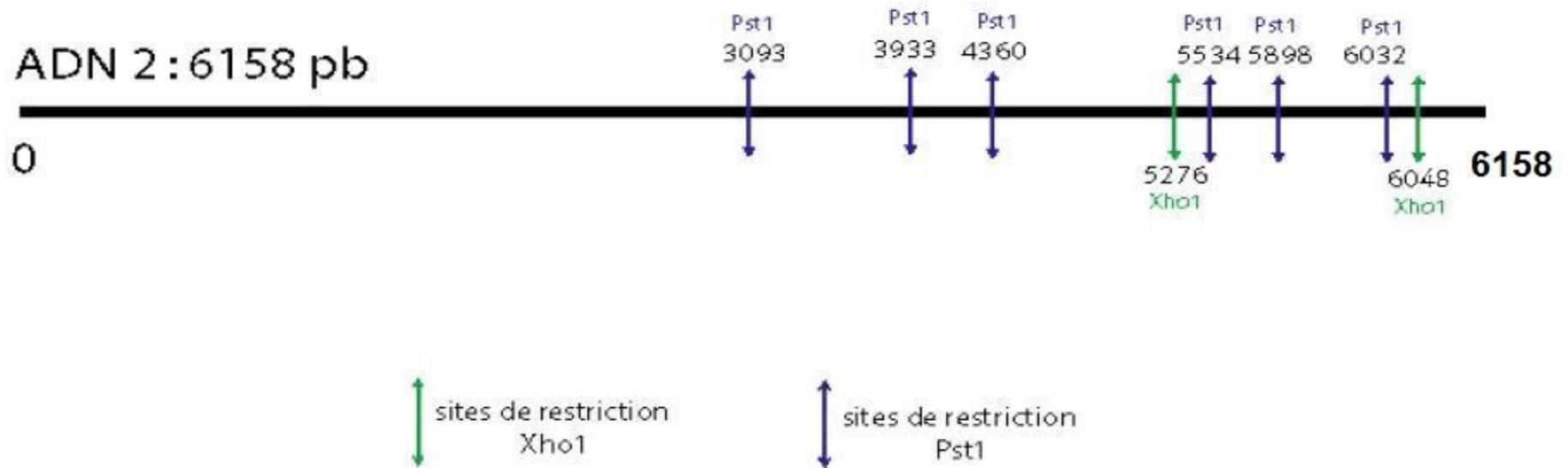


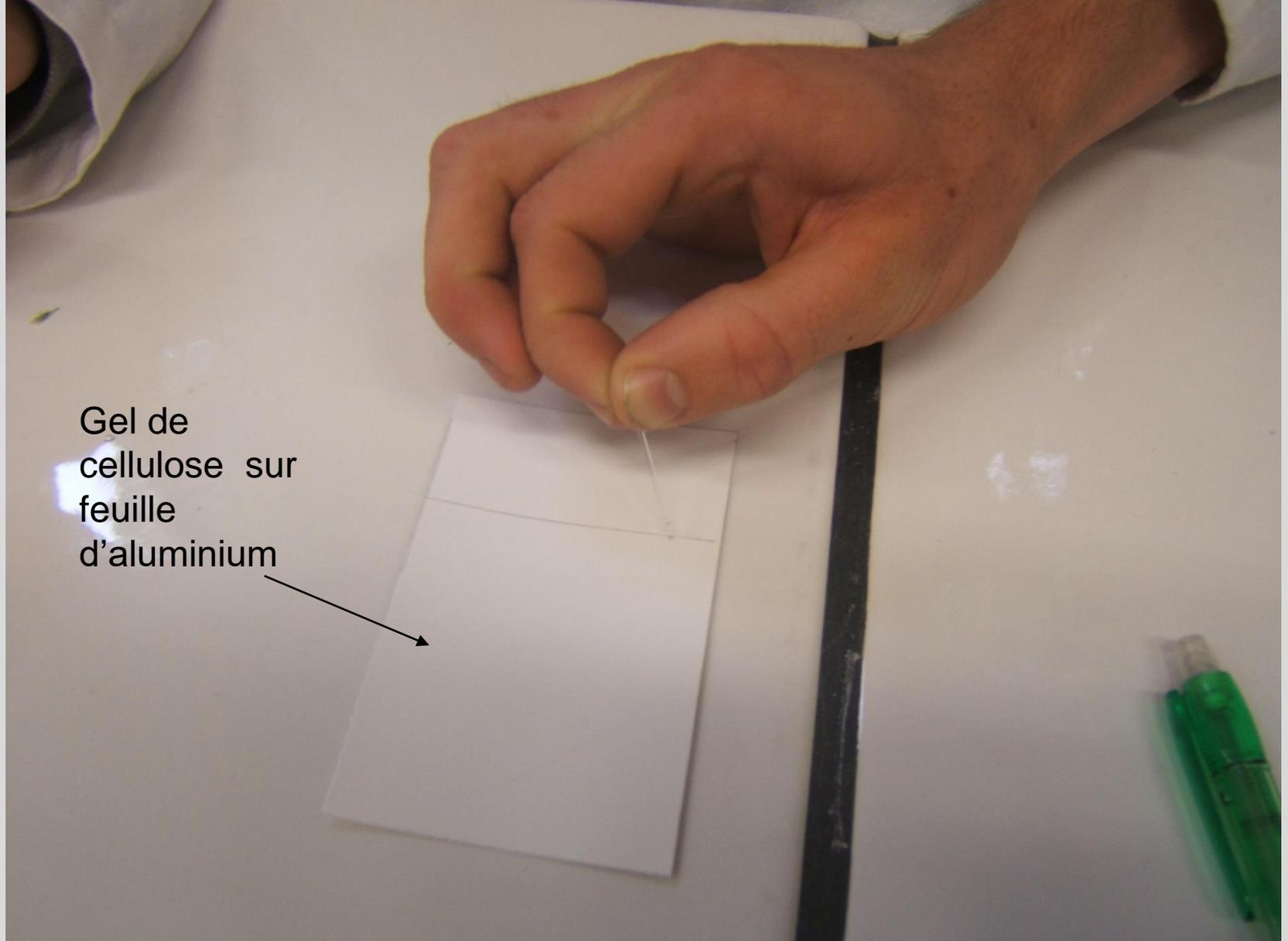
Résultats
complets
avec les deux
enzymes de
restriction
utilisées
séparément
puis
ensemble

	5276	
3093		3093
1174		916
840	772	840
427		427
364		364
		258
134		134
126	110	110
		(16)
ADN 2 digéré par Pst 1	ADN 2 digéré par Xho 1	ADN 2 digéré par Pst 1 et Xho 1

	<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> 5276	
<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> <u>3093</u>		<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> <u>3093</u>
<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> 1174		<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> 916
<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> <u>840</u>	<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> 772	<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> <u>840</u>
<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> <u>427</u> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> 364 <u> </u>		<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> <u>427</u> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> 364 <u> </u>
		<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> 258
<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> <u>134</u> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> 126	<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> 110 <u> </u>	<div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> <u>134</u> <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; display: inline-block;"></div> 110 <u> </u>
		(16)
ADN 2 digéré par Pst 1	ADN 2 digéré par Xho 1	ADN 2 digéré par Pst 1 et Xho 1

Carte de restriction de l'ADN 2

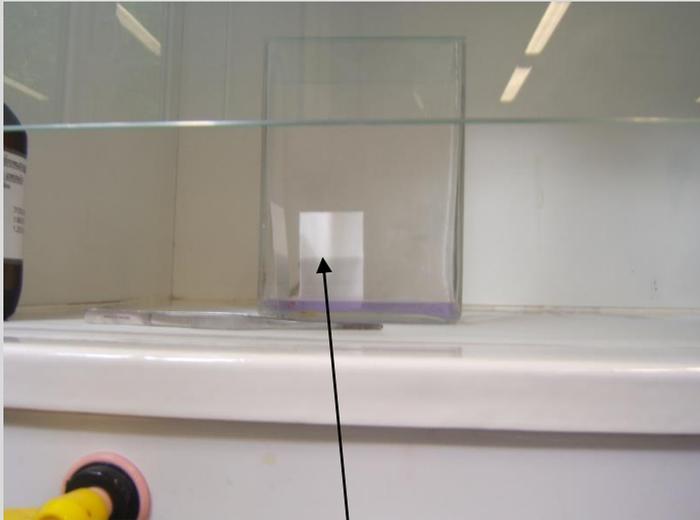




Gel de
cellulose sur
feuille
d'aluminium

Chromatographie des acides aminés: phase de dépôt

Chromatographie des acides aminés sur gel de silice



La migration

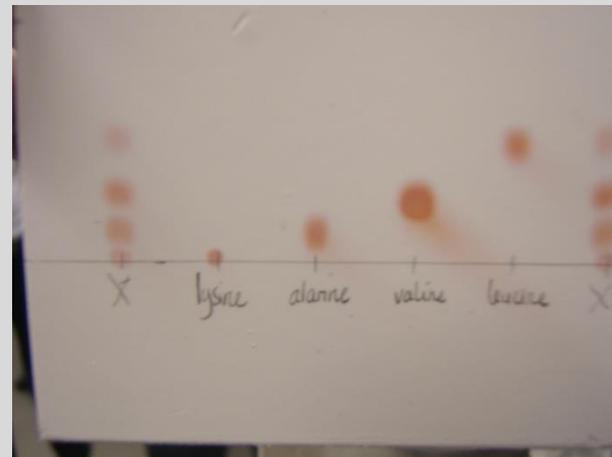
Front de migration du solvant

Solvant :

70% butanol,
18 % acide acétique,
12 % eau

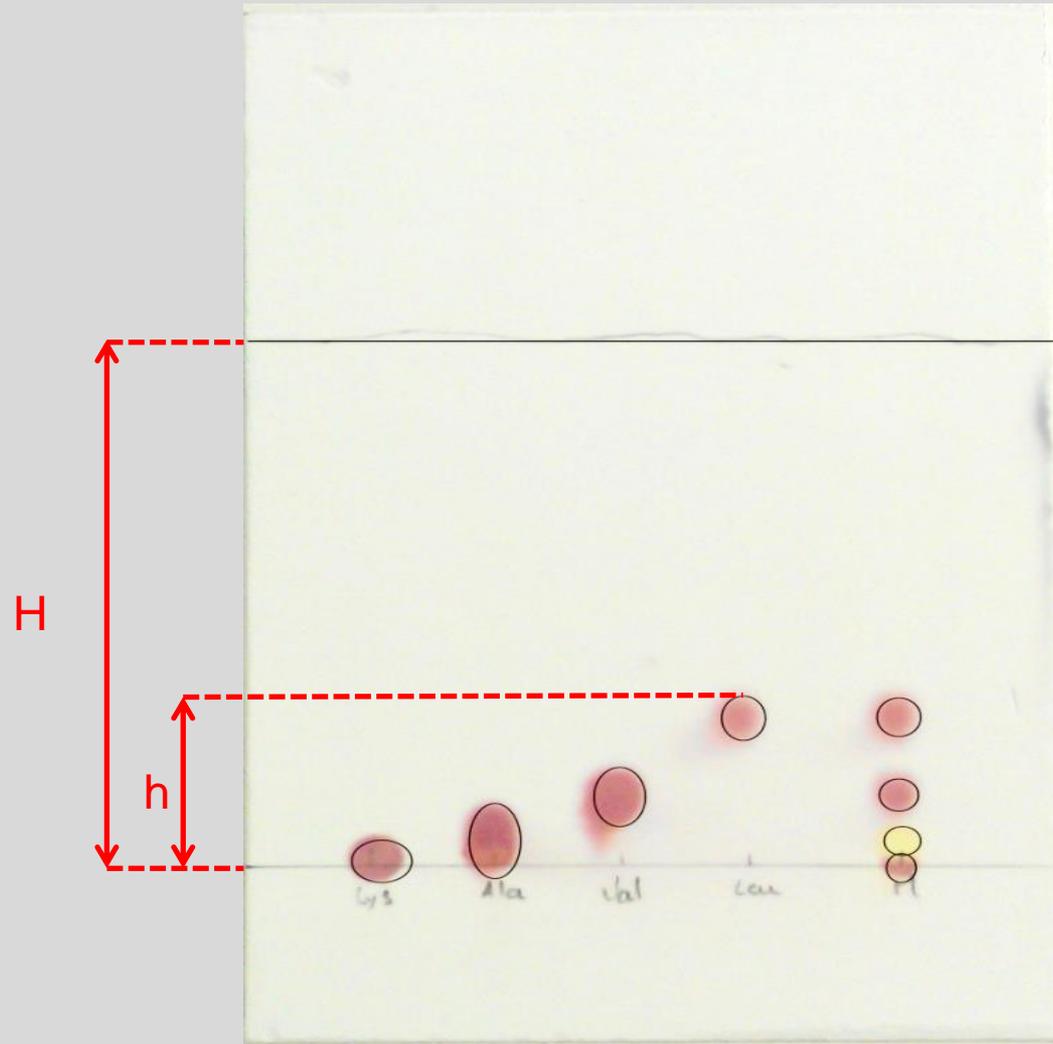


Le séchage
Après bain à la
Ninhydrine



Les tâches des différents acides aminés sont apparues

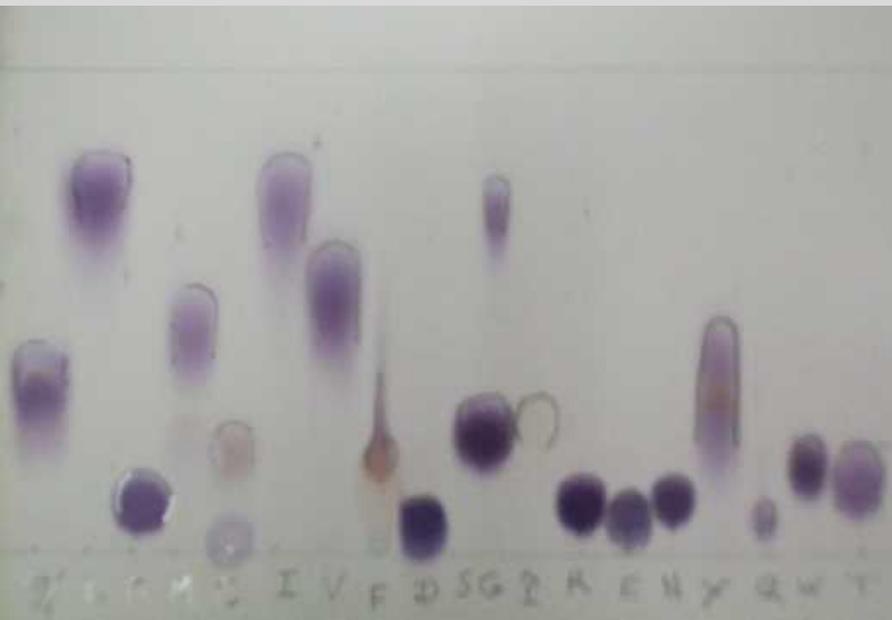
Chromatographie des acides aminés sur gel de silice : résultats



Calcul du rapport frontal pour la leucine :

$$R_f = h / H$$

$$R_f = 2,29 / 7,05 \\ = 0,32$$



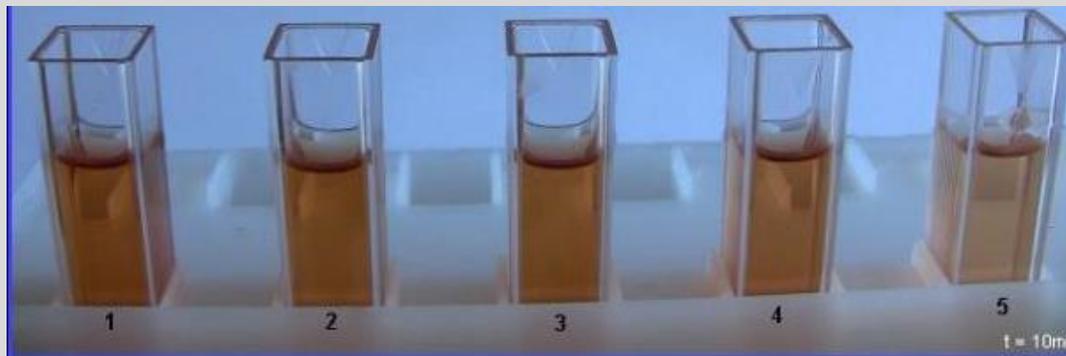
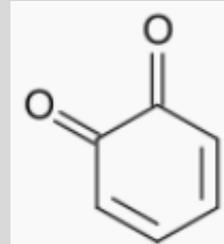
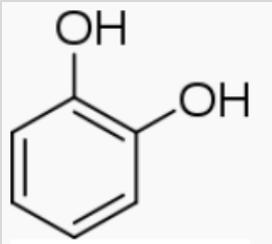
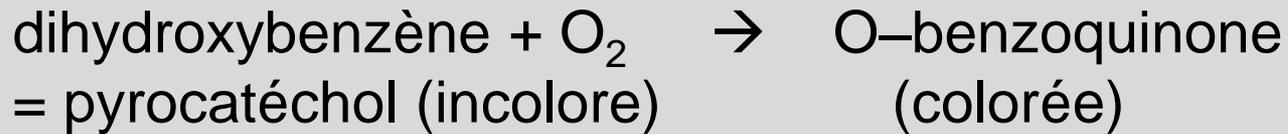
Acides aminés	Symboles à 3 lettres	Symboles à une lettre	Acides aminés	Symboles à 3 lettres	Symboles à une lettre
Alanine	ala	A	Leucine	leu	L
Arginine	arg	R	Lysine	lys	K
Asparagine	asn	N	Méthionine	met	M
Acide aspartique	asp	D	Phénylalanine	phe	F
Cystéine	cys	C	Proline	pro	P
Glutamine	gln	Q	Sérine	ser	S
Acide glutamique	glu	E	Thréonine	thr	T
Glycine	gly	G	Tryptophane	trp	W
Histidine	his	H	Tyrosine	tyr	Y
Isoleucine	ile	I	Valine	val	V

**Chromatographie sur gel de silice
de dix-neufs acides aminés protéinogènes
H A K M C I V F D S G P R E N Y Q W T**

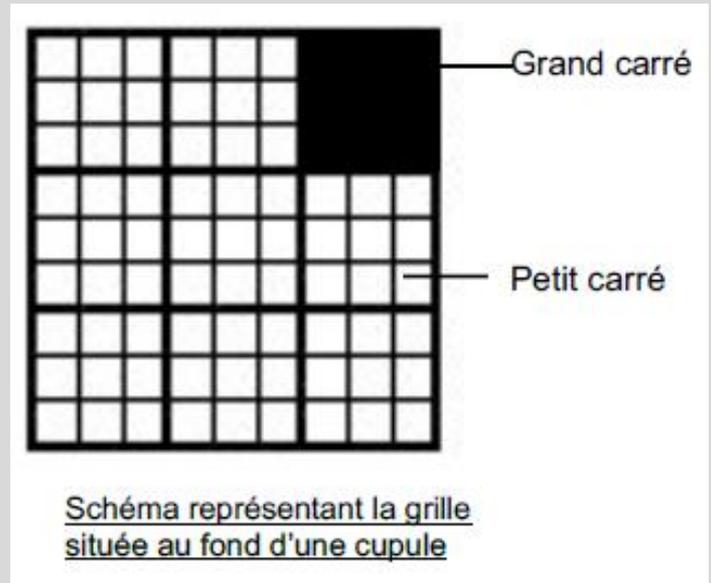
Suivi d'une réaction enzymatique par colorimétrie



tyrosinase



Utilisation d'une lame de numération cellulaire KOVA



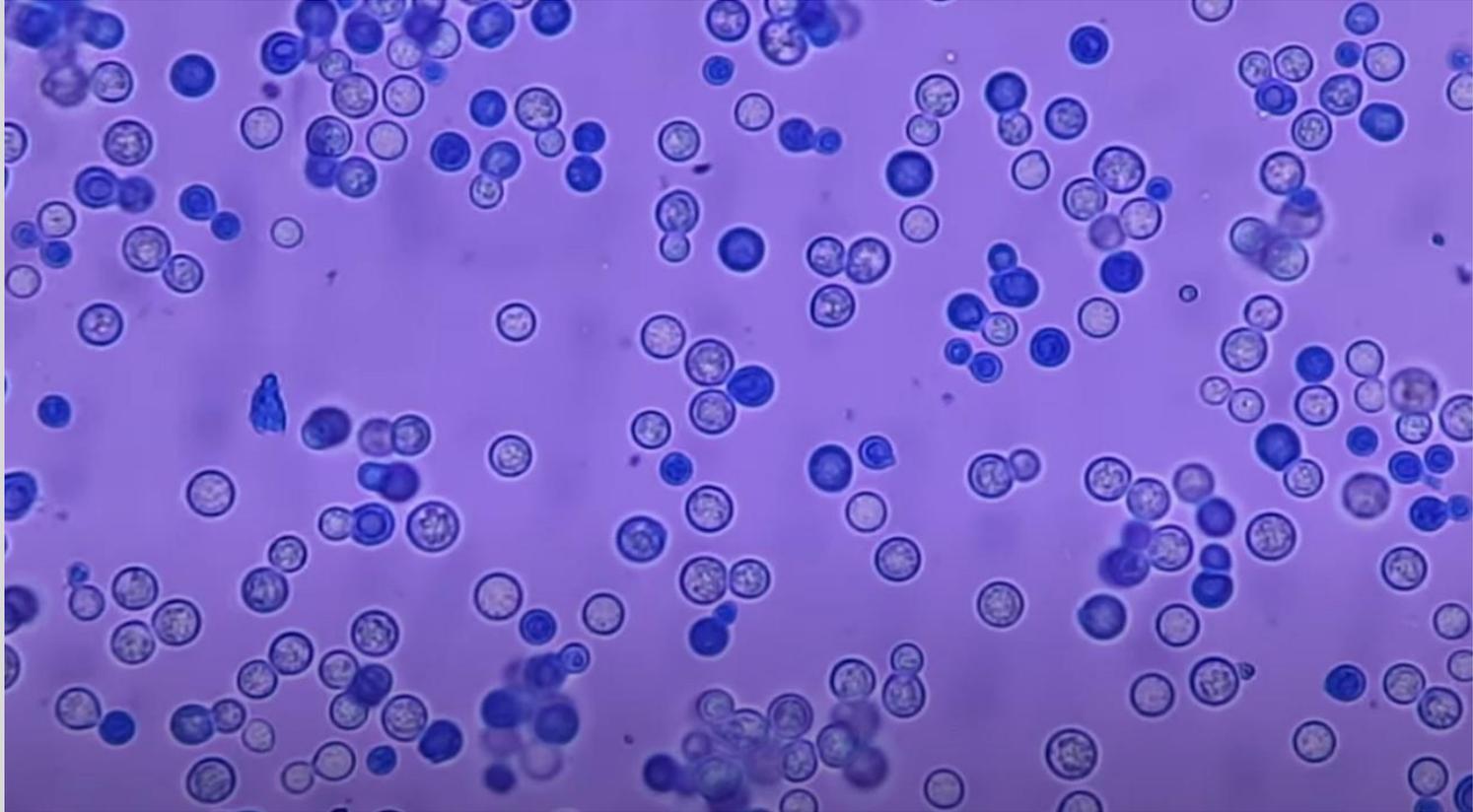
Une lame KOVA comporte 10 cupules ou chambres de comptage individuelles numérotées (voir ci-dessus) à grille quadrillée (représentée à droite).

Le volume de liquide retenu sur la grille est de $0,9 \mu\text{L}$.

En fonction de la densité cellulaire, le nombre total N de cellules par μL s'obtiendra soit :

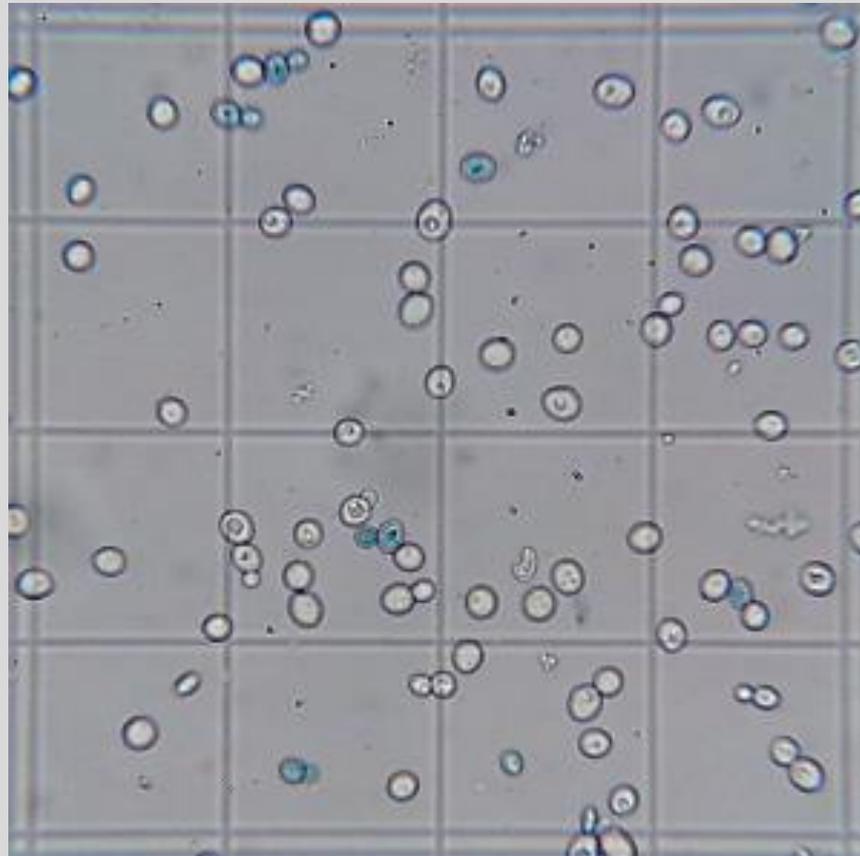
- en comptant sur toute la grille si les cellules sont peu nombreuses,
- en comptant sur un grand carré ($= 0,1 \mu\text{L}$) si les cellules sont nombreuses,
- en comptant sur un petit carré ($\approx 0,01 \mu\text{L}$) si les cellules sont très nombreuses.

Observation de *Saccharomyces cerevisiae*

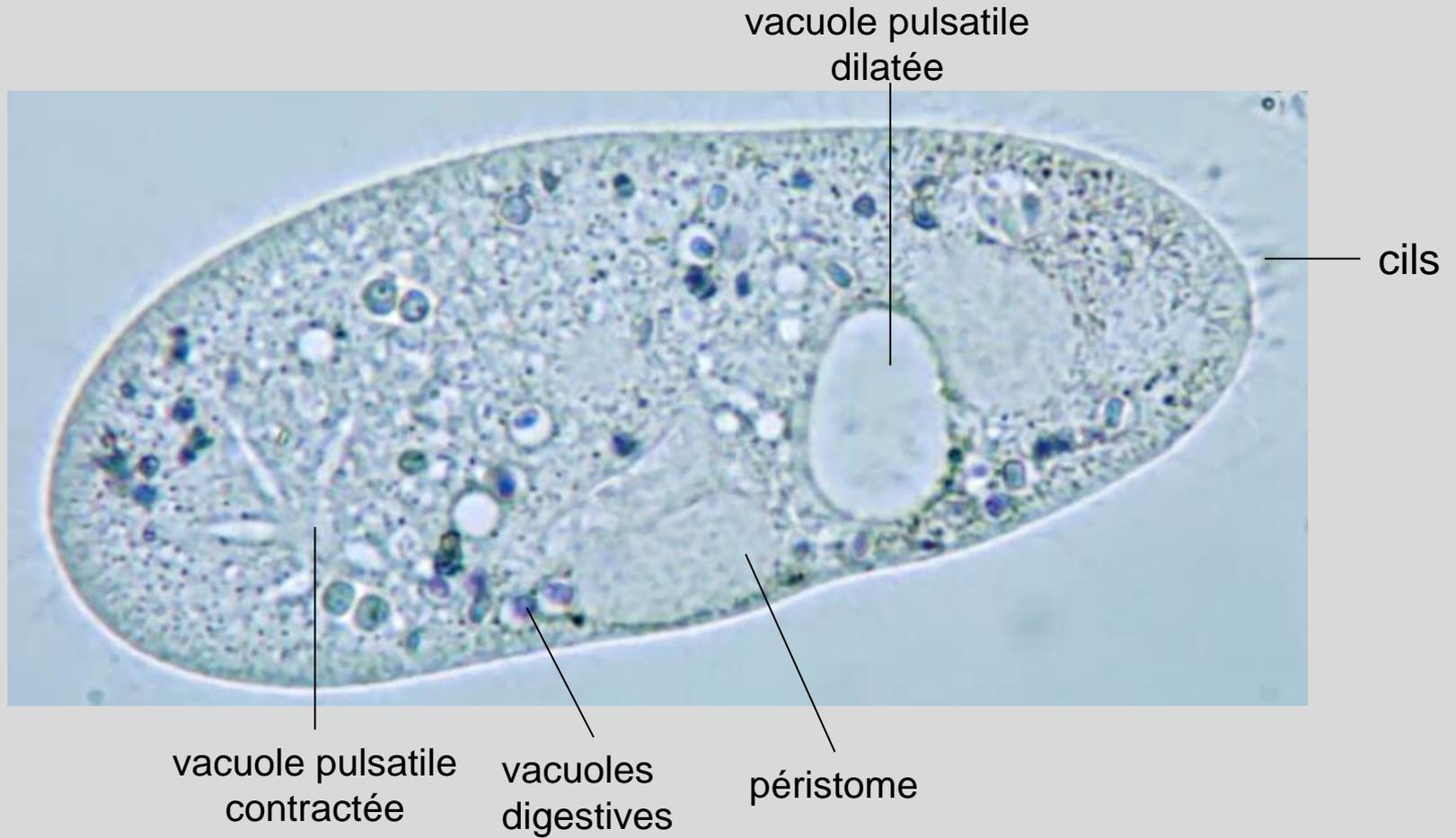


M.O.
Coloration au bleu de méthylène

Numération de levures avec lame KOVA



Observation d'une Paramécie vivante



Observation de Paramécies après coloration à l'eau iodée

trichocystes

cils



rangée de cils locomoteurs

