Fiche TD n°1 : La chromatographie d'exclusion moléculaire

EXERCICE N : °1

On détermine les temps de rétention de (tr) au cours d'une chromatographie sur séphadex, les protéines suivantes dont on connait la masse moléculaire (MM), le débit de la colonne est de 5ml/min.

Protéines	MM	Tr(min)
Aldolase	**145000**	**10.4**
Lactate déshydrogénase	**135000**	**11.4**
Phosphatase alcaline	**80000**	**18.4**
Ovalbumine	**45000**	**26.2**
lactoglobuline	**37100**	**28.6**

1-Expliquer le principe de cette technique
2-Calculer les volumes d'élution (Ve) correspondants. Porter le log de MM en fonction de Ve ; que remarquez-vous ?
3-Pour la glucokinase. Tr=21. Déterminer sa masse moléculaire à l'aide du graphique précédent.

EXERCICE N°2

On veut déterminer la masse moléculaire (MM) d'une protéine P par chromatographie d'exclusion. La limite d'exclusion du gel se situe entre 40000 et 400000 de MM.
L'étalonnage du gel se fait par diverses substances, dont les MM (exprimées en daltons) et les volumes d'élution (Ve, exprimé en ml) sont indiqués dans le tableau suivant :

Protéines	MM	Ve (ml)
Dextran	**2000000**	**45**
Fibrinogène	**340000**	**60**
Catalase	**230000**	**75**
Lactoglobuline	**19000**	**132**

1- **Porter le log de MM en fonction de Ve. Que remarquez-vous ?**
2- **La protéine P montre un volume d'élution Ve=113ml. Déterminer sa MM.**

EXERCICE N°3

On veut séparer un mélange de protéines suivant : Thyroglobuline (669KDa), Ferritine (440KDa), Catalase (232KDa), lactase déshydrogénase (140KDa) et l'albumine (66KDa) par une chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de séphadex.
Le profil d'élution est tracé après mesure d'absorbance à 280nm des fractions éluées. Le volume d'élution Ve de chaque protéine de référence a été déterminé. Le bleu Dextrane (2.10^6Da) permet de déterminer le volume mort Vo du gel.

1- **Tracer la droite de calibration : Ve/Vo=f (log PM). Que remarquez-vous ?**
2- **Calculer PM d'une protéine. Si son Ve=33ml**

V_e (volume d'élution) = d (débit) x tr (temps de rétention)