



Ce document a été mis en ligne par l'organisme [FormaV®](#)

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :

www.formav.co/explorer

CORRIGE

Ces éléments de correction n'ont qu'une valeur indicative. Ils ne peuvent en aucun cas engager la responsabilité des autorités académiques, chaque jury est souverain.

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIES

BIOCHIMIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE
DES PROTEINES

SESSION 2012

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
COEFFICIENT : 1

CORRIGE

Ce corrigé comporte 5 pages numérotées de 1/5 à 5/5.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2012
Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	BOE3BP bis	Page : 1/5

Caractérisation et purification de l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger*

N°	Réponse	Points
1.	Généralités de l'époxyde hydrolase d'<i>Aspergillus niger</i>	12 points
1.1.	C'est une hydrolase donc classe 3.	1 point
1.2.	<p>Le site actif d'un enzyme est la région qui lie les substrats et qui contient les résidus ou groupes catalytiques qui participent directement à la formation ou au clivage des liaisons.</p> <p>Les aminoacids qui participent à ce site actifs sont : Asp 192, Tyr 251, Tyr314, Asp 348, His 374.</p> <p>Les groupes hydroxyls des Tyr 251 et 314 permettent la liaison et le positionnement du substrat dans le site actif de l'enzyme par liaison H. Le groupement carboxylique de Asp 192 permet l'attaque nucléophile. Les chaînes latérales d'His 374 et Asp 348 permettent d'activer une molécule d'eau.</p>	<p>1 point</p> <p>0,5 point</p> <p>1,5 point</p>
1.3.	<p>Deux rôles attendus parmi :</p> <ul style="list-style-type: none"> • réguler l'activité des protéines • les "étiqueter" afin qu'elles soient reconnues par d'autres molécules ou par des systèmes de dégradation • les ancrer dans une membrane • les intégrer à une cascade de signalisation • les "adresser" à un compartiment cellulaire • définir une identité immunologique (groupes sanguins) 	2 points
1.4.	Lieu : RER et appareil de golgi	0,5 point
1.5.	<p>1 : Hélice α</p> <p>2 : Feuillet β</p> <p>3 : Coude β</p> <p>Préciser le niveau d'organisation de ces éléments structuraux ainsi que les liaisons mises en jeu.</p> <p>Structure secondaire. Liaisons H entre les CO et NH des liaisons peptidiques.</p>	3 points
1.6.	<p>Dégradation cyclique récurrente à partir du NH_2 terminal puis séparation et identification des PTH-AA par chromatographie en phase inverse.</p>	1,5 point
1.7.	Dans les conditions testées, détermination du pH optimum : pH=7 et de la température optimale = 40°C.	1 point

2.	Préparation d'extrait soluble brut	8 points																				
2.1.	<p>Ce sont les seuils de coupure des deux techniques qui diffèrent.</p> <p>La microfiltration permet de retenir les cellules intactes et les débris cellulaires et permet la séparation de particules de l'ordre du micromètre. (Pores de 0,1 à 8 µm de diamètre).</p> <p>L'ultrafiltration permet la séparation, la concentration de macro-molécules, le dessalage de solutions. Diamètre des pores plus petits (de 5 à 35 nm voire 100 nm).</p>	2 points																				
2.2.	<p>Dosage des protéines par la méthode de Folin-Lowry</p> <p>[protéines] fraction soluble = m/V = 2000/1000 = 2 mg/mL</p> <p>Pour avoir m = 200 µg soit 0,2 mg il faut un volume V = m/C = 0,2/2 = 0,1mL soit 100 µL donc inférieur au volume maximal de 0,4 mL. Il n'est donc pas nécessaire d'effectuer une dilution.</p>	2 points																				
2.3.	<div>$AS = \frac{\text{Cat conc}}{[\text{protéine}]} = \frac{AT}{\text{masse protéine}}$<p>exemple de calcul : AS fraction soluble=6.0 / (2000/1000) =3</p><p>Avec</p><p>AS : Activité Spécifique en U/mg</p><p>Cat conc : concentration catalytique U/mL</p><p>[protéine] : concentration en protéines en mg/mL</p><p>Masse protéine en mg</p></div> <table><tr><th>Etapes</th><th>Volume récupéré en mL</th><th>concentration catalytique en U/mL</th><th>Protéines totales en mg</th><th>Activité spécifique en U/mg</th></tr><tr><td>Fraction soluble</td><td>1000</td><td>6,0</td><td>2000</td><td>3,0</td></tr><tr><td>Microfiltration</td><td>4000</td><td>1,6</td><td>1000</td><td>6,4</td></tr><tr><td>Ultrafiltration</td><td>380</td><td>15,0</td><td>380</td><td>15,0</td></tr></table>	Etapes	Volume récupéré en mL	concentration catalytique en U/mL	Protéines totales en mg	Activité spécifique en U/mg	Fraction soluble	1000	6,0	2000	3,0	Microfiltration	4000	1,6	1000	6,4	Ultrafiltration	380	15,0	380	15,0	2,5 points
Etapes	Volume récupéré en mL	concentration catalytique en U/mL	Protéines totales en mg	Activité spécifique en U/mg																		
Fraction soluble	1000	6,0	2000	3,0																		
Microfiltration	4000	1,6	1000	6,4																		
Ultrafiltration	380	15,0	380	15,0																		
2.4.	<p>Taux de purification ou d'enrichissement global :</p> <div>$T_n = \frac{AS_n}{AS_0}$<p>avec AS_n l'activité spécifique après l'ultrafiltration et AS₀ l'activité spécifique de départ</p><p>T = 15.0 / 3.0 = 5</p></div>	1,5 point																				

3.	Purification de l'époxyde hydrolase d'<i>A. niger</i>	18 points
3.1.	Ce sont des échangeurs d'anions car les groupements fixés sur la colonne ont une charge positive	1 point
3.2.	<p>A l'équilibre :</p> <div data-bbox="638 537 1037 828"> <p>Sépharose</p> $\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{---O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^{\text{---}}\text{-H(CH}_2\text{-CH}_3\text{)}_2 \\ \text{---O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^{\text{---}}\text{-H(CH}_2\text{-CH}_3\text{)}_2 \\ \text{---O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^{\text{---}}\text{-H(CH}_2\text{-CH}_3\text{)}_2 \end{array}$ <p style="text-align: right;">Liaisons ioniques</p> $\downarrow \text{Cl}^-$ $\uparrow \text{Cl}^-$ <p style="text-align: right;">Contre ion</p> </div> <p>Injection de l'extrait soluble : Les protéines chargées négativement sont retenues par la colonne. Les autres sont éluées.</p> <div data-bbox="622 940 1085 1299"> <p>Sépharose</p> $\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{---O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^{\text{---}}\text{-H(CH}_2\text{-CH}_3\text{)}_2 \xrightarrow{\text{protéines}^-} \text{Cl}^- \\ \text{---O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^{\text{---}}\text{-H(CH}_2\text{-CH}_3\text{)}_2 \xrightarrow{\text{protéines}^-} \text{Cl}^- \end{array}$ <p style="text-align: right;">Molécules non retenues : protéines chargées - ou neutres (pH de travail < pHi)</p> </div> <p>Elution des protéines retenues : Gradient croissant de force ionique. Compétition entre les Cl^- et les protéines chargées</p> <div data-bbox="255 1388 718 1769"> <p>Sépharose</p> $\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{---O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^{\text{---}}\text{-H(CH}_2\text{-CH}_3\text{)}_2 \xrightarrow{\text{Cl}^-} \text{protéines}^- \\ \text{---O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^{\text{---}}\text{-H(CH}_2\text{-CH}_3\text{)}_2 \xrightarrow{\text{Cl}^-} \text{protéines}^- \end{array}$ <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Elution des protéines chargées négativement comme l'époxyde hydrolase</p> </div>	<p>1 point</p> <p>2 points</p> <p>2 points</p>
3.3.	Gradient continu ou linéaire de concentration en contre ion Cl^- .	1 point
3.4.	La présence d'un pic d'activité époxyde hydrolase montre qu'elle est récupérée dans les fractions 60 à 75. L'époxyde hydrolase est éluée pour une concentration en KCl entre 0,22 et 0,26 mol/L	2 points

