

## Détermination de la structure primaire

Les agents dissociants permettent de séparer les sous unités des protéines

Pour séparer les différentes chaînes il existe des composés chimiques tel que le béta mercapto-éthanol

Afin de couper la chaîne polypeptidique en fragments il existe des protéases spécifiques

### Pour couper les chaînes polypeptidiques :

- Au niveau chimique : le bromure de cyanogène qui coupera après les méthionines
- Au niveau enzymatique :
  - o La trypsin qui coupe après les lysines ainsi que les arginines
  - o La chimotrypsine qui elle coupe après les acides aminés aromatiques (thyrosine, tryptophane et phénylalanine)

### Afin de déterminer les acides aminés N et C terminaux :

- Pour le C terminal (A DROITE !!) : Les carboxypeptidases (DCFB par exemple)
- Pour le N terminal (A GAUCHE !!!) :
  - o De nature enzymatique : l'aminopeptidase
  - o De nature chimique :
    - Le dinitrofluorobenzène (côté N terminal toujours)  DNP-AA
    - Le chlorure de Dansyl
    - Le phénylisothiocanate

### Afin de séparer les protéines :

- Les électrophorèses : fondé sur le déplacement d'ions sous l'effet d'un champ électrique. Les ions auront des vitesses de migration différentes ce qui va faire qu'elles se séparent les uns des autres. Les Molécules anioniques (chargés négativement) migrent vers l'anode (positive) et les molécules cationiques, elles, migrent vers la cathode (chargé négativement).
  - o Dénaturantes : La SDS page est une combinaison permettant de séparer les molécules leur poids moléculaire, les pores peuvent être contrôlées. Le SDS se fixe sur les protéines et leur donne donc une charge négative, cela permet de faire une séparation qu'en fonction de leur poids moléculaire, la migration est faite grâce à un courant mais la séparation n'est faite qu'à partir de leur poids moléculaire. Les molécules avec un petit poids moléculaire migreront plus loin que les grosses.
  - o Natives : Ici les molécules sont séparées ET/ OU en fonction de leur poids moléculaires mais aussi en fonction de leur charge lorsqu'elles sont repliées  Isoélectrofocalisation (IEF) : séparation qu'en fonction de la charge
  - o La séparation par SDS-page et par IEF permet la combinaison des deux

### Les chromatographies :

- o Sur colonne : Alors la colonne est chargée soit positivement soit négativement (alors cations qui s'y fixent) puis pour élution on augmente le pH petit à petit ce qui va faire devenir les acides aminés fixés sur la colonne de plus en plus neutre donc ceux qui atteignent la neutralité vont tomber et être élué
- o Sur papier et en couches minces : les protéines sont déposées sur un support et un solvant les traînent plus ou moins loin
- o Liquides hautes performances :
  - Échange d'ions : On met des molécules sur un gel et ensuite on ajoute un sel ou on modifie le pH afin de faire éluer les molécules
  - Gel filtration : On met des billes gonflées dans un solvant utilisé pour l'élution : les molécules dont le volume est supérieur à celui des billes ne peuvent y pénétrer et sont donc éluées, rapidement, pour les autres elles sont freinées et ainsi retardées