

# Séquençage des protéines

= détermination de l'ordre des acides aminés dans une chaîne polypeptidique

## ETAPE 1 : Coupure des liaisons disulfures

- **Réduction** : Cyanure de potassium (KCN), Dithiothréitol (DTT),  $\beta$ -mercaptoéthanol, urée à forte concentration
- **Oxydation** : Acide performique

## ETAPE 2 : Détermination de la composition (fréquence) des AA de chaque chaîne

- **Coupure** :
  - Hydrolyse acide (HCl 6N, 110°C, 24-48h) :
    - ✓ Gln et Glu  $\rightarrow$  Glx
    - ✓ Asn et Asp  $\rightarrow$  Asx
    - ✓ Cys  $\rightarrow$  acide cystéique
    - ✓ Trp  $\rightarrow$  détruit
  - Hydrolyse acide ménagée (Acide formique) : uniquement pour les liaisons Asp-Pro
  - Hydrolyse basique (NaOH 6M, 100°C, 4-8h) : uniquement pour déterminer la teneur en Trp
- **Séparation** : HPLC, CCM, chromatographie échangeuse d'ions, électrophorèse
- **Dosage** : UV, fluorimétrie, colorimétrie

## ETAPE 3 : Détermination de l'enchaînement des acides aminés

<b>Coupures des extrémités</b> <i>Inefficaces si le peptide est circulaire ou si la proline est en N-ter.</i>		
<u>Coupures chimiques</u>	<b>Méthode de Sanger (DNFB)</b>	1. Fixation du DNFB 2. Hydrolyse acide 3. Identification du DNP-AA
	<b>Chlorure de Dabsyl ou de Dansyle</b>	1. Fixation du chlorure 2. Hydrolyse acide 3. Identification de l'AA marqué
	<b>Méthode d'Edman (PITC)</b>	1. Couplage 2. Coupure 3. Conversion 4. Identification du PTH-AA

<u>Coupures enzymatiques (exopeptidases)</u>	<b>Aminopeptidases</b>	Utilité limitée
	<b>Carboxypeptidases</b>	- A : inactive sur Pro, Arg, Lys - B : active uniquement sur Arg et Lys <u>sauf</u> si Pro est l'avant dernier AA - C et D : actives sur tous les AA
<b>Coupures spécifiques</b>		
<u>Coupures chimiques</u>	<b>Bromure de cyanogène</b>	Coupe après Met
	<b>O-iodobenzoate</b>	Coupe après Trp
	<b>Hydroxylamine</b>	Coupe la liaison Asn-Gly
	<b>2-nitro-5-thiocyanobenzoate</b>	Coupe avant Cys
<u>Coupures enzymatiques (endopeptidases)</u>	<b>Trypsine</b>	Coupe après Arg et Lys
	<b>Chymotrypsine</b>	Coupe après les AA aromatiques
	<b>Clostripaïne</b>	Coupe après Arg
	<b>Thrombine</b>	Coupe après Arg
	<b>Endoprotéase V8</b>	Coupe après Glu

#### ETAPE 4 : Détermination de la structure de la protéine