

## Initiation à la chromatographie d'échange d'ions appliquée à la séparation de protéines

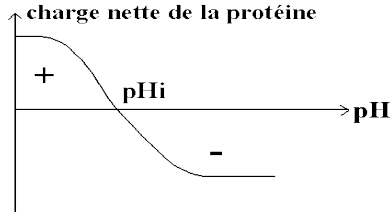
On se propose de séparer un mélange artificiel de 3 protéines du blanc d'œuf de poule (ovalbumine, OVA, lysozyme, Lyso et conalbumine, conA) par chromatographies d'échange d'ions afin d'analyser les effets de la nature de l'échangeur d'ions et du mode d'éluion.

### 1. Questions préalables

**Question 1.** A l'aide de « diagrammes de formes prédominantes », prévoir les profils d'éluion sur échangeur d'anions à pH 8 et échangeur de cations à pH 5,5 d'un mélange OVA, Lyso et conA.

**Question 2.** On souhaite obtenir des chromatogrammes où les pics d'éluion à 280 nm soient sensiblement de la même surface. On dispose de solutions d'OVA, Lyso et conA à 1 mg/mL en tampon d'équilibrion pH 5,5 et en tampon d'équilibrion pH 8. Proposer les proportions d'un mélange adapté.

Données :

Protéine	Lysozyme	Ovotransferrine = Conalbumine	Ovalbumine	On rappelle le profil d'évolution de la charge nette globale d'une protéine en fonction du pH. 
MM	14,3 kDa	82 kDa	46 kDa	
pH <sub>i</sub>	11,3	6,5	4,6	
ε <sub>280 nm</sub>	2,64 Lg <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	1,16 Lg <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	0,69 Lg <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	

### 2. Travail pratique : résolution du mélange OVA/Lyso/ConA par chromatographie d'échange d'ions

Il s'agit de mettre au point une éluion en gradient de force ionique et/ou une éluion par paliers de forces ioniques croissantes permettant la sortie successive des 3 protéines avec une résolution complète. Différentes phases stationnaires sont disponibles. Le document annexe "chromatographie d'échange d'ions et éluion en gradient de force ionique" rappelle quelques points techniques fondamentaux.

#### 2.1. Matériel et réactifs

- Équipements chromatographiques de la série AKTA®, Amersham Biosciences, à l'échelle laboratoire.
- Kit de colonnes d'échange d'ions Amersham Biosciences IEX selection kit 17-6002-33. Documentation technique à consulter :

Property	SP Sepharose Fast Flow	CM Sepharose Fast Flow	Q Sepharose Fast Flow	DEAE Sepharose Fast Flow
Matrix	6% highly cross-linked agarose	6% highly cross-linked agarose	6% highly cross-linked agarose	6% highly cross-linked agarose
Mean particle size	45–165 μm	45–165 μm	45–165 μm	45–165 μm
Charged group	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-O-CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	-N+(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-N+(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> H <sup>+</sup>
Total ionic capacity	.18–0.25 mmol H+/ml medium	0.09–0.13 mmol H+/ml medium	0.18–0.25 mmol Cl <sup>-</sup> /ml medium	0.11–0.16 mmol Cl <sup>-</sup> /ml medium
Dynamic binding capacity <sub>1</sub>	70 mg ribonuclease A/ml medium	50 mg ribonuclease A/ml medium	120 mg HSA/ml medium	110 mg HSA/ml medium
pH stability:				
Short term	3–14	2–14	1–14	1–14
Long term	4–13	4–13	2–12	2–12
Storage temperature	4°C to 30°C	4°C to 30°C	4°C to 30°C	4°C to 30°C
Storage buffer	supplied in 0.2 M sodium acetate in 20% ethanol	supplied in 20% ethanol	supplied in 20% ethanol	supplied in 20% ethanol
Chemical stability	All commonly used buffers, 1 M NaOH, 8 M urea, 6 M guanidine hydrochloride, and 70% ethanol Avoid Oxidizing agents, cationic detergents, and buffers			

[https://www.genomiphi.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/E12BFF121D0F1173C1256EB40044AC6E/\\$file/18117722AA.pdf](https://www.genomiphi.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/E12BFF121D0F1173C1256EB40044AC6E/$file/18117722AA.pdf)

<https://www.genomiphi.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&parentid=553&moduleid=164320&zone=Labsep>

• Solutions pour phases mobiles pour les chromatographies sur échangeur d'anions (filtrées sur filtre 0,45  $\mu\text{m}$ ) :

✓ tampon d'équilibration Tris-HCl 50 mM, pH 8,0

✓ tampon d'élution à force d'élution élevée (par force ionique élevée) Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 + NaCl 1M

• Solutions pour phases mobiles pour les chromatographies sur échangeur de cations (filtrées sur filtre 0,45  $\mu\text{m}$ ) :

✓ tampon d'équilibration NaOAc (acide acétique/acétate de sodium) 50 mM pH5,5

✓ tampon d'élution à force d'élution élevée (par force ionique élevée) NaOAc 50 mM pH5,5 + NaCl 1 M

• Solutions OVA, Lyso et conA à 1 mg/mL chacune et en tampon d'équilibration pH 5,5 et en tampon d'équilibration pH 8 (donc 6 solutions au total). Deux mélanges sont à réaliser en fonction de la réponse à la question 2 du paragraphe 1. Les mêmes mélanges, mais hypersalés par l'ajout (par pesée) de NaCl à 1 mol/L final pourront aussi, en plus, être réalisés afin de mettre en évidence « l'interférence » par effet de force ionique de départ déséquilibrée.

### **3. Manipulations**

#### **3.1.1. Pilotage informatique du chromatographe**

Utiliser le document « données concernant l'utilisation des appareils Akta-explorer et Akta-purifier et leur logiciel de pilotage.

#### **3.1.2. Première séparation, gradient « large »**

Choisir un mélange à injecter (en tampon d'équilibration pH8 ou pH5,5) et une colonne. Mettre en œuvre un gradient large : de 0 à 0,5M en NaCl, en 20 volumes de colonne.

#### **3.1.3.3 Autres séparations, optimisation, études particulières**

Optimiser le gradient puis proposer un mode opératoire par paliers et le mettre en œuvre.

Tester éventuellement la résolution du mélange hypersalé par l'ajout de NaCl.

#### **3.1.4. Compte-rendu**

Schéma de structure de l'installation chromatographique utilisée.

Chromatogrammes obtenus annotés.

Analyse commentée des résultats obtenus sous la forme de quelques lignes annexées à chaque chromatogramme obtenu.

### **4. Remerciements, bibliographie**

- Remerciements à Xavier Santarelli qui a proposé cette série de manipulations pour les élèves de STS Biotechnologies dans le cadre de la convention ESTBB/Lycée St-Louis Bordeaux

- Yost, Ettre, Conlon, traduction de Vaumoron, « pratique de la chromatographie liquide », Tec & Doc, 1981

- Documentation technique Amersham Biosciences :

[https://www.genomiphi.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/E12BFF121D0F1173C1256EB40044AC6E/\\$file/18117722AA.pdf](https://www.genomiphi.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/E12BFF121D0F1173C1256EB40044AC6E/$file/18117722AA.pdf)

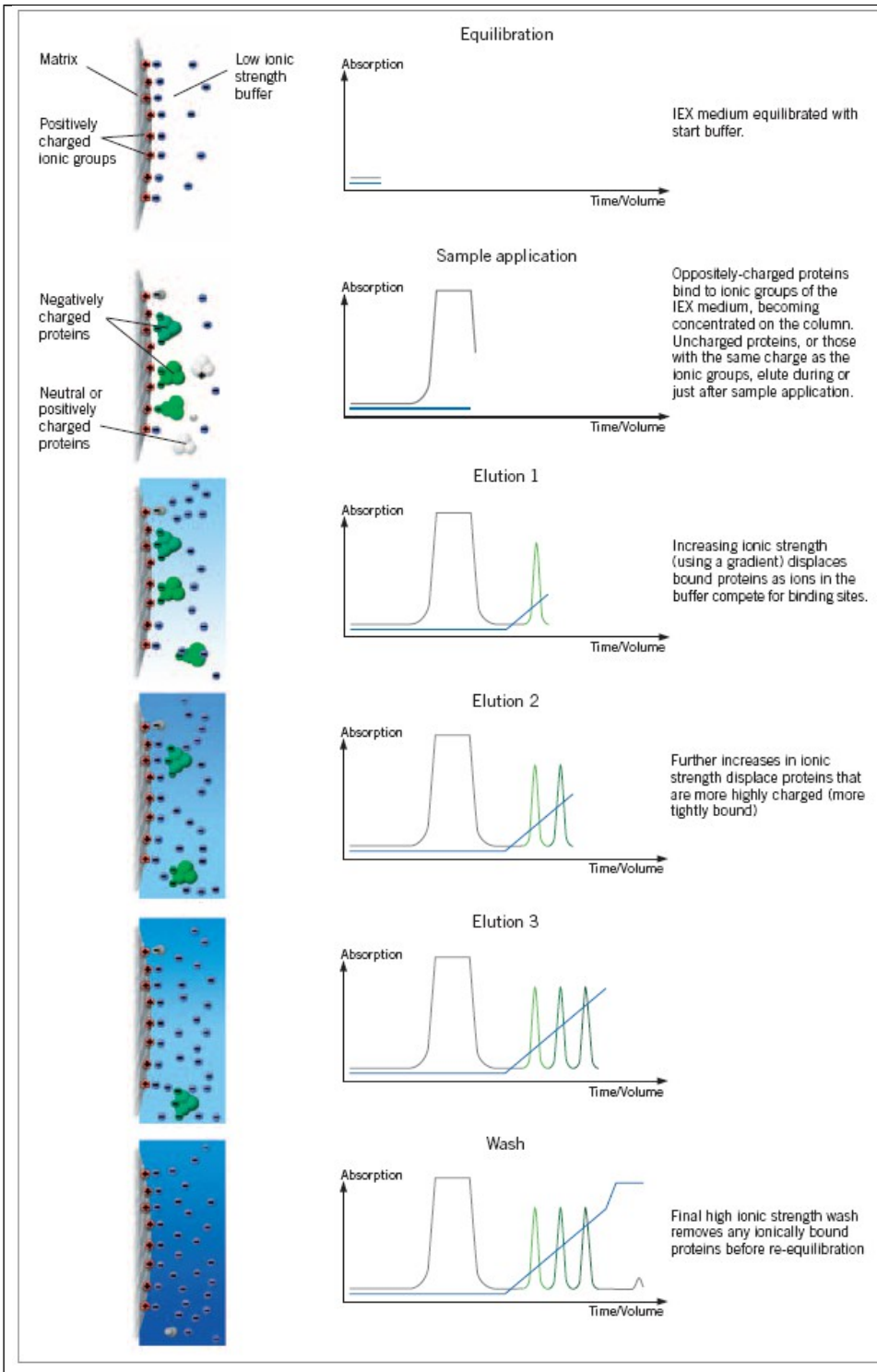
et

<https://www.genomiphi.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&parentid=553&moduleid=164320&zone=Labsep>

Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing Principles and Methods

Protein Purification Handbook

**Document annexe**



La phase stationnaire est un échangeur d'ions : elle est constituée d'un support solide portant des charges excédentaires positives ou négatives. Ces charges sont équilibrées par des ions qui s'équilibrent avec les ions de la phase mobile. On les appelle ions compensateurs. Les ions compensateurs peuvent être échangés par des molécules d'échantillon introduites dans la phase mobile. La conservation de la neutralité électrique implique que les molécules d'échantillon qui échangent possèdent une quantité de charge totale identique à celle des ions compensateurs qu'elles déplacent.

Les molécules neutres et non chargées sont non retenues et éluées en premier : Flow-Through

L'éluion des protéines retenues ne doit commencer que lorsque que le signal d'absorbance est revenu au niveau basal.

Le gradient de force ionique permet de décrocher les protéines en fonction du nombre de liaisons ioniques mises en jeu avec le support donc en fonction du nombre de groupements de charge opposée à celle de la phase stationnaire, dépendant du pI et du pH de la phase mobile.

En fin de chromatographie, on réalise un palier avec une phase mobile de force ionique très élevée pour décrocher d'éventuelles protéines encore retenues.

Le support est alors prêt pour la chromatographie suivante, commençant par une équilibration.