

## Initiation à la chromatographie sur gel d'exclusion-diffusion

### A. Dessalage d'une solution protéique par chromatographie d'exclusion-diffusion

#### Objectif :

Élimination du sulfate d'ammonium d'une solution d'albumine préparée par relargage d'un pool de sérum bovin.

#### Technique globale et matériel :

Phase stationnaire : gel de marque Sephadex type G25, granulométrie « coarse » ou « medium », domaine de perméabilité sélective de 1000 à 5000 Daltons pour des protéines globulaires.

Colonne de 5 à 8 cm de hauteur à mesurer exactement et de diamètre interne à mesurer également.

Collecteur de fractions réglé en comptage de gouttes et permettant de recueillir des fractions d'environ 0,5 mL. Lors des réglages de débit de colonne, il conviendra d'évaluer le volume d'une goutte en comptant le nombre de gouttes nécessaires pour obtenir un volume de x mL dans un récipient jaugé.

#### Quantification de l'albumine éluée par dosage selon la méthode du biuret

Analyse de l'élution par micro dosage en méthode du biuret en plaque 96 puits.

Étalon sérumalbumine bovine (SAB) à 5 mg/mL. Lectures à 540 nm.

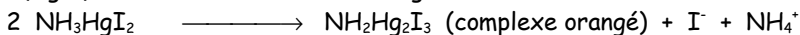
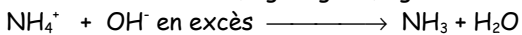
Gamme d'étalonnage (à réaliser en triplicata) :

	TR	1	2	3	4	5
SAB 5 mg/mL μL	0	5	10	20	40	50
NaCl 9g/L en μL	50	45	40	30	10	0
Réactif de Gornall en μL	200	200	200	200	200	200
	Révélation 30 minutes à l'obscurité. Lecture à 540 nm contre le témoin réactif (TR). En triplicata.					
Quantité de protéines dans la cupule en μg	0	50	100	200	400	500
Absorbances contre le TR						

Essais dans le cadre de la manipulation de dessalage proposée : 50 μL de prise d'essai (en triplicata).

#### Mode opératoire pour la mise en évidence de l'élution de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> par le réactif de Nessler

Le réactif de Nessler signe la présence de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> avec une excellente détectabilité. La composition du réactif de Nessler est la suivante : KI 3,5 g ; HgI<sub>2</sub> 1,3 g ; H<sub>2</sub>O 70 mL, NaOH 30% 30 mL.



Lors de la réaction de Nessler, la formation du complexe orangé n'est pas instantanée et il est d'abord en solution colloïdale puis floccule. Les dosages spectrophotométriques sont possibles à condition de réaliser les mesures lorsque l'état est colloïdal et pour une durée de réaction bien déterminée (par exemple 10 minutes).

Protocole quantitatif:	Protocole qualitatif
- qsp 50 μL d'échantillon ou d'étalon contenant de 0,1 à 0,5 μmol de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - 2 mL d'eau puis 500 μL de réactif de Nessler	- 4 volumes de solution à tester (par exemple 100 μL) - 1 volume de réactif de Nessler (par exemple 25 μL)
Lire à 430 nm contre de l'eau distillée après une durée d'incubation comprise entre 10 et 15 minutes. Durant cet intervalle de temps les « absorbances » n'augmentent pas de plus de 8%. Prévoir un témoin réactif.	Attendre quelques minutes

## Données pour la mise en place du système chromatographique et l'élution :

Le gel G25 est fourni gonflé en eau+NaCl 9 g/L, dégazé sous vide. La colonne utilisée est remplie à 1/3 d'eau+NaCl 9 g/L. Le gel, en suspension est versé le long d'un fin tube de verre, selon un débit doux, régulier, le robinet d'élution étant très légèrement ouvert. Le gel sédimente, il est recouvert d'une couche d'eau. La colonne est alors fermée et le piston de réglage de hauteur de gel est réglé au contact du gel légèrement tassé. Il faut absolument constituer une « veine liquide » dépourvue de toute bulle d'air. On peut alors mettre en place le réservoir de solution éluante, mettre en place le collecteur de fractions, mesurer le volume d'une goutte éluee et régler la pression en tête de colonne pour un débit de 1 mL pour 4 minutes. Un réglage de « piston » de colonne est parfois nécessaire si le gel tend à se tasser un peu lors des premières éluions.

On dispose d'une préparation de sérumbumine bovine SAB obtenue par relargage au sulfate d'ammonium puis diluée. On donne l'ordre de grandeur des concentrations : [protéines totales (SAB)] = 5 g/L et  $[(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4^{2-}] = 50 \text{ g/L}$  (soit environ 0,76 mol/L de  $\text{NH}_4^+$  puisque masse molaire = 132,14 g/mol et 2  $\text{NH}_4^+$  pour 1  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

- Mesurer la concentration de départ en protéines sur une dilution convenable ;
- Injecter 0,8 mL de préparation en tête de colonne ;
- Recueillir des fractions de 400 à 500  $\mu\text{L}$  ;
- Chaque fraction recueillie est analysée pour son contenu en protéines et en sulfate d'ammonium.

### Compte rendu

- Schématiser la préparation de la colonne et le montage final sous forme d'une suite logique de 3 ou 4 dessins légendés.
- Établir l'histogramme d'élution : histogramme quantitatif pour l'albumine, résultats qualitatifs pour le sulfate d'ammonium sous forme de symboles du type -,+,++,+++ ou quantitatif ...
- En préliminaire à la construction de l'histogramme, rédiger un paragraphe présentant le mode opératoire exact de dosage de l'albumine éluee (micro dosage selon la méthode du biuret en plaque 96 puits) et donnant les résultats expérimentaux obtenus.
- Évaluer le % de récupération de l'albumine.

## B. Chromatographie d'exclusion-diffusion et détermination de masse moléculaire d'une protéine globulaire

### Objectif

Il s'agit d'étalonner un montage de chromatographie d'exclusion diffusion.

A disposition colonne conditionnée avec du gel de marque sephacryl-S-200HR de domaine de fractionnement 5000-250 000Da pour les protéines globulaires). Le système de chromatographie comprend une pompe, une vanne d'injection (boucle de 1 mL) et un détecteur en ligne, absorbance U.V. Visible.

A disposition bleu de dextran exclu ( $10^6$  Da), béta-galactosidase d'*Aspergillus niger* forme glycosylée (123 kDa), serumbumine bovine (69,3 kDa), his<sub>6</sub>-eGFP (29,11 kDa), lysozyme (14,6 kDa)

### Compte-rendu

- Caractéristiques du gel utilisé, géométrie de la colonne, calcul du volume total  $V_t$  ;
- schéma du montage mis en œuvre ;
- description des solutions injectées, volumes injectées ;
- débit d'élution ;
- chromatogrammes obtenus ;
- discussion des chromatogrammes ;
- tracé de la fonction  $\text{Ln}(\text{masse moléculaire}) = \text{volume d'élution puis } \text{Ln}(\text{masse moléculaire}) = f(K_{av})$  ;  $K_{av}$  : coefficient dit « available ».

Soient  $V_0$  le volume hors billes de gel,  $V_i$  le volume dans les billes de gel,  $K_D$  le coefficient de distribution d'une protéine P dans  $V_i$  et  $V_e$  son volume d'élution.  $K_D$  caractérise le comportement de la protéine et est compris entre 0 (exclusion) et 1 (diffusion parfaite dans l'espace interne des billes).

$$V_e = V_0 + K_D V_i \text{ soit } K_D = \frac{V_e - V_0}{V_i}$$

On rappelle que pour une protéine globulaire « idéale » de masse moléculaire M,  $K_D$  est une fonction affine de  $\text{Ln}(M)$

$$V_i \text{ étant très difficile à déterminer, on préfère le coefficient } K_{av} : K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} . K_{av} \text{ est proportionnel à } K_D \text{ pour un gel « non tassé » car } V_i \cdot V_0 (V_t - V_0)$$

$V_0$  : volume interne aux billes + volume de matrice) et  $V_i$  sont proportionnels.