

MANIPULATION N° 2

Chromatographie par filtration sur gel

Etalonnage de la colonne

Détermination de la masse molaire apparente d'une protéine

La chromatographie par filtration sur gel dite aussi chromatographie d'exclusion - diffusion, est une technique qui permet une séparation simple et rapide des molécules solubles dans l'eau ou certains solvants organiques, en fonction de leur taille, donc de leur masse molaire. La forme de la molécule intervient également, comme on peut le constater dans le tableau de la page suivante, c'est pourquoi on parle de masse molaire apparente.

Cette technique est particulièrement utilisée pour le fractionnement des mélanges d'origine biologique qui sont souvent très sensibles à la dénaturation.

1 - CARACTERISTIQUES DE LA CHROMATOGRAPHIE.

Un gel est constitué par un empilement de grains poreux. Le grain est formé par l'enchevêtrement de macromolécules linéaires reliées entre elles par voie chimique de façon à former un réseau à trois dimensions aux mailles plus ou moins serrées selon le degré de réticulation.

De nombreux gels sont maintenant disponibles, les gels de dextrans (SEPHADEX), les gels de polyacrylamide, les gels d'agarose... ils sont choisis en fonction des contraintes expérimentales. Les dextrans sont des polysaccharides linéaires, d'origine bactérienne, constitués par des unités glucose liées entre elles par les carbones en position 1 et 6. Le réseau est obtenu en réticulant les chaînes par la création de "ponts" glycéryl. Les gels de polyacrylamide sont le résultat de la copolymérisation de l'acrylamide et du méthylène bis acrylamide. L'agarose, une galactane formée par l'alternance de restes α -D-galactose et de restes 3,6 anhydro- α -L-galactose, est purifiée à partir de l'agar qui est un mélange de polysaccharides produit par certaines algues rouges (Rhodophyta).

A l'état sec, le gel se présente sous forme de petites perles fines ; après gonflement, chaque perle donne naissance à un grain. L'empilement dans une colonne constitue le gel proprement dit.

Chaque gel est caractérisé par un domaine de fractionnement qui est fonction de la grosseur des mailles du réseau et donc de la réticulation. Au-dessus d'un poids moléculaire donné appelé "limite d'exclusion", toutes les molécules sont traitées par le gel de la même façon, il n'y a plus chromatographie.

Exemples :

| Marque | Gel | domaine de fractionnement en poids moléculaire | |
|-----------|--------|---|---|
| | | pour des protéines ou des molécules sensiblement sphériques | pour des molécules en forme de bâtonnet |
| SEPHADEX | G 25 | 1.000 - 5.000 | 100 - 5.000 |
| BIORAD | P 10 | 1.500 - 20.000 | 500 - 10.000 |
| SEPHADEX | G 75 | 5.000 - 70.000 | 1.000 - 50.000 |
| PHARMACIA | AcA 34 | 20.000 - 350.000 | — |

La limite d'exclusion est indiquée par le chiffre le plus élevé du domaine de fractionnement : elle varie pour un gel donné avec la forme de la molécule étudiée.

2 - MECANISME DE LA CHROMATOGRAPHIE.

L'empilement des grains agit comme un "tamis", aux grosseurs de mailles variées, pour les molécules à séparer :

Pendant l'éluion d'un mélange donné, toute les molécules de dimensions supérieures aux dimensions des plus gros pores des grains de gel le traversent en passant autour des grains et quittent la colonne après un trajet relativement court. Leur masse molaire apparente est supérieure à la limite d'exclusion, elles sont "exclues".

Les molécules plus petites diffusent à l'extérieur et à l'intérieur des pores des grains et d'autant mieux qu'elles sont plus petites. Le trajet à parcourir est plus long et ces molécules sortent de la colonne dans l'ordre des masses molaires apparentes décroissantes.

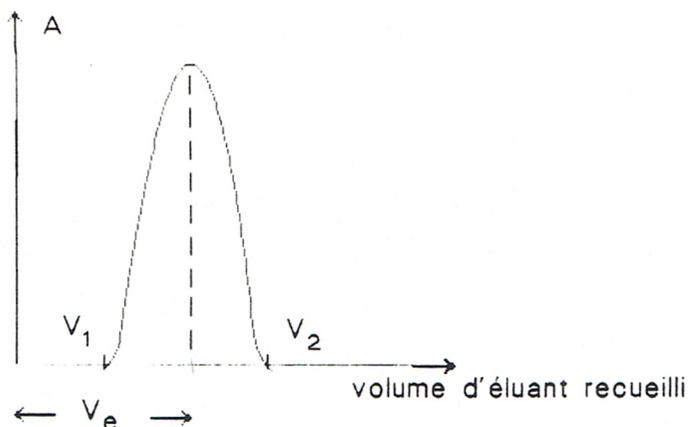
Remarques :

- a) En raison de ce mécanisme de fractionnement, il est fondamental que la colonne de gel ne présente ni hétérogénéité, ni fissure. C'est pourquoi il est aussi indispensable que la surface en haut de colonne soit toujours recouverte de liquide.
- b) Les gels de dextrane de marque SEPHADEX contiennent toujours un petit nombre de groupements carboxyles libres ; il se produit des interactions entre les groupements ionisés (s'il en existe) des molécules étudiées et les grains du gel, ce qui ralentit migration.
- c) Les molécules à structure aromatique sont fortement retardées, le mécanisme de la chromatographie est compliqué par des adsorptions parasites.

3 - PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE.

Le comportement d'une molécule lors de son passage sur gel, peut être caractérisé par son volume d'éluion V_e ; c'est le volume d'éluant qui est recueilli entre l'introduction de l'échantillon sur la colonne et son apparition dans l'effluent. V_e est donc le volume d'éluant qui a transporté la molécule du haut en bas de la colonne, le profil d'éluion (courbe ci-dessous) est généralement symétrique par rapport à son axe.

$$V_e = \frac{V_1 + V_2}{2}$$



Au cours de la chromatographie, une molécule dispose, pour sa migration, de l'espace compris entre les grains et, selon sa masse molaire apparente, d'une partie des canaux des grains : ceux dont les dimensions sont supérieures à ses propres dimensions.

Ce que l'on peut traduire par la réaction :

$$V_e = V_o + K_d V_i$$

avec V_e : volume d'éluion

V_o : volume de liquide entre les grains, encore appelé "volume vide" ou "volume mort"

V_i : volume disponible à l'intérieur des grains

K_d : coefficient de partage

En effet, le phénomène se ramène à un partage des molécules considérées entre une phase fixe à l'intérieur des grains et une phase mobile à l'extérieur. La filtration sur gel peut être assimilée à une chromatographie de partage.

D'autre part, on a : $V_t = V_o + V_i + V_g$

avec V_t : volume total de la colonne de verre vide

V_g : volume du gel sec

on en tire :

$$V_i = V_t - V_o - V_g$$

d'où :

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o - V_g}$$

Vg est peu différent de zéro pour les gels gonflant beaucoup.

$$K_d \approx \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

On donne souvent la valeur de K_d pour caractériser un comportement de molécule car ce coefficient est indépendant des dimensions géométriques de la colonne et de la compacité du gel.

4 - MANIPULATION

4-1 BUT

La manipulation consiste à déterminer la masse molaire apparente de la phosphatase alcaline après étalonnage de la colonne.

Le gel utilisé est un gel AcA34 (de marque ULTROGEL) dont les limites du domaine de fractionnement sont 20 000 et 350 000.

La solution à chromatographier renferme les molécules suivantes :

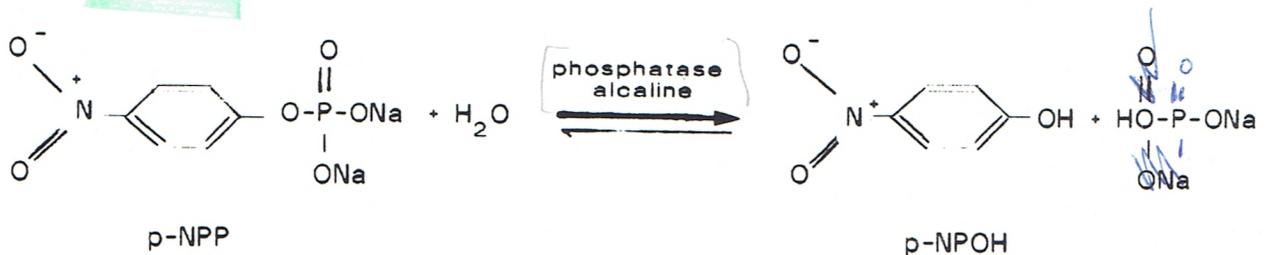
| | masse molaire apparente |
|---|-------------------------|
| Bleu Dextrane) | 2 000 000 |
| Ovalbumine .) | 43 000 |
| Vitamine B12 | 1 355 |
| Phosphatase alcaline (d'intestin de veau) | à déterminer |

4-2 CARACTERISATION DES DIFFERENTES MOLECULES

Les molécules séparées sont repérées dans les différentes fractions éluées en utilisant soit leurs propriétés spectrales, soit leur activité enzymatique.

Le Bleu Dextrane présente un maximum d'absorbance à 280 nm ainsi qu'à 625 nm, l'ovalbumine et la phosphatase alcaline, comme toutes les protéines, absorbent à 280 nm, la vitamine B12 absorbe à 280 nm, 305 nm, 322 nm, 361 nm, 550 et 581 nm. Comme toutes ces molécules absorbent à 280 nm, elles seront repérées à cette longueur d'onde.

La quantité de phosphatase alcaline déposée étant trop faible pour que cette protéine puisse être détectée par son absorbance à 280 nm, la présence de cette enzyme est mise en évidence dans les fractions, par son activité sur un substrat de synthèse, le p-nitrophényl phosphate de sodium (p-NPP) qui est hydrolysé en p-nitrophénol (p-NPOH) et phosphate minéral selon la réaction suivante :



Lors de la première séance de Travaux Pratiques, vous avez déjà observé que le p-nitrophénol présente en milieu alcalin un maximum d'absorbance à 410 nm.

4-3 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

- A l'aide de la pompe péristaltique laver le gel avec 10 ml de tampon d'éluion (Tampon Tris-HCl 10mM pH 7,5, azide de sodium 10 mM, NaCl 0,2M). Veillez à ce que la partie supérieure de la colonne de gel reste surmontée de tampon (2 à 3 ml).

Déterminer le nombre de gouttes qu'il faut afficher sur le collecteur pour avoir des fractions de 1 ml. Vérifier que le débit est compris entre 18 et 22 ml par heure. Si la valeur est trop différente, consulter un assistant.

- Disposer 60 tubes dans le panier support sur le collecteur de fractions.

- Enlever l'embout supérieur (en plastique) de la colonne et à l'aide d'un Pipetman, déposer, **très doucement et à travers le tampon**, 0,1 ml de la solution à chromatographier. Celle-ci contient du glucose pour accroître sa densité, ce qui facilite le dépôt.

- Remettre l'embout de la colonne et brancher le cathéter inférieur sur le collecteur de fractions, mettre la pompe en marche.

- Veiller à ce qu'il n'y ait pas desamorçage des tuyaux et contrôler le bon fonctionnement du compte-gouttes du collecteur.

Préparation du test d'activité de la phosphatase alcaline.

- Pendant la chromatographie, préparer 50 ml du milieu réactionnel contenant :

| | |
|----------------------------------|--------|
| p-NPP 10 mM | 2,5 ml |
| tampon carbonate 0,1 M pH 10 qsp | 50 ml |

- Répartir 0,8 ml de ce milieu dans 20 tubes à hémolyse, ils serviront au repérage de la phosphatase alcaline par son activité.

4-4 MESURE DES ABSORBANCES ET RESULTATS.

1- Numéroté les tubes dans l'ordre d'éluion et les placer dans un portoir. Lire à 280 nm l'absorbance des fractions éluées. Commencer cette lecture dès qu'une quinzaine de tubes est remplie.

2- Repérer le numéro des tubes renfermant les fractions correspondant au volume mort de la colonne (V_0). Soit Y le tube pour lequel l'absorbance est maximum.

3- Recherche de l'activité de la phosphatase :

- Numéroté les tubes à hémolyse préparés précédemment (contenant 0,8 ml de la solution de p-NPP substrat de la phosphatase alcaline) en commençant par le tube Y repéré ci-dessus.

- Ajouter 0,2 ml des fractions éluées contenues dans les tubes Y, Y+1, Y+2 ... dans les tubes à hémolyse numérotés renfermant le substrat, agiter immédiatement. Pour plus de commodité, espacer les additions de 20 secondes.

- Attendre 10 minutes.

- Arrêter la réaction en additionnant 0,1 ml de lessive de soude en respectant le même décalage de 20 secondes (Utiliser impérativement un Pipetman de 1 ml).

- Lire l'absorbance à 410 nm correspondant à la coloration jaune caractéristique de la présence du p-nitrophénol.

COMPTE-RENDU

- 1- Tracer le graphe Absorbance à 280 nm = f (numéro des tubes).
- 2- Déterminer V_o et V_T de la colonne.
- 3- Donner le graphe $A_{410nm} = f(\text{numéro des tubes})$ en superposant ce graphe au précédent, $A_{280nm} = f(\text{numéro des tubes})$, afin de repérer le volume d'éluion V_e de la phosphatase alcaline.
- 4- Tracer le graphe $V_e = f(\log \text{ masse molaire apparente des composés connus})$, en tenant compte pour ce tracé de l'ensemble des données : les données expérimentales et celles concernant le gel AcA 34, ainsi que du principe de la chromatographie.
- 5- Dédire de la mesure de son V_e , la masse molaire apparente de la phosphatase alcaline et évaluer la précision de votre résultat.
- 6- Calculer le K_d pour chacun des composants du mélange chromatographié.

Exercice d'application

Soit une colonne de gel G 75 5.000 poids moléculaire - 70.000
 $V_t = 100 \text{ ml}$, $V_o = 35 \text{ ml}$;

- Donner l'allure de la courbe $A_{280nm} = f(\text{volume d'éluion})$

pour le mélange des produits suivants :

Thyroglobuline PM = 669 000, Catalase PM = 210 000, Aldolase PM = 158 000, Ovalbumine PM = 43 000, Ribonuclease B PM = 13 700, Cyanocobalamine PM = 1 355, Tyrosine PM = 181.

- Tracer le graphe $V_e = f(\log \text{ masse molaire apparente})$ des différents constituants du mélange.



12-12-11
10,4
10,4
10,4