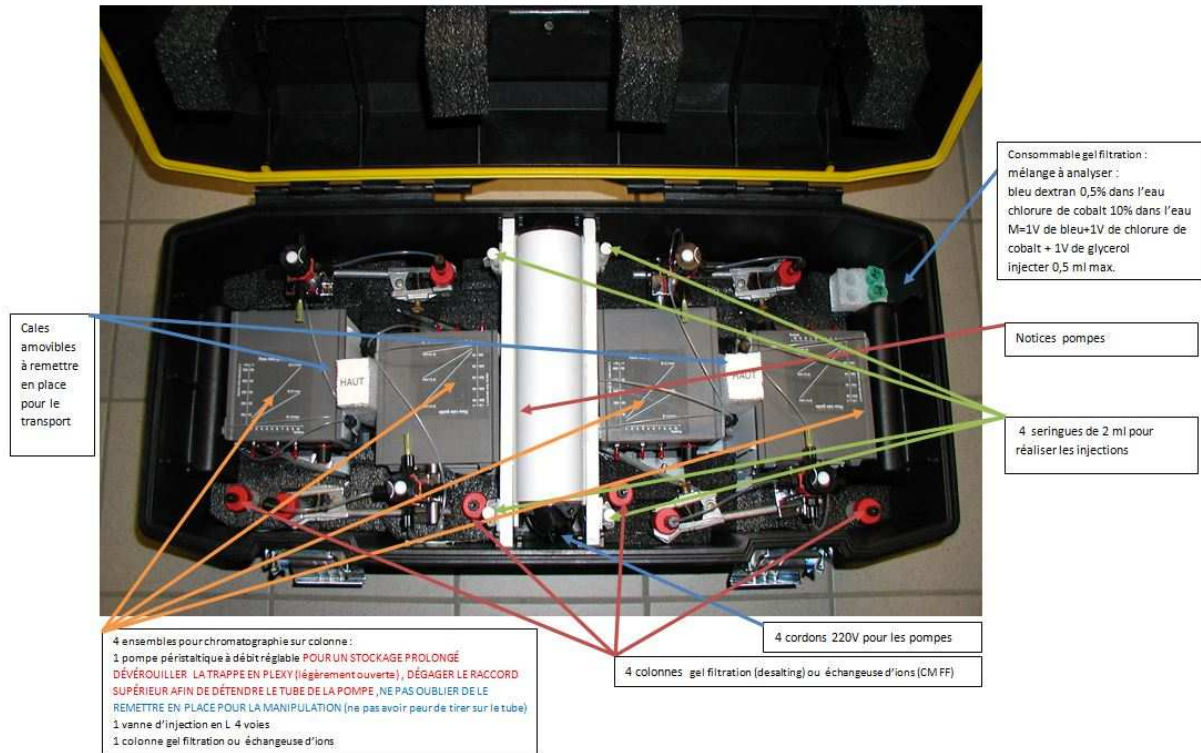


# Mallette « Chromatographie sur colonne »

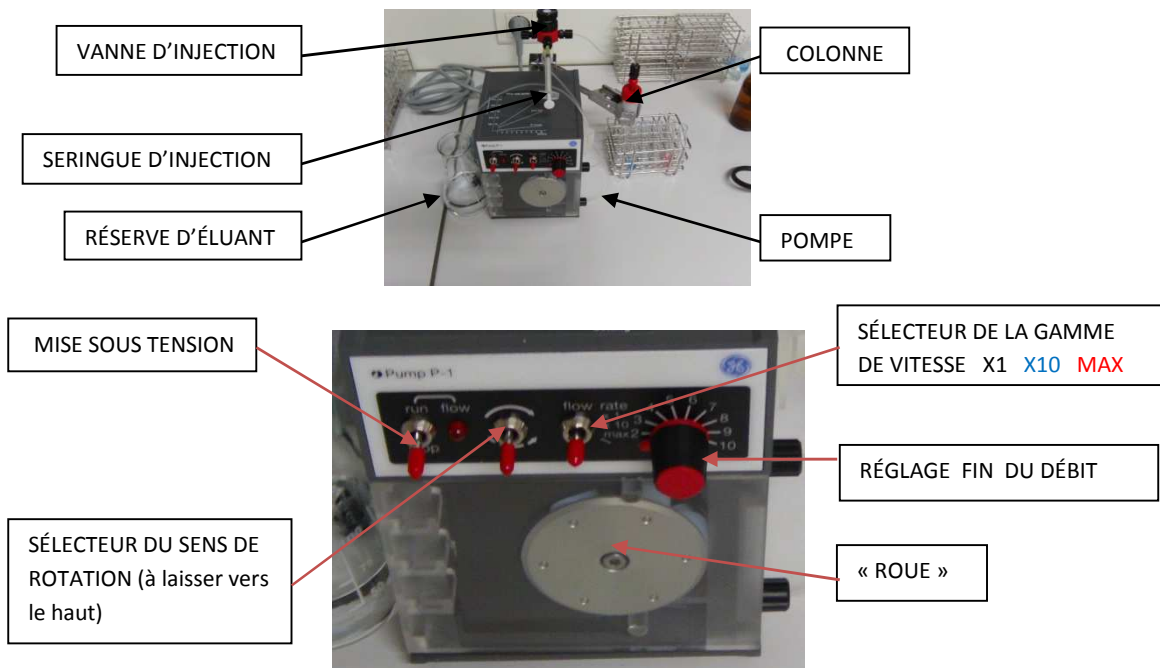
## 1 MATERIEL

### 1.1 Contenu de la mallette

CONTENU DE LA MALLETTE « CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE »



### 1.2 Description du matériel



# Mallette « Chromatographie sur colonne »

## 2 DEBALLAGE ET PREPARATION DU MATERIEL POUR CONTROLER LE DEBIT DE LA POMPE

- Retirer les mousses de blocage (marquées « haut ») situées entre les pompes,
- Sortir les pompes de leurs logements en les prenant par le capot supérieur, les tirer doucement et bien verticalement,



- Connecter les cordons d'alimentation,
- Sortir le raccord noir du clips et le placer dans la réserve d'éluant (tube avec les marques noires), pour ce contrôle mettre de l'eau  $\Delta$  dans la réserve,



- Vérifier que le tube souple à l'intérieur de la pompe ne comporte pas de pincement, si oui les éliminer en roulant le tube entre deux doigts puis le mettre en place autour de la « roue » de la pompe en tenant fermement le raccord noir supérieur et en tirant (fort) pour l'insérer dans son logement.



A noter le raccord noir inférieur reste toujours en place dans son logement. Refermer la trappe avant pour verrouiller l'écrasement du tube sur la « roue »,

- Afin d'amorcer le dispositif, mettre la vanne d'injection en positionnant la ligne blanche entre **E** (évier) et **P** (pompe),



ligne blanche

## Mallette « Chromatographie sur colonne »

- Placer le tube d'égout dans une fiole jaugée de 5 mL, après avoir choisi la gamme (x1 ou x10) et régler le bouton sur une valeur entre 1 et 10, démarrer la pompe en déclenchant un chronomètre et en l'arrêtant lorsque l'éluant arrive au trait de jauge. **Stopper** la pompe, calculer le débit en **litres par heures** et comparer ce résultat à la courbe donnée par le constructeur qui est affichée sur le dessus de la pompe (**utiliser la courbe du tube de 2,1 mm de diamètre interne**)

### 3 MISE EN ŒUVRE DE LA CHROMATOGRAPHIE DE GEL FITRATION SUR COLONNE HITRAP

#### 3.1 Déballage et préparation du matériel

- Retirer les mousses de blocage (marquées « haut ») situées entre les pompes,
- Sortir les pompes de leurs logements en les prenant par le capot supérieur, les tirer doucement et bien verticalement,
- Connecter les cordons d'alimentation,
- Sortir le raccord noir du clips et le placer dans la réserve d'éluant (tube avec les marques noires),
- Vérifier que le tube souple à l'intérieur de la pompe ne comporte pas de pincement, si oui les éliminer en roulant le tube entre deux doigts puis le mettre en place autour de la « roue » de la pompe en tenant fermement le raccord noir supérieur et en tirant (fort) pour l'insérer dans son logement.  
A noter le raccord noir inférieur reste toujours en place dans son logement. Refermer la trappe avant pour verrouiller l'écrasement du tube sur la « roue »,
- Afin d'amorcer le dispositif, mettre la vanne d'injection en positionnant la ligne blanche entre **E** (évier) et **P** (pompe).



- Placer le tube d'égout dans un bécher, démarrer la pompe (débit position **max**),

## Mallette « Chromatographie sur colonne »

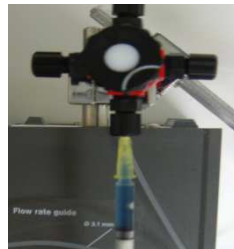
- Lorsque l'éluant arrive dans le bécher, **stopper** la pompe, tourner la vanne en positionnant la ligne blanche entre l'arrivée du solvant **P** (pompe) et la sortie vers la colonne **C**,



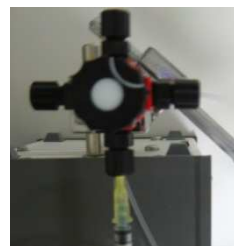
- Placer un bécher sous la colonne, **enlever** le bouchon (le mettre sur son support sur le capot de la pompe à côté de la vanne), démarrer la pompe, faire circuler pendant 10 minutes l'éluant qui va être utilisé pendant la manipulation (débit x10 et position 5) afin d'éliminer la solution de conservation,
- Le matériel est prêt à l'emploi.

### 3.2 Préparation du matériel pour la manipulation

- Préparer la seringue en aspirant 0,1 mL d'air puis de 0,2 à 0,5 mL d'échantillon (maximum pour ce type de colonne), placer la seringue dans l'aiguille (ne pas démonter l'aiguille), tourner la vanne en position injection (la ligne blanche entre la seringue **I** et la colonne **C**),



- Pousser le piston de la seringue à fond (l'air mesuré au début sert à pousser complètement l'échantillon dans la colonne) puis replacer la vanne en position d'élution

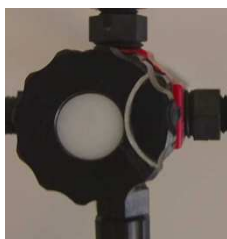


- Mettre une série de tubes à hémolyse numérotés et jaugés à 1 ml sous la colonne,
- Démarrer la chromatographie.

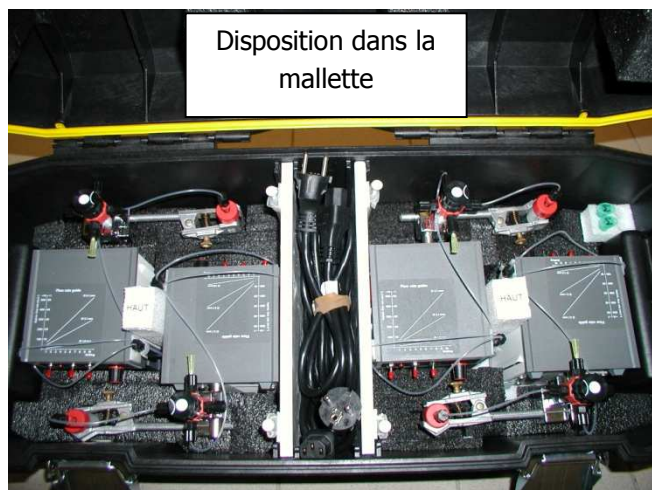
# Mallette « Chromatographie sur colonne »

## 3.3 Conditionnement et remise en place dans la mallette

- A la fin de la manipulation, faire circuler une solution d'éthanol à 20% (débit x10 et position 5) pendant 10 minutes. Stopper la pompe,
- Préparer la seringue en aspirant 0,1 ml d'air puis remplir la seringue avec de l'éthanol à 20%, l'insérer dans l'aiguille, tourner la vanne la ligne blanche entre la seringue **I** et **E** (évier), rincer en vidant la seringue,
- Placer la vanne en position évier en positionnant la ligne blanche entre **E** (évier) et **P** (pompe), sortir l'embout noir de l'éthanol, démarrer la pompe pour vider le circuit
- Stopper la pompe, reboucher la colonne avec le bouchon à vis,
- **Mettre la vanne d'injection en position fermée** (pour éviter le dessèchement du gel) en positionnant la ligne blanche entre 2 sorties,



- **Déverrouiller la trappe avant**, tirer sur le raccord noir supérieur pour le sortir de son logement et détendre le tube souple,
- **Mettre la trappe avant dans sa position de stockage ouverte à 45°**,
- Déconnecter les cordons d'alimentation, les plier et les remettre dans le logement central de la mallette,
- Bloquer le raccord noir dans le clips,
- Remettre les pompes dans leurs positions d'origine en les insérant dans leurs emplacements respectifs,
- Replacer les mousses de blocage (marquées « haut ») entre les pompes.



# Mallette « Chromatographie sur colonne » »

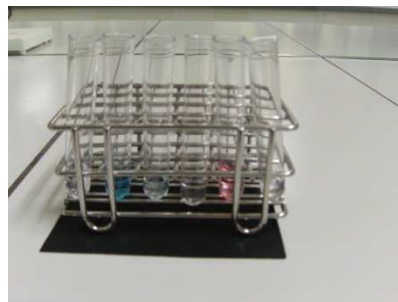
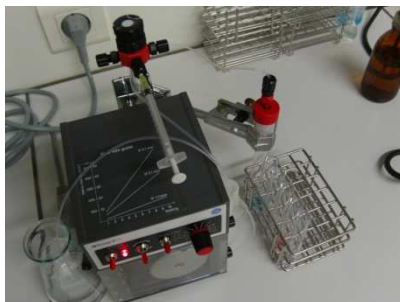
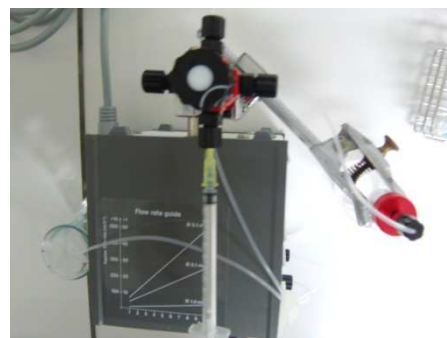
## 3.4 Exemple de manipulation : séparation de deux molécules, le bleu dextran et le chlorure de cobalt

### 3.4.1 Matériel

- solution de bleu dextran dans l'eau distillée à 0,5%
- solution de chlorure de cobalt dans l'eau distillée à 10%
- mélange à analyser : 1 volume de bleu + 1 volume de chlorure de cobalt + 1 volume de glycérol
- une série de tubes à hémolyse jaugés à 1ml sur un portoir
- un spectrophotomètre et des micro cuves 1,5 ml

### 3.4.2 Manipulation

- Réaliser les spectres des solutions de bleu et de chlorure de cobalt de 380 à 750 nm,
- Préparer la pompe et la colonne comme indiqué ci-dessus,
- Injecter le mélange comme indiqué ci-dessus,
- Eluer avec de l'eau distillée à un débit de l'ordre de 1mL par minute (cf diagramme des débits sur la pompe),
- Recueillir les fractions dans les tubes à hémolyse,
- Réaliser les spectres des solutions colorées recueillies.



# Mallette « Chromatographie sur colonne »

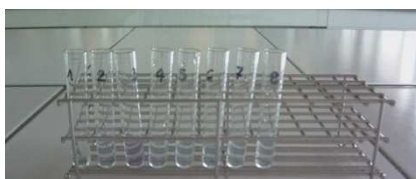
## 3.5 Exemple de manipulation : dessalage d'une solution de blanc d'œuf

### 3.5.1 Matériel

- un blanc d'œuf dilué au 1/10 dans une solution de NaCl à 1 g/L
- solution de nitrate d'argent à 2g/L (pour caractériser les ions chlorures)
- réactif de Gornall ou Biuret (pour caractériser les protéines)
- une série de tubes à hémolyse jaugés à 2mL sur un portoir (une dizaine)
- une série de tubes à hémolyse sur un portoir (une dizaine)
- de l'eau distillée
- bécher 100ml

### 3.5.2 Manipulation

- Préparer la pompe et la colonne comme indiqué ci-dessus,
- Injecter le blanc d'œuf comme indiqué ci-dessus (max 0,5mL),
- Eluer avec de l'eau distillée à un débit de l'ordre de 1,5mL par minute (cf diagramme des débits sur la pompe),
- Recueillir les fractions dans les tubes à hémolyse (2 mL)
- Transvaser 1mL de chaque tube dans la seconde série de tubes à hémolyse
- Dans une série de tubes à hémolyse, ajouter 1 mL de réactif de Gornall puis observer,
- dans l'autre série de tubes à hémolyse, ajouter quelques gouttes de nitrate d'argent puis observer.



Série de tubes + réactif de Gornall



Série de tubes + nitrate d'argent

Liens pour des animations sur la chromatographie sur colonne

- [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdocGE\\_GelFiltration\\_20131119173159.swf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdocGE_GelFiltration_20131119173159.swf)
- [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdocGE\\_IonExchange\\_20130407221710.swf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdocGE_IonExchange_20130407221710.swf)

## 4 SÉPARATION DU LYSOZYME DU BLANC D'ŒUF PAR CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

### 4.1 Matériel

- mini colonne CM Sepharose Fast Flow (Résine-O- CH<sub>2</sub>-COOH) HITRAP CM FF
- tampon TRIS-HCl à 50 mmol pH=8 à 1mol de NaCl
- tampon TRIS-HCl à 50 mmol pH=8
- blanc d'œuf
- lysosyme témoin à 1G /L
- solution de bleu de coomassie G250 : 100mg dans 100 ml d'eau Δ, agiter 3 heures puis ajouter 1 ml HCl pur

### 4.2 Préparation de la solution d'œuf diluée

Pour ne pas saturer et colmater la colonne, on dilue au 1/10 le blanc d'œuf dans de l'eau physiologique. La réalisation de cette dilution dépendra du volume de blanc d'œuf obtenu. Il faut absolument agiter doucement.

### 4.3 Préparation des cuves d'élution

Dans un portoir à cuve spectrophotométrique, placer les 2 séries de micro-cuves UV :

- Jauger 20 micro-cuves pour 1mL (trait de marqueur sur une micro-cuve avec 1mL d'eau)
- Numéroté 10 micro-cuves de F1 à F10 et les 10 autres de E1 à E10

### 4.4 Injection de la solution d'œuf diluée

Lors de cette étape la pompe d'entraînement est obligatoirement **stoppée**.

- Mettre la vanne d'injection sur la position injection / colonne (I/C),
- Aspirer avec la seringue 0,1mL d'air,
- Puis aspirer avec la seringue 0,5mL de dilution d'œuf au 1/10,
- Adapter la seringue dans l'injecteur (garde jaune de l'aiguille),
- Injecter tout le volume de la seringue air y compris,
- Mettre la vanne d'injection sur la position colonne / pompe (C/P).



# Mallette « Chromatographie sur colonne »

## 4.5 Elution F avec le tampon TRIS-HCl pH=8

La pompe a été paramétrée et doit être alimentée par le tampon TRIS-HCl pH=8. Plonger le tube d'alimentation de la pompe dans le flacon de TRIS-HCl pH=8.

- Placer la première micro-cuve F1 sous la colonne,
- Mettre sous tension la pompe,
- Lorsque le trait de jauge est atteint, placer la micro-cuve suivante,
- Dès que la micro-cuve F7 est remplie, éteindre la pompe.

## 4.6 Elution E avec le tampon TRIS-HCl pH=8 à 1M de NaCl

La pompe doit seulement être alimentée par le tampon TRIS-HCl pH=8 à 1M de NaCl :

- Plonger le tube d'alimentation de la pompe dans le flacon de TRIS-HCl pH=8 à 1M de NaCl,
- Placer la première micro-cuve E1 sous la colonne,
- Mettre sous tension la pompe,
- Lorsque le trait de jauge est atteint placer le tube suivant,
- Dès que la dernière micro-cuve E8 est remplie, éteindre la pompe.

fractions	A à 280 nm	fractions	A à 280 nm
F0	0.000	E0	0.010
F1	0.016	E1	-0.001
F2	0.081	E2	-0.004
F3	0.874	E3	0.003
F4	1.159	E4	0.059
F5	0.730	E5	0.256
F6	0.351	E6	0.120
F7	0.172	E7	0.023
F8	0.099	E8	0.002
F9	0.063	E9	-0.002
F10	0.043	E10	-0.001

PRINCIPALES PROTÉINES DU BLANC D'ŒUF →

← LYSOZYME

## 4.7 Remise en fonction de la colonne avec le tampon TRIS-HCl pH=8 à 1M de NaCl

La colonne doit être régénérée avec le tampon TRIS-HCl pH=8 à 1M de NaCl :

- Plonger le tube d'alimentation de la pompe dans le flacon de TRIS-HCl pH=8 à 1M de NaCl,
- Mettre sous tension la pompe pour délivrer 25 mL de tampon soit 5 fois le volume de la colonne puis éteindre la pompe