



Mallette FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

publié le 13/09/2016

Extraction et purification du lysozyme du blanc d'oeuf

Descriptif :

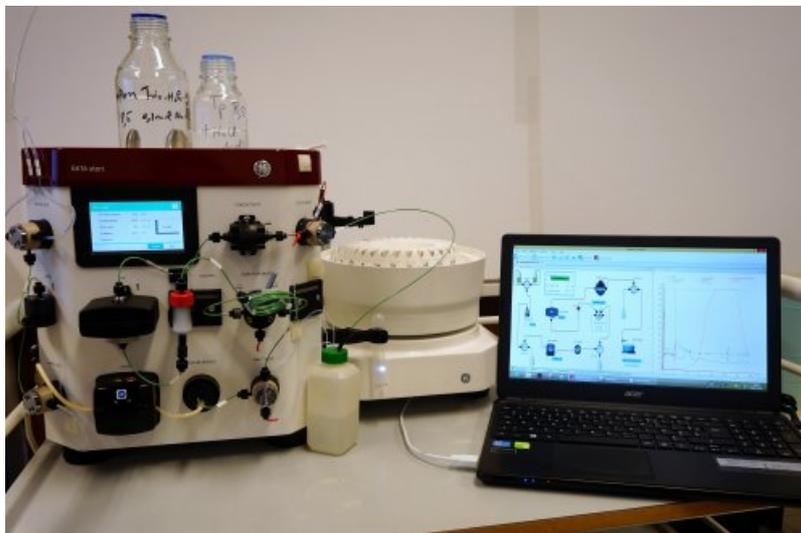
Fiche technique de l'utilisation d'un chromatographe basse pression ÄTKA Start et du logiciel Unicorn®
Protocole d'extraction et de purification du lysozyme du blanc d'oeuf

Sommaire :

- 1. Composition de la mallette FPLC
- 2. Principe de la FPLC (Système ÄTKA Start)
- 3. Extraction et purification du lysozyme du blanc d'oeuf
- 4. Mesure de l'activité enzymatique
- 5. Calculs et résultats
- 6. Consignes d'utilisation de ÄTKA
- 7. Utilisation d'UNICORN®

● 1. Composition de la mallette FPLC

- Un système chromatographique automatisé ÄTKA Start®
- Un PC Acer – Windows 8.1 muni du logiciel Unicorn®



Vue de face de l'ÄTKA

● 2. Principe de la FPLC (Système ÄTKA Start)

Il s'agit d'une chromatographie sur colonne réalisée avec un système automatisé. Ce système utilise une pompe, réglée à un débit consigne, qui permet au solvant d'entraîner les constituants d'un mélange (protéines) sur une colonne remplie de matrice.

Ce système automatisé accepte quatre types de colonne, à savoir :

- Des colonnes d'affinité
- Des colonnes échangeuses d'ions (IEX)

- Des colonnes d'interaction hydrophobe (HIC)
- Des colonnes d'exclusion de taille (SEC).

La plupart des protocoles de purification de protéines nécessitent l'utilisation de plusieurs de ces types de procédures chromatographiques pour obtenir la pureté nécessaire pour les applications en aval. Le choix de la (les) méthode(s) chromatographique(s) la (les) plus appropriée(s) et l'ordre de ces méthodes est essentielle dans l'optimisation d'une méthode de purification des protéines.

En analysant la séquence d'une protéine, des caractéristiques uniques peuvent être identifiées qui peuvent aider à sa purification. La taille et la charge d'une protéine (à un pH spécifique) peut être déterminée, ainsi que l'identification de grandes régions de résidus hydrophobes.

Type de Chromatographie	Sépare les protéines par	lie avec	Elue avec
Affinité	une interaction spécifique	pas de ligand de compétition	ligand de compétition (spécifique); conditions qui rompent les interactions protéine/protéine (non-spécifique)
Echange d'ions	Charge de surface nette	force ionique faible	Force ionique élevée, augmentant (échange de cations) ou diminuant (échanges d'anions) pH
Interactions Hydrophobe	Hydrophobicité	force ionique élevée	force ionique faible
Exclusion de taille	Radius Hydrodynamique		

► Référence : [Purification de Protéine par chromatographie sur colonne](#)

● 3. Extraction et purification du lysozyme du blanc d'œuf

○ 3.1 Généralités

Le lysozyme EC. 3.2.1.17, catalyse l'hydrolyse des liaisons $\beta(1-4)$ osidiques entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine du peptidoglycane des parois bactériennes.

Cette hydrolyse de la couche rigide de la paroi provoque la lyse des cellules en milieu hypotonique. Le lysozyme, découvert en 1929 par Fleming dans les larmes, est également présent dans le blanc d'œuf où il représente 7 à 8 % des protéines. Son pHi est de 11 (nettement supérieur à celui des autres protéines du blanc d'œuf) et son poids moléculaire est de 14600 Da.

○ 3.2 Description de la procédure de purification du lysozyme

Deux étapes de purification sont proposées pour obtenir un lysozyme purifié du blanc d'œuf

- Une chromatographie par échange d'ions (IEX) qui sépare les protéines en fonction de leur charge de surface nette. La colonne utilisée est une colonne échangeuse de cations faibles à carboxyméthyl (CM)
- Une chromatographie d'exclusion (SEC) qui sépare les molécules présentes, en fonction de leur rayon (taille) hydrodynamique. La colonne utilisée contient une résine Séphadex G-25 (fractionne jusqu'à 5000 Da)

○ 3.3 Préparation de l'échantillon

- Peser le blanc d'un œuf et le transvaser quantitativement dans une fiole de 200 mL
- Compléter la fiole avec le tampon Tris-HCl (pH 8,5 - 0,1 M NaCl)
- Garder une fraction pour étude complémentaire (Tube SBO)

○ 3.4 1ère étape de purification : Chromatographie IEX

- Préparer la colonne (voir **6.3 Démarrage**)
- Monter la colonne HiTrap CM FF 5mL (voir **6. Consignes d'utilisation**)
- Plonger les crépines dans les solvants respectifs (Solvant A = Tris-HCl pH8,5 à 0,1M NaCl ; Solvant B = Tampon pH8,5 à 1M de NaCl)
- Allumer le chromatographe
- Ouvrir le logiciel Unicorn® (System Control ; Evaluation) (voir **7. Utilisation unicorn**)
- Sur System Control, connecter le chromatographe à Unicorn® en cliquant sur « Connect »

- Lancer la méthode en cliquant sur « Method Run », choisir « Lysozyme2 »
- Suivre les instructions à l'écran (le volume de blanc d'œuf à injecter est de 1 mL)
- Sur Évaluation, intégrer et éditer vos pics
- Garder la fraction la plus intéressante pour étude complémentaire (Tube P1)
- Re-conditionner la colonne (voir **6.4 Rinçage**)

○ 3.5 2ème étape de purification : Chromatographie SEC

- Préparer la colonne (voir **6.3 Démarrage**)
- Changer de colonne, monter la colonne HiTrap Desalting 5mL (voir **6. Consignes d'utilisation**)
- Plonger la crépine A dans de l'eau distillée
(Remarque : la crépine B peut aussi plonger dans le même récipient que la A)
- Allumer le chromatographe
- Ouvrir le logiciel Unicorn® (System Control ; Évaluation) (voir **7. Utilisation unicorn**)
- Sur System Control, connecter le chromatographe à Unicorn® en cliquant sur « Connect »
- Lancer la méthode en cliquant sur « Method Run », choisir « dessalage »
- Suivre les instructions à l'écran (le volume de fraction à injecter est de 1 mL)
- Sur Évaluation, intégrer et éditer vos pics
- Garder la fraction la plus intéressante pour étude complémentaire (Tube P2)
- Re-conditionner la colonne (voir **6.4 Rinçage**)

● 4. Mesure de l'activité enzymatique

○ 4.1 Mode opératoire

- Opérer en cuve de spectrophotomètre, si possible à 25°C
- Introduire :
 - 2,9 mL de substrat (suspension de parois de *Micrococcus* à 200mg/L)
 - 0,1 mL de fraction enzymatique
- Trois fractions sont testées préalablement diluées comme suit :

Fraction	S _{BO}	P ₁	P ₂
dilution proposée	1/10	Non diluée	Non diluée

- la variation d'absorbance à 450 nm pendant 2 à 3 min et déterminer le A/min

L'activité catalytique du lysozyme est mesurée par diminution de l'absorbance à 450 nm d'une suspension bactérienne de *Micrococcus lysodeikticus* à pH 6,24. Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui provoque une variation d'absorbance de 0,001 par minute dans les conditions de l'expérience et à 25°C.

○ 4.2 Dosage colorimétrique des protéines (par FOLIN-LOWRY)

- Réalisation de la gamme d'étalonnage :
 - A l'aide d'une solution de protéine étalon (SAB) à 0,5 g.L⁻¹, réaliser une gamme 6 tubes contenant au maximum 1 mL de solution de protéine étalon.
 - Ajouter dans chaque tube 5 mL de réactif de LOWRY et agiter et attendre 10 minutes
 - Ajouter dans chaque tube 0,5 mL de réactif de FOLIN, puis agiter immédiatement et laisser la coloration se développer 30 minutes à l'obscurité, à température ambiante.
 - Mesurer l'absorbance à 650 nm contre un témoin réactif.
- Dosage des protéines :
Réaliser, selon le même protocole que la gamme étalon, le dosage des fractions SBO, P1 et P2.

Les éventuelles dilutions seront réalisées en eau physiologique. Une estimation des protéines présentes peut être

réalisée par l'intégration des pics obtenus en chromatographie

● 5. Calculs et résultats

Remplir les différents tableaux suivants :

○ 5.1 Mesure de l'activité enzymatique

Fraction	S_{B0}	P_1	P_2
Dilution effectuée			
A_{450}/min (Slope)			

○ 5.2 Gamme de dosage des protéines

m protéines mg/tube	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
$A_{650\text{nm}}$						

○ 5.3 Dosage des protéines dans les fractions

Fraction	S_{B0}	P_1	P_2
Prise d'essai			
Dilution			
$A_{650\text{nm}}$			
Concentration en protéine en mg.mL^{-1}			

○ 5.4 Résultats des activités totales et spécifiques

Fraction	Volume (mL) (à lire sur « evaluation »)	b				Teneur Protéines mg/mL	Z_T U	Quantité totale de protéines mg	Z_{sp} U/mg
		Dilution	$\Delta A/\text{min}$	b U/mL Fraction diluée	b U/mL Fraction non diluée				
S_{B0}									
P_1									
P_2									

○ 5.5 Calculs du Rendement de purification et de l'enrichissement

Fractions à comparer	Rendement %	Enrichissement
P_1 par rapport à S_{B0}		
P_2 par rapport à S_{B0}		
P_2 par rapport à P_1		

○ 5.6 Principes et conditions opératoires

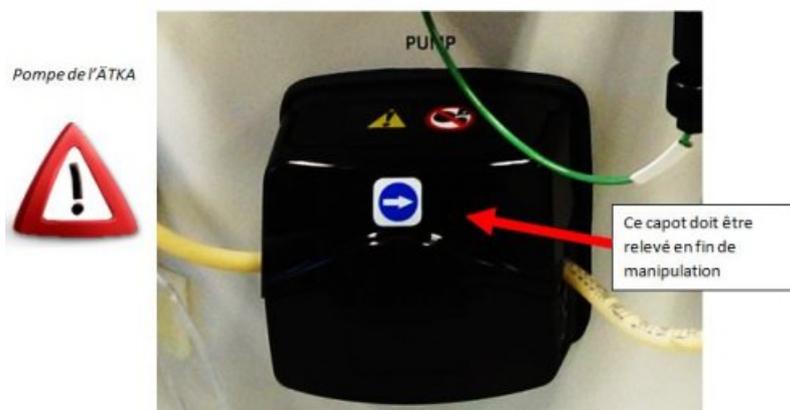
Caractéristiques des étapes de purification	1 ^{er} étape de purification	2 ^{ème} étape de purification
Méthode chromatographique utilisée		
Principe de cette méthode		
Caractéristiques des étapes de purification	1 ^{er} étape de purification	2 ^{ème} étape de purification
Nom de la colonne		
Valeur du CV en mL		
Nature du solvant A		
Nature du solvant B		
Débit de filtration		
Débit d'élution		
Méthode d'élution (gradient ou isocratique) Détaillez la programmation		
Volume des fractions de filtration en mL		
Volume des fractions d'élution en mL		

● 6. Consignes d'utilisation de ÄTKA

Pour le bon fonctionnement de l'appareil ces consignes sont à suivre impérativement.

○ 6.1 Traitement de la pompe

Prière de desserrer le système péristaltique de la pompe après utilisation.



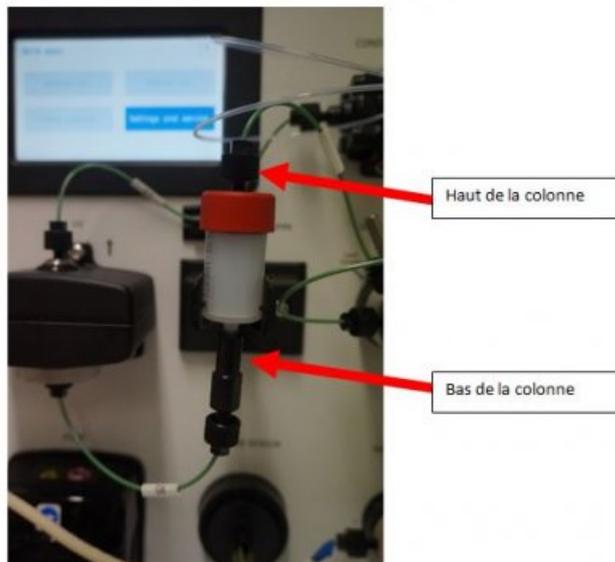
○ 6.2 Montage et démontage d'une colonne

Les colonnes peuvent facilement être installées et retirées.

Pour le montage, il convient de viser d'abord la partie basse de la colonne puis la partie haute.

Pour le démontage l'opération doit être inversée, d'abord le haut puis le bas

Colonne de l'ATKA



○ 6.3 Démarrage avec une colonne

A chaque démarrage ou à chaque changement de colonne, il faut faire un rinçage manuel avec le solvant A pour une colonne échangeuse d'ions ou avec de l'eau distillée avec une colonne d'exclusion.

La procédure est la suivante :

- Plonger les crépines A et B dans le solvant A ou l'eau distillée
- Déconnecter le tube collecteur de fractions de son emplacement et le brancher sur le récipient poubelle. (voir le **1** sur le schéma ci-dessous)
- Allumer le chromatographe
- Ouvrir le logiciel Unicorn® (System Control) (voir **7. Utilisation unicorn**)
- Sur System Control, connecter le chromatographe à Unicorn® en cliquant sur « Connect »
- Mettre la boucle en position « inject »
- Lancer la méthode manuelle en cliquant sur « Manual Run »
- Choisir un débit de 4 mL/min (Pump, flow rate)
- Ouvrir les vannes (en cliquant sur le schéma présenté sur System control) pour que le solvant A ou l'eau passe par l'ensemble du système comme présenté sur ce schéma (chemin en vert).
- Laisser tourner 5 min et cliquer sur stop (voir le **2** sur le schéma ci-dessous)
- Remettre la boucle sur la position « Load » et le tube collecteur de fractions sur son emplacement d'origine.
Remarque : pour ouvrir ou fermer une vanne, il suffit de cliquer sur la vanne sur l'écran directement. (Vanne bleu = ouvert ; vanne blanche = fermé (exemple : voir **3** sur le schéma ci-dessous))

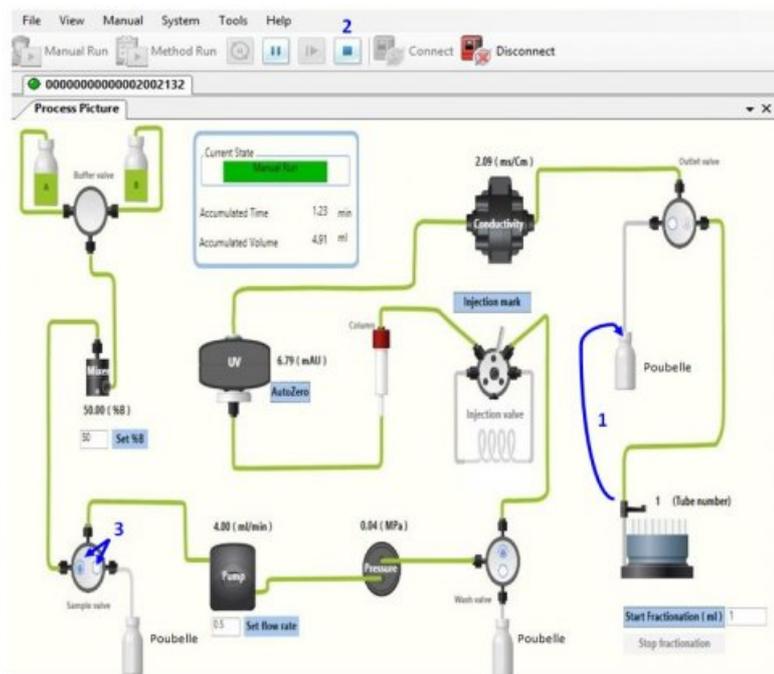


Schéma du principe de la FPLC ATKA : procédure de rinçage

○ 6.4 Rinçage de la colonne en fin de manipulation

A l'arrêt de l'utilisation de l'appareil et pour conserver les colonnes, un rinçage du circuit est à réaliser avec de l'éthanol à 20% (colonne échangeuse d'ions et colonne d'exclusion).

Suivre la même procédure que le démarrage de la colonne.

● 7. Utilisation d'UNICORN®

Le logiciel Unicorn® comprend 4 applications que l'on peut ouvrir simultanément.

○ 7.1 Utilisation de l'application « Method Editor »

Cette application permet **d'éditer** une procédure.

Exemple d'édition d'une méthode pour une « Chromatographie échangeuse d'ions » :

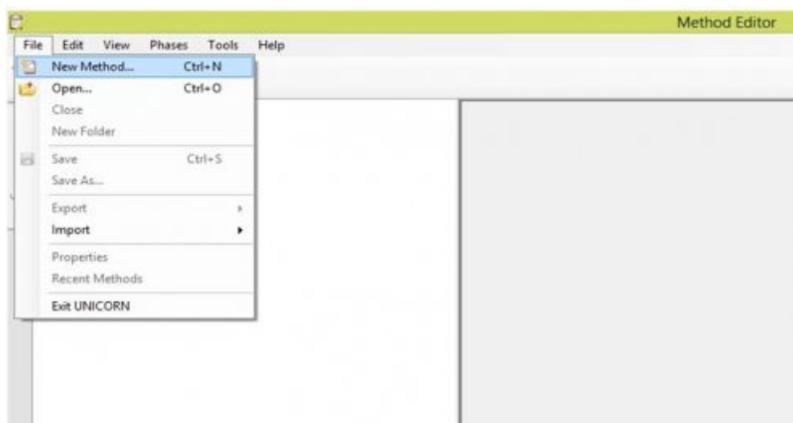
- Ouvrir « UNICORN® » en cliquant sur l'icône située sur le bureau



- Choisir les applications à ouvrir "METHOD EDITOR"

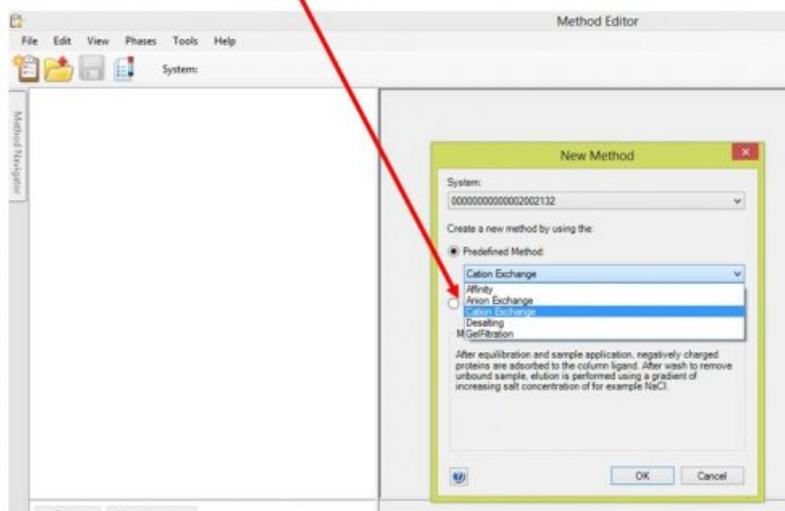


- Puis « FILE » et « NEW METHOD »



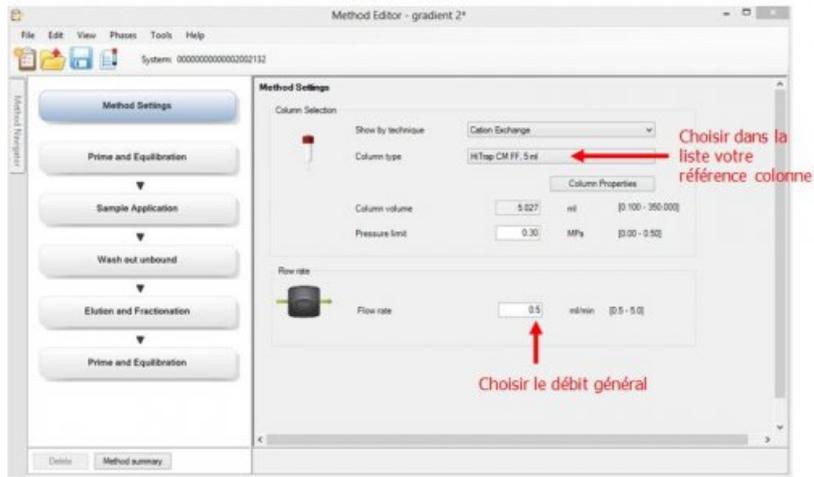
- Choisir pour la méthode à éditer, le type de chromatographie

→ *Echangeuse de cations*

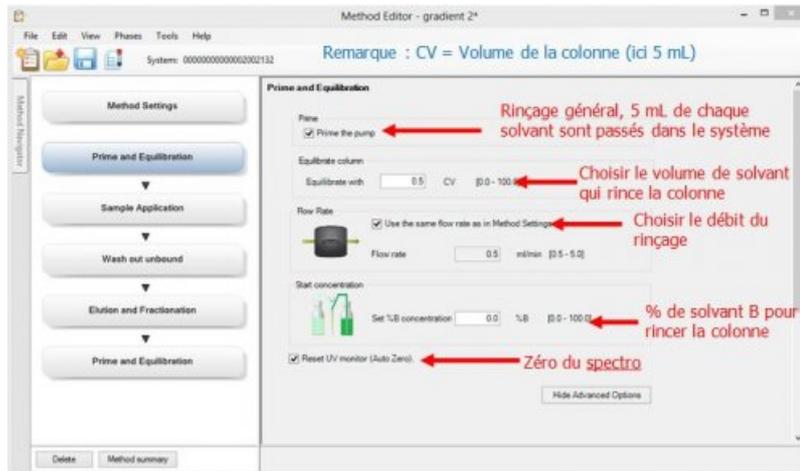


La méthode « échangeuse de cations » présente 6 pages à programmer :

- 1ère page : Method Setting : Choix de colonne et choix de débit général



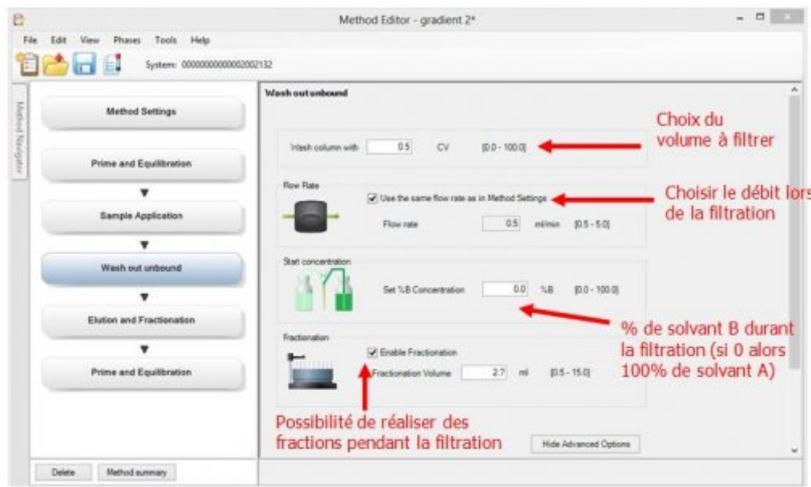
- 2ème page : Prime Equilibration : Programmation de mise en route de la colonne



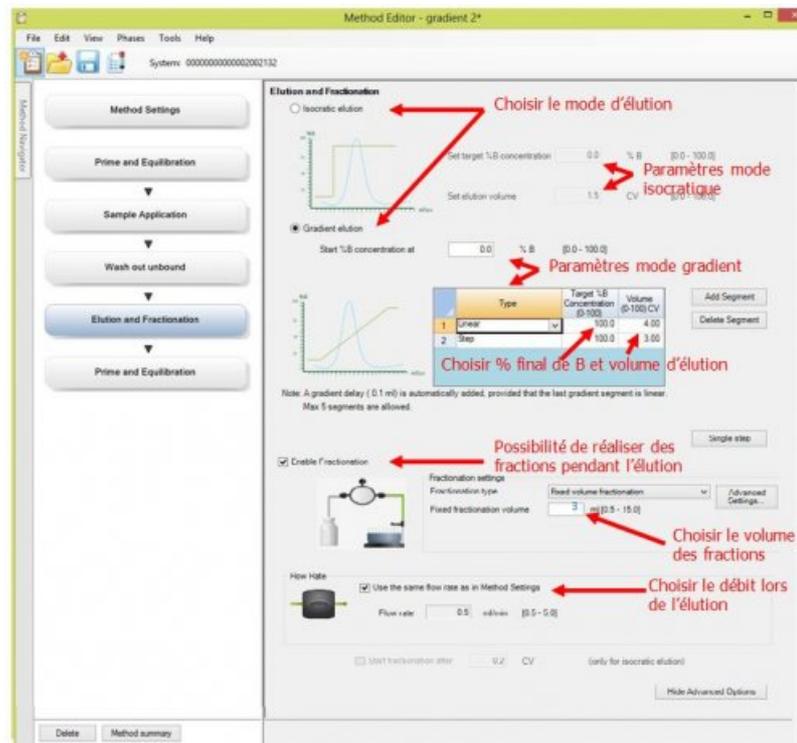
- 3ème page : Sample Application : Choix du type injection



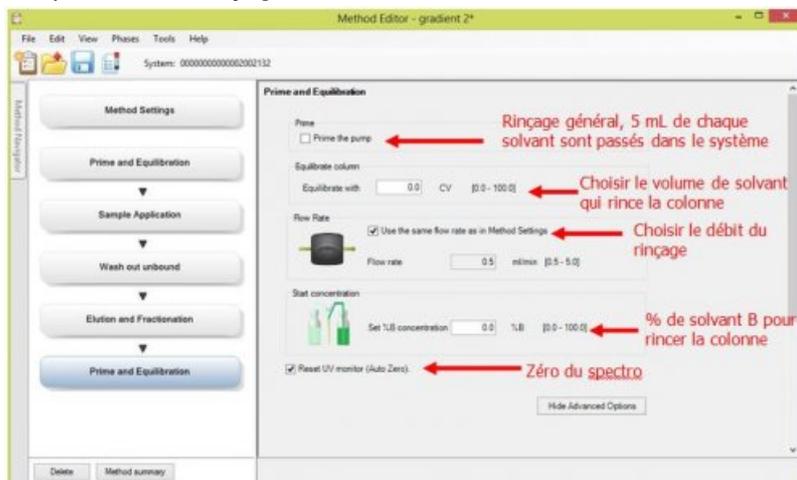
- 4ème page : Wash out unbound : Programmation de la filtration



- 5ème page : Elution and Fractionation : Programmation de l'éluion

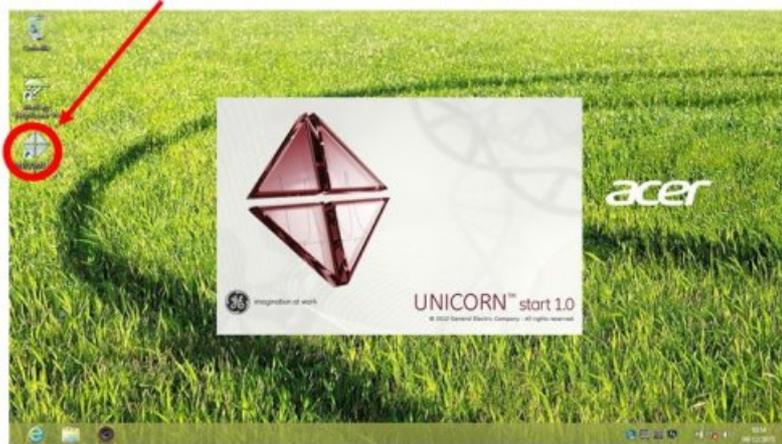


- 6ème page : Prime and Equilibration : rinçage et remise en condition

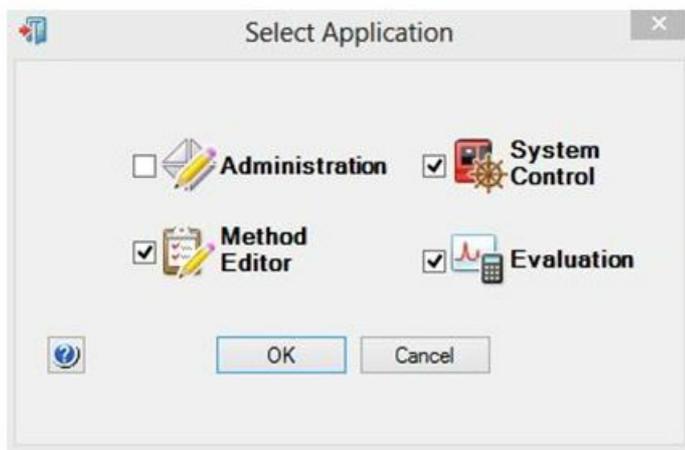


Exemple d'édition d'une méthode pour une « Chromatographie d'exclusion » :

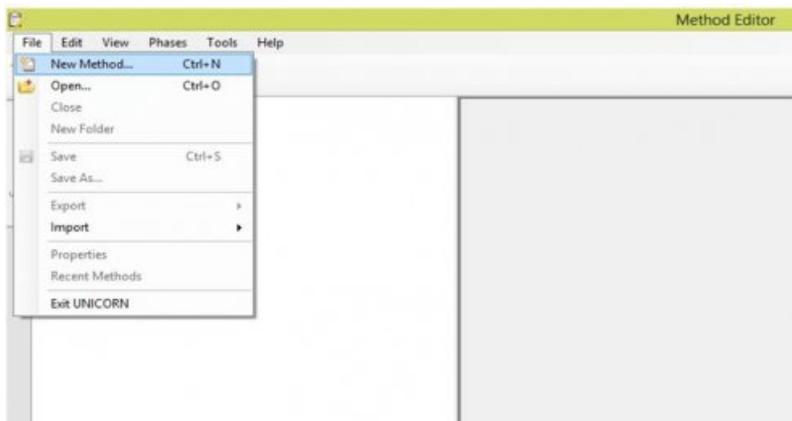
- Ouvrir « UNICORN® » en cliquant sur l'icône situé sur le bureau



- Choisir les applications à ouvrir "METHOD EDITOR"

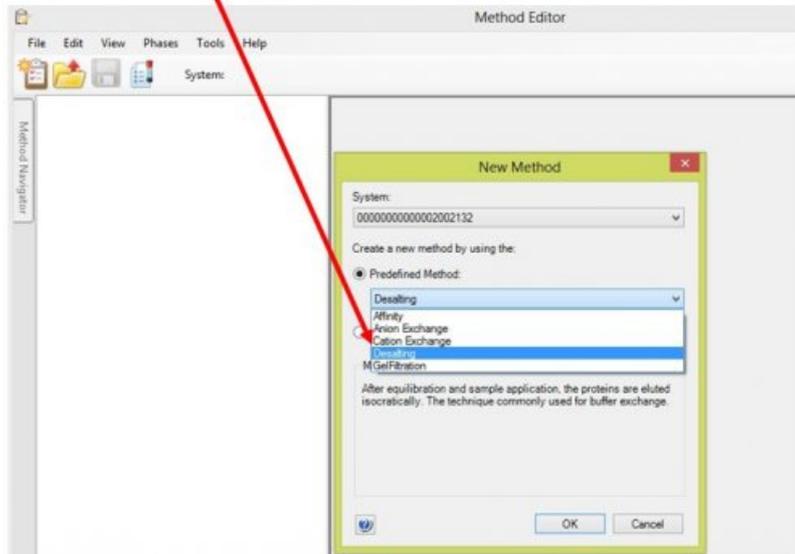


- Puis « FILE » et « NEW METHOD »



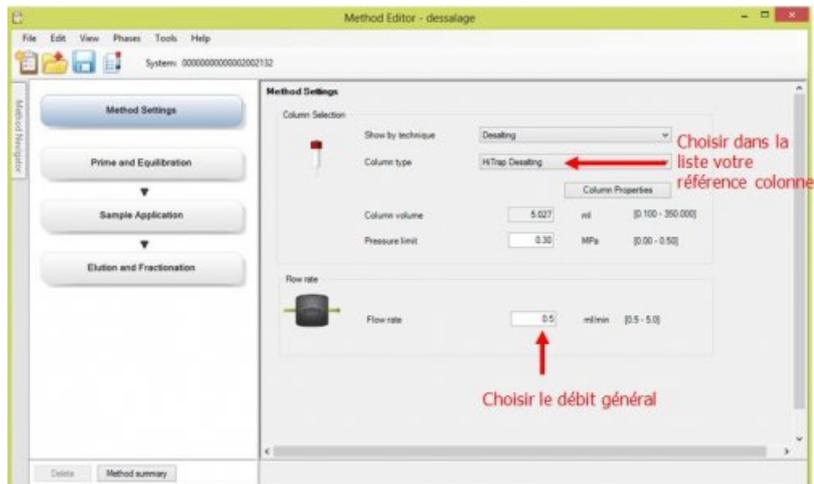
- Choisir pour la méthode à éditer, le type de chromatographie Desalting (Dessalage par exclusion)

→ Desalting (Dessalage par exclusion)

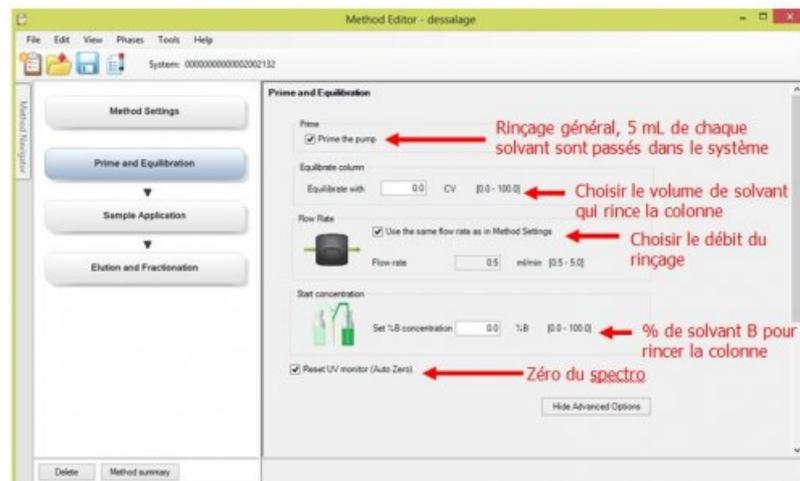


La méthode « échangeuse de cations » présente 4 pages à programmer :

- 1ère page : Method Setting : Choix de colonne et choix de débit général



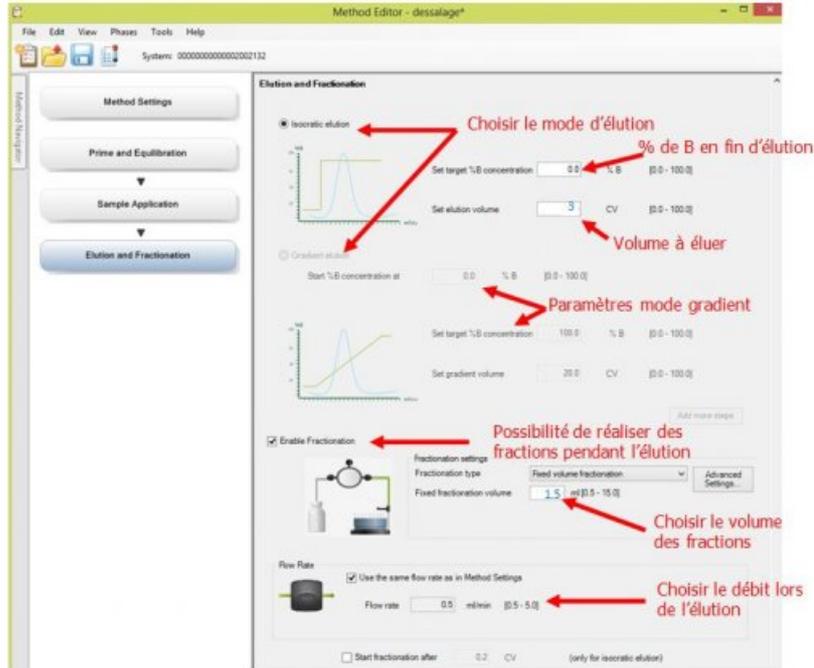
- 2ème page : Method Setting : Choix de colonne et choix de débit général



- 3ème page : Method Setting : Choix de colonne et choix de débit général



- 4ème page : Method Setting : Choix de colonne et choix de débit général

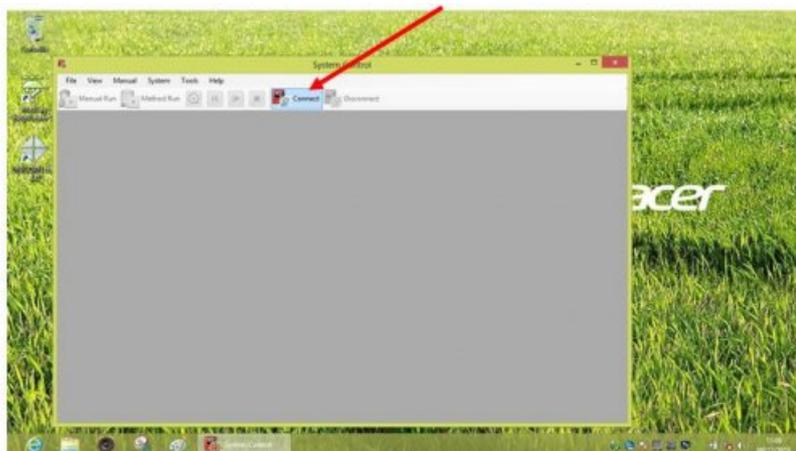


o 7.2 Utilisation de l'application « System Control »

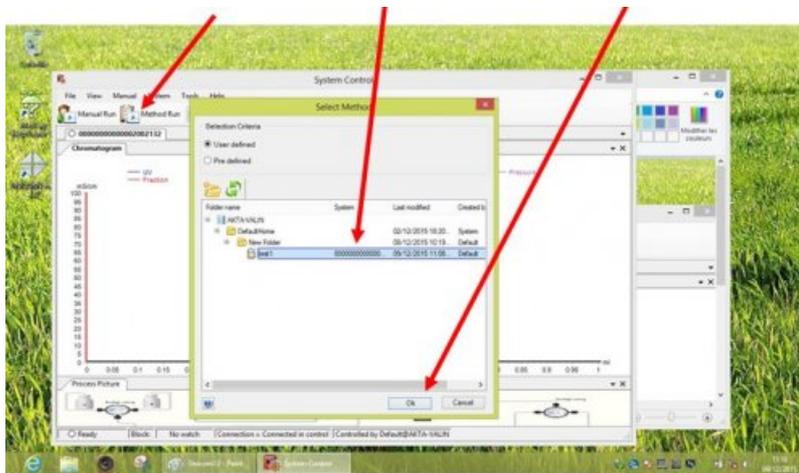
Elle permet de lancer une méthode déjà enregistrée.

Exemple de lancement d'une méthode "test" :

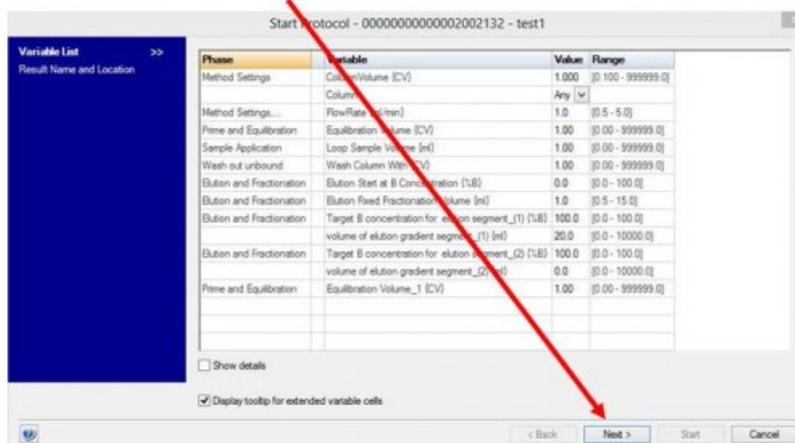
- Lancer SYSTEM CONTROL et cliquer sur « CONNECT »



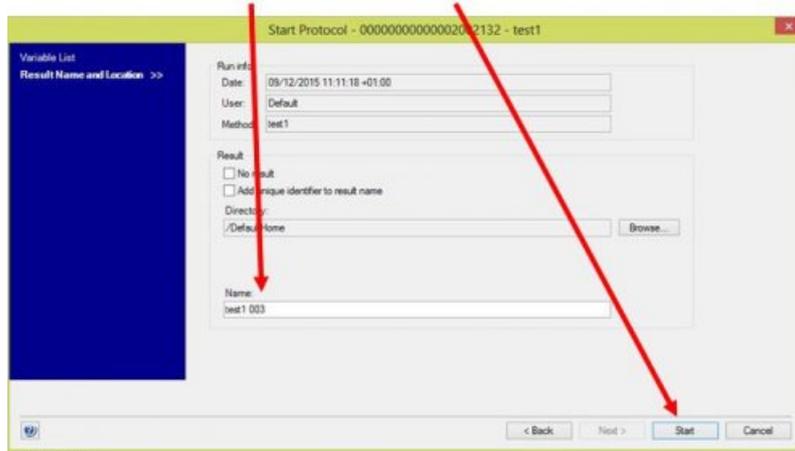
- Cliquer sur METHOD RUN et choisir la méthode dans la liste puis OK



- Valider la méthode par Next



- Donner un nom au fichier « résultats » et lancer la procédure



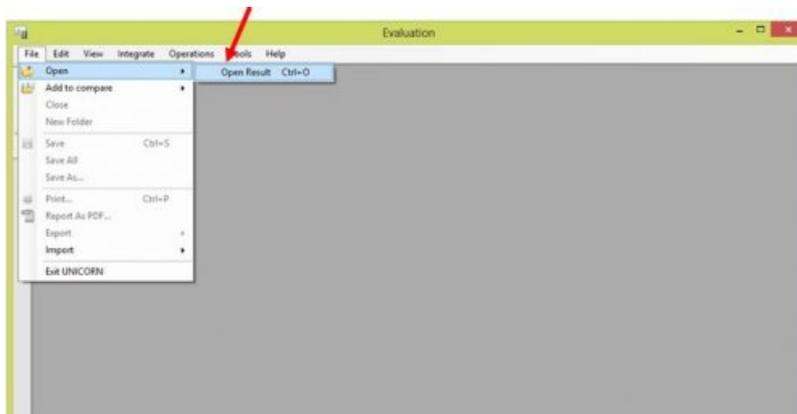
Remarque : suivre à l'écran le déroulé des différentes étapes. Une demande et une confirmation seront proposées au cours de la procédure si vous avez choisi l'injection par la boucle (LOOP).

○ 7.3 Utilisation de l'application « Evaluation »

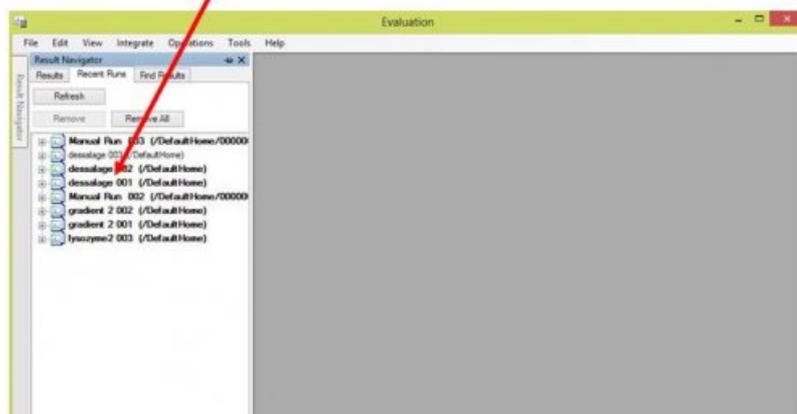
Elle permet d'analyser les profils obtenus lors des chromatographies.

Exemple d'évaluation d'une "Chromatographie échangeuse d'ions"

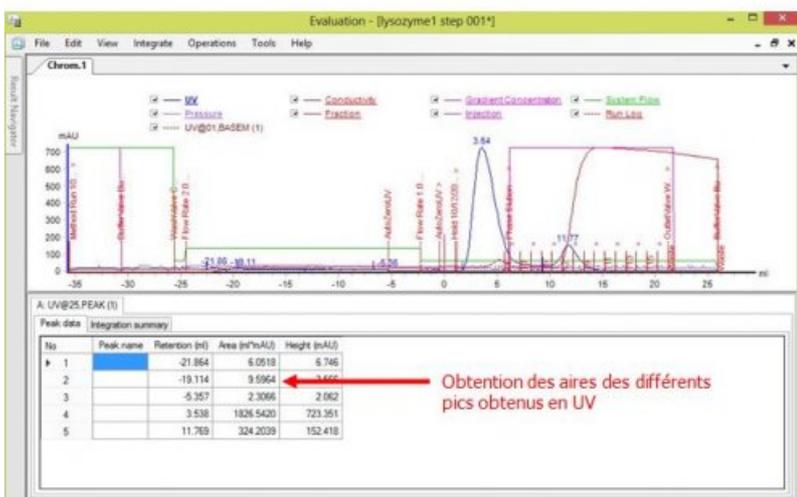
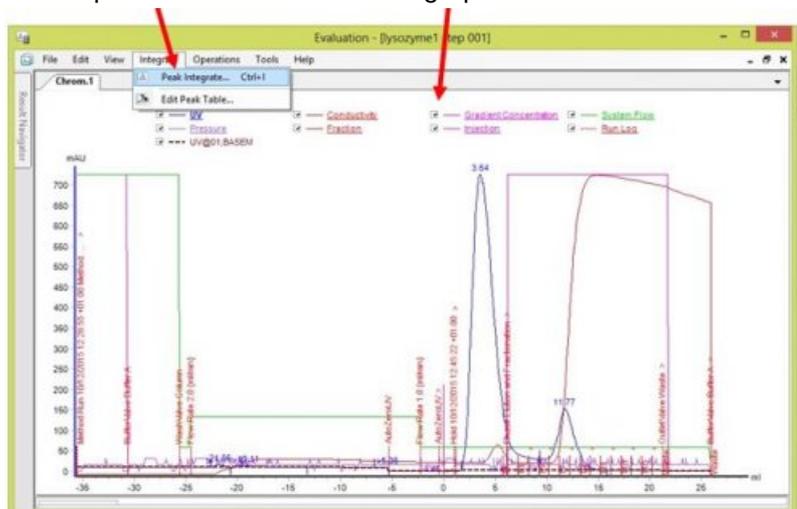
- Ouvrir l'application « EVALUATION »
- Ouvrir le fichier résultats



- Choisir le fichier correspondant à l'analyse à faire.

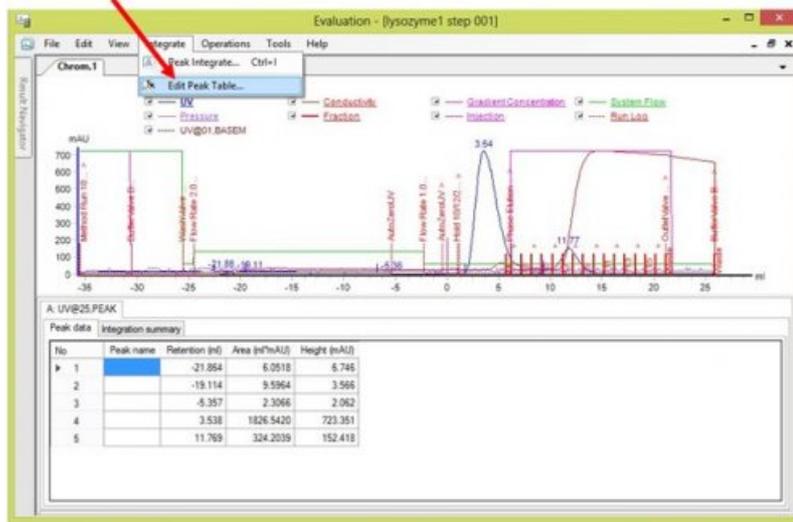


- Intégrer les pics et choisir les paramètres à laisser sur le graphe

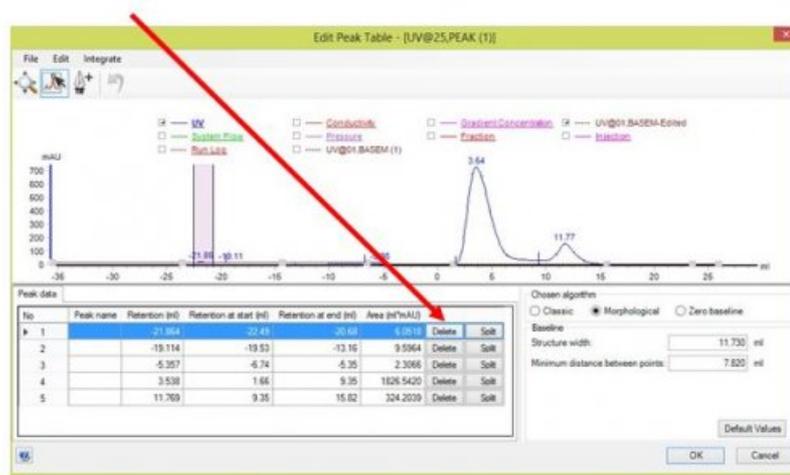


Obtention des aires des différents pics obtenus en UV

- Éditer les pics obtenus (Nommer et/ou éliminer certains pics)



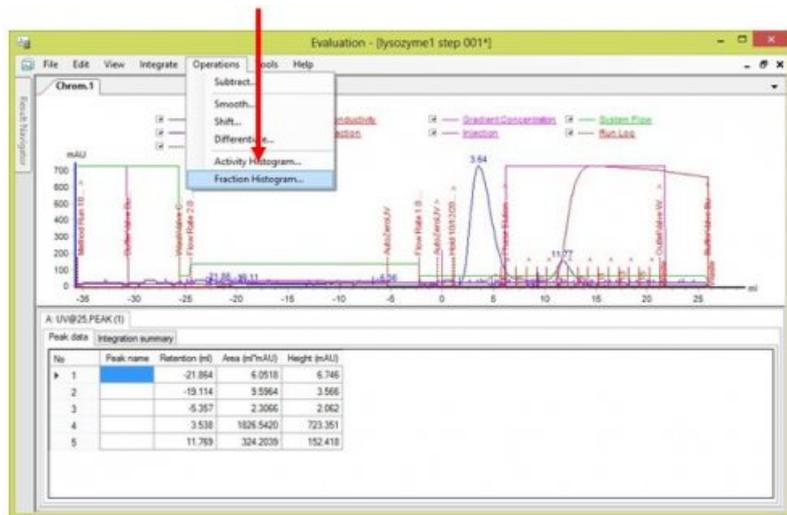
- Pour éliminer les pics non désirés



- Pour nommer les pics obtenus



- Trouver l'aire correspondant à chaque fraction
Operations>Fraction Histogram



Path length (cm)	Fraction	Start (min)	Stop (min)	Duration (min)	Area (mAU)	Ext. coef.	Conc.	Amount
T1		5.701	6.198	0.497	59.227			
T2		6.198	7.198	1.000	56.148			
T3		7.198	8.202	1.004	35.897			
T4		8.202	9.205	1.003	31.006			
T5		9.205	10.199	0.994	29.632			
T6		10.199	11.199	1.000	58.296			
T7		11.199	12.203	1.004	137.966			
T8		12.203	13.206	1.004	81.622			
T9		13.206	14.200	0.993	22.245			
T10		14.200	15.200	1.000	4.320			

o 7.4 Application « Administration »

Elle permet d'installer et de paramétrer le logiciel Unicorn®

Exemples de résultats obtenus :

[Feuille de résultats obtenus](#) (PDF de 62.9 ko)

Ce document contient des résultats expérimentaux obtenus par les étudiants de BTS 2ème année du lycée Valin à La Rochelle en avril 2016



**Académie
de Poitiers**

Avertissement : ce document est la reprise au format pdf d'un article proposé sur l'espace pédagogique de l'académie de Poitiers.

Il ne peut en aucun cas être proposé au téléchargement ou à la consultation depuis un autre site.