



Biotechnology ExplorerTM

Chromatographie d'exclusion

Manuel d'instructions

**Référence
166-0008-EDU**

<http://explorer.bio-rad.fr>



Pour le service technique, composez le 01.47.95.69.64

A l'attention de l'enseignant

L'un des plus grands défis pour ceux étudiant les biotechnologies pour la première fois, est que nombre des événements et des processus qu'ils étudient sont invisibles. Les produits Explorer de Bio-Rad offrent une solution unique. L'ensemble de nos kits éducatifs utilisent des molécules colorées ou fluorescentes de sorte que les processus biologiques qui sont étudiés sont clairement et facilement visualisés.

Le kit de Chromatographie d'exclusion (SEC) est conçu pour enseigner les techniques de base de la chromatographie par filtration sur gel. Ce kit utilise les molécules colorées d'hémoglobine et de vitamine B12 pour illustrer les principes de la SEC. Les élèves peuvent facilement visualiser la séparation de ces molécules lorsqu'elles traversent la colonne chromatographique.

Un guide d'enseignement complet

Développés sur cinq années, les kits Biotechnology Explorer ont été écrits pour des enseignants, par des enseignants et ils ont été intensivement testés sur le terrain dans un large éventail de salles de cours, du lycée à la faculté. Les kits Biotechnology Explorer qui sont faciles à utiliser, sont un moyen parfait d'introduire l'exaltation de la biotechnologie dans la salle de cours. Chaque kit contient un mode opératoire innovant étape par étape qui fait des kits le choix parfait pour des enseignants aussi bien expérimentés que débutants.

Le Guide de l'enseignant est divisé en trois parties. Une partie contient des informations sur le contexte, des sujets d'exposés et des suggestions d'exposés qui permettront à tout enseignant, qu'il soit expérimenté ou nouveau venu en terme de biotechnologie, de préparer et concevoir des exposés et des cours pouvant précéder les véritables travaux pratiques. Cette préparation préalable assurera virtuellement que les travaux pratiques fonctionneront en douceur et que les élèves comprendront les concepts inclus dans chaque TP. Il y a une partie détaillée qui porte sur la préparation d'un TP, complétée par des techniques simples qui contiennent des graphiques détaillant la préparation à l'avance des TP. Ceci permet de simplifier la préparation de chaque TP. En outre, cette partie contient des calendriers qui vous aideront à planifier votre emploi du temps. Chaque TP peut être réalisé pendant un cours de 50 minutes, ce qui devrait convenir à la plupart des emplois du temps.

Nous nous efforçons d'améliorer continuellement nos programmes de cours et nos produits. Votre contribution est très importante pour nous. L'incorporation de vos idées, commentaires, critiques et suggestions permettront de faire évoluer les produits Explorer en des aides éducatives encore meilleures.

Vous pouvez trouver le catalogue et le manuel sur internet. Consultez notre page d'accueil à <http://explorer.bio-rad.fr> ou appelez-nous au 01.47.95.69.65.

L'équipe Bio-Education
Bio-Rad division Bio-Recherche
3, bd Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette

Sommaire

	Page
Guide de l'enseignant	
Liste de contrôle pour l'inventaire du kit	2
Déroulement du TP	3
Introduction à la chromatographie	4
Principes de la SEC	5
L'échantillon—Hémoglobine et Vitamine B12	6
Liste de contrôle des postes de travail	8
Préparation préalable de travaux pratiques	9
Manuel de TP pour les enseignants	10
Guide rapide de travaux pratiques : Schéma du mode opératoire des TP	13

Objectifs de l'élève

- Comparer et opposer l'utilisation de différents types de chromatographie sur colonne dans la purification des protéines.
- Expliquer comment des protéines naturelles ou recombinées sont séparées et purifiées à l'aide de la chromatographie sur colonne.
- Discuter comment la structure et les propriétés chimiques des protéines concernent la purification à l'aide de la chromatographie sur colonne .
- Appliquer la méthode scientifique pour résoudre un problème*

* **Problème** : Est-ce que l'hémoglobine (masse moléculaire de 65000 daltons) peut être séparée de la vitamine B12 (masse moléculaire de 1350 daltons) par chromatographie par filtration sur gel?

Activités préalables aux travaux pratiques

Les activités suivantes sont recommandées avant de conduire une chromatographie :

1. Parcourir le cours de Biologie sur la structure des protéines.
2. Revoir la structure et la fonction de l'ADN ainsi que la synthèse des protéines.
3. Effectuer des recherches à la bibliothèque et en ligne sur les fonctions de quelques protéines courantes.

Exposé de faits dans le contexte

Notre corps contient des milliers de protéines différentes qui effectuent de nombreuses tâches différentes. Les enzymes digestives sont des protéines ; certains des signaux hormonaux qui circulent dans notre corps et les anticorps qui nous protègent contre des maladies sont des protéines. Les informations pour l'assemblage d'une protéine sont portées (sous forme de code) dans notre ADN. La partie de l'ADN qui contient le code pour fabriquer une protéine est appelée gène. Il y a des milliers de gènes sur chaque chromosome. Chaque gène code pour une protéine unique. Le gène qui fabrique une enzyme digestive dans votre bouche est différent de celui qui fabrique un anticorps.

Les protéines sont souvent des produits recherchés pour une utilisation dans un but médical. Certaines de ces protéines sont purifiées en grandes quantités à partir d'une source naturelle. Récemment, de nombreuses protéines destinées à un but médical ont été fabriquées par la technologie des modifications génétiques et de l'ADN recombiné. Quelle que soit la source, une protéine d'intérêt se trouve dans un mélange d'autres protéines de la cellule. Certaines cellules, telles que les bactéries, produisent de grandes quantités allant jusqu'à deux mille sortes différentes de protéines.

Du fait que 75 % de la matière sèche des organismes vivants est constitué de protéines, les biologistes doivent souvent purifier une protéine d'intérêt parmi les autres protéines dans une cellule. La détermination des techniques de purification d'une protéine particulière représente un défi pour l'industrie biotechnologique. Pour séparer une macromolécule quelconque, les scientifiques utilisent leurs connaissances de la chimie de ces molécules, y compris : la masse moléculaire de la protéine (taille), sa charge et sa forme.

Guide de l'enseignant

Liste de contrôle (✓) pour l'inventaire du kit

Cette partie liste les composants fournis dans le kit de chromatographie d'exclusion. Elle liste aussi les accessoires nécessaires. Chaque kit contient le matériel nécessaire pour équiper huit postes de travail. Utilisez ceci comme une liste de contrôle pour récapituler vos besoins avant de commencer les expériences.

Composition du coffret	Nombre/coffret	(✓)
Mélange de protéines Hémoglobine Vitamine B12	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Colonnes d'exclusion Poly-Prep®	8	<input type="checkbox"/>
Bouchons de colonne	25**	<input type="checkbox"/>
Tampon de colonne	50 ml	<input type="checkbox"/>
Pipettes (1 ml)	10	<input type="checkbox"/>
Tubes de prélèvement	100	<input type="checkbox"/>
Manuel et mode opératoire	1	<input type="checkbox"/>
** Des bouchons supplémentaires sont fournis dans le coffret.		
Accessoires nécessaires		
Support de tubes pour 12 tubes	8	<input type="checkbox"/>
Marqueur noir	8	<input type="checkbox"/>

Déroulement du TP

La session de ce TP est conçue pour être réalisée en une seule période de 50 minutes.

- Cours 1 Cours sur la chromatographie**
Cours sur l'hémoglobine, les érythrocytes, la vitamine B12, la biochimie des protéines. Analyse et questions de réflexion.
- Cours 2 Exécution des travaux pratiques**
- Cours 3 Analyse des résultats**
Questions sur l'analyse

Cours 1

Introduction à la chromatographie

Cette étude est destinée à enseigner les techniques de base de la chromatographie d'exclusion. Cette activité de TP s'intègre bien dans les cours de biologie basiques et supérieurs. Les deux molécules utilisées dans cette activité, l'hémoglobine et la vitamine B12, sont des composés essentiels à certaines fonctions du corps humain ; ainsi cette activité de TP peut être liée aux cours de base en biologie, physiologie humaine et biochimie.

Cette partie décrit les points expérimentaux et conceptuels qui peuvent se révéler être des défis pour des élèves. Ces points sont extrêmement importants pour le résultat global de cette activité. Les enseignants devront attirer l'attention de leurs élèves sur ces points et, lorsque c'est possible, faire une démonstration de la technique avant que les élèves commencent la manipulation.

La chromatographie est couramment utilisée en biotechnologie pour la purification de molécules biologiques, comme les protéines, pour un usage médical ou autre. La chromatographie sépare des composants individuels à partir de mélanges complexes. La chromatographie est constituée d'une phase mobile (le solvant et les molécules à séparer) et d'une phase stationnaire soit en papier (chromatographie sur papier) soit en billes de verre, appelée résine, (dans la chromatographie sur colonne), à travers laquelle la phase mobile progresse. Les molécules progressent à travers la phase stationnaire à des vitesses différentes selon leur chimie.

Quelques types courants de chromatographie

Dans la **chromatographie par filtration sur gel**, couramment appelée la **chromatographie d'exclusion (SEC)**, des billes microscopiques qui contiennent des petits trous sont tassées dans une colonne. Lorsqu'un mélange de molécules est dissous dans un liquide et ensuite appliqué sur une colonne de chromatographie qui contient des billes poreuses, les grosses molécules passent rapidement autour des billes, tandis que les molécules plus petites pénètrent dans les petits trous des billes et traversent la colonne plus lentement. Selon les molécules, les protéines peuvent être séparées, seulement d'après leur taille et les fractions contenant les protéines isolées peuvent être recueillies.

Dans la **chromatographie d'affinité**, une biomolécule (souvent un anticorps) qui se liera à la protéine à purifier est fixée sur les billes. Un mélange de protéines est ajouté à la colonne et la totalité traverse sauf la protéine d'intérêt qui se lie à l'anticorps et est retenue sur le support solide. Pour que la protéine s'élue de la colonne, un autre tampon est utilisé pour rompre la liaison entre la protéine d'intérêt et l'anticorps. Souvent ce tampon d'élution contient de fortes concentrations de sel ou d'acide.

Dans la **chromatographie sur échangeur d'ions**, les billes de verre de la colonne possèdent une charge (soit + soit -). Un mélange de protéines est ajouté à la colonne et la totalité traverse sauf la protéine d'intérêt. Ceci est dû au fait que la charge des billes est choisie pour avoir la charge opposée à la protéine d'intérêt. Si la charge des billes est positive, celles-ci se lieront à des molécules chargées négativement. Cette technique est appelée **l'échange d'anions**. Si les billes sont chargées négativement, elles se lient à des molécules chargées positivement (**échange de cations**). Ainsi, un scientifique choisit la résine à utiliser d'après les propriétés de la protéine d'intérêt. Au cours de la chromatographie, la protéine se lie aux billes de charge opposée. Après la séparation du contaminant de la protéine d'intérêt, un tampon très concentré en sel est utilisé pour que la protéine souhaitée s'élue de la colonne.

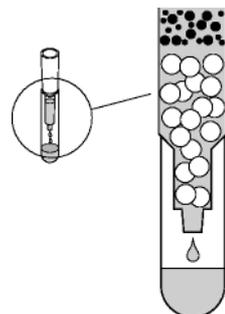
Ce kit est conçu pour enseigner les principes de base de la chromatographie d'exclusion (SEC), une technique qui permet la séparation de molécules d'après leur taille. Le kit utilise les molécules colorées d'hémoglobine et de vitamine B12 pour illustrer les principes de la SEC. L'hémoglobine (brun rougeâtre) est beaucoup plus grosse que la vitamine B12 (rose), et, ainsi, elle traverse la colonne plus rapidement que la vitamine B12. Les élèves peuvent facilement visualiser la séparation de ces molécules alors qu'elles traversent la colonne et passent dans des tubes de recueil.

Principes de la chromatographie d'exclusion (SEC)

La masse des billes au sein de la colonne est souvent appelée le **lit de la colonne**. Les billes agissent comme des “pièges” ou des “tamis” et ils fonctionnent pour filtrer les petites molécules qui sont temporairement emprisonnées au sein des pores. Les molécules plus grosses passent autour, ou sont exclues, des billes. Ce kit contient huit colonnes qui sont pré-remplies de billes qui séparent efficacement ou “fractionnent” les molécules qui sont inférieures à 60000 daltons. Alors que le liquide circule à travers la colonne, les molécules inférieures à 60000 daltons pénètrent dans les billes et traversent la colonne plus lentement. Plus les molécules sont petites, plus elles traversent lentement la colonne. Les molécules supérieures à 60000 daltons passent autour des billes et sont exclues de la colonne, ce qui est également appelé la **limite d'exclusion** de la colonne.

Le liquide utilisé pour dissoudre les biomolécules pour constituer la phase mobile, est généralement appelé un **tampon**. Le mélange des biomolécules dissoutes dans le tampon est appelé l'**échantillon**. L'échantillon est déposé sur le lit de la colonne et les biomolécules dans le tampon pénètrent par le haut du lit de la colonne, filtrent à travers et autour des billes poreuses et, finalement, passent à travers une petite ouverture au bas de la colonne. Pour compléter ce processus, du tampon supplémentaire est déposé sur le lit de la colonne après que l'échantillon a pénétré dans le lit. Le liquide de la phase mobile est recueilli, sous la forme de gouttes, dans des tubes de recueil qui sont placés dans un ordre séquentiel. Un nombre fixé de gouttes est habituellement recueilli dans chaque tube. Les molécules plus grosses qui traversent rapidement la colonne finiront dans les premiers tubes ou “**fractions**”. Les molécules plus petites qui pénètrent dans les pores de la phase stationnaire finiront dans les dernières fractions.

L'hémoglobine et la vitamine B12 sont les deux molécules qui sont séparées dans cette activité de TP. L'hémoglobine, qui est brune, a une masse moléculaire de 65000 daltons et, ainsi, elle est **exclue** de la colonne. L'hémoglobine traversera plus rapidement la colonne et apparaîtra dans les premiers tubes de recueil ou les premières **fractions**. La vitamine B12, qui est rose, a une masse moléculaire de 1350 daltons et ainsi, elle est **fractionnée** par la colonne. Les molécules de vitamine B12 pénètrent dans les pores des billes et sont temporairement emprisonnées. Il en résulte qu'elles traversent beaucoup plus lentement la colonne et apparaissent dans les dernières **fractions**. Le schéma ci-dessous illustre le fractionnement différentiel des grosses et des petites molécules sur une colonne d'exclusion.



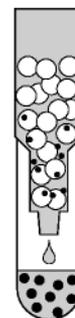
Un mélange de grosses et de petites protéines est appliqué sur une colonne de billes poreuses.

Fraction 1



Alors que le tampon circule vers le bas de la colonne, les petites molécules de protéines pénètrent dans les billes et sont ralenties.

Fraction 2



Les plus grosses molécules de protéines émergent en premier de la colonne.

Fraction 3

L'échantillon—Hémoglobine et Vitamine B12

Hémoglobine

L'hémoglobine, une protéine qui se trouve dans les érythrocytes, a pour fonction de transporter l'oxygène vers les tissus du corps. L'hémoglobine utilisée dans cette expérience est de l'hémoglobine bovine. L'utilisation d'hémoglobine bovine (plutôt que la contre-partie humaine) évite le risque sanitaire potentiel présenté lors de l'utilisation de produits sanguins humains. L'hémoglobine est constituée de quatre polypeptides (petites protéines) qui s'associent pour former une grosse protéine globulaire. L'hémoglobine tire son nom du groupe de l'hème, le composant de l'hémoglobine qui contient du fer et qui fixe physiquement l'oxygène. Le groupe de l'hème qui contient du fer est responsable de la couleur brun rougeâtre de l'hémoglobine. La protéine étroitement apparentée, la **myoglobine**, se trouve dans les muscles et est responsable de la délivrance de l'oxygène dans les tissus musculaires. Les muscles, qui sont très actifs et qui nécessitent beaucoup d'oxygène, sont de couleur sombre à cause de leur teneur élevée en myoglobine. Comme exemple, on peut citer la couleur brun rouge de la viande foncée du poulet.

L'hémoglobine est le composant principal des érythrocytes, les cellules du corps qui portent l'oxygène. De nouveau, c'est le groupe de l'hème de l'hémoglobine qui donne aux érythrocytes leur couleur rouge distinctive. Différentes formes d'hémoglobine sont produites au cours des différents stades du développement. Les fœtus produisent une forme d'hémoglobine qui possède une **affinité** plus grande (liaison plus étroite) pour l'oxygène que l'hémoglobine adulte. Parce que les fœtus dépendent de leur mère pour l'alimentation en oxygène, il est important que l'hémoglobine maternelle puisse abandonner facilement son oxygène à l'hémoglobine fœtale. Pour cette raison, les obstétriciens conseillent à leurs patientes d'éviter tout exercice intensif au cours de leur grossesse. Les exercices intensifs appauvrissent les tissus en oxygène, ce qui entraîne une compétition entre le transfert d'oxygène vers les tissus de la mère ou vers l'hémoglobine fœtale.

En plus de l'oxygène, l'hémoglobine peut également fixer le monoxyde de carbone. En fait, l'hémoglobine présente une affinité plus grande pour le monoxyde de carbone que pour l'oxygène. Une suffocation par le monoxyde de carbone survient lorsque l'oxygène lié à l'hémoglobine est déplacé par le monoxyde de carbone qui, à son tour, prive les tissus corporels d'oxygène.

Le corps peut s'adapter à des variations de l'environnement qui réclament des quantités accrues d'oxygène délivrées aux tissus. A haute altitude, où la quantité d'oxygène de l'air est diminuée, le corps répond en augmentant la production des érythrocytes. Ceci augmente efficacement le nombre de molécules d'hémoglobine présentes dans la circulation sanguine, ce qui a pour effet d'accroître l'alimentation en oxygène des tissus. Pour cette raison, les athlètes s'entraînent à haute altitude pour augmenter la quantité de leurs érythrocytes et ainsi augmenter leur capacité en oxygène, ce qui est nécessaire pour des exercices rigoureux.

La drépanocytose est une maladie moléculaire de l'hémoglobine. Un simple changement ou mutation dans le gène qui code pour l'hémoglobine produit une mutation de la séquence des acides aminés. Cette mutation modifie la structure tridimensionnelle des polypeptides de l'hémoglobine, ce qui les fait se "coller" ensemble sous la forme de structures en bâtonnets. Les molécules anormales en forme de bâtonnets de l'hémoglobine déforment la structure des érythrocytes, les faisant avoir une forme de **faucille**. A la différence de leurs contre-parties rondes, les érythrocytes falciformes ne peuvent pas traverser librement les lits de capillaires et, en conséquence, les lits de capillaires se retrouvent bloqués. Les lits de capillaires bloqués des organes et des tissus rendent difficile la délivrance de l'oxygène, entraînant une fatigue extrême et même la mort. Parce que la drépanocytose est un trouble génétique qui provient d'une séquence génétique mutée, il n'existe actuellement aucun traitement. Cependant, les effets secondaires de la drépanocytose peuvent être atténués par des transfusions fréquentes de sang provenant de personnes qui ont une hémoglobine et des érythrocytes normaux. La drépanocytose est une maladie génétique dans laquelle l'individu a hérité d'un gène de l'hémoglobine mutant défectueux de ses deux parents. Les individus souffrant du **trait drépanocytaire** ont reçu un gène anormal d'un seul de ses parents et l'anomalie simple confère vraiment un avantage évolutif. En Afrique, l'expression du gène de la drépanocytose est en corrélation positive avec les infections paludiques. Le paludisme est une maladie mortelle provoquée par un parasite porté par un moustique.

Le parasite infecte et finalement tue les érythrocytes. Le parasite peut infecter des érythrocytes normaux, mais il ne peut pas infecter des érythrocytes falciformes. Ainsi, le trait drépanocytaire aide à conférer une résistance au paludisme et produit une adaptation évolutive positive. Malheureusement, l'expression de deux copies du gène est délétère.

Vitamine B12

La vitamine B12 est une vitamine qui est essentielle aux hommes et à d'autres vertébrés. La vitamine B12 est un cofacteur essentiel de plusieurs réactions biochimiques qui se produisent dans le corps humain. Une fonction de la vitamine B12 est la rupture des graisses. Les sources riches en vitamine B12 comprennent les oeufs, les produits laitiers et les viandes. Il n'y a pas de vitamine B12 dans les plantes et les aliments à base de végétaux. Ainsi, les personnes qui suivent un régime végétarien strict présentent souvent des déficits en vitamine B12, à moins qu'ils prennent un complément vitaminique.

Les molécules pures de vitamine B12 ne peuvent pas être absorbées par les intestins. La vitamine B12 doit se lier à une protéine vectrice dans le tractus intestinal. Lorsque la vitamine B12 se lie à cette **protéine vectrice**, le complexe est capable de traverser les intestins et de pénétrer dans la circulation sanguine, où il est éventuellement absorbé par le foie.

Parce que les besoins en vitamine B12 sont minimes (l'homme a besoin de $\sim 3 \mu\text{g}/\text{jour}$), les déficits en vitamine B12 sont extrêmement rares. Cependant, certains individus souffrent d'un trouble génétique dans lequel le gène qui code pour la protéine vectrice est muté. Les individus portant cette mutation ne synthétisent pas la protéine vectrice nécessaire à l'absorption dans la circulation sanguine. Ainsi, même si ces personnes ingèrent des quantités adéquates de vitamine B12, ils présentent tout de même des signes de déficit parce qu'ils manquent de la protéine vectrice requise.

Liste de contrôle (✓) des postes de travail des travaux pratiques

Postes de travail des élèves. La liste indique le matériel et les consommables qui doivent être présents à chaque poste de travail des élèves avant de commencer toute expérience de TP. Les composants fournis dans ce kit sont suffisants pour 8 postes de travail d'élève.

Poste de travail (commun) de l'enseignant. La liste indique le matériel, les consommables et les instruments qui doivent être présents en un endroit commun accessible à tous les groupes d'élèves. C'est à l'enseignant de décider si les élèves peuvent accéder aux solutions communes ou s'il doit aliquoter les solutions.

Eléments des postes de travail des élèves	Nombre requis	(✓)
Tubes de recueil	12	<input type="checkbox"/>
Colonne de chromatographie d'exclusion	1	<input type="checkbox"/>
Bouchon de colonne	1	<input type="checkbox"/>
Pipette	1	<input type="checkbox"/>
Marqueur	1	<input type="checkbox"/>
Portoir de tubes à essai	1	<input type="checkbox"/>

Eléments du poste de travail de l'enseignant	Nombre requis	
Mélange de protéines	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Tampon de colonne	1 bouteille	<input type="checkbox"/>

Préparation préalable des travaux pratiques

Cette partie décrit la préparation qui doit être réalisée par l'enseignant avant les travaux pratiques. Une estimation du temps de préparation est indiquée dans chaque partie.

Préparation préalable

Objectifs	Réhydrater le mélange de protéines Préparer les postes de travail des élèves et de l'enseignant Photocopier les modes opératoires pour les élèves
Temps requis	Vingt minutes à 1 heure
Technique	Approximativement 15 minutes avant le début des travaux pratiques, utilisez l'une des pipettes fournies dans le kit et ajoutez 0,5 ml d'eau distillée dans le flacon du mélange de protéines. Mélangez doucement plusieurs fois au cours des 15 minutes qui suivent. Conservez le flacon sur de la glace ou dans le réfrigérateur jusqu'au début de l'expérience.

Cours 2 Travaux pratiques

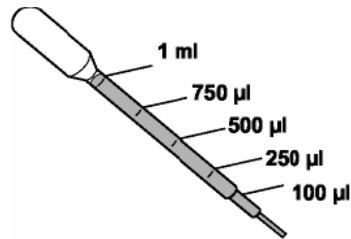
Manuel de TP pour les enseignants

Cette version du mode opératoire des TP contient des remarques détaillées et des astuces pour préparer et exécuter les TP.

Techniques à rappeler

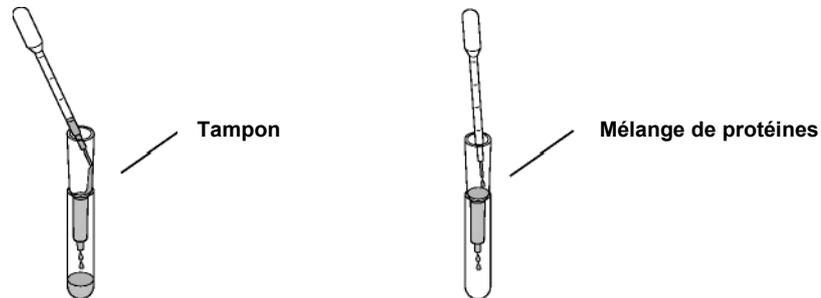
Pipetage

Avant de commencer l'expérience, faites remarquer aux élèves les graduations présentes sur la pipette. Les marques de 250 μl et de 1 ml seront utilisées pour les mesures dans cet exercice. Faites les élèves s'entraîner avec des volumes d'eau pour qu'ils s'habituent au pipetage de précision.



Chromatographie

Soulignez aussi qu'il est important de ne pas remuer le lit de la colonne. Lors du chargement de l'échantillon ou du tampon sur le lit de la colonne, la pipette doit être insérée près du lit contre la paroi de la colonne. Le liquide doit être expulsé en douceur de la pipette le long de la paroi de la colonne (pour le tampon) ou sur le dessus du lit (pour le mélange de protéines).



Points importants pour réussir une chromatographie

1. Brisez, ne tordez pas, la languette en bas de la colonne pré-remplie.
2. Placez doucement la colonne dans les tubes de recueil. Si vous enfoncez fermement la colonne dans les tubes de recueil, cela créera un joint étanche à l'air et l'échantillon ne circulera pas. Vous pouvez fabriquer un "support en papier" en pliant un petit morceau de papier, à peu près de la taille d'une allumette, et le coincer entre la colonne et le tube de recueil. Ce support empêchera la formation d'un joint étanche à l'air et assurera la circulation de la colonne.
3. Les colonnes sont conçues pour s'écouler lentement. La technique complète de la chromatographie doit durer 20 à 30 minutes. Il est important de ne pas retirer la colonne plus que nécessaire du recueil au tube de recueil, car tout mouvement peut gravement perturber le lit de la colonne.

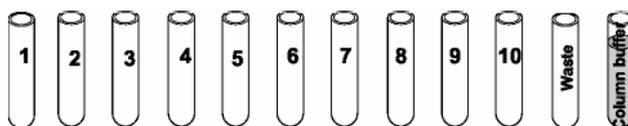
Préparation et exécution des TP

1. Chaque groupe d'élèves aura besoin de 12 **tubes de recueil**. Chaque groupe d'élèves doit numéroter séquentiellement 10 tubes de recueil de 1 à 10. Les deux derniers tubes sont étiquetés “déchets” et “tampon de colonne”. Placez les tubes sur le portoir. Inscrivez votre nom et la période des TP soit sur le portoir soit sur les tubes.
2. Pipetez 4 ml de **Tampon de colonne** dans le tube étiqueté tampon de colonne. Une seule bouteille de stock de tampon de colonne est fournie dans ce kit. L'enseignant peut aliquoter les 4 ml dans chacun des tubes étiquetés recueil ou un élève de chaque groupe peut aliquoter les 4 ml de tampon de colonne pour le groupe.
3. Les élèves doivent retirer le bouchon du dessus et briser l'extrémité de leur colonne d'exclusion Poly-Prep. Egouttez le tampon dans le tube de recueil “déchets”. Puis rebouchez le bas de la colonne avec le **bouchon de colonne**.
4. Placez la colonne sur le tube 1. Les élèves sont maintenant prêts à charger (ou l'enseignant peut choisir de charger) l'échantillon de protéines sur la colonne. Il y a un flacon de mélange de protéines dans le kit—le plus pratique peut être d'aborder chaque groupe d'élèves avec le flacon et de charger une goutte sur la colonne.
5. Les élèves doivent retirer le bouchon de la colonne. Observez le haut du lit de la colonne ; la totalité du tampon doit s'être écoulée de la colonne. Ceci s'observe mieux en regardant directement au-dessus de la colonne—l'aspect “granuleux” des billes de la colonne doit être visible. Si du tampon résiduel demeure en haut de la colonne, l'échantillon de protéines sera dilué lors de l'application d'une goutte, ce qui provoquera une séparation médiocre. Chargez soigneusement **une goutte** du mélange de protéines sur le haut du lit de la colonne. La pipette doit être insérée dans la colonne et la goutte doit être chargée juste au-dessus du haut du lit de la colonne de manière à ce que l'application de l'échantillon de protéines perturbe le lit de la colonne au minimum.
6. Laissez le mélange de protéines pénétrer dans le lit de la colonne. Ceci s'observe mieux en regardant directement au-dessus de la colonne. Puis, ajoutez soigneusement 250 µl de tampon de colonne sur le haut de la colonne. Ceci s'effectue mieux en insérant l'embout de la pipette dans la colonne de manière à ce qu'il repose juste au-dessus du lit de la colonne. Laissez soigneusement le tampon descendre le long du tube et sur le haut du lit. Commencez à recueillir les gouttes dans le tube n° 1.
7. Lorsque la totalité du liquide s'est écoulée de la colonne, ajoutez encore 250 µl de tampon de colonne sur le haut de la colonne. Ajoutez le tampon comme précédemment, en plaçant la pipette juste au-dessus du haut de la colonne et laissez le tampon descendre le long du tube. Continuez à recueillir les gouttes dans le tube 1. Vous n'avez pas besoin de compter le nombre de gouttes qui sont recueillies dans le tube 1.
8. Lorsque la totalité du liquide s'est écoulée de la colonne, ajoutez 3 ml de tampon de colonne sur le haut de la colonne. Ceci peut s'effectuer en ajoutant 1 ml trois fois avec la pipette. A ce moment-là, le mélange de protéines a pénétré assez loin dans la colonne pour que de légères perturbations du lit de la colonne n'affectent pas la séparation. Transférez la colonne dans le tube 2 et commencez à compter les gouttes qui pénètrent dans chaque tube. Recueillez 5 gouttes de tampon dans le tube 2. Recueillez 5 gouttes dans chaque tube, à l'exception du tube 10, dans lequel 10 gouttes seront recueillies. L'enseignant peut signaler que lorsqu'un élève charge la colonne, un autre élève peut compter les gouttes qui s'égouttent dans les tubes de recueil.

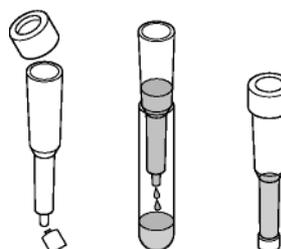
9. Lorsque 5 gouttes ont été recueillies dans le tube 2, transférez la colonne dans le tube 3. Recueillez 5 gouttes de tampon dans chaque tube de recueil. Lorsque 5 gouttes ont été recueillies dans un tube, sortez et transférez la colonne dans le tube suivant.
10. Continuez à recueillir 5 gouttes dans chaque tube. Lorsque vous parvenez au tube 10, recueillez un total de 10 gouttes. Après le recueil des 10 dernières gouttes, bouchez la colonne.
11. Les tubes de recueil contenant les fractions de la colonne peuvent être scellés avec un parafilm ou couverts et stockés dans le réfrigérateur. Si les tubes sont bien scellés, les fractions peuvent être stockées pendant ~ 1 semaine pour des observations/discussions ultérieures. La colonne peut être aussi bouchée avec les bouchons en haut et en bas et stockée dans le réfrigérateur pendant ~ 1 semaine.
12. Il peut être intéressant pour les élèves de comparer le mélange de départ aux fractions individuelles. Vous pouvez prendre le tampon de colonne restant et ajouter ~ 5 gouttes de mélange de protéines à la bouteille. Vous pouvez ensuite aliquoter 5 gouttes de ce “mélange de départ” dans chacun des tubes “déchets” des élèves. Les groupes d'élèves peuvent alors comparer le mélange de départ avec les échantillons fractionnés par taille.

Mode opératoire du TP Kit de chromatographie d'exclusion

1. Prenez 12 tubes de recueil et étiquetez-les séquentiellement de 1 à 10. Inscrivez votre nom et la période des TP sur les tubes. Étiquetez les deux derniers tubes “Déchets” et “Tampon de colonne”. A l'aide d'une pipette propre, transférez 4 ml de tampon de colonne dans le tube étiqueté “Tampon de colonne”.



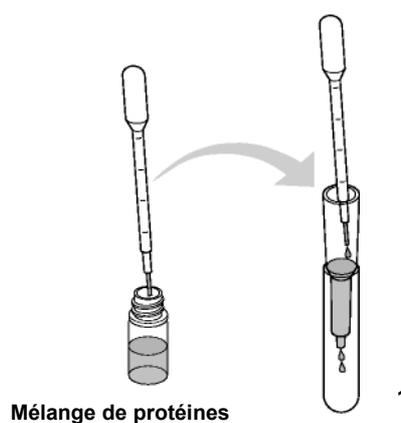
2. Retirez le bouchon et brisez l'extrémité de la colonne d'exclusion. Laissez la totalité du tampon s'écouler dans le tube des déchets. Observez la surface supérieure de la matrice et assurez-vous que la totalité du tampon a pénétré dans la colonne. En regardant directement au-dessus et dans la colonne, vous devriez voir l'aspect “granuleux” de la matrice de la colonne. Bouchez le bas de la colonne.



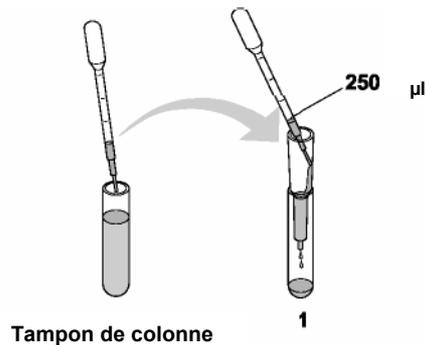
3. Insérez soigneusement la colonne dans le tube 1. Vous êtes à présent prêt à charger (ou l'enseignant peut charger) l'échantillon de protéines sur la colonne.



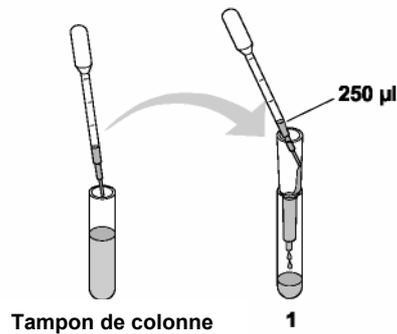
4. Lorsque vous êtes prêt à charger le mélange de protéines, débouchez la colonne. Il est important de ne déboucher la colonne que lorsque vous êtes prêt à charger vos protéines —sinon elle risquerait de sécher. A l'aide d'une pipette, ajoutez une goutte de mélange de protéines sur le dessus du lit de la colonne (votre enseignant peut réaliser le chargement pour vous). La pipette doit être insérée dans la colonne et la goutte doit être chargée juste au-dessus du haut de la colonne de manière à perturber le lit de la colonne au minimum.



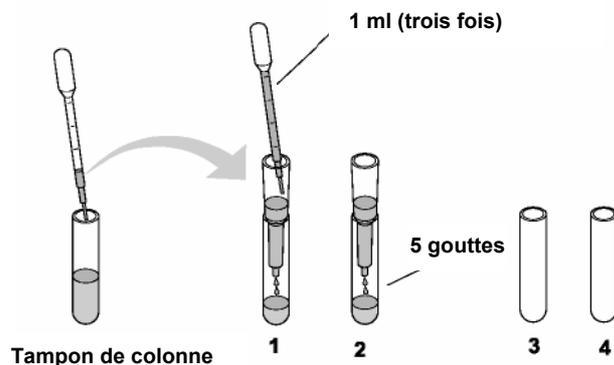
5. Dès que la goutte de mélange de protéines pénètre dans le lit de la colonne, ajoutez soigneusement 250 μ l de tampon de colonne sur le haut de la colonne. Ceci s'effectue mieux en insérant l'embout de la pipette dans la colonne de manière à ce qu'il repose au-dessus de la surface de la matrice de la colonne. Laissez soigneusement le tampon descendre le long du tube et sur le haut du lit. (Remarque : la séparation par taille fonctionnera mieux lorsque le lit de la colonne n'est pas perturbé). Commencez à recueillir les gouttes dans le tube 1.



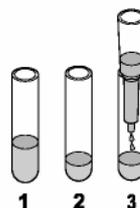
6. Ajoutez encore 250 μ l de tampon de colonne sur le haut de la colonne. Ajoutez le tampon comme précédemment, en plaçant la pipette juste au-dessus du haut de la colonne et en laissant le tampon descendre le long du tube. Continuez à recueillir les gouttes dans le tube 1.



7. Ajoutez 3 ml de tampon de colonne sur le haut de la matrice de la colonne. Ceci peut s'effectuer en ajoutant 1 ml trois fois avec la pipette. A ce moment-là, le mélange de protéines a pénétré assez loin dans la colonne pour que de légères perturbations du lit de la colonne n'affectent pas la séparation. Transférez la colonne dans le tube 2 et commencez à compter les gouttes qui pénètrent dans chaque tube. Recueillez 5 gouttes de tampon dans le tube 2.



8. Lorsque vous avez recueilli 5 gouttes dans le tube 2, transférez la colonne dans le tube 3. Recueillez 5 gouttes de tampon dans chaque tube de recueil. Lorsque vous avez recueilli 5 gouttes dans un tube, sortez et transférez la colonne dans le tube suivant.



9. Continuez à recueillir 5 gouttes dans chaque tube. Lorsque vous parvenez au tube 10, recueillez un total de 10 gouttes. Bouchez la colonne et si votre enseignant vous le demande, scellez avec un parafilm ou couvrez vos fractions jusqu'aux TP suivants. Stockez les fractions dans le réfrigérateur. Résumez vos résultats.

