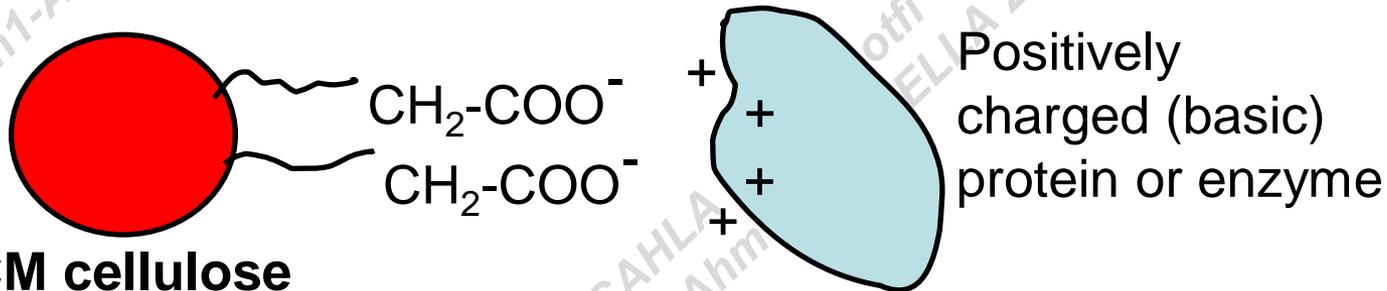


Chromatographie sur Colonne

- **mobile phase.**
- **stationary phase (resines)**
- La phase stationnaire a des caractéristiques physico-chimiques qui lui permettent d'interagir avec les protéines par différentes méthodes
 - **Echange d'ions**
 - **Hydrophobic**
 - **Gel de filtration**
 - **Affinité**

Ion exchange chromatography

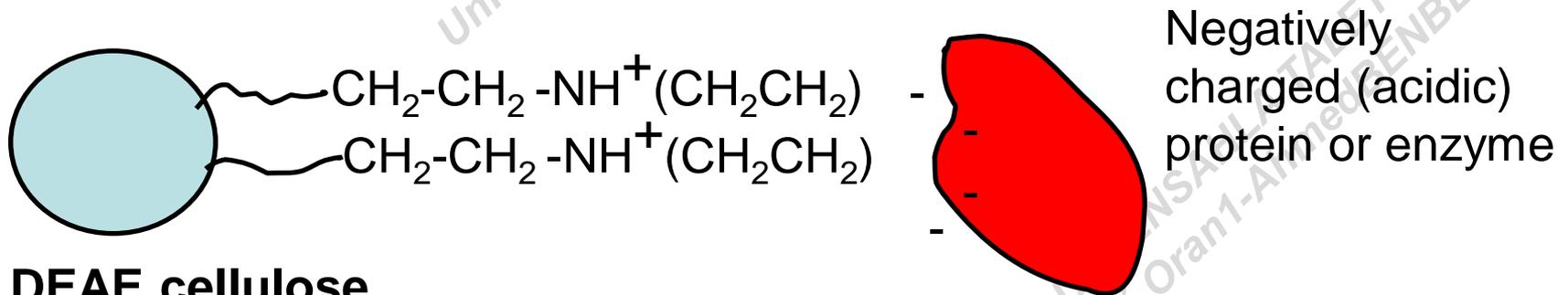
- L'échangeur d'ions contient des **groupes chargés**
- Si la nature de la resine est acide elle agira avec des protéines chargées positivement donc c'est une **échangeuse de cations**



CM cellulose

cation exchanger = échangeur de cation

- Si la nature de la resine est basique elle agira avec des protéines chargées négativement donc c'est une **échangeuse anions**



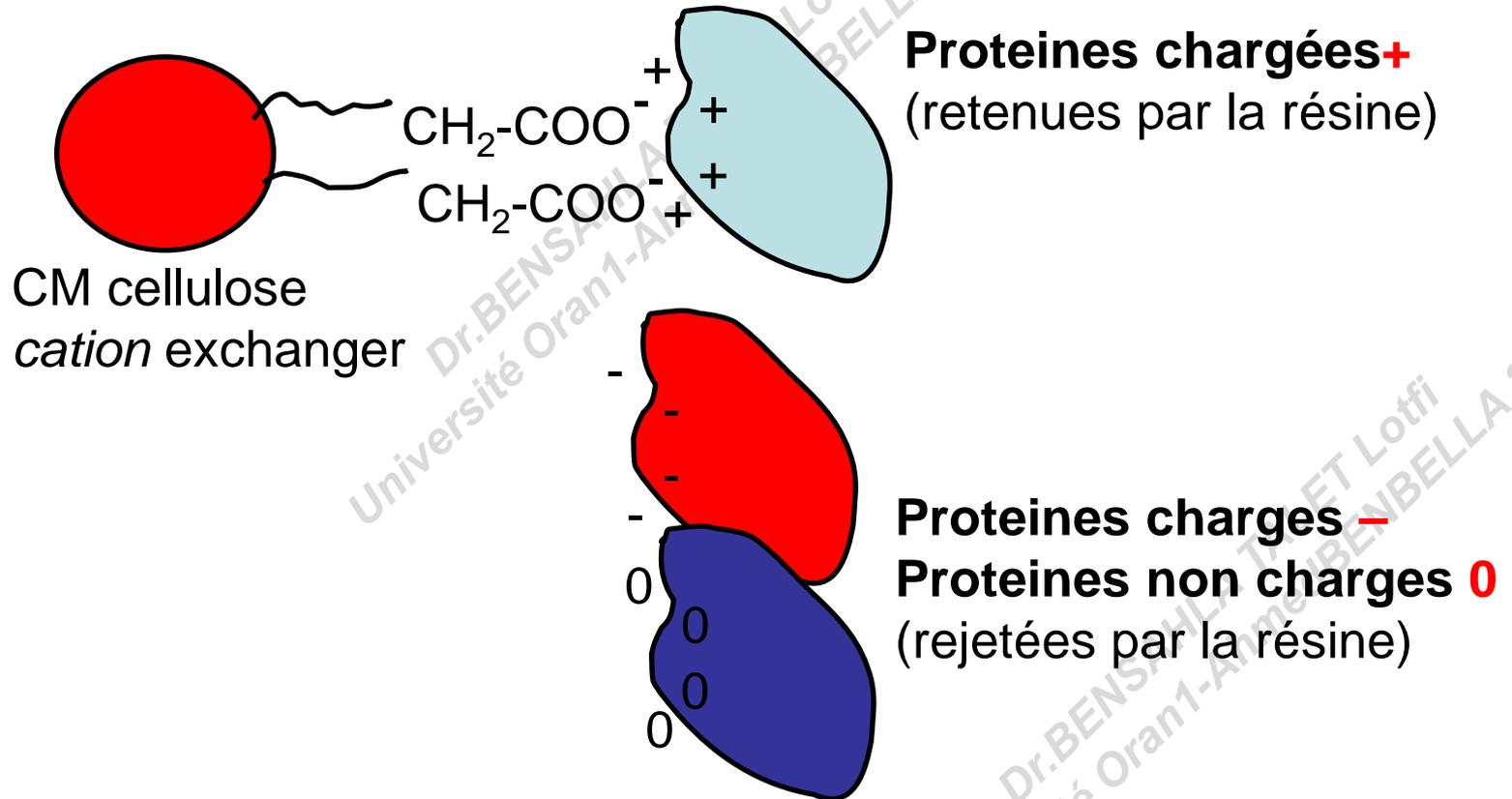
DEAE cellulose

anion exchanger = échangeur d'anion

Ion exchange chromatography

chromatographie échangeuse d'ions

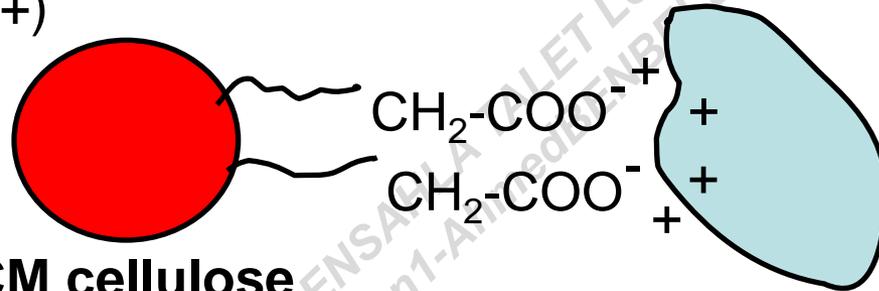
Pour lier les protéines, le pH est fixé près de la neutralité



Ion exchange chromatography

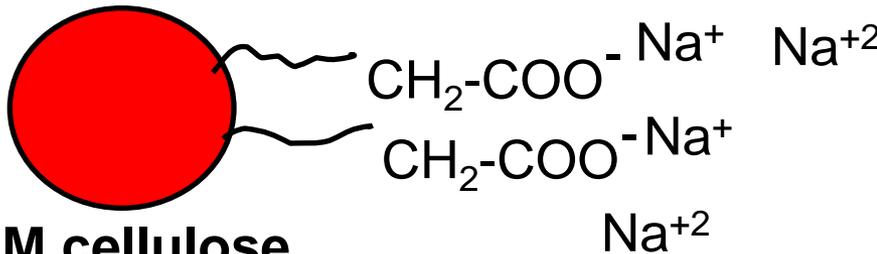
Pour eluer une protein on ajoute des concentrations croissants en sel ou on change de pH (decroissant ou croissant)

exp: Na^+ agit avec le cation de la resine et Cl^- agit avec notre protein charged positive (+)

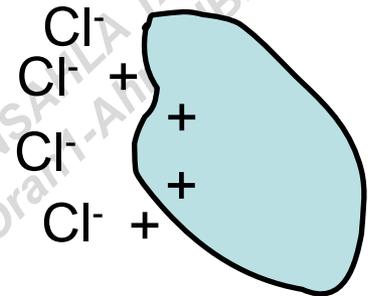


CM cellulose
cation exchanger

+++++[NaCl] de la solution d'elution



CM cellulose
cation exchanger



Etapes de la chromatographie échangeuse d'ions *exp: proteines*

- 1-choix de la résine : **R+** ou **R-**
- 2-choix du pH pour fixer l'ensemble des proteines
- 3-variance du ph (croissant/décroissant)
- 4-elution: ordre;1;2;3.....n

Quelques échangeurs d'ion très utilisés

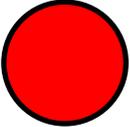
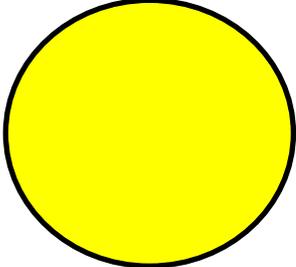
Name ^a	Type	Ionizable group	Remarks
DEAE-cellulose	Weakly basic	Diethylaminoethyl —CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Used to separate acidic and neutral proteins
CM-cellulose	Weakly acidic	Carboxymethyl —CH ₂ COOH	Used to separate basic and neutral proteins
P-cellulose	Strongly and weakly acidic	Phosphate —OPO ₃ H ₂	Dibasic; binds basic proteins strongly
Bio-Rex 70	Weakly acidic, polystyrene-based	Carboxylic acid —COOH	Used to separate basic proteins and amines
DEAE-Sephadex	Weakly basic cross-linked dextran gel	Diethylaminoethyl —CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Combined chromatography and gel filtration of acidic and neutral proteins
SP-Sepharose	Strongly acidic cross-linked agarose gel	Methyl sulfonate —CH ₂ SO ₃ H	Combined chromatography and gel filtration of basic proteins
CM Bio-Gel A	Weakly acidic cross-linked agarose gel	Carboxymethyl —CH ₂ COOH	Combined chromatography and gel filtration of basic and neutral proteins

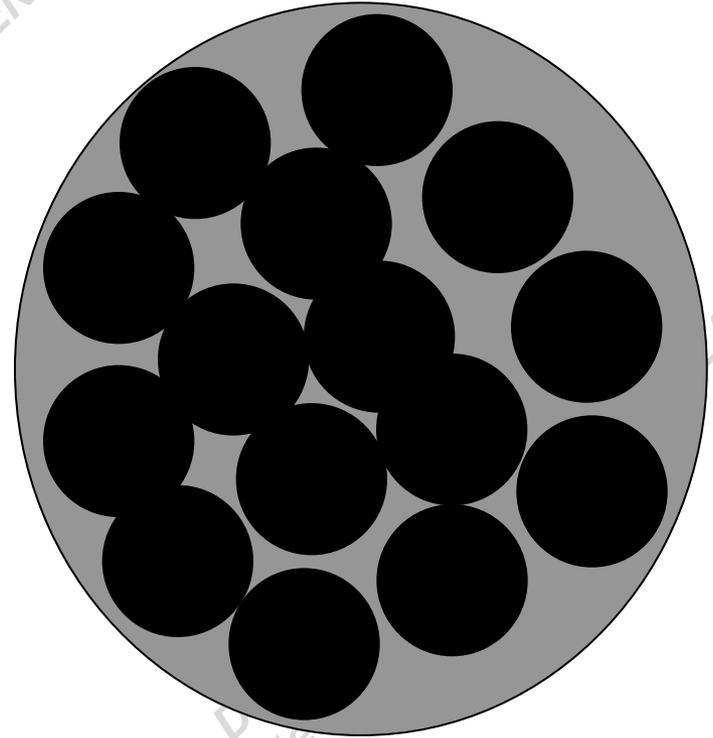
^aSephadex and Sepharose gels are manufactured by Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey; Bio-Rex resins and Bio-Gels are manufactured by BioRad Laboratories, Hercules, California.

Gel filtration chromatography

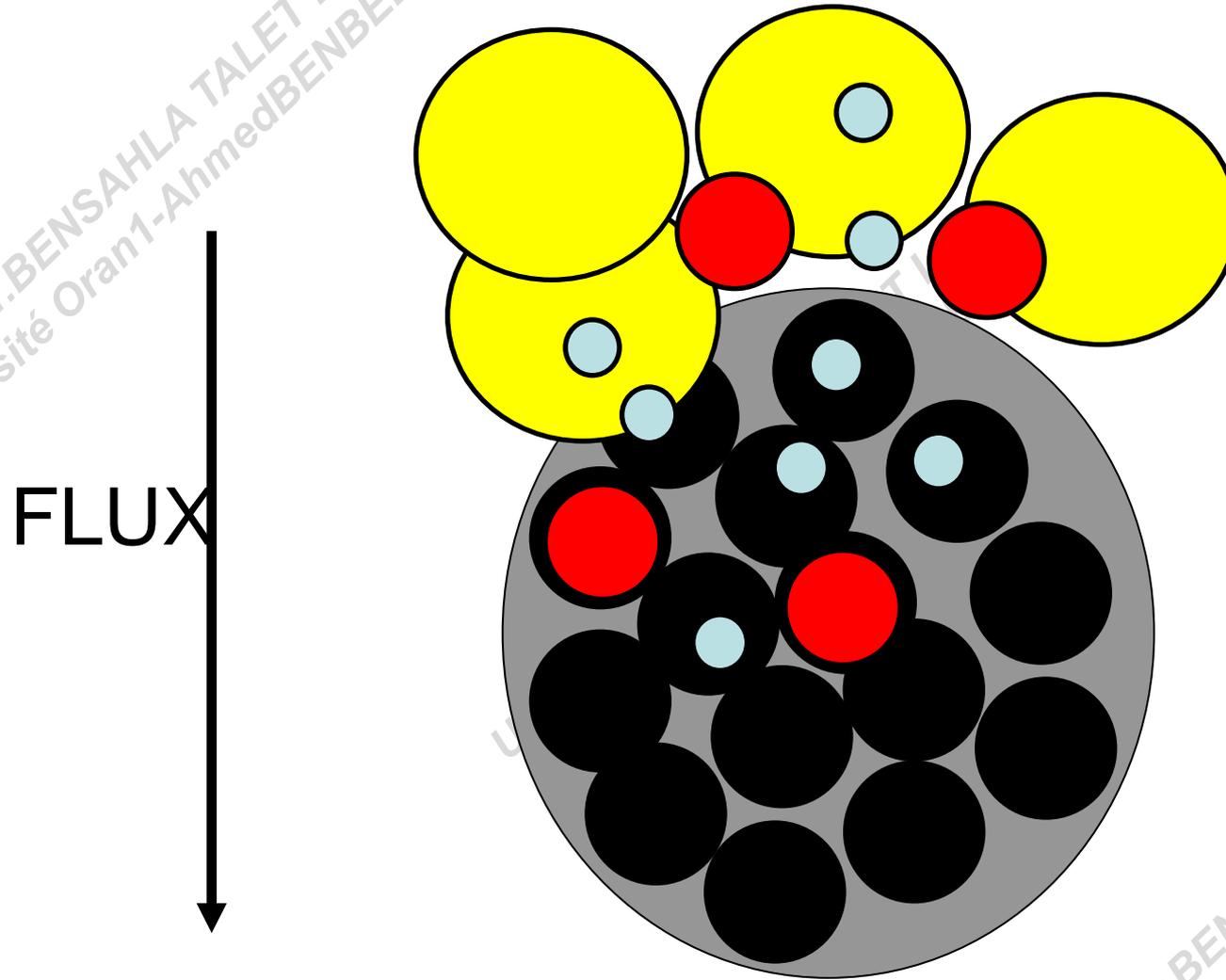
- ✓ **Chromatographie sur Gel de filtration**
- ✓ **Exclusion moléculaire**
- ✓ **Tamis moleculaire**

Gel filtration chromatography

<u>Size/Taille</u>	<u>Masse moléculaire</u> (daltons)
	10,000
	30,000
	100,000



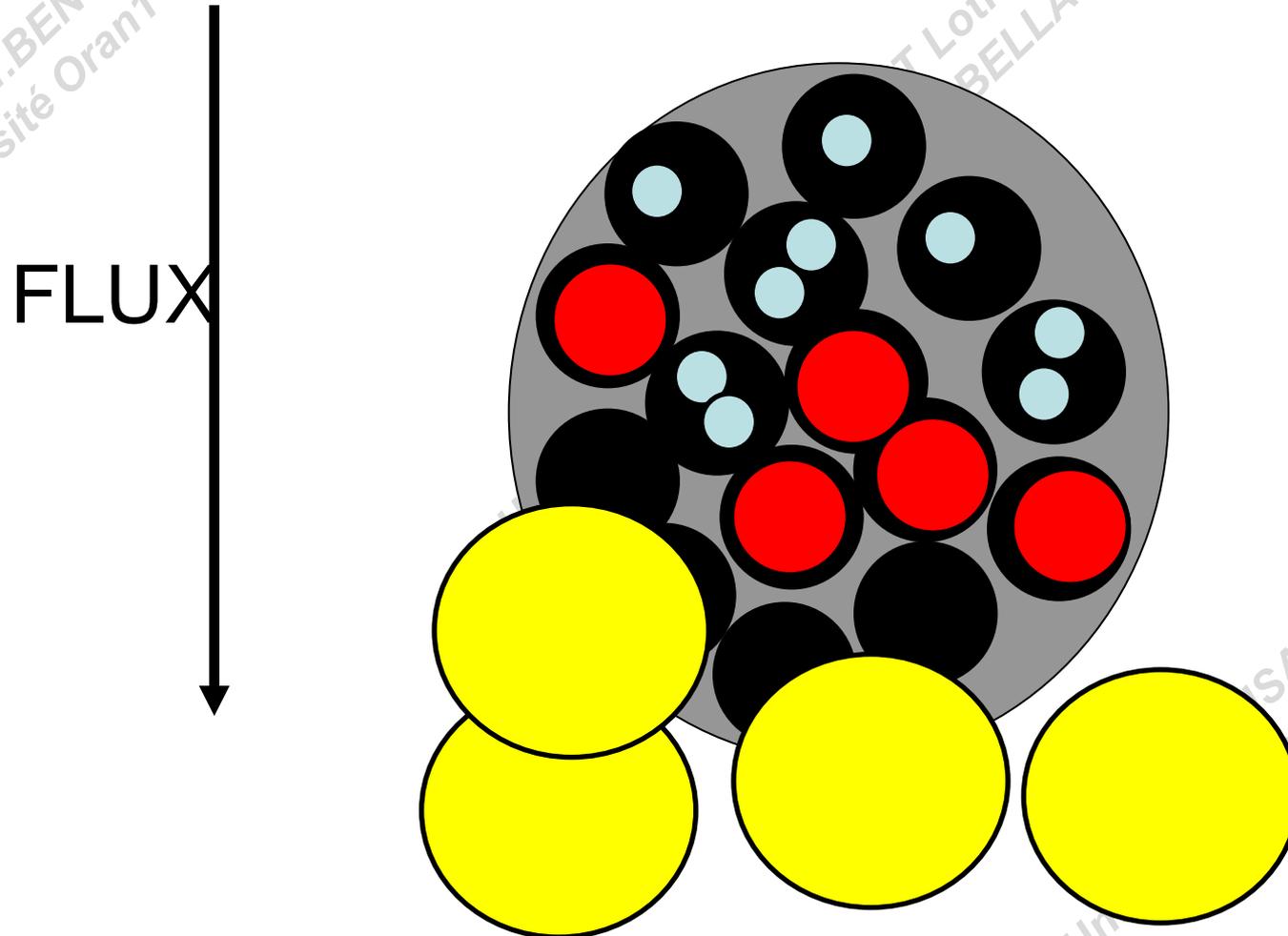
Gel filtration chromatography



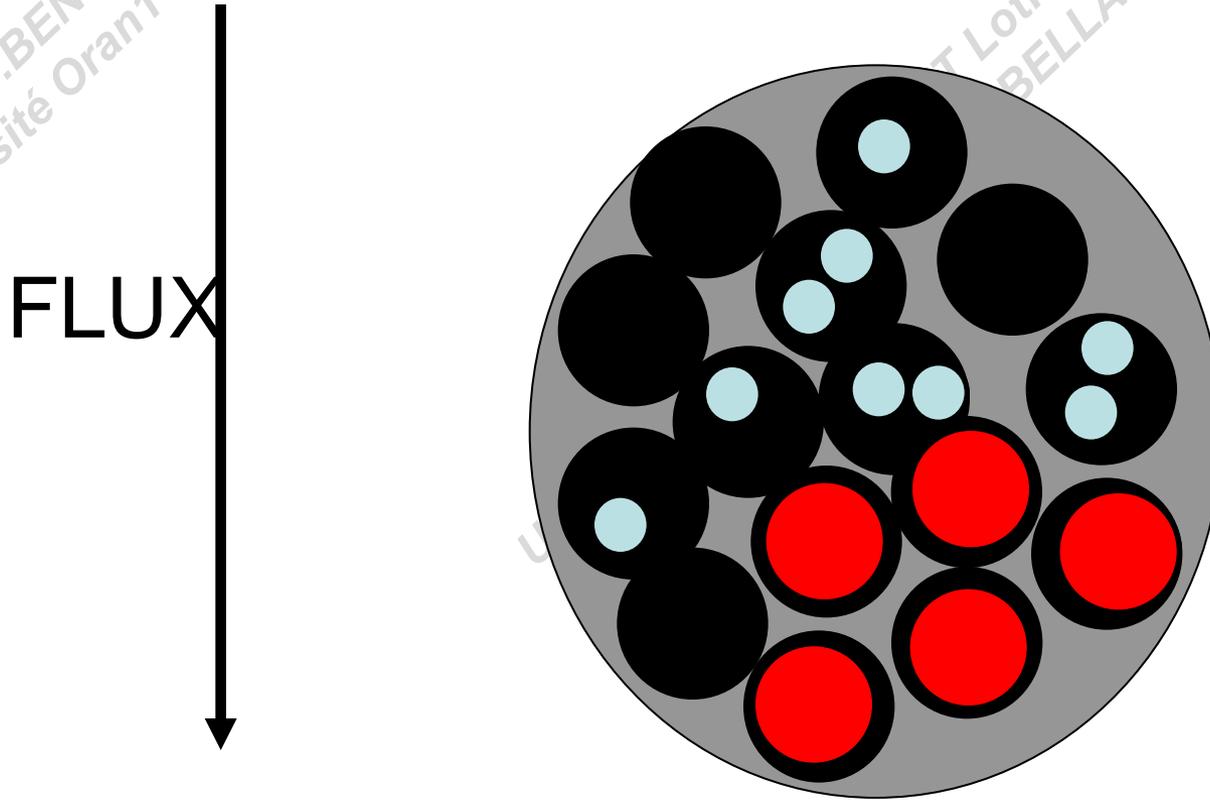
Dr.BENSAHLA TALET Lotfi
Université Oran1-AhmedBENBELLA 2017

Dr.BENSAHLA TALET Lotfi
Université Oran1-AhmedBENBELLA 2017

Gel filtration chromatography



Gel filtration chromatography

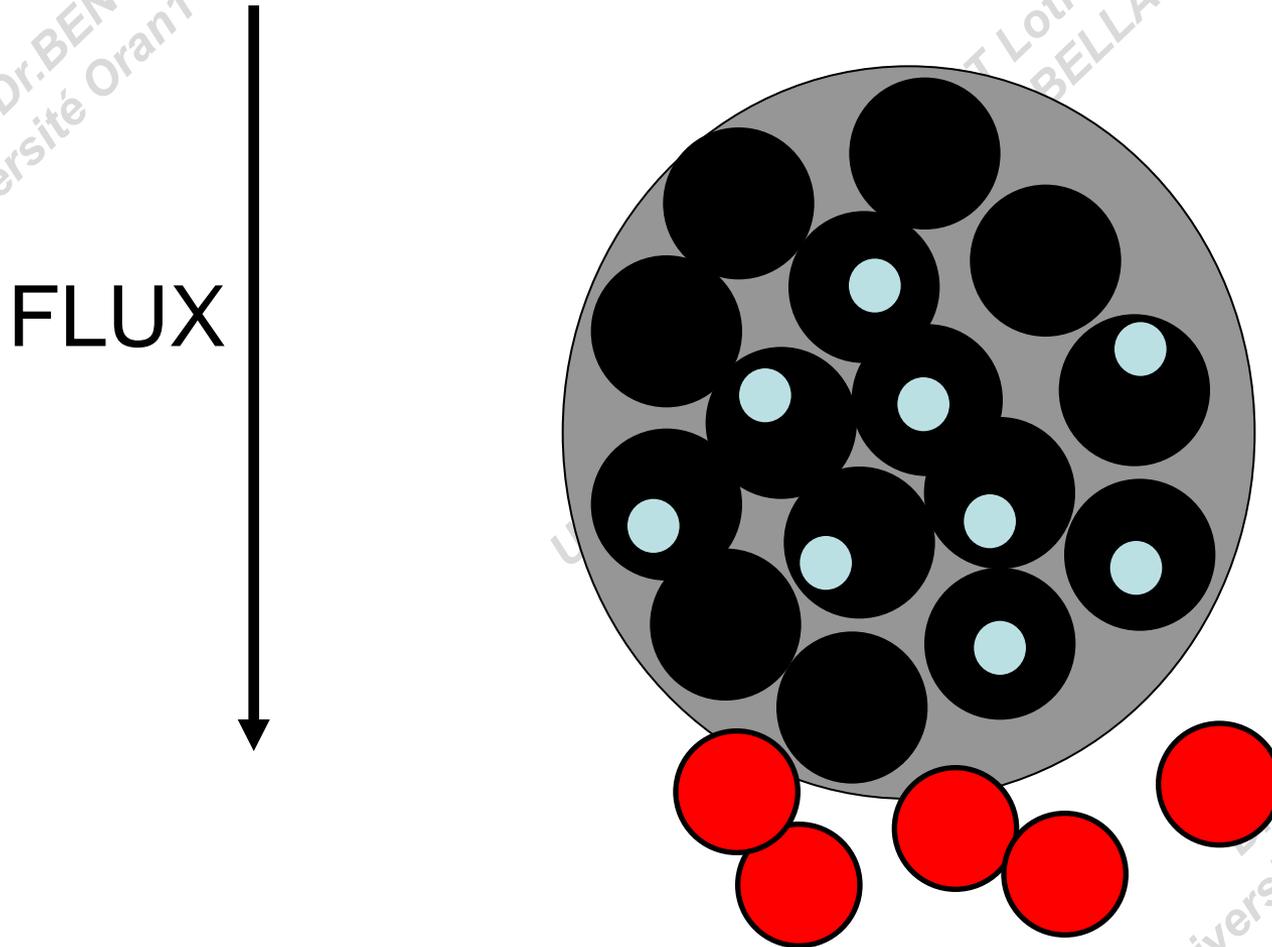


Dr.BENSAHLA TALET Lotfi
Université Oran1-AhmedBENBELLA 2017

Dr.BENSAHLA TALET Lotfi
Université Oran1-AhmedBENBELLA 2017

Dr.BENSAHLA TALET Lotfi
Université Oran1-AhmedBENBELLA 2017

Gel filtration chromatography

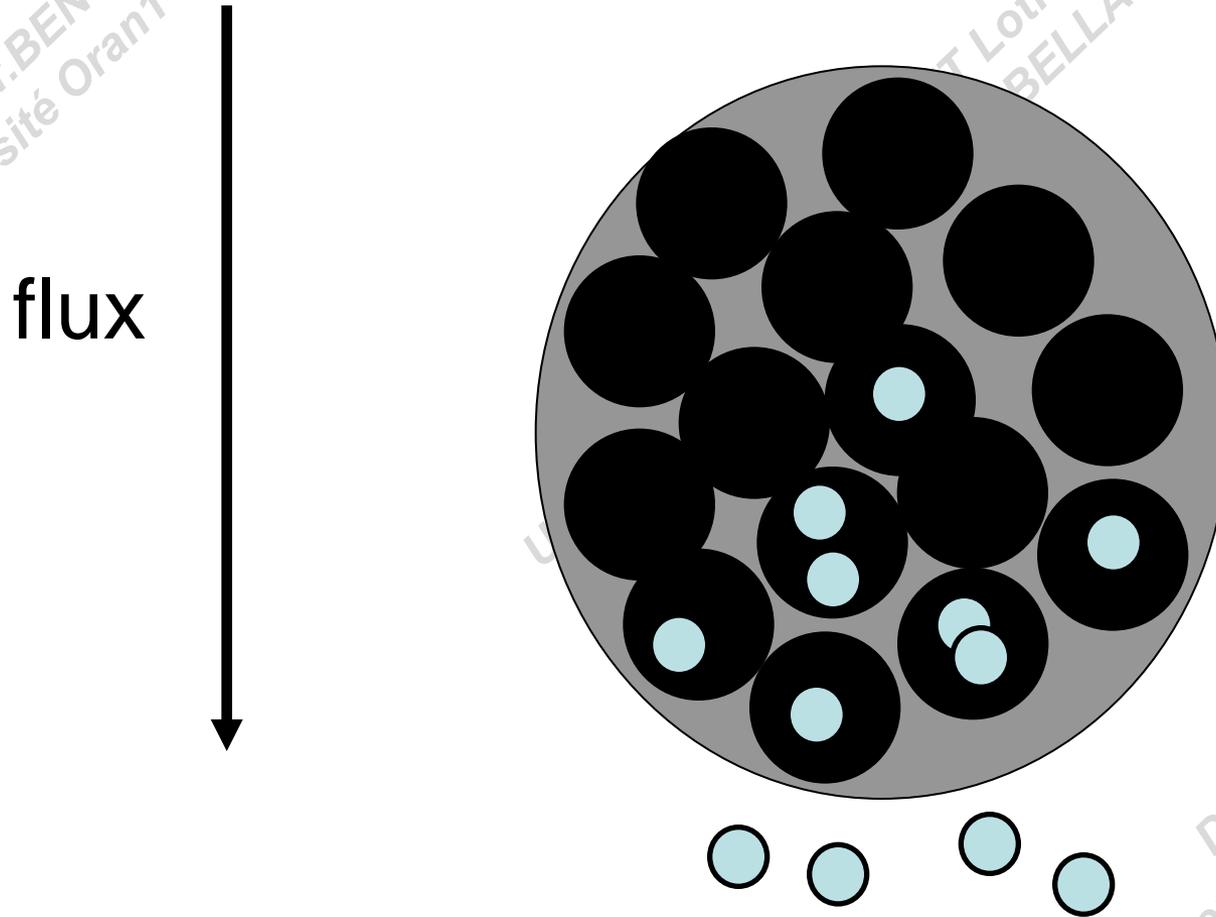


Dr.BENSAHLA TALET Lotfi
Université Oran1-AhmedBENBELLA 2017

Dr.BENSAHLA TALET Lotfi
Université Oran1-AhmedBENBELLA 2017

Dr.BENSAHLA TALET Lotfi
Université Oran1-AhmedBENBELLA 2017

Gel filtration chromatography



Dr.BENSAHLA TALET Lotfi
Université Oran1-AhmedBENBELLA 2017

Dr.BENSAHLA TALET Lotfi
Université Oran1-AhmedBENBELLA 2017

Dr.BENSAHLA TALET Lotfi
Université Oran1-AhmedBENBELLA 2017

Gel filtration chromatography

La masse moléculaire de la plus petite molécule incapable de pénétrer dans le gel est considérée comme la **limité d'exclusion** de la chromatographie

Gel filtration chromatography

- **Volume d'Elution** (V_e) c'est le volume du solvant necessaire pour faire sortir un compose donné de la colonne
- Les molécules dont le poids est inferieur à la limite d'exclusion du gel seront éluées en ordre décroissant avec les plus grandes qui descendent en premier de la colonne

Figure 6-9 Gel filtration chromatography.

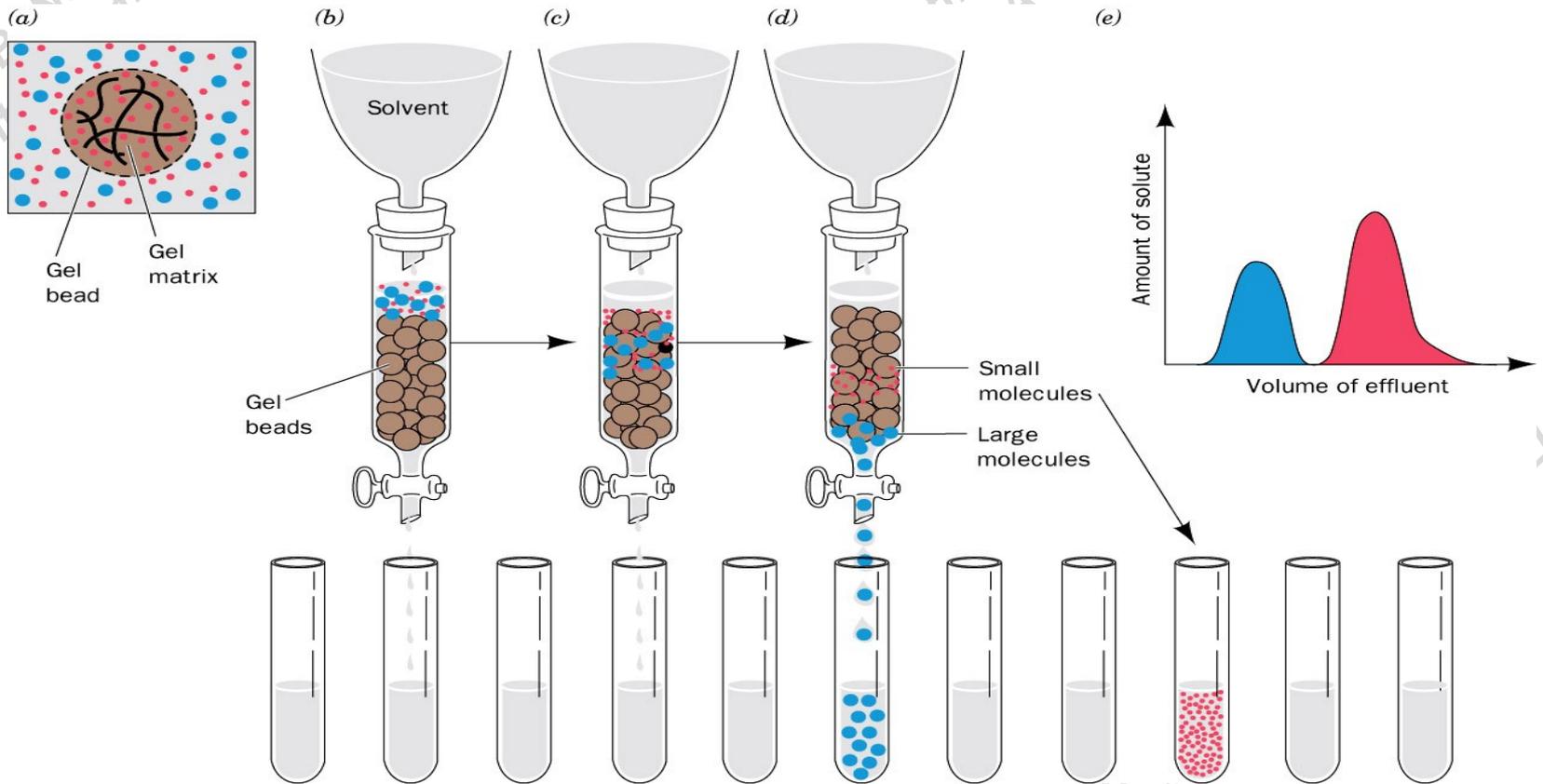
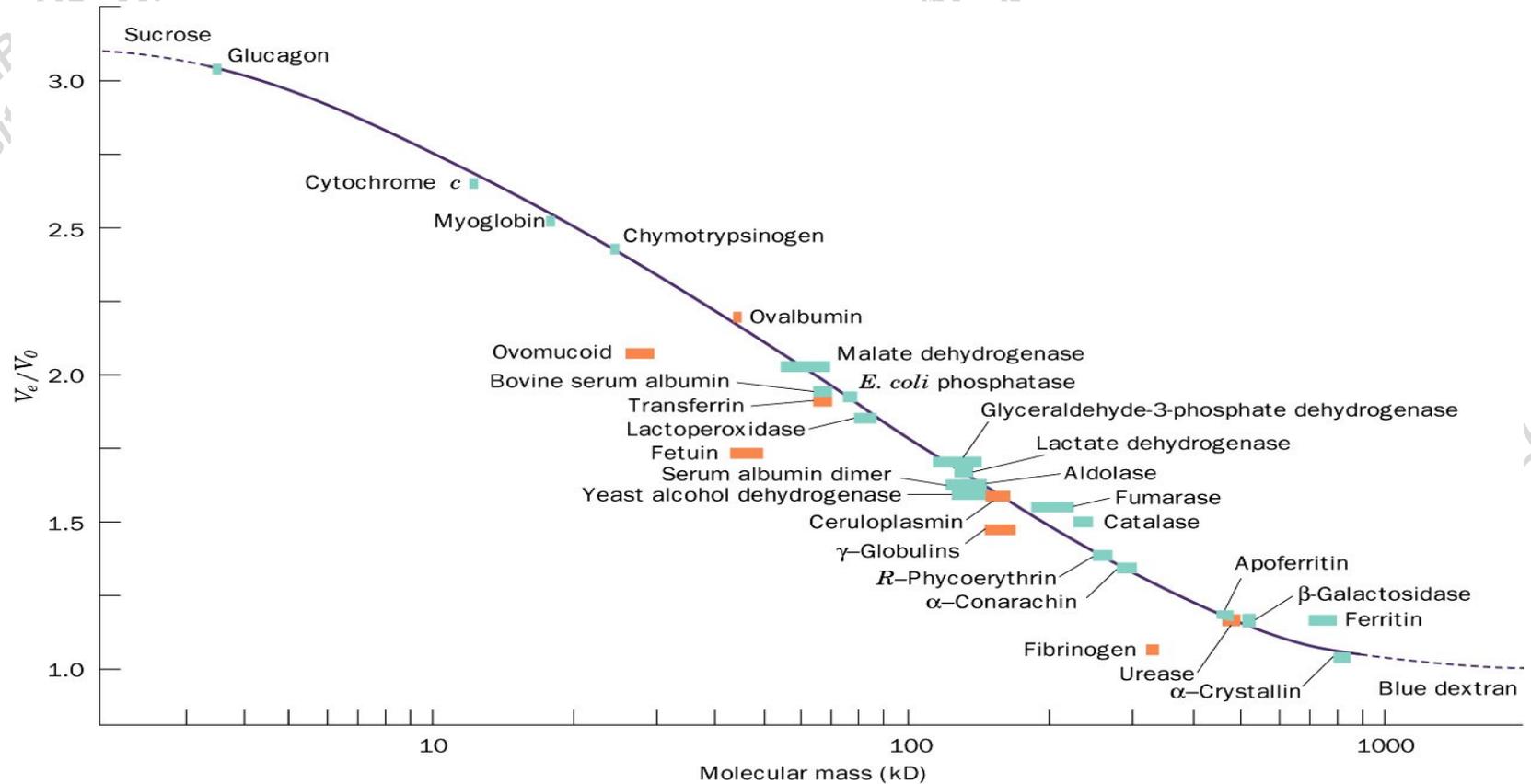


Figure 6-10 Molecular mass determination by gel filtration chromatography.



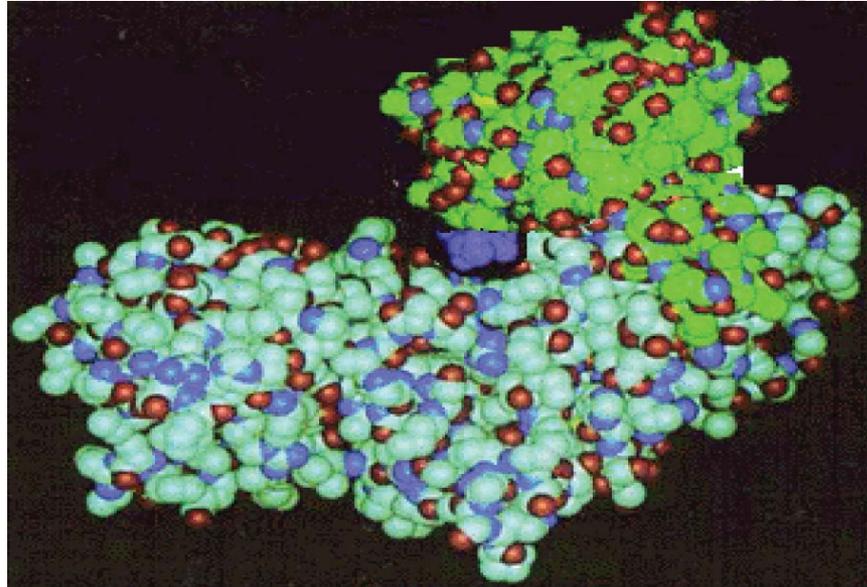
Quelques gels de filtration utilisés pour le tamis moléculaire

Name ^a	Type	Fractionation Range (kD)
Sephadex G-10	Dextran	0.05–0.7
Sephadex G-25	Dextran	1–5
Sephadex G-50	Dextran	1–30
Sephadex G-100	Dextran	4–150
Sephadex G-200	Dextran	5–600
Bio-Gel P-2	Polyacrylamide	0.1–1.8
Bio-Gel P-6	Polyacrylamide	1–6
Bio-Gel P-10	Polyacrylamide	1.5–20
Bio-Gel P-30	Polyacrylamide	2.4–40
Bio-Gel P-100	Polyacrylamide	5–100
Bio-Gel P-300	Polyacrylamide	60–400
Sepharose 6B	Agarose	10–4,000
Sepharose 4B	Agarose	60–20,000
Sepharose 2B	Agarose	70–40,000
Bio-Gel A-5	Agarose	10–5000
Bio-Gel A-50	Agarose	100–50,000
Bio-Gel A-150	Agarose	1000–150,000

^aSephadex and Sepharose gels are products of Amersham Pharmacia Biotech; Bio-Gel gels are manufactured by BioRad Laboratories.

Affinity chromatography

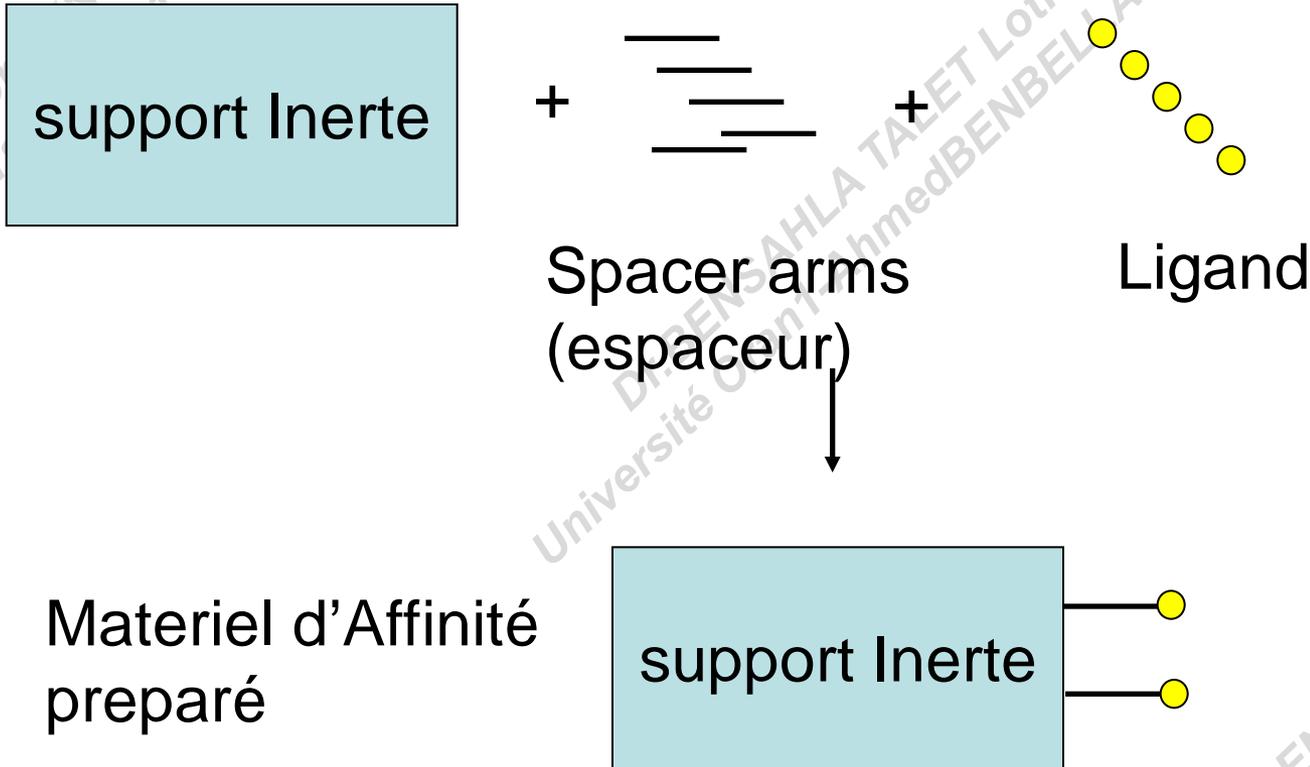
- Many proteins can bind specific molecules very tightly but noncovalently.
- We can use this to our advantage with **affinity chromatography**.



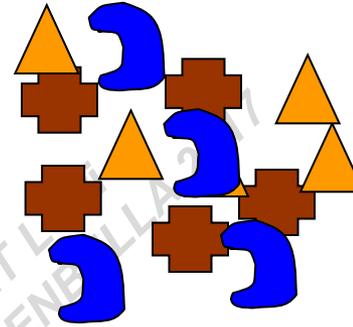
Glucose (small dark blue molecule) binding to hexokinase.
The enzyme acts like a jaw and clamps down on the substrate (glucose)

Affinity chromatography

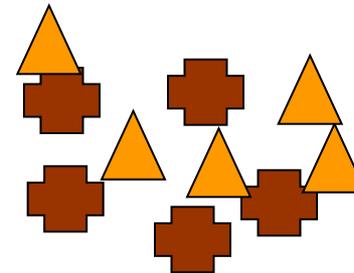
- How does it work?
- **Ligand** – molecule qui se lie specifiquement à la proteine



Affinity chromatography



Mélange de protéines



Protéines non retenues

Affinity chromatography



Elué avec un ligand compétitif



Detaché du ligand
compétitif par dialyse

Affinity chromatography

Pour détacher la protéine voulue:

- utilise un solution contenant un ligand compétitif
- on change: pH, temp ou force ionique.....qui destabilise le complexe proteine-ligand facilement eluable

Chromatographie d'Immunoaffinité

- Anticorps monoclonaux peuvent être attachés à la colonne
- Seront liées seulement les protéines vers lesquelles les AC ont été dirigés

Inconvénients

- -difficile d'obtenir des AC monoclonaux
- -conditions difficiles pour détacher la protéine liée

Dialyse

- **Dialyse**-un process qui separe les molecules selon la taille en utilisant des membranes semipermeables contenant des pores
- **Pores** permettent aux solvants, sels et les petits metabolites de diffuser mais bloquent les grosses molecules.
- Le Cellophane (cellulose acetate) est le materiau le plus utilise

Utilisation de la dialyse pour separer les petites et grosses molecules.

(a) At start of dialysis

(b) At equilibrium

