

Protocole

Purification de la GFP d'un lysat d'*E Coli* par chromatographie sur colonne

1. Préparation de la colonne de chromatographie (30')

**Tâche 1 : Placer votre tube de lysat d'*E Coli* sous la lampe UV.
Noter vos observations**

- 1.1 Centrifuger le tube de lysat bactérien 10 minutes à 13000 rpm (rotations par minute).

Préparation de la colonne

- 1.2 Agiter la colonne de chromatographie fermée (30sec) pour remettre le gel en suspension.
- 1.3 Attendre 2 minutes que le gel resédimente.
- 1.4 Ouvrir la colonne de chromatographie d'abord en haut puis ensuite en bas.
- 1.5 Laisser le liquide s'écouler complètement de la colonne.
- 1.6 Déposer 2 mL de tampon d'équilibration (EB) en le laissant s'écouler le long des parois de la colonne.
- 1.7 Laisser le tampon d'équilibration s'écouler jusqu'à la marque « 1mL » de la colonne.
- 1.8 Fermer la colonne en haut et en bas.
- 1.9 Sortir votre tube de la centrifugeuse.



**Tâche 2 : Placer votre tube contenant le lysat d'*E Coli* qui a été centrifugé sous la lampe UV sans remettre en suspension le culot.
Noter vos observations.**



- 1.10 Pipeter 250 µl de surnageant de votre tube de lysat d'*E Coli* centrifugé (BL) et les placer dans le tube jaune contenant 250µL de tampon de fixation (BB).

- 2.1 Numéroté quatre tubes de récupération: FT, W1, E1, E2

- 2.2 Ouvrir votre colonne de chromatographie et laisser le liquide s'écouler jusqu'à ce que la colonne soit vide.

- 2.3 Placer votre colonne sur le tube FT.



Attention à ne pas agiter votre colonne pour ne pas perturber la phase stationnaire.

- 2.4 Prélever 250µl de lysat bactérien dilué présent dans le tube jaune (BB) et les placer dans la colonne juste au dessus de la phase stationnaire.

- 2.5 Laisser le liquide s'écouler jusqu'à ce que la colonne soit vide.

Tâche 3 : Placer votre colonne sous la lampe UV.

Noter vos observations.

- 2.6 Placer la colonne de chromatographie sur le tube W1.

- 2.7 Déposer 750µl de tampon de lavage (WB) dans la colonne juste au dessus de la phase stationnaire.

Tâche 4 : Placer votre colonne sous la lampe UV.

Noter vos observations.

- 2.8 Placer la colonne de chromatographie sur le tube E1.

- 2.9 Introduire à la pipette 750µl de tampon d'éluion (EL) dans la colonne juste au dessus de la phase stationnaire.

Tâche 5 : Durant l'éluion, placer votre colonne sous lampe UV.

Noter vos observations!

- 2.10 Placer la colonne sur le tube E2 dès que la GFP arrive dans la bas de la colonne de chromatographie



Les tubes FT, W1, E1 et E2 seront conservés à -18 ° C jusqu'à ce qu'ils soient utilisés pour le contrôle de la pureté par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Protocole

Vérification de la pureté de la GFP par électrophorèse SDS-Page

1. Préparation des échantillons pour l'électrophorèse SDS PAGE

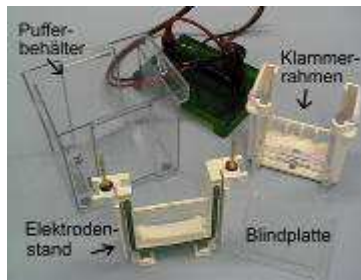
- 1.1 Pipeter 20µl des tubes BL, W1, E1 et E2 dans de nouveaux tubes étiqueter de façon identique.
- 1.2. Ajouter 20µl de tampon Lämmli dans ces nouveaux tubes.
- 1.3. Mélanger le contenu des tubes.

2. Préparation des plaques de gel.

- 2.1 Ouvrir l'emballage du gel PAGE en coupant le long de la ligne noire et prendre la plaque de gel.
- 2.2 Couper avec un scalpel (ou une lame de rasoir) la bande de la plaque de gel le long de la ligne marquée et retirer la bande inférieure.

3. Préparation de la cuve d'électrophorèse.

- 3.1. Mettre la plaque de gel avec la plus petite plaque de verre vers l'intérieur dans le support d'électrode. Ajouter de l'autre côté une autre plaque de gel ou une plaque de verre.



- 3.2. Placer le support d'électrodes dans la structure d'attache et fermer les attaches.
- 3.3. Mettre la structure d'attache avec le support d'électrodes dans la cuve de tampon.
- 3.4. Retirer le peigne.

4. Remplir la cuve avec le tampon

- 4.1. Remplir complètement le compartiment intérieur de tampon TGS.
- 4.2. Remplir le compartiment extérieur avec environ 200mL de tampon TGS.

5. Remplissage des puits de gel

(Deux groupes de travail utilise un seul gel : groupe 1 : 1-5 et groupe 2 : 6-10)

- 5.1. Remplir les puits de gel avec :
 - 10 µl de marqueurs protéiques du Kaléidoscope
 - 20 µL de lysat bactérien centrifugé (BL)
 - 20 µl du tube W1
 - 20 µl du tube E1
 - 20 µl du tube E2

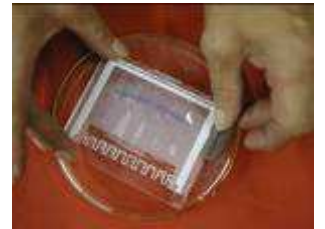
6. Réalisation de l'électrophorèse

- 6.1. Fermer la cuve et commencer l'électrophorèse à 200V.
- 6.2. Arrêter l'électrophorèse quand le Bleu de Bromophénol atteint l'extrémité la plus basse du gel.



7. Démoulage du gel

- 7.1. Sortir la structure d'attache et verser le tampon dans le récipient du tampon.
- Vous pourrez réutiliser le tampon
- 7.2. Prendre la cassette de gel et la déposer; côté plus court vers le haut.
- 7.3. Couper la cassette de gel le long de la ligne blanche.
- 7.4. Soulevez la plaque de gel supérieure.
- 7.5 Retirer le gel qui colle à la plaque sous l'eau dans un plateau en plastique
- 7.6. Retirer l'eau du plateau plastique.



8. Analyse du gel

- 8.1. Observer sous lampe UV ou la protéine de fluorescence verte (GFP) est présente et l'indiquer sur un schéma de la plaque.
 - 8.2. Colorer le gel avec 100 ml de solution de Coomassie pendant 15 minutes.
 - 8.3. Eliminer le colorant dans un récipient prévu à cet effet et mettre au contact du gel 100 mL d'eau tiède
- Recommencer l'opération 2 ou 3 fois et laisser le gel se décolorer dans l'eau une nuit.

9. Analyser la pureté de la GFP après la chromatographie et conclure.

Tab.: Poids moléculaires des marqueurs protéiques du Kaleidoscope

Myosin	blue	201090 u
β-Galactosidase	magenta	133730 u
Bovine albumin	green	83559 u
Karbonanhydrase	violette	39559 u
Soybean Trypsin Inhibitor	orange	31405 u
Lysozyme	red	17408 u
Aprotinin	blue	7081 u

