

Esercitazione 8: cromatografia di esclusione molecolare

Scopo: separazione di molecole a diverso peso molecolare da una miscela

MATERIALE A DISPOSIZIONE

Resina Sephadex G50 in acqua mQ grade (1 gr) imbibita con acqua (fase stazionaria); limite di esclusione: 30 kDa

colonna cromatografica (diametro interno 7 mm, es. Biorad) con rubinetto e supporto

Tampone fosfato 0,5 M, pH 8

cilindro da 100 mL

becher di vetro da 50 mL

siringa di plastica da 60 mL con supporto

provette eppendorf da 1,5 mL (da numerare in 2 serie: la prima da 1 a 10; la seconda da 1 a 30)

pipette tipo gilson

Pasteur con tettarella

campioni per cromatografia:

soluzione A: blu destrano (PM >400kDa) (5 mg/mL in tamp fosfato 100 mM);

soluzione B: cyt C 14 kDa (2,5mg/mL) e p-nitrofenolo (PM 140Da) (10mg/mL in tamp fosfato 100 mM)

Protocollo:

1) Posizionate e fissate la siringa di plastica a testa in giù su un altro stativo (*l'altezza dell'uscita della siringa dovrebbe essere 5 cm al di sopra del livello superiore di resina*)

2) tenendo alto il tubo di plastica in modo da non far uscire il liquido, aggiungete circa 60 mL di tampone fosfato (**fase mobile**) nella siringa serbatoio

NB. Assicuratevi che ci sia sufficiente tampone sopra il letto di separazione in modo che non la resina non vada a secco.

3) Fate scorrere il tampone all'interno del tubo di raccordo e collegate la siringa alla colonna inserendo il tappo giallo (non è un problema se perdetevi un pò di tampone dal tubo).

4) Posizionate un becher sotto la colonna e aprite il rubinetto. *(Se la siringa e la colonna sono ben collegati dovreste vedere fuoriuscire il liquido dalla colonna e contemporaneamente gocciolare tampone all'interno della stessa)*

NB. il volume di tampone nella colonna deve rimanere costante

5) Fate fluire una quantità di tampone corrispondente a circa **2 volumi di letto**

NB. I volumi devono essere riferiti al volume di letto di separazione che potete calcolare con i dati a vostra disposizione (vedi materiale)

6) Numerate 2 serie di eppendorf, la prima da 1 a 10 e la seconda da 1 a 25 (potrebbero servirne di più...)

7) Quando avrete fatto fluire un volume corrispondente ad un letto, misurate il flusso della fase mobile (mL/min) *(per fare questo prendete un tubo graduato o un cilindro da 10 mL, raccogliete per un tempo fissato il tampone all'uscita della colonna e misurate il volume raccolto).*

8) Chiudete il rubinetto e lentamente aprite il tappo superiore giallo; nuovamente aprite il rubinetto e fate uscire il tampone finché il menisco raggiunge la superficie della resina ***(fate attenzione a non farla andare a secco)***.

9) Prelevate **la soluzione A** con una pasteur e caricatela delicatamente sulla resina *(cercando di disturbare il meno possibile il letto della colonna)* oppure entrate nella colonna con la pasteur fin dove possibile (attenzione a non rompere la pasteur!!!!) e fate uscire il campione che dovrebbe lentamente scendere lungo la parete e depositarsi sulla superficie della resina

10) Se necessario, aprite il rubinetto della colonna e fate uscire **una goccia** in modo che il campione caricato entri nella resina e richiudete subito il rubinetto.

11) Aiutandovi con una pasteur pulita, fate scendere lentamente il tampone (fase mobile) lungo la parete della colonna fino a riempire per metà il serbatoio giallo.

12) Inserite sotto la colonna la prima serie di eppendorf *(vi servirà per valutare il volume di fase mobile utilizzata per eluire i componenti)*

13) Collegate la colonna con la bottiglia chiudendo il tappo superiore giallo.

14) Aprite il rubinetto e raccogliete 10 gocce di fase mobile (~ 0,5 mL) per ogni eppendorf fino alla completa fuoriuscita del composto colorato.

15) Senza continuare a raccogliere in frazioni, fate passare in colonna un volume di letto (bed volume) di fase mobile

16) Finito il passaggio di lavaggio, chiudete il rubinetto e lentamente aprite il tappo superiore giallo; nuovamente aprite il rubinetto e fate uscire il tampone finché il menisco raggiunge la superficie della resina (**fate attenzione a non farla andare a secco**).

17) Prelevate **70 uL di soluzione B** con una una pasteur e caricatela sulla resina facendola scendere lentamente lungo le pareti della colonna. **Seguite le indicazioni al p.to 9**

18) se necessario, aprite il rubinetto della colonna e fate uscire **una goccia** in modo che il campione caricato entri nella resina e richiudete subito il rubinetto.

19) Facendo scendere lentamente il tampone lungo la parete della colonna, aggiungete la fase mobile, fino ad arrivare a riempire per metà il serbatoio giallo.

20) Collegate la colonna con la bottiglia chiudendo con il tappo superiore giallo.

21) Inserite sotto la colonna la seconda serie di eppendorf, aprite il rubinetto e raccogliete 10 gocce di tampone di eluizione fino all'uscita di tutti composti colorati dalla colonna

22) Inserite sotto la colonna un becker e lavate la colonna con 2-3 *bed volumes* di tampone.

ALLA FINE della SEPARAZIONE CALCOLATE il V_M , I V_R e i V_R' dei due analiti presenti nella soluzione B e I rispettivi T_R

INDICATE se la colonna ha una buona SELETTIVITA, EFFICIENZA e RISOLUZIONE

Rispetto al volume di partenza (volume caricato), cosa è successo al campione?