

CROMATOGRAFIA di AFFINITA'

SCOPO: Purificazione di GFP (green fluorescent protein) da lisato batterico tramite cromatografia di affinità

MATERIALE

- 1 colonna contenente 250 μ L di slurry Ni²⁺-NTA agarose in 50% etanolo
- 1 Falcon contenente 5 mL di **Native Purification Buffer (NPB) 5X**
250 mM NaH₂PO₄, pH 8.0
2.5 M NaCl
- 1 Falcon contenente 2,5 mL di soluzione di imidazolo 3M in NPB 1X
- 1 Becker con acqua mQ
- 25-30 eppendorf per raccolta campioni
- 1 Falcon con 3 mL di lisato batterico in ghiaccio
- 1 cilindro
- 1 becker
- 3 falcon da 15 mL vuote
- ghiaccio

PROCEDIMENTO

- 1) Utilizzando il cilindro a vostra disposizione preparate 40 mL di Native Purification Buffer (NPB) 1X
- 2) Prendete 1 falcon vuota e, utilizzando la soluzione di imidazolo 3M, preparate 5 ml di **soluzione di lavaggio: 20mM imidazolo in NPB 1X**
- 3) Prendete un'altra Falcon e, utilizzando la soluzione di imidazolo 3M, preparate 5 mL di **soluzione di eluizione: 300 mM imidazolo in NPB 1X**
- 4) Togliete il parafilm dalla colonna, ponete il becker sotto di essa, togliete il tappo giallo e fate fuoriuscire la soluzione di acqua e etanolo (fermatevi quando il menisco sarà sopra la resina)
- 5) Aggiungete 2,5 mL di acqua mQ nella colonna e fate flussare come al p.to 4. Ripete altre 2X e mettete il tappo
- 6) Aggiungete 1 mL di NPB 1X e fate flussare come al p.to 4. Ripetete altre 2X e mettete il tappo

La colonna cromatografica ora risulta condizionata per la purificazione

- 7) Prelevate 50 uL di lisato e ponetelo in una eppendorf (marcatela con L)
Aggiungete il restante lisato batterico alla colonna.
- 8) Ponete sotto la colonna una falcon vuota, aprite il tappo e raccogliete la soluzione fluiva (fermatevi quando il menisco sarà sopra la resina).
Riponete il fluivo nel ghiaccio
- 9) Aggiungete alla colonna 250 uL di soluzione di lavaggio, mettete una eppendorf sotto la colonna e raccogliete la frazione (segnate la epp. W1).
- 10) Ripetere il punto 9 altre 3 volte, raccogliendo il fluivo ogni volta in una nuova eppendorf (W2, W3, W4). Ponete le epp. in ghiaccio. Chiudete la colonna
- 11) Aggiungete alla colonna 250 uL di soluzione di eluizione, mettete una eppendorf sotto la colonna e raccogliete la frazione (segnate la epp. E1)
- 12) Ripetete il punto 11 altre 3 volte, raccogliendo l'eluato ogni volta in una nuova eppendorf (E2, E3, E4). Ponete le epp. in ghiaccio. Chiudete la colonna
- 13) Ricaricate il fluivo (ottenuto alla fine del p.to 8) posto in ghiaccio sulla colonna e ripetete i punti 8-12.
- 14) Controllate la fluorescenza e quindi la purificazione della proteina di interesse ponendo le eppendorf sul transilluminatore.