

## CROMATOGRAFIA di AFFINITA'

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

### **MATERIALE**

- 1 colonna contenente 250 uL di slurry Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose in 50% etanolo
- 1 tubo contenente 5 mL di **tampone di purificazione (TP) 5X** (250 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0, 2.5 M NaCl)
- 1 tubo contenente 2,5 mL di soluzione di imidazolo 3M in TP 1X
- 1 Becher con acqua mQ
- 25-30 eppendorf per raccolta campioni
- 1 tubo con 3 mL di lisato batterico (in ghiaccio)
- 1 cilindro
- 1 becher
- 3 tubi falcon da 15 mL vuoti
- ghiaccio

### **PROCEDIMENTO**

- 1) Utilizzando il cilindro a vostra disposizione preparate 20 mL di tampone di purificazione 1X
- 2) In un tubo graduato vuoto e utilizzando la soluzione di imidazolo 3M, preparate 5 mL di **soluzione di lavaggio 20mM imidazolo in solvente TP 1X (L)**
- 3) In un tubo graduato vuoto e utilizzando la soluzione di imidazolo 3M, preparate 5 mL di **soluzione di eluizione: 300 mM imidazolo in TP 1X (E)**
- 4) Togliete il parafilm dalla colonna, ponete il becher 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 TP 1X e fate fluire come al p.to 4. Ripetete altre 2X e mettete il tappo

**La colonna cromatografica ora risulta condizionata per la purificazione**

- 7) Aggiungete il lisato batterico alla colonna.
- 8) Ponete sotto la colonna una provetta vuota, aprite il tappo e raccogliete la soluzione fluente (fermatevi quando il menisco sarà sopra la resina), la soluzione raccolta va salvata in ghiaccio.
- 9) Aggiungete alla colonna 250 uL di soluzione di lavaggio, mettete una eppendorf sotto la colonna e raccogliete la frazione (segnate la epp. L1).
- 10) Ripetere il punto 9 altre 3 volte, raccogliendo il fluente ogni volta in una nuova eppendorf (L2, L3, L4). 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 fluente (ottenuto alla fine del p.to 8) posto in ghiaccio sulla colonna e ripetete i punti 8-12.
- 14) Controllate la purificazione controllando la fluorescenza ponendo le eppendorf sul transilluminatore.
- 15) Mettete le eppendorf in congelatore