

### Esercitazione 4: cromatografia di esclusione molecolare su resina.

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

#### **MATERIALE A DISPOSIZIONE**

Resina Sephadex G50 in acqua mQ grade

Tampone fosfato 0,2 M pH 8

colonna cromatografica Biorad (diametro interno: colonna 1, 2, 3: 1,2 cm; colonna 5: 1 cm; colonna 4 e 6: 0,7 cm) con rubinetto e supporto

cilindro da 500 mL

cilindro da 100 mL

becker di vetro da 50 mL

siringa di plastica da 50 mL con supporto

cuvette da 1,5 mL (da numerare circa una 20-25)

pipette tipo Gilson e Pasteur

campioni per cromatografia:

**soluzione A:** blu destrano (PM >400kDa) (3 mg/mL in tamp fosfato 50 mM); 5% glicerolo

**soluzione B:** GFP (42kDa) (conc. ignota), lisozima (10mg/mL in tamp fosfato 20 mM); in glicerolo 5%

#### **Protocollo:**

- 1) In un cilindro, preparate 250 mL di tampone fosfato 50 mM
- 2) Aggiungete 50 mL di tampone fosfato nella siringa e tenete il tappo giallo all'interno della stessa in modo da non perdere il solvente (*dovrete sempre controllare che non si abbassi troppo, nel caso aggiungetene dell'altro*)
- 3) Assicuratevi che ci sia sufficiente solvente (fase mobile) sopra la resina.
- 4) Fate scorrere il tampone all'interno del tubo e collegate la siringa alla colonna inserendo il tappo giallo.
- 5) Posizionate un becker sotto la colonna e aprite il rubinetto. (*Se la bottiglia e la colonna sono ben collegati dovrete vedere fuoriuscire il liquido dalla colonna e contemporaneamente gocciolare tampone all'interno della stessa*)
- 6) Fate fluire attraverso la resina un volume corrispondente a 2 letti (il letto corrisponde alla superficie di scambio entro cui le molecole si separano) (**NB. I volumi devono essere riferiti al volume di letto della colonna o volume di**

*resina, che potete calcolare con i dati a vostra disposizione - DIAMETRO E LUNGHEZZA), questo procedimento vi permette di equilibrare la colonna con il tampone di separazione, nel caso fosse risospesa in un tampone diverso e in più vi permette di impaccare al meglio la colonna e quindi rendere più efficiente la separazione)*

7) Numerate 2 serie di cuvette da 1 a 24 e 1 a 10 (potrebbero servirne di più...)

8) Nel frattempo calcolate il flusso della fase mobile (*per fare questo prendete una falcon o un cilindro da 10 mL, raccogliete per un tempo fissato il tampone all'uscita della colonna e misurate il volume raccolto e segnate il livello relativo ad 1 mL sulle cuvette*)

9) 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*).

10) A seconda della colonna, prelevate 500 uL (colonne 1, 2, 3); 200 uL (colonna 5); 100 uL colonna (4 e 6) di soluzione A con una pipetta e caricatela delicatamente sulla resina (*cercando di disturbare il meno possibile il letto della colonna*).

11) Aprite il rubinetto della colonna e fate uscire **una o più gocce** in modo che il campione caricato entri nella resina e richiudete subito il rubinetto.

12) Aggiungete, sempre lentamente, facendo scendere il tampone lungo la parete della colonna, alcuni mL di tampone fosfato in modo da riempire per metà il serbatoio giallo

13) Inserite sotto la colonna le cuvette numerate 1 e 10

14) Collegare la colonna con la siringa chiudendo il tappo superiore giallo.

15) Aprite il rubinetto e raccogliete il tampone in uscita nelle cuvette *fino al segno (tenete il tempo) e fino al passaggio completo del campione blu*, poi inserite sotto la colonna un becker e continuate a far fluire 1 volume di letto

16) 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 la soluzione B: 500 uL (colonne 1, 2, 3); 200 uL (colonna 5); 100 uL colonna (4 e 6) con una P200 e caricatela sulla resina facendola scendere lentamente lungo le pareti della colonna (*cercando di disturbare il meno possibile il letto della colonna*).

- 18) Se necessario, aprite il rubinetto della colonna e fate uscire **una o più gocce** in modo che il campione caricato entri nella resina e richiudete subito il rubinetto.
- 19) Aggiungete, sempre lentamente, facendo scendere il tampone lungo la parete della colonna, alcuni mL di tampone fosfato
- 20) Collegate la colonna con la siringa, mettete le cuvette sotto la colonna, aprite il rubinetto e iniziate a raccogliere le frazioni (1 mL ognuna tenendo anche il tempo), fino ad un volume corrispondente al volume totale
- 21) Se necessario aggiungete ancora tampone fosfato 50 mM e lavate la colonna con *2 bed volume* di tampone.
- 22) Allo spettrofotometro leggete l'assorbanza a 280 nm (ricordatevi di azzerare lo strumento con il solvente) e segnatevi i valori
- 23) Se necessario trasferite le frazioni in cuvette da fluorescenza e leggete la fluorescenza delle medesime frazioni e segnatevi i valori

PER CASA: riportate i valori nel file excel che trovate in moodle e inviatemelo