

ESPERIENZA 10

CROMATOGRAFIA di AFFINITÀ

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

MATERIALE

- 1 colonna contenente 250 μ L di slurry Ni^{2+} -NTA agarose in 50% etanolo
- 1 provetta contenente 5 mL di tampone di purificazione (TP) 5X (250 mM NaH_2PO_4 , pH 8.0, 2.5 M NaCl)
- 1 provetta contenente 2,5 mL di soluzione di imidazolo 3 M in TP 1X
- 25-30 eppendorf per raccolta campioni
- 1 provetta con 3 mL di lisato batterico (in ghiaccio)
- 3 provette da 15 mL vuote
- Pipette Gilson con puntali
- Ghiaccio
- Vetreria che vi serve per l'esperienza

PROCEDIMENTO

- 1) Utilizzando un cilindro preparate 20 mL di tampone di purificazione (TP) 1X
- 2) In una provetta graduata vuota e utilizzando la soluzione di imidazolo 3 M, preparate 5 mL di soluzione di lavaggio 20 mM imidazolo in solvente TP 1X (L)
- 3) In una provetta graduata vuota e utilizzando la soluzione di imidazolo 3 M, preparate 5 mL di soluzione di eluizione: 300 mM imidazolo in TP 1X (E)
- 4) Prelevate 1,5 mL di lisato cellulare per due volte e mettetelo in due provette eppendorf da 2 mL
- 5) Centrifugate a 10000 rpm per 10 min
- 6) Prelevate il surnatante facendo attenzione a non smuovere/prelevare il pellet e mettetelo in un provetta falcon da 15 mL
- 7) La resina si trova in TP 1X. Togliete il tappo dalla colonna, ponete il becher sotto di essa, aprite il rubinetto e fate fuoriuscire la soluzione (non mandate a secco la resina, fermatevi quando il menisco sarà un po' sopra la resina)
- 8) Aggiungete 1 mL di TP 1X e fate flussare come al p.to 7. Ripetete altre 2X e appoggiate il tappo. La colonna cromatografica ora risulta condizionata per la purificazione
- 9) Aggiungete i 3 mL di lisato batterico alla colonna

- 10) Ponete sotto la colonna una provetta da 15 mL vuota, aprite il rubinetto e raccogliete la soluzione fluïta (fermatevi quando il menisco sar  sopra la resina), la soluzione raccolta va salvata in ghiaccio.
- 11) Aggiungete alla colonna 250 μ L di soluzione di lavaggio L, mettete una eppendorf sotto la colonna e raccogliete la frazione (segnate la eppendorf L1). Chiudete il rubinetto della colonna.
- 12) Ripetete il punto 11 altre 3 volte, raccogliendo il fluïto ogni volta in una nuova eppendorf (L2, L3, L4). Ponete le eppendorf in ghiaccio. Chiudete il rubinetto della colonna
- 13) Aggiungete alla colonna 250 μ L di soluzione di eluizione E, mettete una eppendorf sotto la colonna e raccogliete la frazione (segnate la eppendorf E1). Chiudete il rubinetto della colonna.
- 14) Ripetete il punto 13 altre 3 volte, raccogliendo l'eluato ogni volta in una nuova eppendorf (E2, E3, E4). Ponete le eppendorf in ghiaccio. Chiudete il rubinetto della colonna
- 15) Lavate la colonna con 0,5 mL soluzione di eluizione E.
- 16) Riequilibrare la colonna con 1 mL di soluzione TP 1X.
- 17) Ricaricate la soluzione fluïta (ottenuta alla fine del p.to 10) in colonna e ripetete i punti 11-14.
- 18) Controllate il risultato della purificazione ponendo le eppendorf sul transilluminatore e verificando quali eppendorf sono fluorescenti. Per controllo mettete sul transilluminatore una eppendorf contenente 250 μ L di soluzione TP 1X. Consiglio di scattare una foto.
- 19) Confrontate le provette fra loro e fate le vostre considerazioni sui risultati ottenuti
- 20) Lavate la resina con 0,5 mL di soluzione di eluizione E, poi con 1 mL di soluzione TP 1X e lasciate un po' di solvente sopra la resina nella colonna