

Entsalzung und Pufferaustausch von Biomolekülen mittels Gelfiltration/Größenausschlusschromatographie

ROTI®Dex-Säulen für die Chromatographie mittels Spritz-, Pump- oder FPLC-Systemen

ROTI®Dex bietet eine Gelfiltrations-Matrix aus mit Epichlorhydrin-vernetztem Dextran. Diese ermöglicht eine Form der Gruppentrennung mittels Größenausschlusschromatographie zur Entfernung von Salzen und anderen niedermolekularen Faktoren aus Protein- oder Nukleinsäurelösungen.



Die vorgepackten ROTI®Dex-FPLC-Säulen dienen zur Aufreinigung und Entsalzung von Probevolumina zwischen 0,05 bis 1,5 ml. Aufgereinigt werden Biomoleküle >5 kDa oder >10 bp und Partikel >2 nm. Der Fraktionierungsbereich für Proteinen/Peptiden/Biomolekülen liegt zwischen 1 und 5 kDa, wobei die höchste Auflösung (effizienteste Trennung) zwischen Biomolekülen >5 kDa und <1 kDa erzielt wird.

Das Säulenbett besteht aus ROTI®Dex-25 Superfine. Es handelt sich um ein kugelförmiges, poröses Gelfiltrationsmedium, das aus mit Epichlorhydrin-vernetztem Dextran besteht. Das Medium wurde in 20% Ethanol vorgequollen.

Weitere Infos zu ROTI®Dex finden Sie in unserer Technischen Infobroschüre.

Im Folgenden finden Sie unser empfohlenes Protokoll und weitere wichtige Hinweise zur Anwendung der vorgepackten ROTI®Dex-FPLC-Säulen.

Dieses Protokoll ist nur ein Leitfaden und sollte entsprechend Ihren spezifischen Bedürfnissen angepasst werden.

Technische Daten der ROTI®Dex-FPLC-Säulen:

Best.-Nr.	21C6.1	21C6.2	21C7.1	21C7.2	21C7.3
Verpackungsgröße	5 Stk.	100 Stk.	5 Stk.	25 Stk.	100 Stk.
Matrix	ROTI®Dex 25 Superfine				
Partikelgröße (nass)	40 - 110 µm				
Gelbettvolumen	1 ml		5 ml		
Probevolumen	0,05 – 0,3 ml		0,1 – 1,5 ml		
Druck max.	3 bar (0,3 MPa)				
Flussrate max.	3 ml/min		10 ml/min		
Empfohlene Flussrate	0,5 - 2 ml/min		1 - 5 ml/min		
Anschluss Ausgang	10–32 (1/16") male				
Anschluss Eingang	10–32 (1/16") female				
Säulen-Maße	0,7 cm Innendurchmesser x 2,5 cm Höhe		1,6 cm Innendurchmesser x 2,5 cm Höhe		

1. Wählen Sie den richtigen Puffer

Einer der Vorteile der Größenausschlusschromatographie ist der einfache und schnelle Austausch der Pufferlösung, in welcher Ihre Biomoleküle gelöst sind. Wählen Sie also den Puffer, in welchem Sie Ihre Probe für weitere *downstream* Applikationen benötigen oder verwenden Sie den Puffer, in welchem sich Ihre Probe bereits befindet, sofern Sie diese lediglich aufreinigen wollen.

Die chemisch sehr stabile Säulen-Matrix, ermöglicht eine Aufreinigung in Gegenwart von essenziellen Ionen, Cofaktoren, Detergenzien, Harnstoff, Guanidinhydrochlorid, etc. Es können also alle gängigen wässrigen Puffer für die Entsalzung/den Pufferaustausch verwendet werden. Häufig ist ein Puffer mit 25 bis 50 mM Konzentration der Puffersubstanz (z.B. Natrium Phosphat, Tris-HCL, etc.) und einem pH-Wert zwischen 7 und 8 ausreichend. Eine zusätzliche Salzkonzentration von mindestens 25 mM (meist NaCl) wird empfohlen, um mögliche ionische Wechselwirkungen (zu sehen als Verzögerungen bei der Peak-Elution oder als breite Peaks) zu vermeiden. Flüchtige Puffer wie 100 mM Ammoniumacetat oder 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat können verwendet werden, wenn die Anwesenheit von Natriumchlorid vermieden werden muss.

Proteine benötigen salzhaltige Lösungen, aber nicht zu viel. Vermeiden Sie somit die Verwendung von purem Wasser, als auch Salzkonzentrationen über 1 M.

Verwenden Sie hochwertiges Wasser und Chemikalien. Die Lösungen sollten durch 0,45 µm- oder 0,22 µm-Filter filtriert werden. Entgasen Sie die Puffer vor jeder Gelfiltration, um Luftblasen zu vermeiden. Puffer werden automatisch entgast, wenn sie unter Vakuum filtriert werden. Puffer und Säulen müssen vor der Verwendung die gleiche Temperatur haben. Schnelle Temperaturschwankungen können ebenfalls zur Luftblasenbildung führen.

2. Probevorbereitung

Ihre Probe sollte komplett gelöst sein. Um die Lebensdauer der Säule zu verlängern, lassen Sie die Probe vor dem Beladen der Säule durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm laufen. Hochviskose Proben erfordern einen Puffer mit einer Viskosität, die nicht mehr als das 1,5-fache der Probe beträgt.

Bei der Größenausschlusschromatographie ist es wichtig, die Konzentration Ihrer Probe weitestgehend hoch zu halten. Demnach ist zu empfehlen, die Probe zuvor durch Zentrifugation herunter zu konzentrieren. Wie hoch Sie die Konzentration halten können, hängt allerdings von Ihren Biomolekülen ab. Als allgemeine Regel gilt, dass die Proteinkonzentration bei Proteinen unter 70 mg/ml und bei Polymeren mit hohem Molekulargewicht (>1000kD) unter 5 mg/ml liegen sollte.

Wählen Sie nach Möglichkeit eine vorgepackte Säule, die für das zu entsalzende Probevolumen geeignet ist. Die Tabelle gibt Ihnen eine Übersicht darüber, welche Säule für welche Probevolumina am besten geeignet ist.

3. Säulenvorbereitung und -equilibrierung

- a) Bringen Sie die Säule auf Ihre Arbeitstemperatur.
- b) Spülen Sie die Systemschläuche mit Puffer. Entfernen Sie den Säuleneingangs-Stopfen. Verbinden Sie den Eingang der Säule mit dem Systemschlauch, ohne dass Luftblasen in die Säule gelangen.
- c) Entfernen Sie die Endkappe vom Säulen-Ausgang und lassen Sie Ihren Puffer (bei 1 ml-Säule: min. 10 ml mit Flussrate max. 3 ml/min, bei 5 ml-Säule: min. 25 ml mit Flussrate max. 5 ml/min) laufen, um das Lagerethanol zu entfernen und die Säule vollständig mit Ihrem Puffer zu equilibrieren.

4. Auftragen und Eluieren der Probe

- a) Geben Sie Ihre Probe (bei 1 ml-Säule: 0,05 – 0,3 ml, bei 5 ml-Säule: 0,1 – 1,5 ml) auf. Überwachen Sie den Säulenausfluss mit einem UV-, Leitfähigkeits-, Fluoreszenz- oder einem anderen Detektionssystem. Beachten Sie dabei die optimale Flussrate von 0,5 bis 3 ml/min bei 1 ml-Säulen und 1 bis 10 ml/min bei 5 ml-Säulen. Sammeln Sie Eluentenfraktionen, um die gereinigte Probe zu gewinnen.
- b) Spülen Sie die Säule (bei 1 ml-Säule: min. 10 ml mit Flussrate max. 3 ml/min, bei 5 ml-Säule: min. 25 ml mit Flussrate max. 5 ml/min), bevor Sie die nächste Probe verarbeiten. Überwachen Sie den Säulenausfluss mit einem UV-, Leitfähigkeits-, Fluoreszenz- oder einem anderen Detektionssystem, um sicherzustellen, dass die Säule bereit ist.

 **Achtung** H226

Voller Wortlaut der Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe Sicherheitsdatenblatt Abschnitt 2.2

Größenausschluss-Chromatographiesäulen von Carl Roth

ROTI®Dex-25 Superfine FPLC 1 ml	5 Stk.	21C6.1
ROTI®Dex-25 Superfine FPLC 1 ml	100 Stk.	21C6.2
ROTI®Dex-25 Superfine FPLC 5 ml	50 Stk.	21C7.1
ROTI®Dex-25 Superfine FPLC 5 ml	25 Stk.	21C7.2
ROTI®Dex-25 Superfine FPLC 5 ml	100 Stk.	21C7.3

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe • Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe
Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0 • Fax: +49 (0) 721/ 5606-149 • info@carlroth.de • www.carlroth.de

LH 10/2023

