

## Entsalzung und Pufferaustausch von Biomolekülen mittels Gelfiltration/Größenausschlusschromatographie

### ROTI®Dex-Säulen packen und aufbewahren

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.



Eine effizient gepackte Säule ist für hochauflösende Ergebnisse essenziell. Im Folgenden finden Sie unser empfohlenes Protokoll zum Packen und Aufbewahren von Säulen mit unseren ROTI®Dex Gelfiltrationsmedien. Bitte beachten Sie auch die Gebrauchsanweisung zur Anwendung von gepackten Säulen im Webshop.

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

**Für den Pufferaustausch wird eine Säulenbetthöhe von max. 10 cm empfohlen.**

### Schritt 1: Quellen des Gelfiltrationsmediums

ROTI®Dex wird als trockenes Pulver geliefert und muss vor der Verwendung gequollen werden. Als Quellungslösungen eignen sich Wasser, Puffer- oder Salzlösungen. ROTI®Dex Partikel schrumpfen in Alkohollösungen. Sofern nötig, sollten die Lösungen nicht mehr als 20 % Alkohol enthalten. (Filtern Sie alle Puffer durch einen 0,22 µm-Filter, um mikrobielles Wachstum zu verhindern.)

1. Wiegen Sie die entsprechende Menge an trockenem ROTI®Dex für das erforderliche Bettvolumen Ihrer Säule ab: 1 g ROTI®Dex-25 ergibt ca. 5 ml Bettvolumen und 1 g ROTI®Dex-50 ergibt ca. 10 ml Bettvolumen.
2. Fügen Sie genügend Quellungslösung hinzu (Gesamtvolumen der Säule plus 30 %) und lassen Sie das Gel mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur oder 1 Stunde bei 90 °C quellen. Vermeiden Sie die Verwendung von mechanischen Rührhilfen (Magnetrührer, Spatel, etc.).
3. Nach Abschluss der Quellung wird der Überstand dekantiert, sofern bei der Gelfiltration mit einem anderen Puffer weitergearbeitet werden soll.

## Schritt 2: Wählen Sie den richtigen Puffer

Alle gängigen wässrigen Puffer können 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.

## Schritt 3: Befüllung und Packung von Säulen

1. Vor dem Benutzen der Säule, sollte der Säulen-Filter befeuchtet werden, ohne diesen zu beschädigen oder zu verschieben. Verwenden Sie hierzu genug Puffer oder Wasser, sodass der Filter komplett mit Flüssigkeit durchdrängt ist.
2. Stellen Sie eine Suspension aus Puffer und den gequollenen ROTI®Dex-Partikeln her, welche flüssig genug ist, damit keine Luftblasen zurückbleiben. Ein Verhältnis von abgesetztem Gelvolumen zu Puffervolumen von 3:1 ist für diesen Zweck optimal.
3. Gießen Sie die gesamte Suspension bestenfalls in einem Zuge in die Säule. Das Führen der Suspension entlang eines Glasstabes oder an der Innenwand der Säule kann helfen, um Luftblasen zu vermeiden. Alternativ kann ein Trichter verwendet werden, wobei die Spitze des Trichters die Innenwand der Säule berührt. Es ist prinzipiell darauf zu achten, dass keine Luftblasen eingeschlossen werden.
4. Zum Packen der Säule kann eine Schlauchpumpe verwendet werden. Idealerweise sollte die Säule mit dem höchstmöglichen Druck gepackt werden, ohne die Beads zu verformen. ROTI®Dex kann mit einem Druck von bis zu 3 bar beaufschlagt werden. Sie können den Puffer allerdings auch abtropfen lassen, bis sich das Gelbett gleichmäßig abgesetzt hat. Bitte achten Sie darauf, dass Sie immer wieder Puffer nachfüllen, damit das Gelbett nicht trockenläuft.
5. Lassen Sie weitere 2-3 Säulenvolumina des Puffers, der für die Trennung verwendet werden soll, passieren. Dadurch wird das Bett stabilisiert und equilibriert.
6. Das Gelbett sollte während des gesamten Vorganges und auch bei der Verwendung niemals vollständig trockenlaufen. Bitte achten Sie darauf, dass das Gelbett immer in der Pufferlösung ist.

## Schritt 4: Reinigung

1. Waschen Sie die Säule mit zwei Säulenvolumina von 0,2 M NaOH oder einer Lösung eines nichtionischen Detergens. Lassen Sie anschließend 2 Säulenvolumina Wasser durch die Säule laufen.
2. Reequilibrieren Sie das Gel vor dem nächsten Experiment mit 2-3 Säulenvolumina Puffer. Falls erforderlich, kann das Gel aus der Säule entfernt und durch Autoklavieren bei 120 °C, pH 7 sterilisiert werden.

## Schritt 5: Lagerung

Gebrauchtes Gel bei 2-8 °C in 20 %igem Ethanol oder in einer Lösung eines mikrobiellen Wachstumsinhibitors wie 0,002 % Hibitan/Chlorhexidin oder 0,02 % Natriumazid aufbewahren.

Nicht einfrieren. Vor dem nächsten Gebrauch sollte das Gel auf die Umgebungstemperatur eingestellt werden.



### Gelfiltrationsmedium von Carl Roth

ROTI®Dex-25 Medium	10 g	21A5.1
ROTI®Dex-25 Medium	50 g	21A5.2
ROTI®Dex-25 Medium	100 g	21A5.3
ROTI®Dex-25 Medium	250 g	21A5.4
ROTI®Dex-25 Medium	500 g	21A5.5
ROTI®Dex-50 Medium	10 g	21A6.1
ROTI®Dex-50 Medium	50 g	21A6.2
ROTI®Dex-50 Medium	100 g	21A6.3
ROTI®Dex-50 Medium	250 g	21A6.4
ROTI®Dex-50 Medium	500 g	21A6.5

### 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

