

## Entsalzung und Pufferaustausch von Biomolekülen mittels Gelfiltration/Größenausschlusschromatographie

### ROTI®Dex-Säulen für die Schwerkraft-Chromatographie

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-Gravitationssäulen dienen zur Aufreinigung und Entsalzung von Probevolumina zwischen 0,15 bis 10 ml.

Das Säulenbett besteht aus ROTI®Dex-25 Medium (Best.-Nr.: 21A5). Es handelt sich um ein kugelförmiges, poröses Gelfiltrationsmedium, das aus mit Epichlorhydrin-vernetztem Dextran besteht. Das Medium wurde in deionisiertem Wasser gequollen.

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 Gravitationssäulen Größe XS bis XXL. Es dient ebenso als Hilfe für selbst gepackte Säulen mit unseren ROTI®Dex Gelfiltrationsmedien. Bitte beachten Sie hierzu auch die Gebrauchsanweisung zum Packen und Aufbewahren der Säulen in unserem Webshop.

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

### 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.

## Vorbereitung Ihrer Probe

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. Beispielsweise sollte eine Proteinkonzentration bis zu 70 mg/ml die Trennung bei Verwendung normaler wässriger Puffer nicht beeinflussen. Die Probe sollte komplett gelöst sein. Die Entsalzung führt im Allgemeinen zu einer Verdünnung der Probe (außer bei Spin-Protokollen). Eine minimale Verdünnung wird erreicht, wenn die maximale Entsalzungskapazität der Säule genutzt wird. Verwenden Sie demnach ein großes Probenvolumen ( $\leq 30\%$  des gesamten Bettvolumens), um die Probenverdünnung zu minimieren. Die Verwendung eines Probenvolumens von mehr als 30 % des Bettvolumens führt zu einer weniger effizienten Entsalzung. Verringern Sie das Probenvolumen ( $< 30\%$  des Säulenvolumens), wenn die höchste Auflösung für die Trennung erforderlich ist. Wenn die Leitfähigkeit nicht überwacht werden kann und die Rückgewinnung der vollständig entsalzten Probe die wichtigste Anforderung ist, verwenden Sie ein Probenvolumen zwischen 15 % und 20 % des gesamten Bettvolumens.

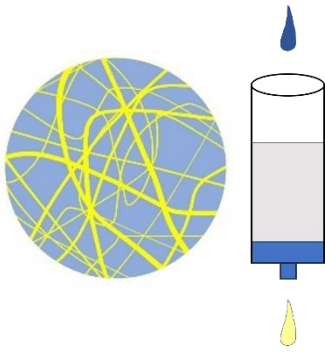
Wählen Sie nach Möglichkeit eine vorgepackte Säule, die für das zu entsalzende Probenvolumen geeignet ist. Tabelle 1 gibt Ihnen eine Übersicht darüber, welche Säule für welche Probenvolumina am besten geeignet ist.



Best.-Nr.	Säulengröße	Partikelgröße (nass)	Gelbettvolumen	Probenvolumen	Elutionsvolumen	MWCO	VE
21AX.1	XS	85 – 260 µm	1,78 ml	0,15 - 0,3 ml	0,35 ml	Proteine >5 kDa	50 Stk.
21AY.1	S		2,75 ml	0,5 ml	1 ml	Nukleinsäuren mit >10 bp	50 Stk.
21C0.1	M		4,31 ml	1 ml	1,5 ml		50 Stk.
21C1.1	L		10,37 ml	2,5 ml	3,5 ml	Nanopartikel >2 nm	25 Stk.
21C2.1	XL		17,2 ml	5 ml	7 ml		10 Stk.
21C3.1	XXL		34,21 ml	10 ml	14 ml		10 Stk.

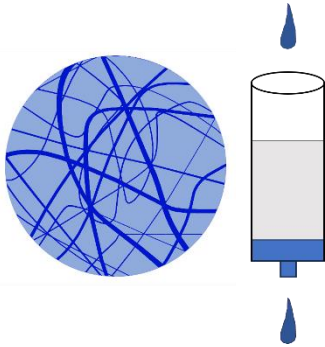
Tab. 1 Anwendungshinweis der ROTI®Dex-Säulen

- ❖ Für das Equilibrieren der Säule, als auch für die Elution der Probe, wird der gleiche Puffer verwendet.



### 1. Säulenvorbereitung

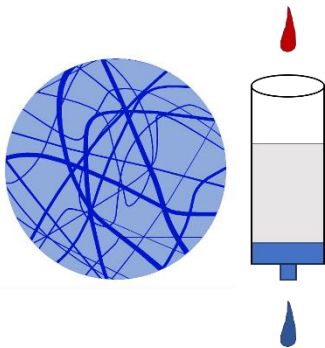
Bringen Sie die Säule auf Ihre Arbeitstemperatur und entfernen Sie die obere und dann die untere Säulenkappe. Aufbewahrungspuffer wird eluiert und gewünschter Puffer, in dem die Probe überführt werden soll, wird zugegeben. Die Säulenmatrix sollte niemals vollständig trocken laufen.



### 2. Equilibrieren der Säule

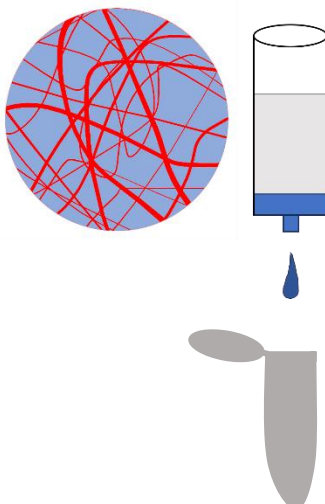
Den gewünschten Puffer mehrmals (2 bis 3 Mal) auftragen und eluieren, um Säule zu equilibrieren. Aufbewahrungspuffer sollte vollständig entfernt sein, sofern dieser nicht dem gewünschten Puffer entspricht.

- ❖ Entnehmen Sie die jeweiligen **Probevolumina** und **Elutionsvolumina** der Tabelle 1.



### 3. Auftragen der Probe

Wenn der Puffer vollständig in das Gelbett eingedrungen ist, überführen Sie das für die jeweilige Säule entsprechende Probevolumen. Achten Sie darauf, dass Sie die Probe möglichst mittig auftragen und lassen Sie die Probe vollständig in das Gelbett eindringen.



### 4. Elution

Platzieren Sie ein Auffang-Tube unter Ihre Säule und überführen Sie die entsprechende Menge an Elutionspuffer in die Säule, um die Biomoleküle zu eluieren. Niedermolekulare Faktoren, wie z.B. Salze, verbleiben vorerst in den Matrix-Partikeln. Demnach ist es wichtig, die Säulen vor dem nächsten Gebrauch zu reinigen und zu equilibrieren. Hierzu finden Sie weitere Informationen in unserer Gebrauchsanweisung zum Thema Packen und Aufbewahren von ROTI®Dex-Säulen.

## **Größenausschluss-Chromatographiesäulen von Carl Roth**

ROTI®Dex-25 Medium Grav XS	<b>50 Stk.</b>	<b>21AX.1</b>
ROTI®Dex-25 Medium Grav S	<b>50 Stk.</b>	<b>21AY.1</b>
ROTI®Dex-25 Medium Grav M	<b>50 Stk.</b>	<b>21C0.1</b>
ROTI®Dex-25 Medium Grav L	<b>25 Stk.</b>	<b>21C1.1</b>
ROTI®Dex-25 Medium Grav XL	<b>10 Stk.</b>	<b>21C2.1</b>
ROTI®Dex-25 Medium Grav XXL	<b>10 Stk.</b>	<b>21C3.1</b>

### **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

