

Razsoljevanje proteinov z gelsko izključitveno kromatografijo

(Teorija je v skriptih na straneh 30-31 in 41-43)

Namen vaje: Spoznati gelsko izključitveno kromatografijo in njeno uporabo za razsoljevanje proteinov.

Uvod: Pri vaji bomo razsolili vzorec, ki smo ga dobili pri obarjanju goveje vranice s 40% nasičeno raztopino amonijevega sulfata. V vzorcu je veliko proteinov, poleg njih pa tudi sol amonijev sulfat. Proteinski vzorec je pogosto potrebno razsoliti, npr. pred nanosom na ionsko-izmenjevalno kromatografijo.

Gelsko izključitveno kromatografijo lahko uporabljamo za ločevanje proteinov na osnovi velikosti, določanje relativne molekulske mase in za odstranjevanje soli iz raztopine proteinov. Prednost te metode za razsoljevanje proteinov je v tem, da razsoljevanje izvedemo v kratkem času, slabost pa, da je primerna le za majhne volumne vzorca.

Potek dela:

1. Priprava kolone: regeneriran gel z določeno velikostjo por (zapiši si vrsto gela!) s 5 mL pipeto prenesi v stekleno kolono. Delaj previdno, da v gelu ni mehurčkov ali razpok. Počakaj, da se gel posede in nato dodaj nov gel, če je potrebno. Nato gel spiraj z mobilno fazo – začetnim pufrom, da se kolona ekvilibrira.
2. Vzorec, ki si ga dobil pri obarjanju s 40% nasičeno raztopino amonijevega sulfata, centrifugiraj v mikrocentrifugi 5 minut pri 14000 vrt./min. Na kolono vedno nanesemo bistro raztopino, da se kolona ne zamaši.
3. Odpri kolono, počakaj, da mobilna faza ponikne v gel, in zapri kolono. Pod kolono postavi čašo.
4. Na gel previdno s kapalko nanesi približno 200 μ L vzorca (supernatanta), pod kolono pa pristavi epruveto, označeno z 0 (nanos).
5. Odpri kolono in v epruveto začni loviti mobilno fazo, ki prihaja s kolone.
6. Ko vzorec ponikne v gel, previdno sper kolono s približno 1 mL mobilne faze, in ko ta ponikne v gel, previdno napolni kolono do vrha z mobilno fazo. Ko se v epruveto nateče 2 mL mobilne faze, zamenjaj epruveto. Pazi, da v koloni ne zmanjka mobilne faze in jo po potrebi dodajaj. Zberi 10 frakcij (skupaj 11 epruvet).
7. Frakcijam izmeri absorbanco pri 280 nm. Frakcij ne zavrzi!
8. V vsako frakcijo dodaj kapljico Nesslerjevega reagenta za kvalitativno določanje amonijevih ionov.

Rezultati in odgovori na vprašanja:

1. Uporabil/a sem gel:
2. Nariši elucijski diagram (os x: št. frakcije, os y: absorbanca) in označi frakcije, kjer se je pojavila oranžna oborina.

frakcija	A ₂₈₀	prisotnost amonijevih ionov
0 (nanos)		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

