

USO DE LAS COLUMNAS *HITRAP DESALTING*

Las columnas *HiTrap Desalting*, de Pharmacia, son útiles para eliminar o intercambiar sales.

A continuación se detalla el procedimiento óptimo para eliminar el imidazol en muestras de KcsA solubilizado:

Modo de procedimiento:

Para cargar la columna acoplar una jeringa de 5 ml a la entrada de la columna.

Evitar cargar burbujas.

Mantener siempre una velocidad de 5 ml/min.

1. Equilibrar la columna con 25 ml de buffer sin imidazol: Hepes 20 mM, KCl 100 mM, DDM 1 mM, pH 7.
2. Cargar la columna con 1.5 ml de KcsA (máximo 1.6 ml). Velocidad = 5 ml/min. Desechar el primer 1.5 ml que se eluye al cargar KcsA.
3. Eluir KcsA empujando con buffer sin imidazol. KcsA se eluye en los 2 ml siguientes. Desechar el resto.
4. Lavar la columna con etanol 20% y guardar.

NOTA (1): La muestra **se diluye 1.3 veces** al pasar por esta columna.

NOTA (2): El volumen muerto de esta columna es 2 ml.

NOTA (3): No cargar más de 1.6 ml de proteína, si esto ocurre se eluirá en un volumen mayor de 2 ml y contaminada con imidazol.

-