Phmac PlasmidPure Beads

目录

1. 产品介绍.....1
2. 纯化流程.....1
3. 订购信息及相关产品.....3

1. 产品介绍

Phmac PlasmidPure Beads 是一种新型的离子交换柱，具体性能见表 1。在特定条件下，质粒 DNA 样品在流过柱子时，结合到介质上，在一定条件下又能将质粒 DNA 充分洗脱，从而实现质粒的快速纯化。无需酚氯仿抽提。三步（上样、洗杂和洗脱）纯化，使质粒 DNA 纯度提高，达到细胞转染级要求。

表 1. Phmac PlasmidPure Beads 产品性能

项目	性能
载量	约 0.15-0.25 mmol Cl^-/ml 介质
粒径	~60 μm
建议流速	150-750 cm/h
pH 稳定范围	2-12
储存缓冲液	20%乙醇
储存温度	4-30℃

2. 纯化流程

2.1 缓冲液的准备

如需提取去内毒素质粒，所用水和缓冲液均使用无内毒素的水配制，所使用的耗材均需无内毒素。
若无内毒素要求，所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤。
P1 、P2 和 P3 Buffer，Wash buffer，ER buffer，Elution buffer 需定制。

2.2 样品准备

2.2.1 菌体制备

2.2.1.1 从-80℃冰箱中取出菌种或者挑单克隆菌斑，接种于 4 ml 培养基试管中，37℃振荡培养 8 h，转速为 200 rpm，8 h 后将 4 ml 培养菌液转入 400 ml 丰富培养基， 37℃振荡过夜培养（15 h 左右），转速为 200 rpm。
2.2.1.2 过夜培养的菌液，6000 rpm，离心 10 min，弃去培养基，保留沉淀。

2.2.2 菌体裂解

2g 菌泥用 20 ml P1 Buffer 加入菌体沉淀中，将菌体充分悬浮。
注意：使用前请添加 RNase A 到 P1 Buffer，终浓度为 100 ug/ml。
加 20 ml P2 Buffer 到已悬浮好的菌液中，缓慢混合均匀（**不能剧烈震荡**），进行裂解，操作时间不能超过 5 min（**防止基因组污染**）。
再向裂解体系中加入 20 ml P3 Buffer，缓慢混合均匀（**不能剧烈震荡**），出现片状沉淀。7000 rpm，离心 20 min，再使用滤纸过滤所得上清。

2.3 介质装填

2.3.1 层析柱装柱

Phmac PlasmidPure Beads 被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中低压色谱层析柱的填装，下面介绍填装层析柱的方法。

2.3.1.1 装柱缓冲液

可以使用 0.4 M NaCl 或纯水。

2.3.1.2 介质匀浆液的准备

2.3.1.2.1

装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积，根据所需装柱高度计算所需介质体积，公式如下：

$$V = 1.15\pi r^2 h$$

V：所需介质体积 ml

1.15：压缩系数

r：柱管半径 cm

h：装填高度 cm

注意：所取悬液体积应为介质体积的两倍，因为介质体积只占悬液总体积的一半，另一半为保护液。

2.3.1.2.2 倾析法小颗粒去除（以 500 ml 填料为例）

1）将 500 mL 的填料倒入 3000 mL 的烧杯中（烧杯的体积应为填料体积的 6 倍）；

2）向烧杯中添加 2000 mL 的 0.4 M NaCl 或纯水（约为填料体积的 4 倍），搅拌并静置；

注：Phmac PlasmidPure Beads 需要静置的时间约为 45-60 分钟。

3）一旦填料静置完成后，小心倒出表面的悬浮液（含小颗粒）；

4）将步骤 2）和 3）重复 3 次或以上。

2.3.1.2.3 匀浆液的配制

将所需的介质匀浆用倾析法（第 2.3.1.2.2 节）清除填料中的小颗粒后，补加装柱液定容至目标柱体积的 1.67-2 倍匀浆浓度（50%-60%）。装填层析柱时可以使用重力沉降法，但是采用流速压力法或动态轴向压缩法，装填效果会更好。

注：在装柱匀浆液的准备过程中，尽量避免碾压摩擦介质，不可用磁力搅拌或挤压式蠕动泵，机械搅拌时桨叶不可离器壁太近，另外层析介质如需重新装柱，也须按上述步骤（第 2.3.1.2.2-3 节）来准备装柱匀浆液。

2.3.1.3 实验室规模的层析柱装柱：

1）将层析空柱用夹具夹好后，调平层析空柱；

2）浸润底部筛板，预留 1-2 cm 的装柱缓冲液，关闭层析柱出口；

3）用塑料搅拌棒将填料再次悬浮，然后沿着柱壁倒入层析柱延长管中；

4）装柱设备连接装柱器或者层析柱上柱头，打开层析柱底部出口，开启泵，用装柱液为流动相开始装柱（刚开始流出液有可能观察到一些浑浊现象，随着装柱进行 1-2 个柱体积之后会变澄清）；

5）待柱床高度稳定后，出口连接层析系统，使其在设定的流速（150-750 cm/h）下进行（应使用至少为预期运行流速的 2 倍流速装柱），或使压强达到 0.5 MPa，压力恒定后再稳定 20 min；

6）关闭层析柱出口，移除延长管，安装层析柱适配器，将其调节至胶面以下 2-3 mm 位置即可。

2.3.1.4 柱效评价

1）装好的色谱柱按下表进行柱效测试；

样品	0.8 M NaCl/1%丙酮
上样量	1%柱体积
洗脱液	0.4 M NaCl/水
线性流速	60-100 cm/h
检测	电导检测仪/UV280
合格标准	As：0.8-1.5；Plates（N/m）：＞3000

2）柱效计算；

3）根据 UV 或电导率曲线计算理论塔板高度（HETP）、理论塔板数（N）和非对称因子（As），公式：$HETP=L/N$，$N=5.54(VR/Vh)^2$；

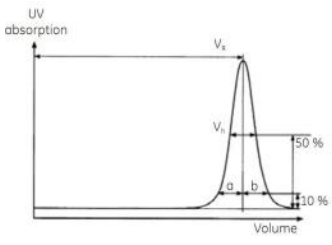
其中：VR=保留体积

Vh=半高峰宽

L=柱高

N=理论塔板数

Ve 和 Vh 的单位应一致；



As=a/b

其中：a=在 10%峰高处的第一个半峰宽，b=在 10%峰高处的第一个半峰宽；

2.3.2 重力柱的装填

1）取合适规格的重力层析柱，装入下垫片，加入适量纯水润洗柱管和垫片，关闭下出口，并在柱底部留出 1-2 cm 的去离子水。
2）将介质混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中（介质实际体积占悬液的一半），打开下出口流干保护液。
3）加入适量纯水冲洗介质，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。
4）装入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之前没有空隙，且保持水平。
5）装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡，暂不使用时则加入保护液，4-30℃保存。

2.4 样品纯化

重力柱和预装层析柱均可按此步骤纯化

1) 用 4 倍柱体积的 ddH_2O 清洗填料，再 5 倍柱体积的 Wash Buffer 平衡填料。使填料处于与目的蛋白相同的缓冲体系下，起到保护核酸的作用。
2) 如果需要去除内毒素，请将 ER Buffer 按照步骤 2.2.2 中过滤的上清液体积的十分之一加入上清液中，一般为 6 ml，4℃孵育 30 min。如果不需要去除内毒素，请直接将步骤 2.2.2 中过滤的上清液上样至平衡好的柱子内，收集流出液。
3) 待上样结束后，使用 12-20 倍柱体积的 Wash Buffer 进行洗杂，重力柱根据柱管容量可以分几次加入，重力流完 Wash Buffer。
4) 待洗杂结束后，用 5-8 倍柱体积的 Elution Buffer 洗脱，并使用离心管收集洗脱液。
5) 依次使用 3 倍柱体积的 wash buffer 和 5 倍柱体积的去离子水平衡填料，最后再用 5 倍柱体积的 20%的乙醇平衡，然后保存在等体积的 20%的乙醇中，置于 4℃保存，防止填料被细菌污染。

2.5 异丙醇沉淀

向含有洗脱液的离心管中加入 0.7 倍（V/V）洗脱液体积的异丙醇，缓慢混匀，离心机 11000 rpm，20 min，4℃，离心沉淀质粒。缓慢倒掉上清**（尽量保证沉淀不被悬起）**。
注：推荐加入异丙醇后，放置于-20℃，30 分钟，更有利于沉淀形成，提高回收率。

2.6 乙醇清洗

向沉淀中加入一倍洗脱液体积的 70%乙醇，离心机 11000 rpm，25 min，4℃，缓慢倒掉上清，室温下，静置，待乙醇挥发完全。

2.7 质粒溶解

取适量ddH_2O（或者TE）溶解沉淀，即得到质粒溶液。使用分光光度计测A260，定量，A260/A280的比值应该在1.8~2.0之间。使用琼脂糖电泳检测质粒纯度。

3. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Rapid Plasmid Purification MegaPrep Kit	SI125K05	5 Assays
	SI125K10	10 Assays
Plasmid Purification MegaPrep Kit	SI108K05	5 Assays
	SI108K10	10 Assays
Phmac PlasmidPure Beads	SA154005	5 ml
	SA154025	25 ml
	SA154100	100 ml
	SA154500	500 ml
	SA15401L	1 L
	SA15410L	10 L