



Plasmid Purification 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

Plasmid Purification 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. Plasmid Purification Beads 产品性能

项目	性能
载量	约 0.18-0.25 mmol Cl/ml 介质
粒径	45-165 μm
建议流速	400-700 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 100 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，5000 rpm，离心 5 min，弃去培养基，保留沉淀。

2.2.2 菌体裂解

将 10 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 10 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 10 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 10 min，再使用滤纸过滤所得上清。

2.3 介质装填

Plasmid Purification 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装填，下面介绍装填层析柱的方法。

层析柱的装填（使用储液器装填）

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。

1) 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头，确保柱底筛板上无气泡，关闭柱底出口，并在柱底部留出 1-2 cm 的去离子水。



- 2) 将填料悬浮起来，小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3) 如果使用储液器，应立即在层析柱和储液器中加满水，将进样分配器放置于浆液表面，连接至泵上，避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4) 打开层析柱底部出口，开启泵，使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱，然后缓慢增加至最终流速，这样可避免液压对所形成柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速，可以用你所使用泵的最大流速，这样也可以得到一个很好的装填效果。（注意：在随后的色谱程序中，不要超过最大装柱流速的 75%）当柱床高度稳定后，在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
- 5) 关闭泵，关闭层析柱出口。
- 6) 如果使用储液器，去除储液器，将分配器置于层析柱中。
- 7) 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器，锁紧分配器接头。
- 8) 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中，开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

层析柱测试

为了检验层析柱的质量，应进行柱效测试，以确定理论塔板数和峰不对称系数。

洗脱液: 去离子水

样品: 2% (v/v) 丙酮水溶液或者 1 M NaCl 溶液

如图 1 所示计算理论塔板数，用如下公式： $N/m = 5.54 (V_R/V_h)^2 \times 1000/L$

计算峰不对称系数 (A_s) 公式如下： $A_s = b/a$ (如图 1 所示)

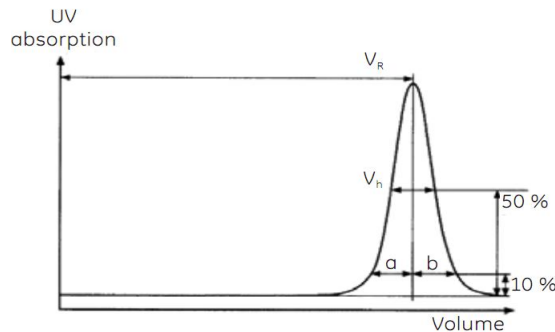


图 1. 柱效检测方法实例

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 2 倍柱体积的 ddH₂O 清洗填料，再 2-3 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 3 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 5-10 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 2-5 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，15 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 8000 rpm，10 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ddH₂O（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
Plasmid Purification MidiPrep Kit	SI020K05	5 Assays
	SI020K10	10 Assays
Plasmid Purification MaxiPrep Kit	SI014K05	5 Assays
	SI014K10	10 Assays
MaxiPrep Buffer Kit	SI014KB	10 Assays
Plasmid Purification GigaPrep Kit	SI017030	10 mg (30 ml)
	SI0170100	30 mg (100 ml)
	SI0170300	100 ml (300 ml)
	SI0170300*3	100 mg*3(300 ml*3)
GigaPrep Buffer Kit	SI017B05	5 Assays
Plasmid Purification Beads	SI014030	30 ml
	SI014100	100 ml
	SI014300	300 ml
	SI014500	500 ml
	SI01401L	1 L