

# 慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 135 期

东曹色谱产品在质粒 DNA 纯化与分析  
中的应用



2020 年 11 月

## 第 135 期 东曹色谱产品在质粒 DNA 纯化与分析中的应用

质粒 (plasmid) 是一种小型环状 DNA, 在基因工程中常利用质粒作为运载体, 将目的基因转移到受体细胞内。虽然近年来开发了不少更为先进的基因转移载体 (如慢病毒载体、腺病毒载体、AAV 载体等), 但质粒载体由于制备简便以及在各类细胞中的高效转染率, 仍然被大多数实验室使用。

随着基因治疗的迅速发展, 高纯度的质粒 DNA 的需求量越来越大。在纯化质粒 DNA 时, 除了需要去除混入的蛋白质、RNA、内毒素和宿主基因组 DNA 等杂质以外, 还需要去除质粒 DNA 的立体异构体 Open circular 体 (开环状质粒) 和 Linear 体 (直链线状质粒), 只对 Supercoiled 体 (超螺旋状质粒) 进行纯化。

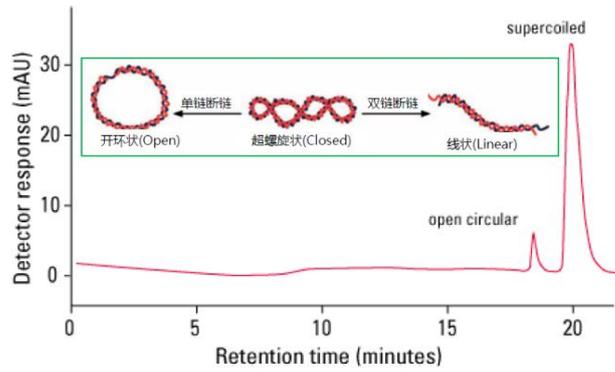
### 质粒的色谱分离模式

分离模式	分离方法	分离原理	去除杂质	纯化步骤
尺寸排阻色谱 (SEC)	等度分离	分子尺寸的差异 (质粒分子较大, 在排阻 V0 附近洗脱)	延迟洗脱	初期粗纯 精制
阴离子交换色谱 (AIEC)	吸附/梯度洗脱	电荷的差异 (质粒带高负电荷)	流穿或梯度 (质粒异构体分离)	捕获 中间步骤 精制
疏水色谱 (HIC)	流穿 吸附/梯度洗脱	疏水性的差异	疏水性的差异 (质粒异构体分离)	捕获 中间步骤

Ref.: Palmieri et al., BioProcess International, 2011, Lonza webinar, modified

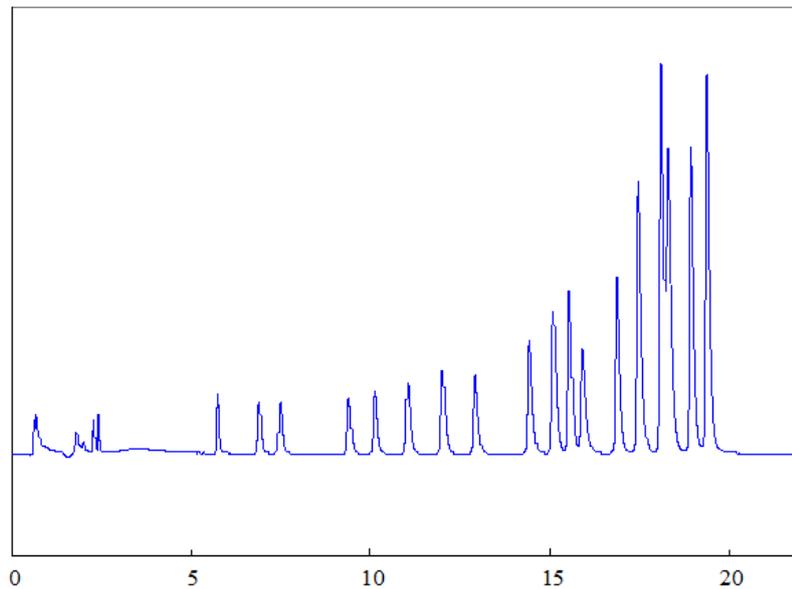
### 使用阴离子交换色谱分析质粒 DNA

基因治疗实验中质粒纯度的检测方法之一是测量开环质粒和超螺旋质粒的相对量。下图是采用阴离子交换色谱柱 TSKgel DNA-NPR 分析质粒的谱图。此款色谱柱采用无孔的亲水聚合物基质填料, 表面由弱阴离子交换基团改性, 具有极高的蛋白回收率。适用于对 DNA 片段, PCR 产物及质粒的高效分离。



色谱柱: TSKgel DNA-NPR (2.5  $\mu$ m, 4.6 mm ID  $\times$  7.5 cm)  
 洗脱液: 缓冲液 A: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)  
 缓冲液 B: 含有 1 mol/L NaCl 的缓冲液 A  
 缓冲液 B: 从 50%到 65%的 10 CV 的线性梯度  
 流速: 1.0 mL/min  
 检测: UV @ 260 nm  
 样品: PUC19 质粒

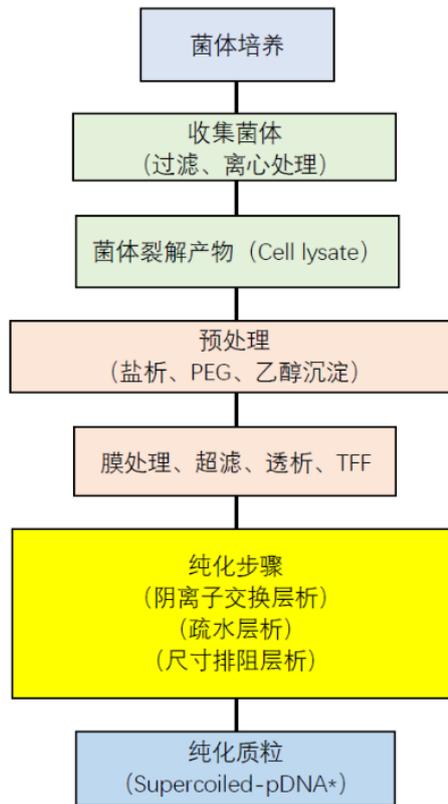
**Application Title:** Separation of plasmid digest  
**Compound:** plasmid pBR322 HaeIII digest



Column: TSKgelDNA-NPR 4.6mm $\times$ 7.5cm, P/N 18249, 4.6mm $\times$ 7.5cm  
 Mobile Phase: A:20mmol/LTris-HCl (pH9.0) ; B:20mmol/LTris-HCl (pH9.0) +1mol/L NaCl;  
 gradient:0min ( B25%) $\rightarrow$ 0.1min ( B45%) $\rightarrow$ 4min ( B50%) $\rightarrow$ 80min ( B100%)  
 Flow Rate: 0.75mL/min  
 Detection: UV/VIS 260nm  
 Temperature: 35 $^{\circ}$ C  
 Injection Volume: 10 $\mu$ L  
 Title: Separation of plasmid digest

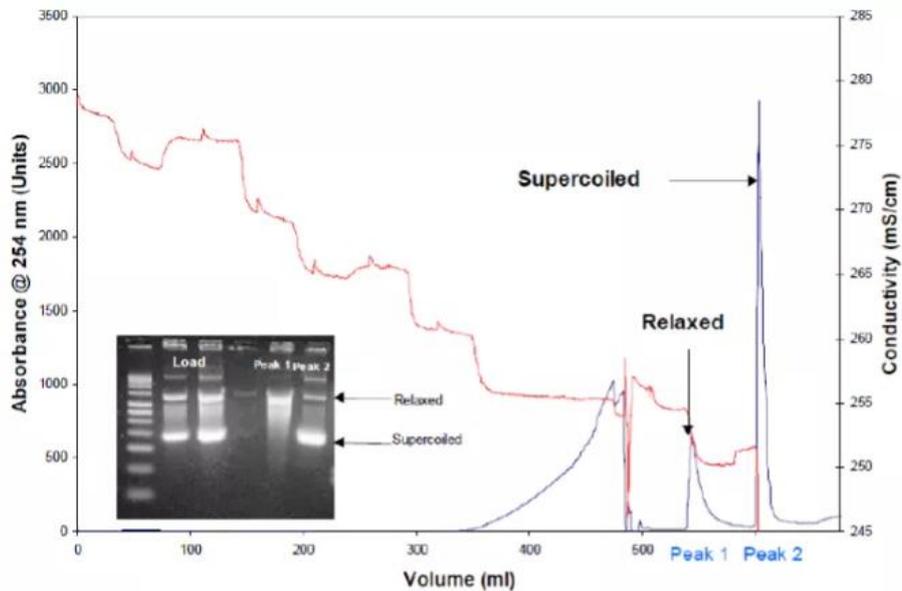
## 质粒的纯化工艺步骤示例

在质粒 DNA 的纯化工艺中通常使用阴离子交换层析、疏水层析和尺寸排阻层析。质粒 DNA 与内毒素相比，其疏水性非常低，所以使用疏水填料可以从质粒 DNA 中有效去除内毒素。



Ref.: S.Palmieri et al., BioProcess International, 2011, Lonza webinar, modified

## 使用 Toyopearl Butyl-650S 疏水填料纯化质粒



Ref.: S.Palmieri et al., BioProcess International, 2011, Lonza webinar

## 使用 TSKgel 和 TOYOPEARL 分离纯化质粒载体的应用实例

分离模式	色谱柱	应用	文献名称
SEC IEC,HIC	TSKgel G-DNA-PW、 G6000PWXL、 DNA-NPR、Butyl-NPR	质粒 DNA	Characterization of Plasmid DNA Samples by Chromatographic Methods
IEC	TSKgel DNA-NPR	质粒 DNA	Separation of topological forms of plamid DNA by anion-exchange HPLC: Shifts in elution order of linear DNA
SEC	TSKgel G-DNA-PW、 G6000PWXL	质粒 DNA	High-speed chromatographic purification of plasmid DNA with a customized biporous hydrophobic adsorbent
IEC	TSKgel DNA-NPR	质粒 DNA	Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of the plasmid isoforms thereby observed
分离模式	层析填料	应用	文献名称
AFC	精氨酸固定化 AF-Epoxy-650M	超螺旋质 粒 DNA	Effect of Chromatographic Conditions on Supercoiled Plasmid DNA Stability and Bioactivity
HIC	Butyl-650M	质粒 DNA	Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy



**北京慧德易科技有限责任公司**

咨询电话：010-59812370/1/2/3

公司官网：[www.prep-hplc.com](http://www.prep-hplc.com)

邮 箱：[sales@prep-hplc.com](mailto:sales@prep-hplc.com)

微信公众号：北京慧德易