

# Plasmid MoSphere<sup>®</sup> 50V

## 超大孔质粒亲和层析介质

## 使用指南

### 1 产品简介

质粒 DNA 是一种尺寸远大于蛋白质的生物大分子，对于传统的色谱介质而言很难进入介质的孔道内。同时，由于细胞裂解液的粘度较高，扩散速度较慢，因此传统的色谱介质已很难满足质粒 DNA 纯化的要求。

科诺赛经过充分的市场调研，了解到质粒纯化过程中的难点与需求，自主设计开发了基于 PMMA 基质超大孔径的质粒亲和层析介质 Plasmid MoSphere<sup>®</sup> 50V。该产品具有 4000 Å 的超大孔径，远大于普通琼脂糖基质（300 Å）和普通聚合物基质（800~1000 Å），且具有独特的亲水性设计，非特异性吸附极低；其超大孔结构优化了配基密度，可实现孔道内快速捕获，大大提高了质粒 DNA 的载量，不仅能够实现质粒 DNA 的快速纯化，还能提高质粒样品的处理量。在高盐环境下配基与质粒因强亲和性而结合，杂质除去后，可通过降低缓冲液盐浓度洗脱质粒，适用于质粒 DNA 的纯化。

应用领域：疫苗、基因治疗领域中超螺旋质粒 DNA 的纯化。

### 2 技术参数

产品名称	Plasmid MoSphere <sup>®</sup> 50V
基质	PMMA
粒径	50μm
孔径	4000 Å
配基密度	3.5mg/ml 2-巯基吡啶
每毫升载量	>5mg 超螺旋质粒
推荐流速	50~300cm/h （根据柱子规格选择合适流速）
最大耐压	3 MPa
pH 稳定性	2~12（储存） 3~11（工作）
化学稳定性	常见水相溶液： 1M HAc <sup>+</sup> 、30%异丙醇，70%乙醇，0.1M NaOH
CIP	0.5M NaOH
存储	2~30°C 20% 乙醇

## 3 操作说明

### 3.1 填料装柱

Plasmid MoSphere<sup>®</sup> 50V 质粒亲和层析介质可以在实验室被填充到 HiQumn<sup>®</sup> 中压层析柱中，以扩大产量。将填料填充到层析柱中，根据样品中蛋白含量和填料载量选择合适的层析柱和柱高。

#### 3.1.1 填料准备

在装柱前，填料要平衡到室温，建议采用静置沉淀法，确定胶悬液浓度，我们原包装的填料以 50% 的浓度储存在 20% 的乙醇中。压缩比在 1.02。

通过真空抽滤，将填料中 20% 乙醇溶液更换为装柱所需的溶液（例如水），重复以上步骤 3 次，最后用装柱缓冲液重新悬浮填料，建议胶悬液浓度为 50%~60%。

所需悬浊液体积 (mL) = 装柱体积 (mL) \* 填料压缩因子 / 胶悬浊液浓度

#### 3.1.2 层析柱准备

HiQumn<sup>®</sup> 中压层析柱和装柱器在使用前，应用装柱液润洗，检查层析柱完好无损伤，确保所选筛网（筛板）的孔径和所选填料的粒径相匹配，确保底端部件和顶部适配器的管件连接牢固。

#### 3.1.3 层析柱装柱

- 1) 取清洗干净的 HiQumn 中压层析柱，借助蛋白纯化仪或注射器，用装柱液通过下端接头排空管线及筛板中的空气，也可用重力法排空筛板及管线中的空气，在柱子底部保留 1cm 高左右的液体，拧紧下堵头，调整柱子使其垂直于地面。
- 2) 再次混匀胶悬液，确保悬液均一，借助玻璃棒将胶悬液缓慢且一次性贴壁倒入柱管中，用装柱液冲洗柱管并加满。注意不要带入气泡。

*注：当装柱体积大于柱体积的 50% 以上时建议借助配套装柱器装柱。*

- 3) 使其自然沉降，胶面上有 1~2cm 澄清液时，将适配器管线连接设备，低流速运行，排出适配器管线中的气泡，打开底部管线堵头，将适配器以 45° 角放入玻璃管中，顺时针拧紧上端固定帽，调节适配器使其 O 型圈浸入澄清液中，之后顺时针拧紧上端调节帽。请确保整个操作在一条直线上完成，注意不要引入气泡。
- 4) 可以采用高流速或者恒压法压至胶面清晰稳定。读取刻度并记录，关闭流速。
- 5) 如用装柱器装柱，拆除装柱器，用快速锁将调节杆缓慢下移至胶面位置，将上端调节帽顺时针拧紧，继续运行上述流速，如果胶面发生改变，可以重新调节适配器高度。
- 6) 稍微拧松上端调节帽，按压缩比确定最终柱床高度，拧紧上端调节帽，采用先下后上的方式拧紧上下端堵头，装柱完毕。

### 3.2 柱效测定

- 1) 通过柱效测定和评价可以确认层析柱装填质量。装柱完成后、层析柱使用期间以及分离纯化效果不理想时都需要进行柱效测定和评价。柱效通常用理论塔板高度 (HETP) 和非对称因子 (As) 来评价。
- 2) 柱效测定可以采用丙酮或者 NaCl 作为样品进行测定，按照下表配制样品溶液和流动相

	丙酮法测柱效	NaCl 法测柱效
样品	1.0% (v/v) 丙酮水溶液	0.8M NaCl (溶于水)
样品体积	1.0%柱体积	1.0%柱体积
流动相	纯化水	0.4M NaCl 水溶液
流速	30 cm/h	30 cm/h
检测器	UV 280 nm	电导率

### 3) HETP 和 As 计算方法

根据 UV 或者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)，公式如下：

$$HETP=L/N$$

$$N=5.54(V_R/W_h)^2$$

其中：

$V_R$ =保留体积  $W_h$ =半高峰宽

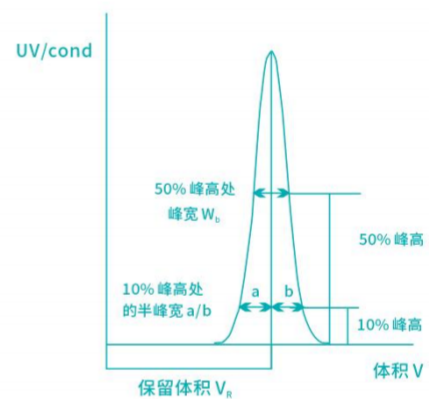
$L$ =柱高  $N$ =理论塔板数  $V_R$  和  $W_h$  的单位应一致；

$As=b/a$

其中：

$a$ = 在 10%峰高处的第一个半峰宽

$b$ = 在 10%峰高处的第二个半峰宽



### 4) 结果评价

一般来说，HETP 的数值若小于三倍介质平均颗粒大小且非对称因子在 0.8~1.8 之间，说明柱效良好。对于不理想的柱效结果需要分析原因并重新装柱。

## 3.3 层析方法

### 3.3.1 缓冲液准备

所用水和缓冲液在使用前用 0.22 $\mu$ m 或 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤除菌。

结合缓冲液：2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+10mM EDTA+100mM Tris, pH 7.5

洗脱缓冲液：1.7M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0.3M NaCl+10mM EDTA+100mM Tris, pH 7.5

### 3.3.2 样品准备

为了避免堵塞层析柱，样品应经离心或 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜处理。

### 3.3.3 样品纯化

- 1) 平衡：用结合缓冲液充分平衡层析柱，通常需要 3~5 CV。
- 2) 上样：根据介质的载量和样品中 DNA 浓度确定上样体积，进行上样。
- 3) 淋洗：利用结合缓冲液清洗掉开环的质粒 DNA。
- 4) 洗脱：可以采用推荐的洗脱缓冲液洗脱，收集洗脱峰。
- 5) 再生：用 3CV 水清洗层析柱，再用 3CV 0.5M NaOH 清洗，用 3CV 水将 NaOH 清洗干净。
- 6) 再平衡：用结合缓冲液清洗，待 pH 和电导率与平衡缓冲液基本一致，就可以进行第二次上样，如此重复。

7) 保存：保存在等体积的 20%乙醇中，置于 4°C 保存，为了防止乙醇挥发以及微生物滋生，建议每 3 个月更换一次新鲜的保存液。

## 4 在位清洗

随着层析介质使用次数的增加，污染物在层析柱上的积累也在不断增加，定期的在位清洗能有效防止污染物的累积，保持层析介质稳定的工作状态。客户可根据使用过程中介质的污染程度确定在位清洗的频率（如果污染较严重，建议每次使用之后都进行在位清洗，以保证结果的可重复性）。

### 4.1 变性蛋白去除

采用 0.5M NaOH 清洗 2~4CV，用纯化水将 NaOH 清洗后用 2~4 CV 的平衡缓冲液平衡。

### 4.2 强疏水性物质或者脂类去除

采用 2~4CV 20mM PB+30%异丙醇，pH7.5 的缓冲液清洗柱子，冲洗前后用纯化水清洗。

## 5 订货信息

### 预装柱

货号	产品名称	规格
30-6010-01	Xtrap Plasmid 50V	1mL
30-6010-05		5mL
30-6010-10		8x100mm

### 层析介质

货号	产品名称	规格
20-6010-02	Plasmid MoSphere <sup>®</sup> 50V	30mL
20-6010-03		100mL
20-6010-04		500mL
20-6010-05		1L
20-6010-07		10L

1. Plasmid MoSphere<sup>®</sup> 50V 层析介质可提供试用装
2. 如需更大规格或型号定制可联系我公司销售人员



非常感谢您订购科诺赛生物的产品！  
如需了解最新产品信息，请拨打服务热线 0532-55679191  
或发邮件至 [marketing@chromsep.cn](mailto:marketing@chromsep.cn)  
或登陆官方网站 [www.chromsep.cn](http://www.chromsep.cn)