



# Plasmid Bind Beads 6FF

## 目录

|                   |   |
|-------------------|---|
| 1. 产品介绍.....      | 1 |
| 2. 纯化流程.....      | 1 |
| 3. 填料再生.....      | 2 |
| 4. 订购信息及相关产品..... | 2 |

## 1. 产品介绍

**Plasmid Bind Beads 6FF** 是一种亲疏芳香族层析介质。可以选择性的将共价闭环环状超螺旋质粒 DNA 和开环的结构分开。**Plasmid Bind Beads 6FF** 以高度交联的 6%琼脂糖凝胶为基质，通过化学方法偶联了巯基吡啶配体，可以耐受最高 0.3 MPa 的压力，该基质的亲水性确保了低水平的非特异性结合。**Plasmid Bind Beads 6FF** 保证从研究规模到 cGMP 生产规模都能得到一致的纯化结果。

表 1. Plasmid Bind Beads 6FF 产品性能

| 性能      | 指标                  |
|---------|---------------------|
| 基质      | 高度交联的 6%琼脂糖凝胶       |
| 配体      | 巯基吡啶                |
| 载量      | ~2 mg sc pDNA/ml 基质 |
| 粒径      | 45–165 μm           |
| 最大耐压    | 0.3 MPa, 3 bar      |
| pH 稳定范围 | 3-11                |
| 储存缓冲液   | 含 20%乙醇的 1XPBS      |

## 2. 纯化流程

### 2.1 缓冲液的准备

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。

平衡液：100 mM Tris, 2.3 M 硫酸铵, 10 mM EDTA, pH 7.5

洗杂液：100 mM Tris, 2.0 M 硫酸铵, 10 mM EDTA, pH 7.5

洗脱液：100 mM Tris, 0.3 M NaCl, 1.7 M 硫酸铵, 10 mM EDTA, pH 7.5

样品稀释液：200 mM Tris, 4.6 M 硫酸铵, 20 mM EDTA, pH 7.5

### 2.2 样品准备

上柱之前要确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，可以用平衡液对样品进行透析，或者用样品稀释液，将样品与溶液按 1:1 稀释。

样品在上样前建议离心或用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤，减少杂质，提高纯化效率和防止堵塞柱子。

### 2.3 Plasmid Bind Bead 6FF 的装填

#### 2.3.1 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。
- 2) 将 **Plasmid Bind Beads 6FF** 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，2-8℃保存。

#### 2.3.2 中压层析柱的装填

**Plasmid Bind Beads 6FF** 被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中压色谱层析柱的填装，下面介绍填装层析柱的方法。

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) 将介质悬浮起来，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。

## 2.4 样品纯化

### 2.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量，取适量 **Plasmid Bind Beads 6FF** 加入离心管中，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清；也可加入重力柱中，流干保护液。
- 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清；如使用重力柱，则直接在重力柱中清洗，直接重力流干平衡液；重复两次以上。
- 3) 加入样品，封闭离心管或重力柱管，4℃振荡孵育 2-4 h 或者 37℃孵育 30 min-2 h。
- 4) 孵育结束后，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清，或过滤收集介质，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。
- 5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤，去除上清（注意不要吸到介质），重复 3-5 次，中间建议更换新离心管。
- 6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱，室温孵育 5 min，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液，可重复 2-3 次。

### 2.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 **Plasmid Bind Beads 6FF** 重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下，重复 2-3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 5 min，保证样品和介质充分接触，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。
- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
- 4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，分段收集，每一个柱体积收集一管，分别检测，既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。

### 2.4.3 中压层析柱法纯化

**Plasmid Bind Beads 6FF** 装填好后，可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子，将层析柱连接至色谱系统中，打开下出口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。
- 2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
- 4) 利用泵或样品环上样。**注：**样品的粘度增加使得即使上样体积很少，也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器更难使用。
- 5) 用洗杂液冲洗柱子，直到紫外吸收达到一个稳定的基线（一般至少 10-15 个柱体积）。
- 6) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，收集洗脱液，即目的蛋白组分。

介质洗脱结束后，用平衡液冲洗 5-10 柱体积，然后用纯水冲洗 5-10 个柱体积，再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积，置于 2-8℃保存。

## 2.5 琼脂糖电泳检测

将使用纯化产品得到的样品（包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分）以及原始样品使用琼脂糖电泳检测纯化效果。

## 3. 填料再生

**Plasmid Bind Bead 6FF** 纯化产品可以重复使用而无需再生，但随着非特异性结合的蛋白的增多和蛋白的聚集，往往造成流速和结合载量都下降，这时可按照下面方法对填料进行清洗。

- 用 5 倍柱体积的去离子水平衡填料；
- 用 5 倍柱体积的 0.5 M NaOH 清洗填料；



- 将填料在 0.5 M NaOH 中孵育至少 15 min;
- 用 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 2-8℃ 保存，防止填料被细菌污染。

#### 4. 订购信息及相关产品

| 名称                    | 货号       | 规格     |
|-----------------------|----------|--------|
| Plasmid Bind Bead 6FF | SA066005 | 5 ml   |
|                       | SA066025 | 25 ml  |
|                       | SA066100 | 100 ml |
|                       | SA066500 | 500 ml |
|                       | SA06601L | 1 L    |
|                       | SA06610L | 10 L   |