



自动化质粒纯化方案——无需辅助设备并减少人工干预

Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc., Irmo, SC

简介

- 质粒纯化在新型生物治疗药物的开发以及最初的产品开发和酶工程中发挥着关键作用。
- 传统的质粒纯化方法需要人工干预，并且由于离心机空间和平衡等要求的限制，产量受限。
- 本文介绍的自动化方法使用分散固相萃取技术（dSPE），去除了离心等离线步骤，并能提供与传统方法相当的产量和质量。
- 文中的方法简化了纯化过程，可以在一小时内纯化 1 ~ 96个样本。

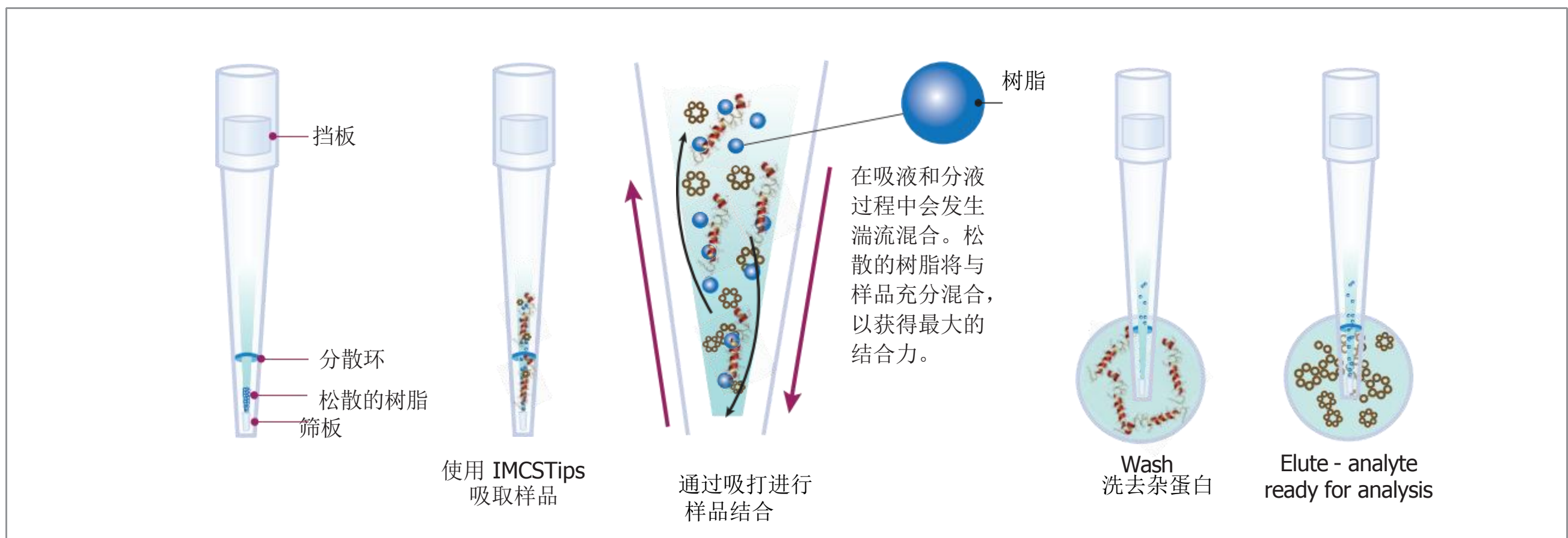
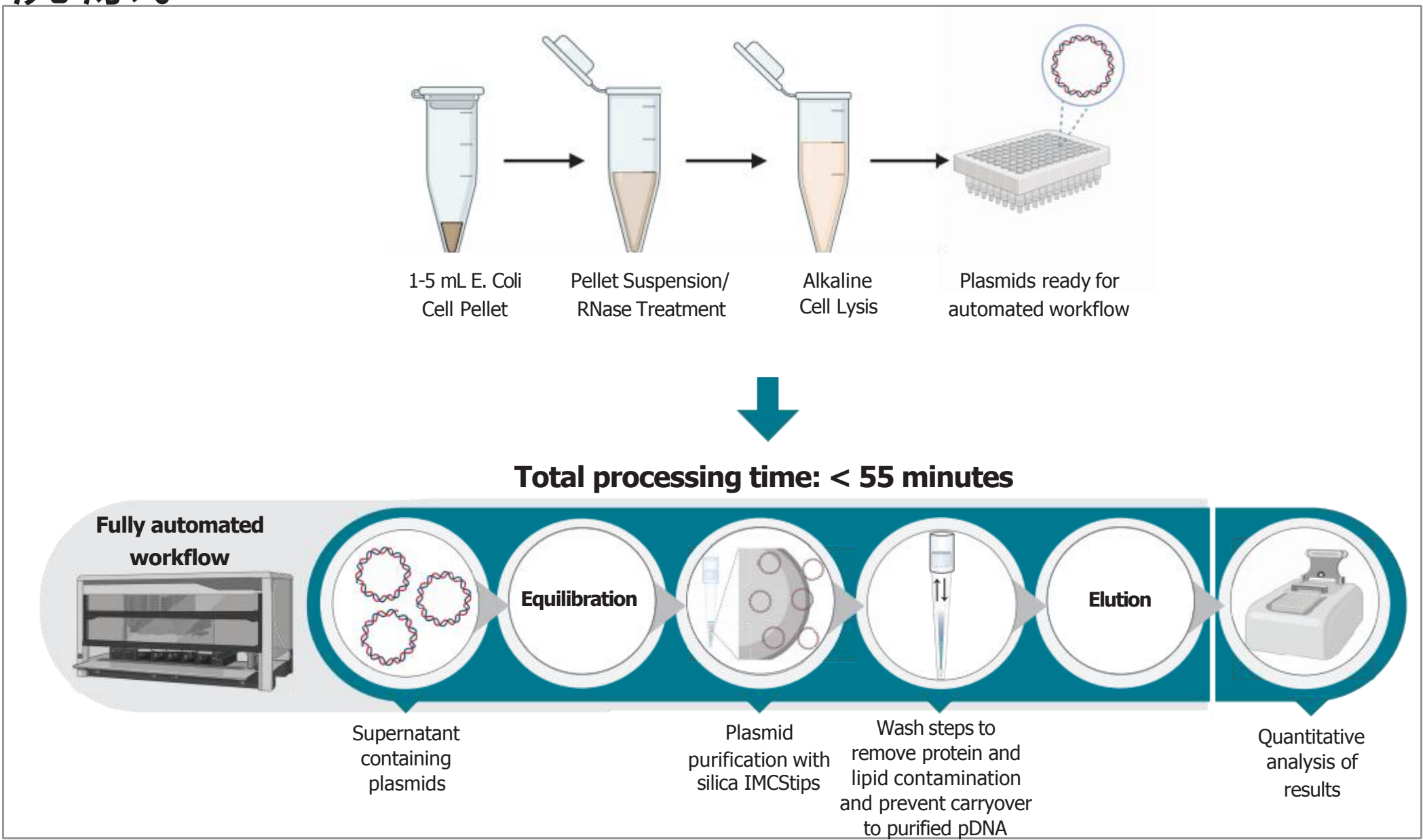


图1:含有松散树脂的 IMCStips® 采用 dSPE 进行高效的自动纯化。硅胶树脂用于从细菌细胞裂解物中纯化pDNA

方法

- 本研究使用了四种源自 DH5α 大肠杆菌的不同大小的质粒：pCRS158 (8484 bp)、pCRS156 (5534 bp)、pCRS492 (4105 bp) 和pCRS 240.4 (3262 bp)。培养物在37°C和300转/分钟的条件过夜培养。
- 过夜培养物通过离心 (4000 xg) 离心收集并通过传统碱性裂解法裂解。
- 将上清液转移到96孔板中，用于自动化纯化。该过程在 Hamilton Microlab STAR™ (ML STAR) 工作站上使用1 mL IMCStips®，其中含有 30 mg 硅胶树脂。
- 纯化过程包括树脂平衡、样本结合、两步醇基洗涤，以及用于去除未结合物和污染物的洗涤。

- 纯化的pDNA在TE缓冲液中洗脱。使用 NanoDrop™ 2000进行定量分析，并通过凝胶电泳对pDNA样本的完整性进行定性评估。
- 将IMCStips®与商业供应商的试剂盒进行了测试



图二 在 Hamilton ML STAR上进行质粒纯化工作流程

仪器及台面布局

- Hamilton Microlab ML STAR.

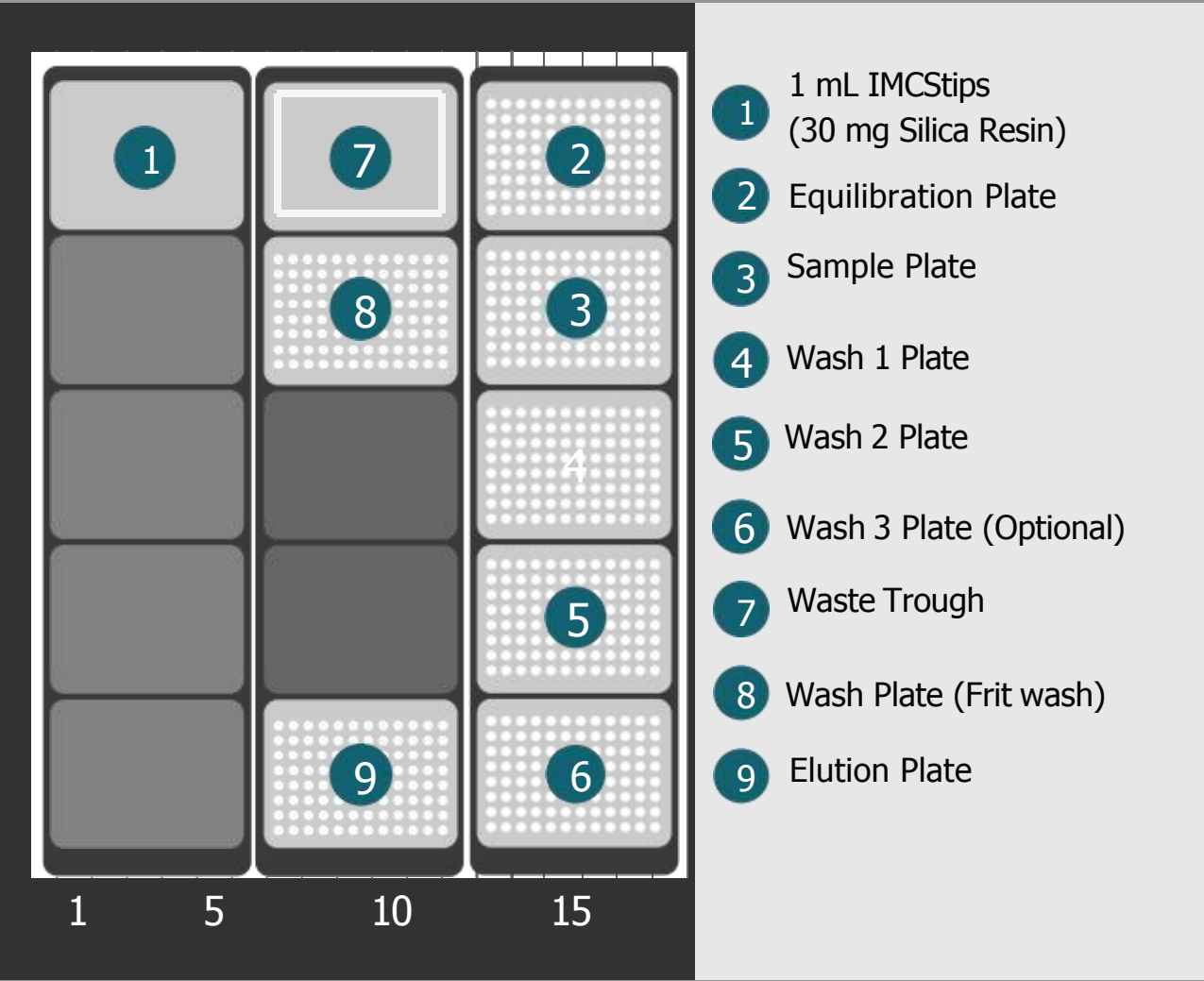


图3 Hamilton ML STAR 上进行自动化质粒纯化的台面布局

Contact: custserv@micro-sep.com

结果

使用 纯化试剂盒比较 pDNA 产率和纯度

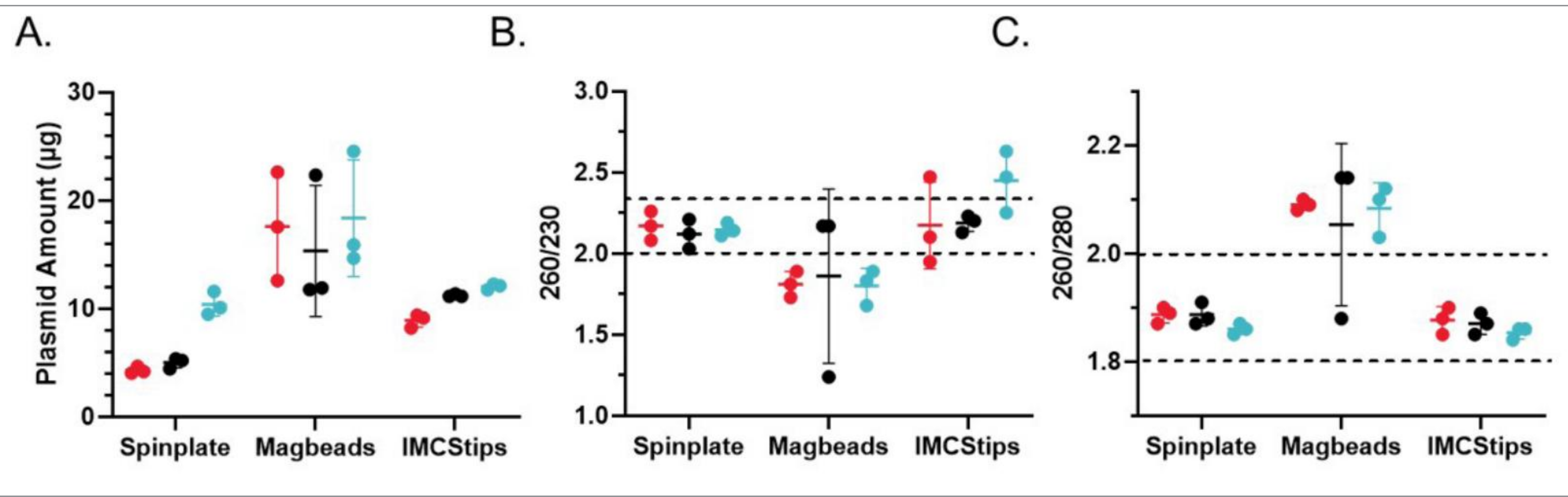


图 4. 不同大小质粒的纯化方法的比较分析
A.) 使用三种不同的纯化方法：旋转平板、磁珠和 IMCStips 分离的 pDNA 的总产率 (µg)
B.) 由 260/230 nm 吸光度比率表示的 pDNA 的纯度。
C.) 由 260/280 nm 吸光度比率表示的 pDNA 的纯度。虚线表示最佳范围。不同颜色的数据点表示不同大小的质粒 (● 4k, ● 5k, ● 8k)。误差线反映了标准偏差。

表1:不同大小质粒的不同纯化方法的pDNA产量和纯度的比较分析

Method	Sample ID	Plasmid Size (bps)	pDNA (ng/µL)	pDNA (µg)	260/280	260/230	Elution Volume (µL)
Spin Plate	4k	4105	28.60 ± 1.70	4.29 ± 0.26	1.89 ± 0.0	2.17 ± 0.1	150
	5k	5534	33.37 ± 2.60	5.01 ± 0.39	1.89 ± 0.0	2.12 ± 0.0	150
	8k	8484	69.23 ± 5.90	10.39± 0.88	1.86 ± 0.0	2.15 ± 0.0	150
IMCStips (30 mg Silica Resin)	4k	4105	59.43 ± 3.30	8.92 ± 0.50	1.88 ± 0.0	2.17 ± 0.2	150
	5k	5534	74.73 ± 0.70	11.21 ± 0.10	1.87 ± 0.0	2.19 ± 0.0	150
	8k	8484	80.27 ± 1.40	12.04 ± 0.22	1.85 ± 0.0	2.45 ± 0.2	150
Magbeads	4k	4105	439.60 ± 102.3	17.58 ± 4.09	2.09 ± 0.0	1.81 ± 0.1	40
	5k	5534	383.37 ± 123.7	15.33 ± 4.95	2.05 ± 0.0	1.86 ± 0.4	40
	8k	8484	459.07 ± 110.1	18.36 ± 4.40	2.08 ± 0.0	1.80 ± 0.1	40

- Spin plates 和 IMCStips® 对不同大小质粒的纯化产量和纯度相似。
- 因为纯化产物中杂质较多，NanoDrop 的结果显示磁珠纯化的产量较高。
- 磁珠纯化产物的 260/280 和 260/230 比率都超出预期范围。
- 凝胶分析显示 Spin plates 和 IMCStips® 具有相似的产量、纯度和超螺旋含量。

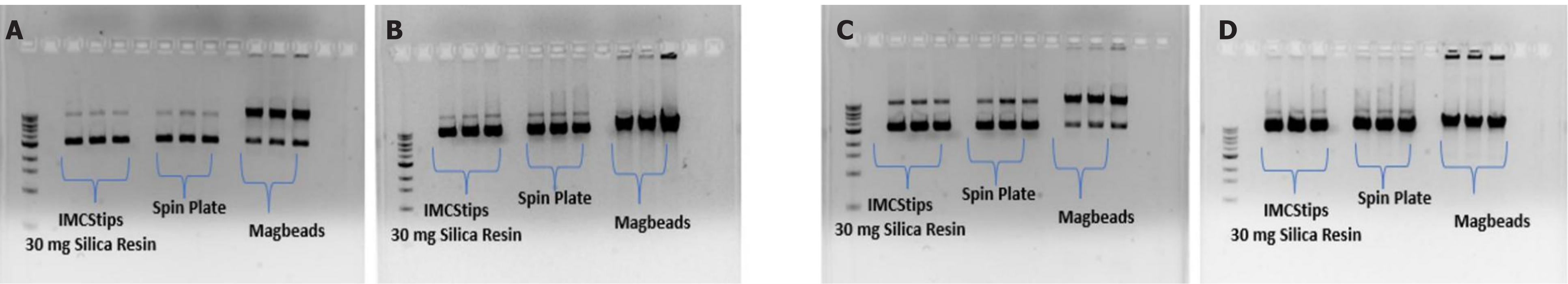


图5. 归一化的方法比较枪头式纯化 (装填硅胶树脂的1 mL IMCStips®)、spin plate 和 磁珠法
图 A 和 B 显示两种大小(4k 和 8k)的质粒纯化结果：分别从 IMCStips、Spin Plate 和 磁珠法的洗脱液体中取 1 µL 洗脱液
图 C 和 D 使用标准电泳直接比较三种纯化方法，为平衡 pDNA 的量，从 IMCStips、Spin Plate 的洗脱液中取 3.75 µL，磁珠洗脱液仍保持 1 µL

硅胶树脂的结合能力

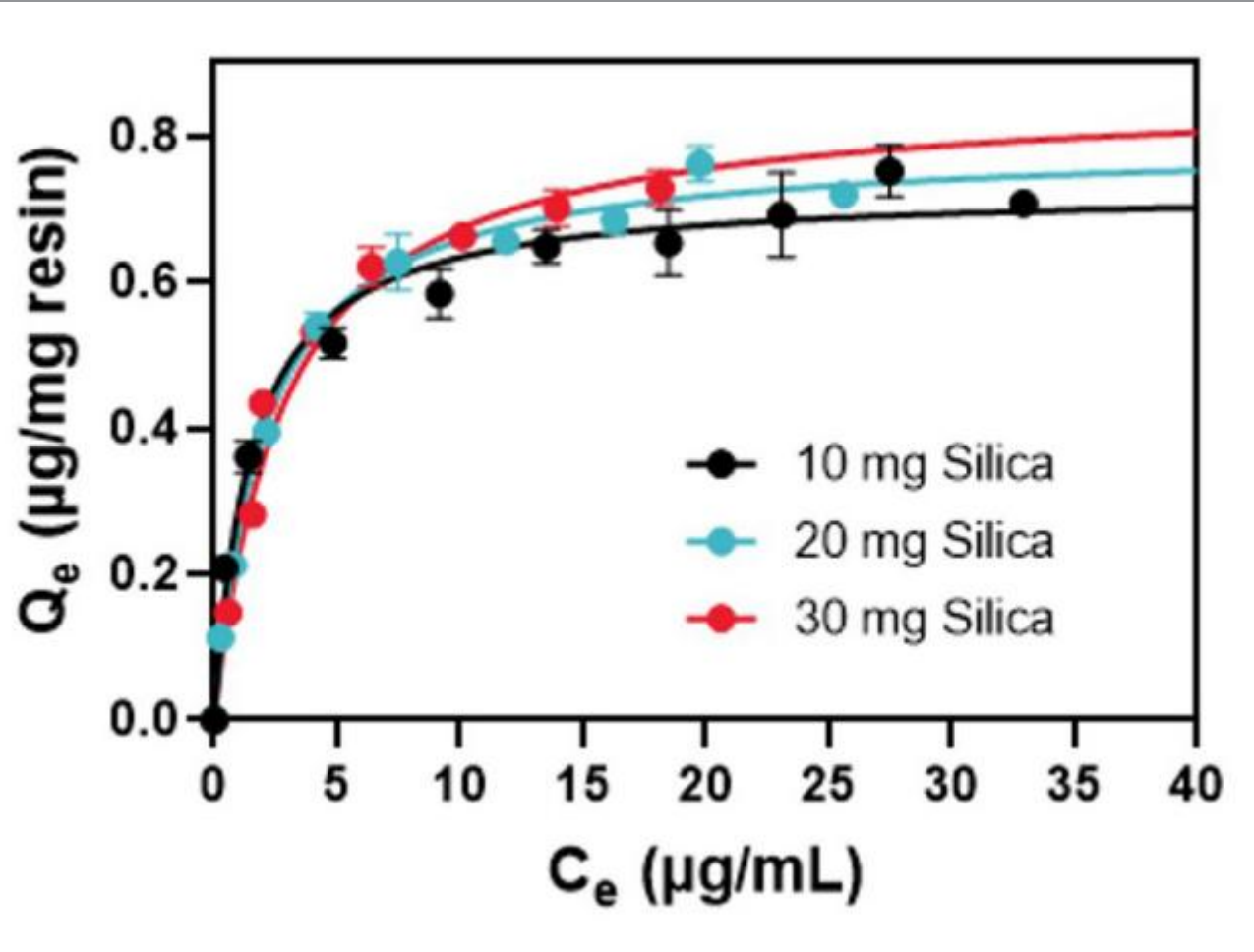


图6. 硅胶树脂结合 pDNA 的能力。该图比较了三种不同量的硅胶树脂 (10 mg、20 mg和30 mg) 对 PCR 156 (5534 bP) 质粒的结合能力 (Qe , µg/mg 树脂)。对于所有树脂量，将溶液中质粒的平衡浓度 (Ce) 对结合的质粒 (Qe) 作图。数据符合朗缪尔等温线模型。

表2：使用不同量的硅胶树脂，当结合时吸打 30 次时 对于PCR 156 (5534 bP) 质粒的最大结合容量 (Qmax)

Silica Resin Amount	Q _{max} @ 30 cycles (5k)
10 mg	0.73 ± 0.03
20 mg	0.79 ± 0.02
30 mg	0.86 ± 0.08

不同树脂量在 30次 循环时的理论结合极限 (Q_{max}) 约为 0.80 µg/mg树脂

结论

- Hamilton ML STAR 自动化液体处理系统的全自动质粒纯化工作流程，无需额外的线下步骤，并能保持与传统方法相当的产量和质量。
- 与磁珠法相比，我们优化的方法具有更高的回收率和纯度，共产量和纯度与手动 Spin Plates 相当。
- 能够在不到 60 分钟的时间内高效处理多达 96 个样品，具有高产量(> 10 µg)和出色的纯度。
- 结合能力实验表明，使用30 mg 二氧化硅可以纯化高达 24 µg 的质粒(5 kb)。