

## CTAB 选择性沉淀和纯化质粒 DNA 工艺的建立

张泉<sup>1</sup>, 于可响<sup>1</sup>, 袁维峰<sup>1</sup>, 薛方明<sup>1</sup>, 孙怀昌<sup>1</sup>, 朱鸿飞<sup>2</sup>

1 扬州大学兽医学院, 扬州 225009

2 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100081

**摘要:** 通过直接在大肠杆菌碱裂解上清中加入十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), 优化 CTAB 与质粒 DNA 量的比例、质粒 DNA 选择性释放溶液的选择和 TritonX-114 的使用, 建立了简单、易行的大规模质粒 DNA 纯化工艺。纯化质粒 DNA 的质量检测结果显示, CTAB 纯化的质粒 DNA 无菌体 RNA 污染, 菌体基因组 DNA、内毒素和蛋白含量分别小于 100 ng/mg、50 EU/mg 和 10 μg/mg 质粒 DNA,  $OD_{260}/OD_{280}$  比值介于 1.75~1.85 之间, 超螺旋质粒 DNA 的比例大于 80%, 该工艺纯化的质粒 DNA 能达到或接近 FDA 规定的人用质粒 DNA 的各项指标, 整个过程不使用动物源性酶和苯酚、氯仿、无水乙醇等有毒或易燃、易爆试剂, 成本低廉, 工艺环保。

**关键词:** 十六烷基三甲基溴化铵, 质粒 DNA, 纯化, 质量检测

## Purification of Large-scale Plasmid DNAs by Selective Precipitation with Cetyltrimethylammonium Bromide

Quan Zhang<sup>1</sup>, Kexiang Yu<sup>1</sup>, Weifeng Yuan<sup>1</sup>, Fangming Xue<sup>1</sup>, Huaichang Sun<sup>1</sup>, and Hongfei Zhu<sup>2</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

2 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** Following *Escherichia coli* lysis with alkali, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was directly titrated into the supernatant. An easy and feasible technology for plasmid purification was established with the optimized proportion between the quantity of CTAB and plasmid, combined with the specific solution for DNA release and TritonX-114 for endotoxin removal. Quality detection showed that the purified plasmid was free of contamination of host RNA. The host bacterial genomic DNA, endotoxin and bacterial protein were less than 10 μg, 50 EU and 10 μg per mg plasmids, respectively. The ratio of  $OD_{260}/OD_{280}$  was between 1.75–1.85. Eighty percent of the prepared plasmids were presented in the supercoiled form. The plasmid purified with this technology can satisfy all criteria stipulated by FDA. The main advantages of the technology include the avoidance of animal-derived enzymes such as ribonucleases A, Proteinase K and toxic reagents like chloroform and phenol. In addition, the technology has low cost and no pollution.

**Keywords:** CTAB, plasmid, purification, quality detection

随着基因免疫和基因治疗研究的快速进展, 批量的动物试验、人体临床试验以及后续的应用需要

**Received:** April 17, 2008; **Accepted:** June 19, 2008

**Supported by:** the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2005AA246020), Scientific Project Research (No. 2004BA519A75-1).

**Corresponding author:** Hongfei Zhu. Tel: +86-10-68919855; E-mail: zqyy123@yahoo.com.cn

国家高技术研究发展项目(No. 2005AA246020)和国家科技攻关项目(No. 2004BA519A75-1)资助。

制备大量高质量的质粒 DNA, 而价格合理的生物制品级重组质粒的规模制备一直是制约基因治疗和基因免疫发展的瓶颈<sup>[1]</sup>。重组质粒的纯化主要涉及菌体基因组 DNA、RNA、蛋白质和内毒素的去除, 目前使用的各种亲和层析法<sup>[2-4]</sup>、蛋白标签法<sup>[5]</sup>和金属离子法<sup>[6-8]</sup>等在某些方面都存在成本高、步骤繁琐等不足。本研究通过对 CTAB 选择沉淀质粒 DNA 方法的优化、质粒 DNA 的选择性释放和用 TritonX-114 沉淀内毒素, 建立了低成本制备高质量质粒 DNA 的方法, 为以重组质粒为基础的核酸疫苗和基因药物在临床上的推广应用奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

限制性内切酶、*Taq* 酶和 DNA marker 购自大连宝生物公司; 大肠杆菌 16S rRNA 基因特异引物由大连宝生物公司合成; CTAB 购自 Amresco 公司; 鲑试剂检测试剂盒购自厦门鲑试剂有限公司; DIG DNA Labeling and Detection Kit 为 Roche 公司产品; BCA 蛋白检测试剂盒购自碧云天公司; 带正电荷的尼龙膜为 Amersham 公司产品; 胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司; 无热原的试管和吸头购自 Axygen 公司; 其他试剂均为国产分析纯级。

### 1.2 菌种、质粒和试验动物

表达 $\beta$ -半乳糖苷酶基因的重组质粒 pcDNA $lacZ$ , 含有不同拷贝数的具有免疫刺激活性的 CpG 寡核苷酸重组质粒 pCpG1、pCPG2、pCpG3 和 pCpG4, 含猪胸膜肺炎放线杆菌保护性抗原基因的重组质粒 pETAII 和 pETIB, 含卡那霉素抗性基因的真核表达载体 pcDNK 均由本实验室构建和保存; pMDT-18 购自大连宝生物公司; 大肠杆菌宿主菌为 *E. coli* DH5 $\alpha$ ; SPF 猪由北京市 SPF 猪育种管理中心提供; AA 肉鸡购自大兴种鸡场。

### 1.3 重组菌的碱性裂解

含重组质粒 DNA 的大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 经 15 L 发酵罐高密度发酵培养后, 6000  $\times$  g 离心 10 min 收集菌体, 按每克湿菌重 5 mL 的比例加入 solution I, 再按 1:2:1.5 的比例分别加入 solution II 和 solution III<sup>[9]</sup>, 室温孵育 15 min 后, 15 $^{\circ}$ C/6000  $\times$  g 离心 10 min, 收集上清, 取 1 mL 上清加入 0.7 倍体积异丙醇沉淀、电泳并进行定量分析。

### 1.4 质粒 DNA 的选择性沉淀

根据质粒 DNA 的初步定量结果, 在室温和 150 r/min 搅拌条件下, 在重组菌碱裂解物离心上清中加入 5%(W/V)的 CTAB 溶液, 使 CTAB 终浓度为 0.18%, 孵育 15 min 后, 室温/6000  $\times$  g 离心 10 min, 将其沉淀用不同的缓冲液溶解, 以备进一步分析; 离心上清液用 0.7 倍体积的异丙醇沉淀后进行琼脂糖凝胶电泳分析。

### 1.5 质粒 DNA 的选择性释放

将 CTAB 沉淀的质粒 DNA 离心沉淀物分为 10 等份, 分别加入 10 mmol/L TE(pH 8.0)、PBS(pH 7.2)、DDW(双蒸水)、3 mol/L NaCl、5 mol/L NaCl、1 mol/L NaAc、3 mol/L NaAc、0.5 mol/L NH<sub>4</sub>Ac、1 mol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 和 3 mol/L KAc 吹散溶解后, 15 $^{\circ}$ C/6000  $\times$  g 离心 10 min, 上清液用紫外分光光度计测定 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub>, 并计算质粒 DNA 含量, 以上清与 CTAB-DNA 复合物中的质粒含量比计算 10 种溶液释放质粒 DNA 的回收率。

### 1.6 内毒素的去除

将纯化的质粒 DNA 溶解于 10 mmol/L TE 缓冲液, 加入 10%的 TritonX-114, 使其终浓度为 1%, 混匀后冰浴 10 min, 然后 42 $^{\circ}$ C 继续孵育 10 min, 20 $^{\circ}$ C/10000  $\times$  g 离心 5 min, 于超净工作台内小心吸取上清液至无热原器皿中, 必要时重复操作 1 次。

### 1.7 纯化质粒的质量检测

#### 1.7.1 酶切鉴定

将纯化的 pcDNA $lacZ$  分别用 *Hind* III 和 *Bam*HI、*Hind* III 和 *Eco*R I、*Hind* III 和 *Xho* I、*Hind* III 和 *Apa* I 酶切, 对消化产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

#### 1.7.2 RNA 检测

取最终纯化的质粒 DNA 进行 1%琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后观察是否存在菌体 RNA 污染。

#### 1.7.3 宿主蛋白检测

按照 BCA 蛋白检测试剂盒说明书, 以已知浓度的 BSA 制备标准曲线。用灭菌 DDW 将纯化的 pcDNA $lacZ$  稀释成 0.06  $\mu$ g/ $\mu$ L、0.12  $\mu$ g/ $\mu$ L、0.18  $\mu$ g/ $\mu$ L、0.24  $\mu$ g/ $\mu$ L、0.30  $\mu$ g/ $\mu$ L、0.36  $\mu$ g/ $\mu$ L、0.48  $\mu$ g/ $\mu$ L、0.60  $\mu$ g/ $\mu$ L、0.72  $\mu$ g/ $\mu$ L 和 0.84  $\mu$ g/ $\mu$ L, 在同样条件下对纯化质粒 DNA 中的菌体蛋白进行定量检测, 每个样品重复 3 次, 取其平均值。

#### 1.7.4 基因组 DNA 检测

PCR 制备 16S rRNA 基因的核酸杂交探针,

50  $\mu$ L PCR 反应体系包括 5  $\mu$ L 10 $\times$ buffer, 2 u *Taq* 酶, 50 pmol 的 16S rRNA 基因特异引物(序列分别为 5'-cgttaccgcgagaagaagca-3'和 5'-catctgacttaacaaccgcc tg-3'), 10 ng 大肠杆菌基因组 DNA; 30 次循环的 PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 45 s(第 1 次循环为 2 min), 54 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s(最后 1 次循环为 10 min)。扩增的目的片段经胶回收后, 按 DIG DNA Labeling and Detection Kit 说明书进行核酸探针标记, 探针用量为 3  $\mu$ g, 引物为随机的 6 聚核苷酸, 变性条件为 100 $^{\circ}$ C/10 min, 标记反应条件为 37 $^{\circ}$ C/24 h, 终止反应为 65 $^{\circ}$ C/10 min。

将用基因组 DNA 试剂盒(OMEGA)提取并定量的 75 ng、37.5 ng、18.7 ng、9.4 ng 和 4.7 ng 的大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 基因组 DNA 和 CTAB 法纯化的 0.5  $\mu$ g、1  $\mu$ g 质粒 DNA 用 *EcoR* I 酶切过夜, 琼脂糖凝胶电泳分离后用虹吸法转膜, 经紫外交联(330 nm/2 min)后, 按 DIG DNA Labeling and Detection Kit 试剂盒说明书进行核酸杂交, 预杂交条件为 42 $^{\circ}$ C/4 h(预杂交液含 50%甲酰胺), 杂交条件为 42 $^{\circ}$ C/6 h(杂交液含 50%甲酰胺), 洗涤条件为 65 $^{\circ}$ C/15 min, 用 NBT/BCIP 显色后判断结果(阴性或阳性)。

1.7.5 内毒素检测

用无热原的去离子水将内毒素标准品和 2  $\mu$ g 质粒 DNA 进行倍比稀释, 使标准品内毒素的含量分别为 0.2 EU/ $\mu$ L、0.1 EU/ $\mu$ L、0.05 EU/ $\mu$ L、0.025 EU/ $\mu$ L、0.0125 EU/ $\mu$ L、0.006 EU/ $\mu$ L, 质粒 DNA 的浓度为 1000 ng/ $\mu$ L、500 ng/ $\mu$ L、250 ng/ $\mu$ L、125 ng/ $\mu$ L 和 62.5 ng/ $\mu$ L, 每样品 3 个重复。向 100  $\mu$ L 内毒素标准品和质粒 DNA 稀释液中加入 100  $\mu$ L 鲎试剂, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h 后观察凝胶的形成情况, 根据凝胶的形成与否和牢固程度判定为阳性和阴性, 并根据与内毒素标准品的比较计算出质粒 DNA 中内毒素的含量。用纯化的质粒 DNA 肌肉注射 20 只 15 日龄 AA 肉鸡 (0.5 mg/只)和 6 头 2 月龄 SPF 猪(1 mg/头), 定期观察和记录体温等生理反应, 观察期为 7 d。

2 结果

2.1 质粒 DNA 的选择性沉淀

向质粒 DNA 的重组菌碱性裂解物离心上清中加入终浓度为 0%~0.25%的 CTAB, 室温孵育 10 min 后, 15 $^{\circ}$ C/6000  $\times$  g 离心 10 min, 凝胶成像系统分析和紫外分光光度计检测结果显示, 当加入的 CTAB 终

浓度达到 0.18%时, 100% RNA 存在于上清中, 28% 杂蛋白存在于沉淀复合物中(图 1)。

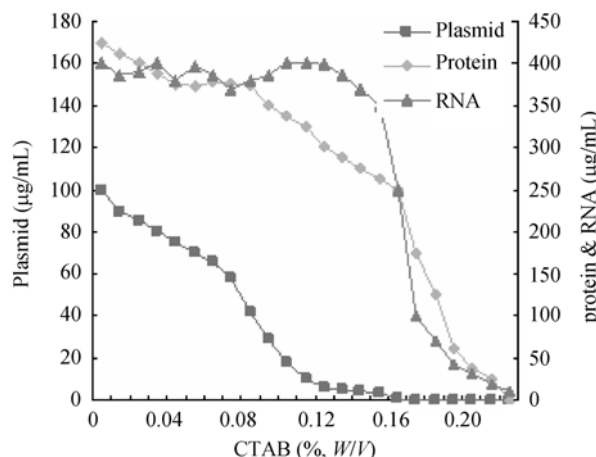


图 1 CTAB 对质粒 DNA 的选择性沉淀效果  
Fig. 1 Selective precipitation of plasmid by CTAB

分别向含不同起始浓度和大小 pcDNA*lacZ*、pCpG1、pCPG2、pCpG3、pCpG4、pMDT、pETAlI 和 pcDNK 质粒 DNA 的重组菌碱性裂解物离心上清液中加入终浓度为 0.18%的 CTAB, 孵育 10 min 和 15 $^{\circ}$ C/ 6000  $\times$  g 离心后, 沉淀复合物经溶液 3 mol/L KAc 溶解, 离心上清经异丙醇沉淀后, 沉淀的质粒 DNA 用琼脂糖凝胶电泳分析, 结果表明, 不同大小的质粒经 CTAB 沉淀法纯化后, 90%为超螺旋质粒, 无 RNA 和宿主基因组 DNA 污染(图 2)。

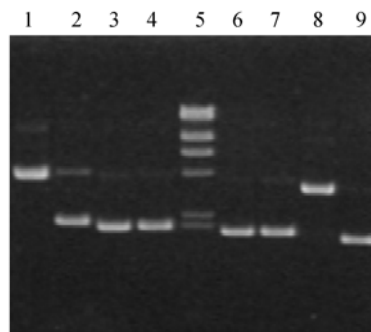


图 2 CTAB 纯化不同质粒的电泳图  
Fig. 2 Electrophoresis of the different plasmidpurified by CTAB

1: pcDNA*lacZ*; 2: pCpG1; 3: pCPG2; 4: pCpG3; 5:  $\lambda$  DNA *Hind* III markers; 6: pCpG4; 7: pMDT; 8: pETAlI; 9: pcDNK

2.2 质粒 DNA 的选择性释放

分别向 CTAB 沉淀物中加入 10 mmol/L TE (pH 8.0)、PBS(pH 7.2)、DDW、3 mol/L NaCl、5 mol/L NaCl、1 mol/L NaAc、3 mol/L NaAc、NH<sub>4</sub>Ac、0.5 mol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 和 3 mol/L KAc, 溶解离心后取上清, 加入

0.7 倍体积的异丙醇沉淀质粒 DNA, TE 溶解后用紫外分光光度计定量, 结果显示除 3 mol/L KAc 溶解质粒 DNA 的回收率为 85%外, 其他溶液的回收率都较低(图 3)。

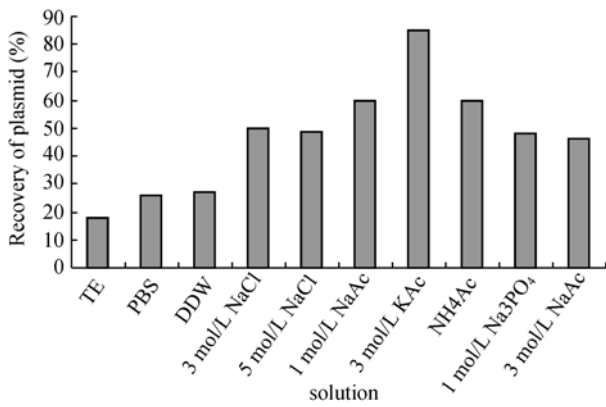


图 3 不同溶液溶解 CTAB-DNA 复合物后质粒的回收率  
Fig. 3 The plasmid recovery after the CTAB-DNA complex dissolved by different solutions

### 2.3 纯化质粒的酶切鉴定

CTAB 纯化后的 pcDNA lacZ 分别经 Hind III 和 BamH I、Hind III 和 EcoR I、Hind III 和 Xho I、Hind III 和 Apa I 双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳结果表明都可被切开, 由于载体中 lacZ 基因也存在一个 EcoR I 位点, 所以用 Hind III 和 EcoR I 双酶切后可以产生 4 条目的片段, 其余的双酶切均产生 2 条带(见图 4)。

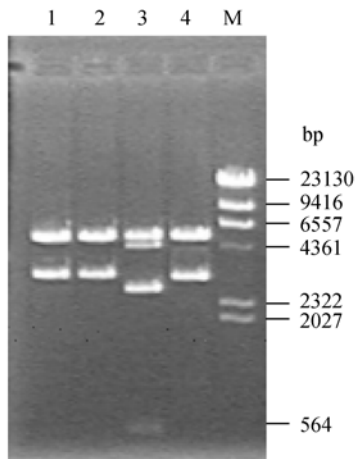


图 4 CTAB 法纯化的 pcDNAlacZ 的酶切鉴定图

Fig. 4 Restriction map of CTAB-purified pcDNAlacZ

1: enzyme digestion by Hind III and Apa I; 2: enzyme digestion by Hind III and Xho I; 3: enzyme digestion by Hind III and EcoR I; 4: enzyme digestion by Hind III and BamH I; M: λDNA Hind III markers

### 2.4 纯化质粒的菌体 RNA 检测

将未纯化和 CTAB 法纯化的质粒 DNA pcDNA lacZ(离心上清和沉淀)进行琼脂糖凝胶电泳分析,

结果显示菌体 RNA 仅存在于 CTAB 选择性沉淀的离心上清中(图 5)。

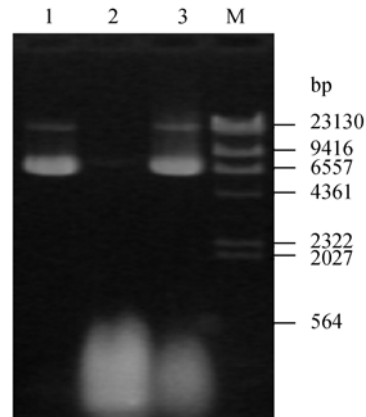


图 5 纯化前后质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 5 RNA detection by gel electrophoresis

1: the plasmid pcDNAlacZ purified by CTAB; 2: the supernatant after CTAB precipitation; 3: the plasmid pcDNAlacZ without purification with CTAB; M: λDNA Hind III markers

### 2.5 纯化质粒的杂蛋白质检测

将 CTAB 法纯化的 pcDNA lacZ 质粒用灭菌 DDW 稀释成 0.06 μg/μL、0.12 μg/μL、0.18 μg/μL、0.24 μg/μL、0.30 μg/μL、0.36 μg/μL、0.48 μg/μL、0.60 μg/μL、0.72 μg/μL 和 0.84 μg/μL, 二辛可宁酸蛋白检测结果显示, 质粒 DNA 中的菌体蛋白含量小于 10 μg/mg 质粒 DNA。

### 2.6 纯化质粒的细菌基因组检测

以 PCR 扩增和地高辛标记的大肠杆菌 16S rRNA 基因片段为探针, 以 DH5α 大肠杆菌基因组 DNA 为参考, 对 CTAB 法纯化的质粒 DNA 中的菌体基因组 DNA 进行检测, 结果小于 10 ng/μg 质粒 DNA(图 6)。

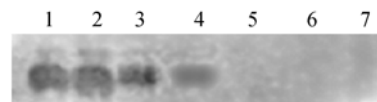


图 6 纯化质粒中宿主基因组的 Southern blotting

Fig. 6 Detection of the host genomic DNA in the purified plasmid by Southern blotting

1~5: 75 ng, 37.5 ng, 19 ng, 10 ng, 5 ng DH5α DNA, respectively, 6: 0.5 μg purified plasmid DNA, 7: 1 μg purified plasmid DNA

### 2.7 纯化质粒 DNA 的内毒素检测

按照鲎试剂说明书对纯化的质粒 DNA 进行检测, 结果显示内毒素含量为 50 EU/mg 质粒 DNA。将纯化的质粒 DNA 肌肉注射 20 只 AA 肉鸡(0.5 mg/只)和 6 头 SPF 猪(1 mg/头), 结果注射后的 7 d 观察

期内未发现体温升高等异常临床表现。

## 2.8 CTAB 选择沉淀质粒 DNA 的成本核算

与常规的质粒 DNA 纯化方法相比, 用优化后的 CTAB 沉淀法从重组菌碱裂解物离心上清中纯化质粒 DNA 不使用 RNase A, 异丙醇使用量显著减少, 从 1 L 裂解上清中纯化质粒 DNA 的试剂成本为 3.2 元, 仅为常规方法的 1/10。

## 3 讨论

随着基因工程技术的迅速发展, 越来越多的 DNA 疫苗和以质粒为基础的基因治疗受到研究人员的青睐, 但是作为核酸疫苗或基因治疗用重组质粒的质量要求非常严格, 按照 FDA 规定, 在制备过程中不得使用动物源性酶、苯酚、氯仿等有毒或潜在病原污染的试剂, 因此质粒 DNA 的大规模生产是制约 DNA 疫苗和基因治疗应用的主要障碍<sup>[10]</sup>。

生物制品级质粒 DNA 纯化工艺的主要环节和目的是去除菌体 RNA、内毒素、杂蛋白和基因组 DNA 的污染, 目前一般用分子切向流<sup>[11]</sup>和高盐<sup>[12]</sup>除去 RNA, 用硝酸纤维膜等方法去除基因组 DNA<sup>[13]</sup>, 用疏水层析等方法去除杂蛋白<sup>[14]</sup>。由于内毒素具有与质粒 DNA 相近的分子量和负电荷, 所以去除相对困难<sup>[15]</sup>。层析法纯化疫苗级质粒 DNA 具有较好的应用前景, 纯化效果与氯化铯密度梯度离心接近, 且没有环境污染等问题, 缺点是耗时且成本昂贵; 分子切向流技术纯化疫苗级质粒 DNA 的设想虽好, 但由于质粒 DNA 主要以负超螺旋形式存在, 不能真实反映其实际分子量, 因此纯化效果并不理想, 目前尚处于摸索研究阶段。

本研究利用 CTAB 来选择性沉淀质粒 DNA, 再利用 3 mol/L KAc 选择性溶解和释放质粒 DNA, 进一步去除与质粒 DNA 共沉淀的部分基因组 DNA 和蛋白质, 达到进一步净化目的, 最后用 TritonX-114 沉淀法去除内毒素。用此工艺制备的质粒 DNA 的纯度较高, 用琼脂糖凝胶电泳检测不到 RNA 污染, 超螺旋质粒大于 80%, 杂蛋白含量小于 7  $\mu\text{g}/\text{mg}$  质粒 DNA, 基因组 DNA 小于 10  $\text{ng}/\mu\text{g}$  质粒 DNA, 内毒素含量小于 50 EU/mg 质粒 DNA, 纯化质粒的质量指标与商品化试剂盒相当, 达到或接近 FDA 规定的人用重组质粒的质量要求。与现有的质粒 DNA 大规模纯化方法相比, 本研究建立的质粒 DNA 纯化方法不使用动物源性 RNase A, 也不使用苯酚、氯仿等有毒物质和层析柱、滤膜等昂贵材料, 具有操作简单、

容易放大、成本低和无需专门仪器设备等优点, 为大规模纯化质粒 DNA 及其相关产品在兽医临床上的推广应用奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Prazeres DM, Ferreira GN, Monteiro GA, *et al.* Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Tibtech Appl*, 1999, **17** (4): 169–174.
- [2] Prazeres DM, Schlupe T, Cooney C. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anionexchange chromatography. *J Chromatogr A*, 1998, **806** (1): 31–45.
- [3] Tseng WC, Ho FL. Enhanced purification of plasmid DNA using Q-Sepharose by modulation of alcohol concentrations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, **791**(1-2): 263–272.
- [4] Eon-Duval A, Burke G. Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, **804** (2): 327–335.
- [5] Darby RA, Hine AV. LacI-mediated sequence-specific affinity purification of plasmid DNA for therapeutic applications. *FASEB J*, 2005, **19** (7): 801–803.
- [6] Wahlund PO, Gustavsson PE, Izumrudov VA, *et al.* Precipitation by polycation as capture step in purification of plasmid DNA from a clarified lysate. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **87** (5): 675–684.
- [7] Shenoy SR, Khalid M, Gupta A, *et al.* Purification of an Enterobacter aerogenes plasmid DNA using  $\text{MnCl}_2$  as compaction agent. *Anal Biochem*, 2003, **321** (2): 256–258.
- [8] Balan S, Murphy J, Galaev I, *et al.* Metal chelate affinity precipitation of RNA and purification of plasmid DNA. *Biotechnol Lett*, 2003, **25** (13): 1111–1116.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Levy MS, O'Kennedy RD, Ayazi-Shamlou P, *et al.* Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA. *Trends Biotechnol*, 2000, **18** (7): 296–305.
- [11] Eon-Duval A, MacDuff RH, Fisher CA, *et al.* Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an RNase-free plasmid DNA purification process. *Anal Biochem*, 2003, **316** (2): 66–73.
- [12] Eon-Duval A, Gumbs K, Ellett C. Precipitation of RNA impurities with high salt in a plasmid DNA purification process: use of experimental design to determine reaction conditions. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **83** (5): 544–553.
- [13] Levy MS, Collins IJ, Tsai JT, *et al.* Removal of contaminant nucleic acids by nitrocellulose filtration during pharmaceutical-grade plasmid DNA processing. *Journal of Biotechnology*, 2000, **76** (2-3): 197–205.
- [14] Teeters MA, Conrardy SE, Thomas BL. Adsorptive membrane chromatography for purification of plasmid DNA. *J Chromatogr A*, 2003, **989** (1): 165–173.
- [15] Anspach FB. Endotoxin removal by affinity sorbents. *J Biochem Biophys Methods*, 2001, **49** (1-3): 665–681.