

阴离子交换晶胶层析分离质粒 DNA

郭延涛, 沈绍传, 俞军贤, 姚克俭

浙江工业大学化学工程与材料学院 绿色合成技术国家重点实验室培育基地, 浙江 杭州 310032

郭延涛, 沈绍传, 俞军贤, 等. 阴离子交换晶胶层析分离质粒 DNA. 生物工程学报, 2012, 28(8): 995-1001.

Guo YT, Shen SC, Yun JX, et al. Chromatographic separation of plasmid DNA by anion-exchange cryogel. Chin J Biotech, 2012, 28(8): 995-1001.

摘 要: 质粒 DNA (pDNA) 作为重要的基因治疗药物载体, 其广泛应用受纯度和产量的限制。为了获得高纯度的 pDNA, 首先制备超大孔连续床晶胶基质, 接枝二乙氨基乙基葡聚糖得到阴离子交换型晶胶介质; 然后以 pUC19 质粒为例, 将目标质粒转化至大肠杆菌, 培养收集, 碱液裂解和离心; 最后用阴离子交换型晶胶介质从离心上清液中一步法层析分离 pDNA。通过优化层析过程的 pH 值和洗脱条件, 最终在 pH 值为 6.6 时, 用 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱, 得到较高纯度的 pDNA。整个分离过程中不使用动物源性酶, 也不需常规分离中的高毒试剂, 使获得 pDNA 的过程和产物更加安全。

关键词: 超大孔连续床, 离子交换, 晶胶, 质粒 DNA

Chromatographic separation of plasmid DNA by anion-exchange cryogel

Yantao Guo, Shaochuan Shen, Junxian Yun, and Kejian Yao

State Key Laboratory Breeding Base of Green Chemistry Synthesis Technology, College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, Zhejiang, China

Abstract: Plasmid DNA (pDNA) is used as an important vector for gene therapy, and its wide application is restricted by the purity and yield. To obtain high-purity pDNA, a chromatographic method based on anion-exchange supermacroporous cryogel was explored. The anion-exchange cryogel was prepared by grafting diethylaminoethyl-dextran to the epoxide groups of polyacrylamide-based matrix and pUC19 plasmid was used as a target to test the method. The plasmid was

Received: January 18, 2012; **Accepted:** April 9, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 20876145, 21036005), Science and Technology Cooperation Project between China-Europe Country's Governments from the Ministry of Science and Technology of China (No. 1017), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (No. Y4080329).

Corresponding author: Junxian Yun. Tel: +86-571-88320951; Fax: +86-571-88033331; E-mail: yunjx@zjut.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 20876145, 21036005), 科技部中欧政府间国际合作项目 (No. 1017), 浙江省自然科学基金 (No. Y4080329) 资助。

transferred into *Escherichia coli* DH5 α , cultivated, harvested and lysed. The obtained culture was centrifuged and the supernatant was used as the plasmid feedstock, which was loaded into the anion-exchange cryogel bed for chromatographic separation. By optimizing the pH of running buffer and the elution conditions, high-purity pDNA was obtained by elution with 0.5 mol/L sodium chloride solution at pH 6.6. Compared to the traditional methods for purification of pDNA, animal source enzymes and toxic reagents were not involved in the present separation process, ensuring the safety of both the purification operations and the obtained pDNA.

Keywords: supermacroporous monolith, ion-exchange, cryogel, plasmid DNA

质粒 DNA (pDNA) 可作为 DNA 载体用于基因治疗。相比于病毒载体来说, 作为非病毒的 pDNA 安全方便^[1]。近几年, 基因治疗和 DNA 疫苗技术的快速发展推动了对 pDNA 载体的大量需求^[2], 至 2011 年, 全球开展的 1 714 项基因治疗临床医学试验中, 有 18.7% (320 项) 是以超螺旋质粒 DNA (scpDNA) 为外源基因运载体^[3]。获得 pDNA 一般要经过质粒转化、菌体培养扩增质粒、菌体裂解和分离纯化等几个步骤。从工程菌裂解液中分离 pDNA 的实验室方法有些要用到动物源性酶, 如煮沸法要用的溶菌酶和 RNA 酶, 有些要用到有毒试剂, 如碱裂解法要用苯酚和氯仿, 溴化乙锭-氯化铯密度梯度离心法要用溴化乙锭和氯化铯, 不适于药用 pDNA 的大规模制备。柱层析是生物分离中应用最广泛的方法之一, 层析介质是其关键。针对蛋白质或酶等生物分子吸附分离而设计的常规商业化介质, 孔径在纳米量级范围, 适于分子量较小的目标物的扩散吸附。但是, 对于 pDNA 等生物大分子物质, 难以在这些介质内部扩散吸附, 吸附容量和分离效率低。因此, 研究适于 pDNA 等生物大分子的层析新技术和新介质, 具有重要意义。近些年来, 依据 pDNA 的各种特性, 研究人员提出了不同的层析分离纯化方法, 如离子交换色谱法^[4-5]、疏水作用色谱法^[6-7]、尺寸排阻色谱法^[8]等。

超大孔连续床晶胶是一种新型的分离介质, 内部有几微米至上百微米的相互连通的超大孔隙, 可实现生物大分子的快速分离纯化^[9-16]。离子交换型晶胶介质因其具有良好的选择性、传质阻力小和吸附分离迅速等优点, 在分离纯化生物大分子的应用中受到广泛关注^[5,9,12,14-16]。Wang 等制得经二乙氨基乙基葡聚糖 (DEAE-Dextran) 改性的弱阴离子交换聚甲基丙烯酸酯基连续床, 并应用于蛋白混合物的分离^[17]。本研究中, 通过溶剂结晶致孔法制备聚丙烯酰胺基晶胶基质, 然后接枝 DEAE-Dextran 得到阴离子交换型晶胶介质。用该晶胶介质从大肠杆菌 *Escherichia coli* 裂解液中分离 pDNA。分离过程中未加入动物源性酶, 也没有加入苯酚、氯仿和溴化乙锭等有毒试剂, 使操作过程以及获得的 pDNA 产物更加安全。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

DEAE-Dextran (相对分子质量 500 000)、烯丙基缩水甘油醚 (AGE) 和 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 (MBAAm) 购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国); 丙烯酰胺 (AAm)、考马斯亮蓝 G-250 和琼脂糖购自 Biobasic 公司 (加拿大); 质粒 pUC19 购自 Fermentas 公司 (加拿大); *E. coli* DH5 α 菌

株、过硫酸铵 (APS)、LB 培养基、N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (TEMED)、十二烷基硫酸钠 (SDS) 和乙二胺四乙酸 (EDTA) 购自生工生物工程 (上海) 有限公司; 其余试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器

BT₁-100E 恒流泵、HD-21-88 紫外检测仪 (上海琪特分析仪器有限公司), Sub-Cell GT system 核酸电泳仪 (Bio-Rad, 美国), Tanon-3500 全自动数码凝胶图像分析系统 (上海天能科技有限公司), THCD-01 低温恒温槽 (宁波天恒仪器厂), Ultrospec 3300 pro 紫外/可见光分光光度计 (GE Healthcare)。

1.2 方法

1.2.1 晶胶基质的制备

将单体 AAm、配基 AGE 和交联剂 MBAAm 配成反应液, 在直径为 10 mm 的玻璃层析柱内, 变温冷冻条件下聚合获得晶胶基质, 具体方法见文献[18]。AAm、AGE 和 MBAAm 的总质量浓度为 7%, 其中 AAm 与 AGE 质量比为 10/1, (AAm+AGE) 和 MBAAm 质量比为 10/1, 引发剂 APS 占 AAm、AGE 和 MBAAm 总质量的 1.2%, 加速剂 TEMED 占 AAm、AGE 和 MBAAm 总质量的 0.5%。具体变温过程见文献[19]中的冷冻曲线 B。

1.2.2 阴离子交换基团的接枝

将 DEAE-Dextran 溶于 0.025 mol/L Na₂HPO₄-NaOH 缓冲液 (pH 12) 中, 配成质量分数为 1% 的溶液。先用恒流泵将 DEAE-Dextran 溶液以 1.6 mL/min 的速度泵过晶胶基质至 pH 值恒定, 然后在室温下, 以 0.4 mL/min 的速度密封循环反应 48 h。反应机理见文献[17]。

1.2.3 阴离子交换晶胶介质的性能测试

阴离子交换晶胶介质的性能测试方法见文献[18-19]。通过脉冲示踪法以 3% (V/V) 丙酮为示踪剂获得停留时间分布 (RTD) 曲线, 根据相应公式计算得到理论塔板数和理论塔板高度 (HETP)。通过测定单位时间内流经晶胶介质的水流量和对应的水力压降, 利用达西方程计算得到渗透率。以牛血清白蛋白为模型蛋白考察层析性能。通过扫描电镜观察孔隙结构。

1.2.4 pDNA 的扩增及初步处理

E. coli DH5 α 用 LB 液体培养基在 37 °C、150 r/min 下进行培养。菌体培养至 OD₆₀₀ 达 0.5 左右, 进行质粒 pUC19 转化, 经含氨苄青霉素 (Amp) 平板筛选后, 在含有 0.1 mg/mL Amp 的 LB 液体培养基中再培养, 在 OD₆₀₀ 达到 2.0 时收集菌体。采用比较常用的碱法进行裂解, 具体步骤如下: 1) 150 mL 经 pDNA 转化的 *E. coli* DH5 α 培养液, 室温下 12 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体; 2) 将菌体重悬于 10 mL 预冷的溶液 I (50 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L EDTA, 25 mmol/L Tris-HCl, pH 8) 中, 剧烈振荡, 室温放置 3 min; 3) 加入 20 mL 新鲜配制的溶液 II (0.2 mol/L NaOH, 1% SDS), 颠倒数次混匀, 冰上静置 3 min; 4) 加入 15 mL 预冷的溶液 III (3 mol/L 乙酸钾, 2 mol/L 乙酸, pH 4.8), 将离心管温和颠倒数次混匀, 冰上静置 20 min 后, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 所得的上清液用于层析。

1.2.5 阴离子交换晶胶介质层析分离 pDNA

阴离子交换晶胶层析分离 pDNA 的过程如下: 1) 用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PB) 平衡晶胶床柱; 2) 将 1.2.4 中所得的上清液用 PB 稀释至 5 倍作为层析上样液, 以 1.6 mL/min 上样至吸

附饱和, 然后用 PB 进行冲洗以除去游离在晶胶介质中的杂质; 3) 分别用不同浓度的 NaCl 溶液 (用 PB 配制) 依次洗脱; 4) 用 0.5 mol/L NaOH 和大量的去离子水对晶胶介质进行再生。整个层析过程在波长为 254 nm 的紫外检测仪下检测并记录, 在上样和冲洗阶段每 60 s 收集 1 管, 在洗脱阶段每 30 s 收集 1 管。

1.2.6 分析方法

选取层析过程代表性样品用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析, 电压 80 V。0.05 mg/L 溴化乙锭染色 20 min 后用 Tanon-3500 全自动数码凝胶图像分析系统在紫外灯下进行观察和图像拍摄。用 Quantity One (v 4.6.2) 软件对 pDNA 的纯度和含量进行分析。洗脱液中的蛋白含量用考马斯亮蓝染色法测定^[20]。

2 结果与分析

2.1 阴离子交换晶胶介质的基本性能

阴离子交换晶胶介质直径为 10 mm, 长度为 7.5 cm。用脉冲示踪法所测得的该晶胶介质的 RTD 曲线如图 1 所示。由图可知, 表观流速 (U_L) 从 1 cm/min 到 12 cm/min 范围内, RTD 峰型对称性较好。根据 RTD 数据计算得到晶胶介质的 *HETP*, 如图 2 所示。晶胶介质的 *HETP* 在 0.069 cm 到 0.076 cm 之间, 说明此晶胶介质的传质分离性能较好。晶胶介质的压降与流速的关系如图 3 所示, 根据达西公式计算得到渗透率为 $2.03 \times 10^{-12} \text{ m}^2$, 流体流动阻力较小。晶胶介质对牛血清白蛋白的吸附容量达到 1.1 g/L 晶胶介质。通过扫描电镜观察到的晶胶孔隙结构如图 4 所示, 由图可知晶胶介质的孔隙结构较均匀, 且连通性较好。因此, 该阴离子交换型晶胶介质性能

较好, 适用于 pDNA 的层析分离。

2.2 pDNA 的层析分离

通过在碱性条件下使晶胶基质上的环氧基团开环后接枝阴离子交换基团 DEAE-Dextran。由于 DEAE-Dextran 是长链聚合物, 吸附位点多, 如触手一样长在晶胶孔隙表面, 可灵活地延伸到孔内料液流体中, 有利于较大尺寸的 pDNA 的吸附, 使晶胶介质有较大的吸附容量和较高的选择

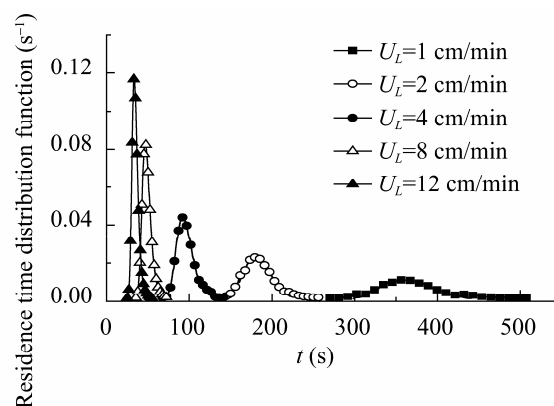


图 1 阴离子交换晶胶介质的 RTDs

Fig. 1 Residence time distributions at various liquid velocities in the anion-exchange cryogel.

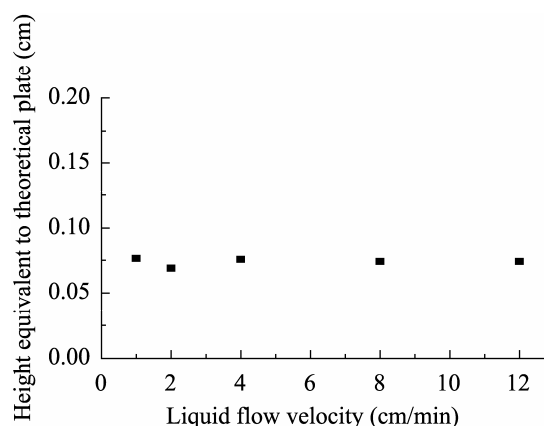


图 2 阴离子交换晶胶介质的 *HETP*

Fig. 2 Variation of height equivalent to theoretical plate with liquid velocity in the anion-exchange cryogel.

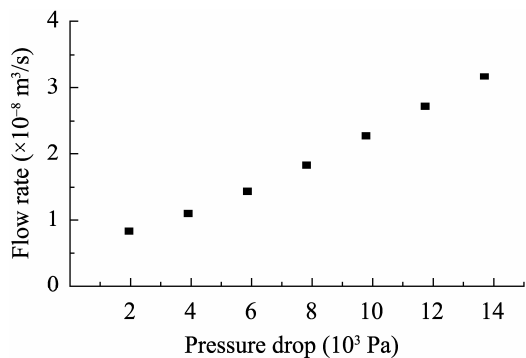


图3 阴离子交换晶胶介质压降与流速的关系

Fig. 3 Flow rate vs. pressure drop in the anion-exchange cryogel.

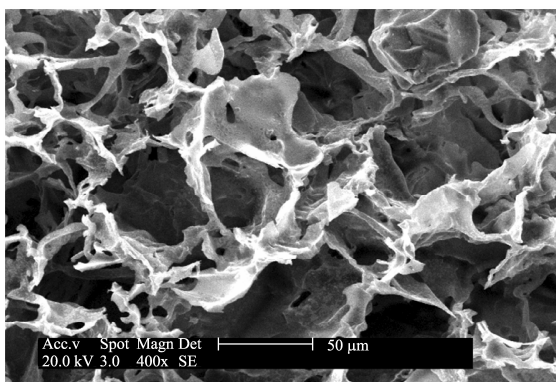


图4 阴离子交换晶胶介质孔隙结构的扫描电镜图片

Fig. 4 Scanning electron microscope photograph of the anion-exchange cryogel.

性。pDNA 有 scpDNA、开环 pDNA (ocpDNA) 和线性 pDNA (lnpDNA) 三种构型, 其中 scpDNA 是有效的 DNA 载体^[21], 电泳迁移速率 scpDNA 大于 lnpDNA 和 ocpDNA。E. coli 经过溶液 I、II 和 III 处理后, 细胞被裂解, 大部分蛋白被沉淀, 经离心后, 上清液中除了目标物 scpDNA 外, 还含有基因组 DNA (gDNA)、lnpDNA、ocpDNA、RNA、少量蛋白和细胞碎片等杂质, 细胞碎片可直接通过晶胶介质流出, 其他杂质均可能被吸附, 需要优化层析条件以得到高纯度的 scpDNA。

在 pH 7.2 下进行层析, 分别用 0.3、0.35、

0.4 或 0.5 mol/L NaCl 进行第一步洗脱, 用 1 mol/L NaCl 进行第二步洗脱。洗脱的 scpDNA 中均含有较多杂质, 梯度洗脱没有将 scpDNA 与杂质分开。在 pH 6.0、6.6 或 7.8 条件下分别进行层析, 发现在 pH 6.0 和 7.8 条件下层析得到的 scpDNA 均含有较多杂质, 只有在 pH 6.6 条件下层析得到的 scpDNA 纯度较高。

在 pH 6.6 时进行层析, 用 0.4 或 0.5 mol/L NaCl 进行第一步洗脱, 用 1 mol/L NaCl 进行第二步洗脱, 用 0.5 mol/L NaOH 再生床柱, 层析曲线见图 5, 电泳结果见图 6。从图 5 中可知, 第一步洗脱峰较高, 第二步洗脱峰较低, 特别是用 0.5 mol/L NaCl 进行第一步洗脱时, 1 mol/L NaCl 洗脱已几乎看不到洗脱峰, 说明用 0.5 mol/L NaCl 一步洗脱足以将目标物洗脱下来。从图 6 中可知, 洗脱物中杂质较少, 晶胶柱对 scpDNA 取得了较理想的分离效果。上样液中 scpDNA 浓

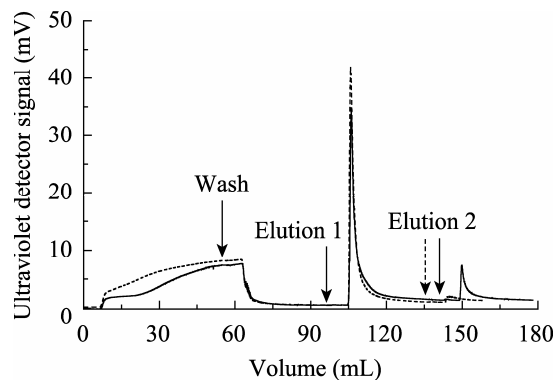


图5 不同洗脱条件下的层析过程

Fig. 5 Chromatographic processes under different elution conditions. The cryogel column was equilibrated and washed with 20 mmol/L sodium phosphate buffer of pH 6.6. The liquid velocity was 1.6 mL/min. (solid line) Eluted with 0.4 mol/L NaCl (elution 1) followed by 1 mol/L NaCl (elution 2). (dotted line) Eluted with 0.5 mol/L NaCl (elution 1) followed by 1 mol/L NaCl (elution 2).

度较低,电泳图中未见明显条带(图6A,泳道2),在洗脱峰中有明显的 scpDNA 条带,说明晶胶介质对 scpDNA 起到了较好的浓缩作用。在用 0.4、1 mol/L NaCl 洗脱时,0.4 mol/L NaCl 洗脱得到的 scpDNA 杂质较少,纯度达到 83.8% (图6A,泳道9~11),回收率为 29.4%,1 mol/L NaCl 洗脱只隐约见 scpDNA 一条条带,浓度较低(图6A,泳道6~8);用 0.5、1 mol/L NaCl 洗脱时,0.5 mol/L NaCl 洗脱得到的 scpDNA 纯度达到 82.8%

(图6B,泳道3~5),回收率为 33.3%,而 1 mol/L NaCl 洗脱几乎看不到条带(图6B,泳道6~8)。0.5 mol/L NaCl 洗脱较 0.4 mol/L NaCl 洗脱得到的 scpDNA 纯度相差不多,但是 scpDNA 浓度有所提高,所以用 0.5 mol/L NaCl 一步洗脱更为合适,具体结果见表1。用 0.5 mol/L NaOH 可将残留在晶胶介质内的 scpDNA 和其他杂质一并洗脱下来使床柱再生(图6A,泳道3~5,图6B,泳道9~10)。用考马斯亮蓝法对洗脱液进行检测,未检出蛋白。

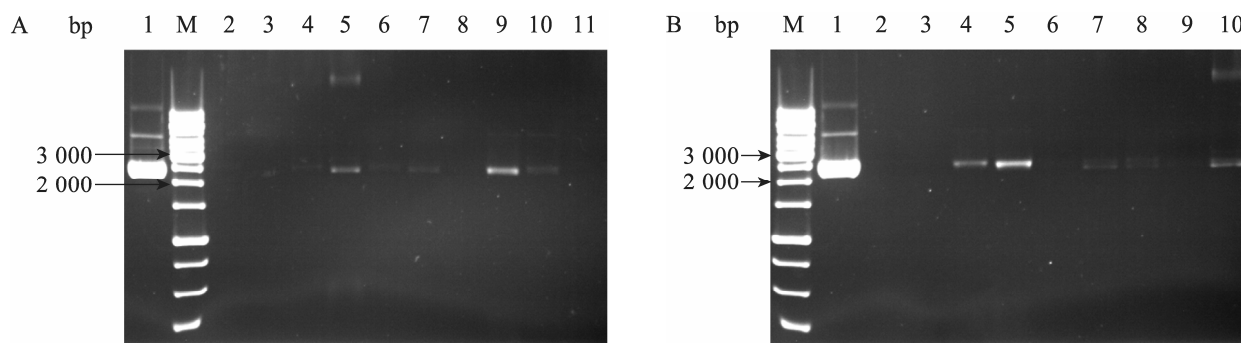


图6 层析收集液的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis images of chromatographic eluents. M: DNA marker (10 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 500, 3 000, 2 500, 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500, 250 bp). (A) 1: pUC19 DNA; 2: loading sample; 3-5: eluted with 0.5 mol/L NaOH; 6-8: eluted with 1 mol/L NaCl; 9-11: eluted with 0.4 mol/L NaCl. (B) 1: pUC19 DNA; 2: breakthrough; 3-5: eluted with 0.5 mol/L NaCl; 6-8: eluted with 1 mol/L NaCl; 9-10: eluted with 0.5 mol/L NaOH.

表1 pH 6.6 下层析获得的 scpDNA 的纯度和浓度,以及晶胶的分离能力

Table 1 The purity and concentration of scpDNA obtained by chromatography under pH 6.6, and the corresponding separation capacity of the cryogel

	Profile 1	Profile 2
	Elution 1	Elution 1
Purity (%)	83.8	82.8
Concentration (mg/L)	16.7	19.7
Capacity (mg/L cryogel)	4.5	5.4

Profile 1 corresponding to Fig. 5 (solid line), profile 2 corresponding to Fig. 5 (dotted line).

3 结论

利用自制的超大孔晶胶基质,成功接枝

DEAE-Dextran 得到阴离子交换晶胶介质。用该介质在 pH 6.0、6.6、7.2 或 7.8 条件下进行层析,从 *E. coli* 裂解液中分离 pDNA,分别以 0.3、0.35、0.4 或 0.5 mol/L NaCl 进行第一步洗脱,1 mol/L NaCl 进行第二步洗脱,最终找到了获得较高纯度 scpDNA 的合适层析条件。在 pH 6.6 条件下进行层析,用 0.5 mol/L NaCl 一步洗脱得到的 scpDNA 纯度达到 82.8%,晶胶吸附量达到 5.4 mg/L 晶胶介质。整个分离过程迅速高效,没有使用动物源性酶,也没使用苯酚、氯仿和溴化乙锭等毒性试剂,使操作过程和所获得的 pDNA 更加安全。

REFERENCES

- [1] Williams JA, Carnes AE, Hodgson CP. Plasmid DNA vaccine vector design: Impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(4): 353–370.
- [2] Ferreira GNM, Monteiro GA, Prazeres DMF, et al. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends Biotechnol*, 2000, 18(9): 380–388.
- [3] Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [EB/OL]. [2011-06]. <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
- [4] Hanora A, Savina I, Plieva FM, et al. Direct capture of plasmid DNA from non-clarified bacterial lysate using polycation-grafted monoliths. *J Biotechnol*, 2006, 123(3): 343–355.
- [5] Zhong L, Scharer J, Moo-Young M, et al. Potential application of hydrogel-based strong anion-exchange membrane for plasmid DNA purification. *J Chromatogr B*, 2011, 879(9/10): 564–572.
- [6] Li Y, Dong XY, Sun Y. High-speed chromatographic purification of plasmid DNA with a customized biporous hydrophobic adsorbent. *Biochem Eng J*, 2005, 27(1): 33–39.
- [7] Freitas SS, Santos JAL, Prazeres DMF. Plasmid purification by hydrophobic interaction chromatography using sodium citrate in the mobile phase. *Sep Purif Technol*, 2009, 65(1): 95–104.
- [8] Latulippe DR, Zydney AL. Size exclusion chromatography of plasmid DNA isoforms. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(35): 6295–6302.
- [9] Arvidsson P, Plieva FM, Savina IN, et al. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *J Chromatogr A*, 2002, 977(1): 27–38.
- [10] Plieva FM, Savina IN, Deraz S, et al. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. *J Chromatogr B*, 2004, 807(1): 129–137.
- [11] Yao KJ, Yun JX, Shen SC, et al. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. *J Chromatogr A*, 2006, 1109(1): 103–110.
- [12] Yao KJ, Yun JX, Shen SC, et al. In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. *J Chromatogr A*, 2007, 1157(1/2): 246–251.
- [13] Yao KJ, Shen SC, Yun JX, et al. Protein adsorption in supermacroporous cryogels with embedded nanoparticles. *Biochem Eng J*, 2007, 36(2): 139–146.
- [14] Yun JX, Shen SC, Chen F, et al. One-step isolation of adenosine triphosphate from crude fermentation broth of *Saccharomyces cerevisiae* by anion-exchange chromatography using supermacroporous cryogel. *J Chromatogr B*, 2007, 860(1): 57–62.
- [15] Shen ZM, Shen SC, Yun JX, et al. Purification of adenosine triphosphate from crude fermentation broth by one-step isolation using a large-size weak anion-exchange supermacroporous cryogel. *J Chem Eng Chinese Univ*, 2009, 23(5): 768–773.
沈哲明, 沈绍传, 贲军贤, 等. 大尺寸弱阴离子交换晶胶层析一步法分离 ATP 的实验研究. *高校化学工程学报*, 2009, 23(5): 768–773.
- [16] Yan LD, Shen SC, Yun JX, et al. Isolation of lysozyme from chicken egg white using polyacrylamide-based cation-exchange cryogel. *Chinese J Chem Eng*, 2011, 19(5): 876–880.
- [17] Wang MY, Xu J, Zhou X, et al. Modification with DEAE-dextran, an alternative way to prepare anion-exchange monolithic column with lower pressure drop. *Biochem Eng J*, 2007, 34(1): 76–81.
- [18] He XJ, Yao KJ, Shen SC, et al. Freezing characteristics of acrylamide-based aqueous solution used for the preparation of supermacroporous cryogels via cryo-copolymerization. *Chem Eng Sci*, 2007, 62(5): 1334–1342.
- [19] Yao KJ, Shen SC, Yun JX, et al. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. *Chem Eng Sci*, 2006, 61(20): 6701–6708.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [21] Diogo MM, Queiroz JA, Prazeres DMF. Chromatography of plasmid DNA. *J Chromatogr A*, 2005, 1069(1): 3–22.