

阴离子交换色谱快速分析质粒 DNA 构象方法优化

作者

刘彬, 孟颖
安捷伦科技 (中国) 有限公司

前言

细菌质粒是 DNA 重组技术中常用的载体。载体是将有用的外源基因通过基因工程手段送进受体细胞中进行增殖和表达的工具。近年来, 基因疗法的市场愈发火热, 该领域最常用的载体 AAV 和慢病毒的生产均需使用质粒作为关键原料。mRNA 新型疫苗生产工艺中也使用质粒 DNA 作为模板生产 mRNA 疫苗原液。另外, 质粒也广泛用作基因疗法的中间体和原料药, 或直接用作治疗药物。

标准环形双链 DNA 质粒分子具有三种不同的构象: 超螺旋质粒 DNA、开环质粒 DNA 和线性质粒 DNA 分子。在这三种构象中, 超螺旋构象的质粒在细胞中的转染和表达效率最高。因此, 高质量的质粒是确保基因载体安全性和有效性的前提。目前用于分析质粒构象的方法主要包括电泳法和离子交换色谱法, 国内外法规对此有相关规定。但是, 在应用液相色谱分析超螺旋比例时, 始终存在分离度和峰形差、质粒吸附残留等问题。

本研究利用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元液相色谱系和 Bio-Monolith DEAE 阴离子交换色谱柱, 建立了一种快速分析质粒构象的方法; 同时对常用的 DNA-NPR 阴离子交换色谱法进行了优化。

质粒 DNA 构象分析

利用离子交换色谱法分析质粒构象一直面临巨大挑战。主要原因在于质粒分子量大、带有强负电荷并且不同构象的电荷差异小，导致采用阴离子交换色谱柱所得到的峰形差、分离度差，并且在色谱系统和色谱柱上经常存在吸附残留问题。

本实验采用 1260 Infinity II 生物惰性四元液相色谱系统。该系统设计为全生物惰性管路设计，可完全消除金属管路与质粒 DNA 的电荷吸附，同时对阴离子交换色谱方法中采用的高 pH 和高盐流动相具有更出色的耐受性。整个系统可耐受 pH 高达 14 的条件，实现 CIP (Cleaning in Place) 清洗。例如，用 0.5 mol/L NaOH 直接清洗系统和色谱柱，可去除吸附在系统表面的核酸、蛋白质和核酸酶等，从而避免质粒 DNA 降解和吸附残留。

Bio-Monolith DEAE 为整体填充阴离子交换色谱柱，内部孔径大，有利于质粒 DNA 的吸附和解吸，有效减少质粒 DNA 在色谱柱上的残留，同时使 DNA 的不同构象获得良好的分离度。向流动相中添加盐酸胍，对方法进行优化，详细色谱条件如下。

1260 Infinity II 生物惰性液相色谱条件	
色谱柱	Bio-Monolith DEAE (安捷伦, 部件号 5069-3636), DNA-NPR (TOSOH)
柱温	25 °C
流速	0.6 mL/min
流动相	A: 100 mmol/L Tris + 0.3 mol/L GuHCl, pH 8.8 B: A + 1 mol/L NaCl, pH 8.8

图 1 显示了在 Bio-Monolith DEAE 色谱柱上分离质粒 DNA 构象所得到的色谱图。从图中可以看出，线性质粒、开环质粒和超螺旋质粒在 3–8 min 内依次洗脱，三者获得了基线分离；单个样品的总分析时间仅为 14 min。其中超螺旋质粒的保留时间为 5.5 min 左右，肩峰拖尾是由于存在超螺旋质粒聚集体。

应用相似的色谱条件，对传统的非多孔离子交换色谱方法 DNA-NPR 进行优化。图 2 显示了在 DNA-NPR 色谱柱上分离质粒 DNA 构象所得到的色谱图。从图中可以看出，该方法能够将线性质粒、开环质粒和超螺旋质粒与超螺旋质粒聚集体分离，但完成单个样品分析需要 40 min。

通过以上两种方法获得的线性质粒、开环质粒和超螺旋质粒（包括聚集体）的比例相同。因此，Bio-Monolith DEAE 适用于快速分析作为 mRNA 和基因治疗病毒载体原料的质粒的构象，而 DNA-NPR 则适用于分析例如作为治疗药物的裸质粒的纯度。

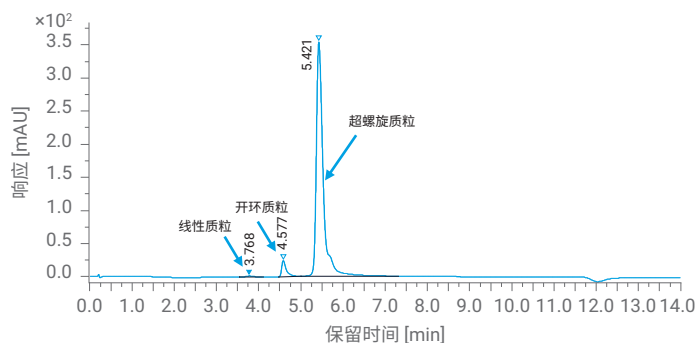


图 1. 在 Bio-Monolith DEAE 色谱柱上分离质粒 DNA 构象的色谱图

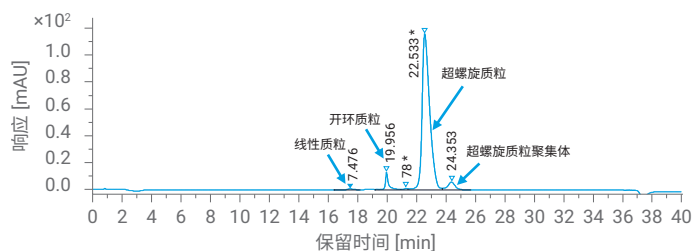


图 2. 在 DNA-NPR 色谱柱上分离质粒 DNA 构象的色谱图

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

DE21134057

仅供科研使用，不用于临床诊断用途。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2023

2023年5月15日, 中国出版

5994-6139ZHCN

