

应用纪要

利用阴离子交换色谱法(AEX)分离双链DNA(dsDNA)片段并进行大小评估

Hua Yang, Stephan M. Koza, Weibin Chen

Waters Corporation



摘要

可靠地分离dsDNA物质并评估其分子大小是细胞和基因治疗以及疫苗领域的重要分析任务。例如，科学家需要

确认是否存在用作治疗剂或用作载体以产生治疗性转基因的质粒DNA并进行鉴定。对于此特定目的，建议将由限制性内切酶酶解质粒DNA获得的dsDNA片段的分离和大小测定作为检测项目之一。本应用纪要表明，Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱能够分离0.1~10 kbp范围内的dsDNA分子量标准品。由质粒限制性内切酶酶解获得的dsDNA片段的大小可通过比较片段的保留时间与dsDNA分子量标准品的保留时间来评估。

优势

- 利用经优化的Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱分离1 kb Plus DNA分子量标准品
- 在Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上使用AEX方法估计dsDNA的大小

简介

人类基因治疗产品会操纵基因表达或改变活细胞的生物学特性¹。这些产品可以是裸核酸（例如质粒DNA），也可以是携带治疗基因的腺相关病毒(AAV)等经改造微生物。在新药临床试验申请(Investigational New Drug Application, IND)中，申办方需要证明基因治疗产品的独特性。监管机构建议以示意图形式描述遗传序列，其中包括相关调控元件（例如启动子和限制性内切酶位点）的图谱。在生产过程中，需要检测是否存在治疗性质粒DNA或用于生产转基因的质粒DNA并进行鉴定，以证明原料、中间体和成品药得到适当控制。推荐的检测项目之一是限制性内切酶酶解，用特定的限制性内切酶将质粒DNA酶解为不同长度的片段¹。然后通过分离这些片段并评估其大小来鉴定质粒DNA，此过程以往采用琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳法来完成。但该技术的通量较低，并且需要很多手动处理步骤。

阴离子交换色谱法(AEX)根据分析物表面携带负电荷的数量及定位差异来分离分子。这项分析技术具有许多优势，例如稳定、可重现、提供定量信息、易于自动化并且只需少量样品。由于dsDNA骨架上的磷酸酯基团导致片段带负电荷，因此我们研究了AEX对dsDNA片段的分离。

本应用纪要表明，0.1 kbp~10 kbp的dsDNA分子量标准品能够在ACQUITY UPLC H-Class Bio系统中安装的Waters Protein-Pak Hi Res Q强阴离子交换色谱柱上得到分离。此外，分子量标准品分离可用于估计从限制性内切酶酶解质粒中获得的dsDNA片段的大小。

实验

样品描述

1 kb Plus DNA分子量标准品(N3200L)和pBR322质粒-BstNI酶解物(N3031L)购自New England Biolabs。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC H-Class Bio系统
检测条件:	ACQUITY UPLC TUV检测器, 配备5 mm钛合金流通池, 波长: 260 nm
样品瓶:	聚丙烯12 × 32 mm螺纹口样品瓶, 带瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫, 容积300 μL, 100个/包 (部件号: 186002639)
色谱柱:	Protein-Pak Hi Res Q色谱柱, 5 μm, 4.6 × 100 mm (部件号: 186004931)
柱温:	30 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	0.3 mL
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	100 mM Tris-HCl
流动相B:	100 mM Tris碱
流动相C:	3 M四甲基氯化铵(TMAC)
流动相D:	水
提供的缓冲液浓度:	20 mM

梯度表 (AutoBlend Plus方法, 由亨德森-哈塞尔巴尔赫方程得出)

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	50	50	初始
0.5	0.4	47	53	6
4.0	0.4	45	55	6
7.0	0.4	35	65	6
7.5	0.4	20	80	1
10	0.4	1	99	6
11	0.4	1	99	1
12	0.4	50	50	1

在上面的梯度表中, 缓冲液为20 mM Tris (pH 7.4)。将初始盐浓度设置为0 mM, 确保所有分析物均牢固地结合在色谱柱上。然后在分离梯度开始前, 将盐浓度迅速增加至1620 mM, 平衡2 min。对于1 kb DNA分子量标准品分离, 盐浓度在20 min内线性增加至1780 mM。然后在2 min内升至2400 mM, 以去除任何剩余的结合分子。最后, 通过平衡步骤返回初始条件, 准备进行下一次进样。

通用四元液相色谱系统的等效梯度表如下所示:

时间 (min)	%A	%B	%C	%D
0	17.8	2.2	0.0	80.0
1	17.8	2.2	0.0	80.0
2	17.8	2.2	54	26
4	17.8	2.2	54	26
24	17.8	2.2	59.3	20.7
26	17.8	2.2	80.0	0.0
26.1	17.8	2.2	0.0	80.0
42	17.8	2.2	0.0	80.0

数据管理

结果与讨论

如图1B所示，由一系列0.1 kbp~10 kbp的dsDNA片段组成的1 kb Plus DNA分子量标准品在Waters Protein-Pak Hi Res Q强阴离子交换色谱柱上得到分离。能够分离各种不同大小的dsDNA对于限制性内切酶酶解分析至关重要。

该色谱分离结果与New England Biolabs网站上提供的琼脂糖凝胶分离结果一致（图1A和1B）。为帮助轻松鉴定片段的大小，有意使1 kb Plus dsDNA分子量标准品中1 kb和3 kb片段的数量多于其他片段，1 kbp和3 kbp片段可以在凝胶上观察到更粗、更亮的谱带。同样，在阴离子交换色谱图中，1 kbp和3 kbp片段的峰面积也高于其他片段的峰面积。

由于带负电荷的磷酸二酯基团的数量与核苷酸的数量成正比，因此DNA片段应根据其大小洗脱。一般而言，当DNA片段较短(<100 bp)时此说法成立。但随着DNA大小增加，DNA的组成可能对AEX分离产生一些影响。例如，已有研究表明，A-T含量较高的片段洗脱时间晚于根据其链长预期的时间^{2,3}。有时，A-T含量较高的较短片段比A-T含量较低的较长片段更晚洗脱⁴。这种情况在大小评估中可能很棘手，因为DNA未按照其链长顺序洗脱。尝试的解决方法有，在AEX分离中利用NaCl作为洗脱盐。有趣的是，已有研究表明富含A-T的DNA在NaCl中的解链温度高于富含G-C的DNA。当用四甲基氯化铵(TMAC)开展实验时，富含A-T的DNA与富含G-C的DNA在解链温度上无差异。据推测，TMAC可以嵌入DNA结构的凹槽中，优先与A-T碱基对结合，导致DNA的解链温度与组成无关^{5,6}。

我们之前的研究表明，对涉及核酸的分析物使用TMAC作为洗脱盐相比使用NaCl可提供更出色的分离能力^{7,8}。本研究再次将TMAC作为盐进行实验，以分离不同长度的dsDNA片段。由多角度光散射(Multi-Angle Light Scattering, MALS)得到的初步数据表明，色谱图中各峰的分子量随保留时间增加（数据未显示）。虽然尚未明确TMAC能够根据DNA片段大小将其分离而不受片段组成影响的原因，但人们认为TMAC在消除dsDNA片段组成对最终AEX分离结果的影响方面具有重要作用。

过去评估DNA片段大小的方法为：在琼脂糖凝胶上运行片段DNA，在相同凝胶上以相同条件运行DNA分子量标准品，比较片段样品和标准品的谱带位置。同样，本研究表明，在AEX方法中，通过在相同的色谱条件下运行DNA片段和1 kb Plus DNA分子量标准品，可使用保留时间来评估片段大小（图1B和图1C）。图1D显示了dsDNA片段的log (bp)与保留时间的关系图。蓝点为1 kb Plus DNA分子量标准品的数据点，橙点为BstNI酶解pBR322质粒的数据点。由1 kb Plus DNA分子量标准品得到的线性拟合结果表明，片段大小的对数与保留时间之间的相关性非常高($R^2 = 0.981$)。使用该曲线，可根据限制性内切酶酶解片段的保留时间计算其大小。使用

下式计算百分比(%)误差： $\{(\text{计算大小} - \text{理论大小}) / \text{理论大小}\}$ 。pBR322质粒中大多数限制性内切酶解片段的测量结果误差均小于11%，通过图中位于趋势线上或非常接近趋势线的橙点突出显示。第一个限制性内切酶解片段(0.121 kbp)的%误差大于其他DNA片段。该偏差可能归因于1 kb Plus DNA分子量标准品中先洗脱片段(0.1 kbp)的数据点，这些片段也远离趋势线。

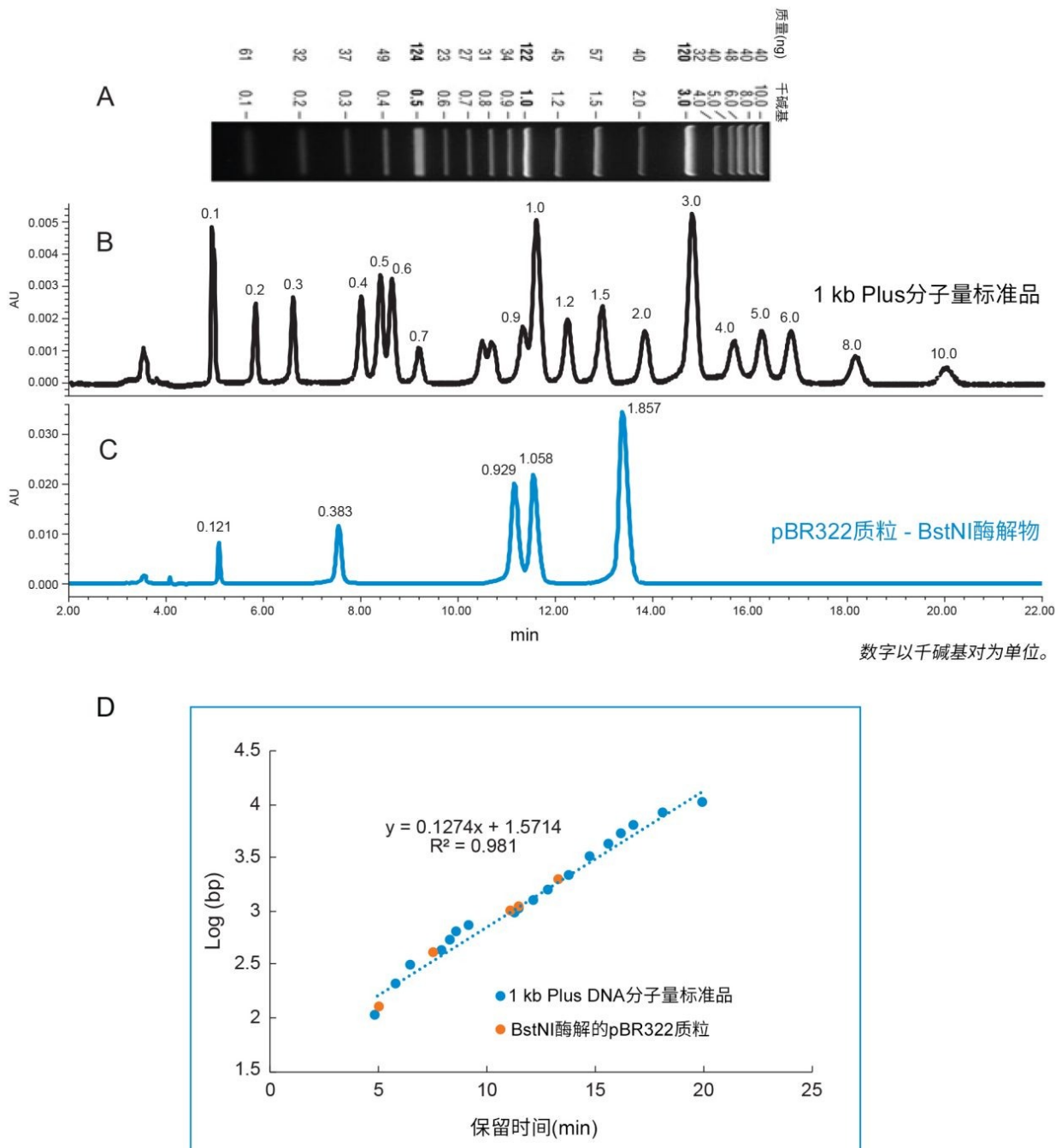


图1.A) 1 kb Plus DNA分子量标准品的琼脂糖凝胶分离结果（经New England Biolabs许可后转载自 www.neb.com [2021]）；B) 1 kb Plus DNA分子量标准品在Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上的阴离子交换分离结果；C) 由BstNI酶解的pBR322质粒得到的DNA片段在Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上的阴离子交换分离结果；D) dsDNA片段的log (bp)与保留时间的关系图。

结论

阴离子交换色谱法稳定、可重现、提供定量信息，且易于自动化。本文证明，1 kb Plus DNA分子量标准品、范围为0.1 kbp~10.0 kbp的dsDNA片段可以在Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上得到分离。AEX分离结果与琼脂糖凝胶分离高度一致。可通过比较dsDNA和1 kb Plus DNA分子量标准品的保留时间来评估dsDNA的大小。该方法可用于（但不限于）分离限制性内切酶酶解质粒所获得的DNA片段并评估其大小。此类分析可作为证明基因治疗产品整个生产工艺中存在质粒并进行鉴定的试验方法。

参考资料

1. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs), Guidance for Industry.US Food and Drug Administration (CDER), January 2020.
2. Kato, Y.; Sasaki, M.; Hashimoto, T. Separation of DNA Restriction Fragments by High-Performance Ion Exchange Chromatography.J. Chromatogr.1983, 265, 342–346.
3. Kato, Y.; Yamasaki, Y.; Onaka, A.; Kitamura, T.; Hashimoto, T. Separation of DNA Restriction Fragments by High-Performance Ion Exchange Chromatography on a Non-Porous Ion Exchanger. J. Chromatogr.1989, 478, 264-268.
4. Muller, W. Fractionation of DNA Restriction Fragments with Ion-Exchangers for High-Performance Liquid Chromatography.Eur.J. Biochem.1986, 155, 203-212.
5. Shapiro, J. T.; Stannard, B. S.; Felsenfeld, G. Binding of Small Cations to Deoxyribonucleic Acid.Nucleotide Specificity.Biochemistry 1969, 8(8), 3233–3241.
6. Melchior, W. B. Jr.; Von Hippel, P. H. Alteration of the Relative Stability of dA-dT and dG-dC Base Pairs in DNA.Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 1973, 70(2), 298–302.
7. Yang, H.; Koza, S.; Chen, W. Anion-Exchange Chromatography for Determining Empty and Full Capsid Contents in Adeno-Associated Virus.Waters Application Note, 720006825EN <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/anion-exchange-chromatography-for-determining-empty-and-full-capsid-contents-in-adeno-associated-virus.html>> , 2021.

8. Yang, H.; Koza, S.; Chen, W. 利用阴离子交换色谱法(AEX)分离并定量质粒亚型. 沃特世应用纪要, 720007207ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/plasmid-isoform-separation-and-quantification-by-anion-exchange-chromatography-aex.html>> , 2021.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

Protein-Pak色谱柱 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513086>>

720007321ZH, 2021年7月