

应用纪要

利用阴离子交换色谱法(AEX)分离并定量质粒亚型

Hua Yang, Stephan M. Koza, Weibin Chen

Waters Corporation



摘要

质粒的纯度和质量在基因疗法和疫苗的生产中起到至关重要的作用。在质粒的所有亚型中，活性形式为超螺旋

质粒，开环和线性形式被视为杂质。因此需要监测这些不需要的质粒亚型的水平并定量超螺旋质粒的百分比。本应用纪要证明，ACQUITY UPLC H-Class Bio系统和Waters Protein-Pak Hi Res Q强阴离子交换色谱柱可用于分离和定量质粒亚型。

优势

- 利用经优化的Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱分离DNA质粒亚型
- 实现亚型混合物中单个质粒亚型的定量分析

简介

质粒是小分子环状双链DNA，近年来越来越多地用于基因疗法和疫苗的生产。生产的质粒DNA主要为超螺旋形式，其具有优异的稳定性和良好的抗原性，因此是所需的构象。然而，由于生物工艺过程中发生构象变化，通常存在其他形式的质粒，例如开环和线性形式。当质粒在一条链上带切口时，产生开环形式；而当质粒在两条链上的同一位点处或同一位点附近带切口时，则产生线性形式。这些亚型与其他亚型均被视为质粒杂质，因为它们可能会影响产品的有效性或安全性^{1,2}。为此，FDA指导原则建议，超螺旋形式的质粒纯度应高于80%^{2,3}。为保证高纯度和高质量，行业对超螺旋质粒纯度水平的预期通常高于90%^{2,3}。因此，可靠地测量质粒亚型的相对丰度对于确保批处理、配制和储存一致性至关重要。

几十年来，琼脂糖凝胶电泳一直是分离质粒亚型的常规分析方法^{4,5}。但该技术存在难以定量、通量低且需要手动处理等弊端。毛细管电泳(CE)也曾用于质粒亚型分析⁴，但它难以分析复杂基质（例如细胞裂解物）中的样品。阴离子交换色谱法(AEX)根据分析物在表面负电荷数量和定位方面的差异分离分析物。业界普遍认为，AEX是一种稳定、可重现、易于自动化的分析技术，且只需少量样品。由于质粒DNA因骨架上的磷酸基团而带负电荷，因此AEX是用于质粒相关分离和分析的不二之选^{4,5}。

本应用纪要表明，ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上配备的Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱可分离和定量质粒DNA中三种主要亚型（即超螺旋、开环和线性形式）的不同水平。

实验

样品描述

ΦX174 RFI（超螺旋形式，N3021L）、ΦX174 RFII（开环形式，N3022L）和XhoI限制酶（R0146S）购自New England BioLabs。线性形式的ΦX174质粒用XhoI酶解ΦX174 RFI获得。随后使用New England BioLabs的Monarch PCR & DNA净化试剂盒(T1030S)去除酶解混合物中的XhoI。

液相色谱条件

系统：	ACQUITY UPLC H-Class Bio
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：	聚丙烯材质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, 5 μm, 4.6×100 mm（部件号：186004931）
柱温：	30 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	0.6~10 μL
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)

时间 (min)	流速 (mL/min)	pH	盐 (mM)	盐曲线
0	0.4	7.4	0	
1	0.4	7.4	0	11
2	0.4	7.4	1690	6
4	0.4	7.4	1690	6
14	0.4	7.4	1750	6
16	0.4	7.4	2400	6
16.1	0.4	7.4	0	11
32	0	7.4	0	11

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1690 mM，平衡2 min。对于亚型分离，盐浓度在10 min内线性增加至1750 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	56.3	23.7
4	17.8	2.2	56.3	23.7
14	17.8	2.2	58.3	21.7
16	17.8	2.2	80.0	0.0
16.1	17.8	2.2	0.0	80.0
32	17.8	2.2	0.0	80.0

数据管理

色谱软件：

Empower 3 FR 4

结果与讨论

如图1所示，不同质粒亚型在形状和构象上存在差异。AEX利用带正电荷的固定相与质粒DNA骨架上带负电荷的磷酸基团之间的相互作用分离化合物。尽管不同亚型的总体分子量和电荷相似，但它们的局部电荷密度因构象不同而存在差异。因此，这些亚型可以在AEX色谱柱上得到分离。



图1. 质粒的主要亚型图示

图2展示了 Φ X174质粒（约5.4 kbp）三种亚型的混合物在Waters Protein-Pak Hi Res Q强阴离子交换色谱柱上的分离。通过将保留时间与单独进样亚型的保留时间相匹配来鉴定这些亚型。超螺旋DNA的电荷密度高于更松弛的开环形式和线性形式，因此与固定相的相互作用更强，导致比其他两种形式更晚洗脱。

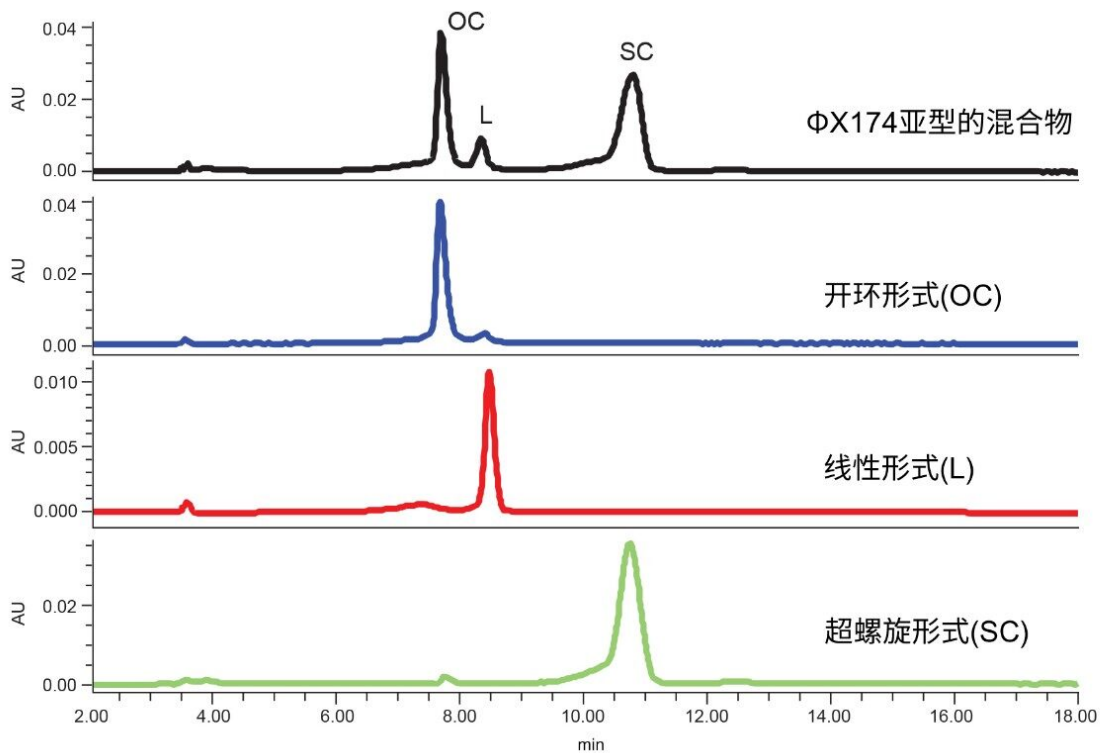


图2. Φ X174质粒亚型在Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上的分离。20 mM Tris pH 7.4，四甲基氯化铵在10 min内从1.69 M增加至1.75 M。流速：0.4 mL/min。

通过改变pH和柱温优化AEX分离方法（图3）。增加流动相pH时，开环形式与线性形式之间的分离度略有下降

，线性形式与超螺旋形式之间的分离度也是如此。因此选择较低的pH值(pH 7.4)。增加柱温时，开环形式与线性形式之间的分离度有所下降，而线性形式与超螺旋形式之间的分离度有所提高。由于线性形式与超螺旋形式在所有测试温度下均得到良好分离，因此选择较低的柱温(30°C)，确保开环形式与线性形式之间获得良好的分离度。

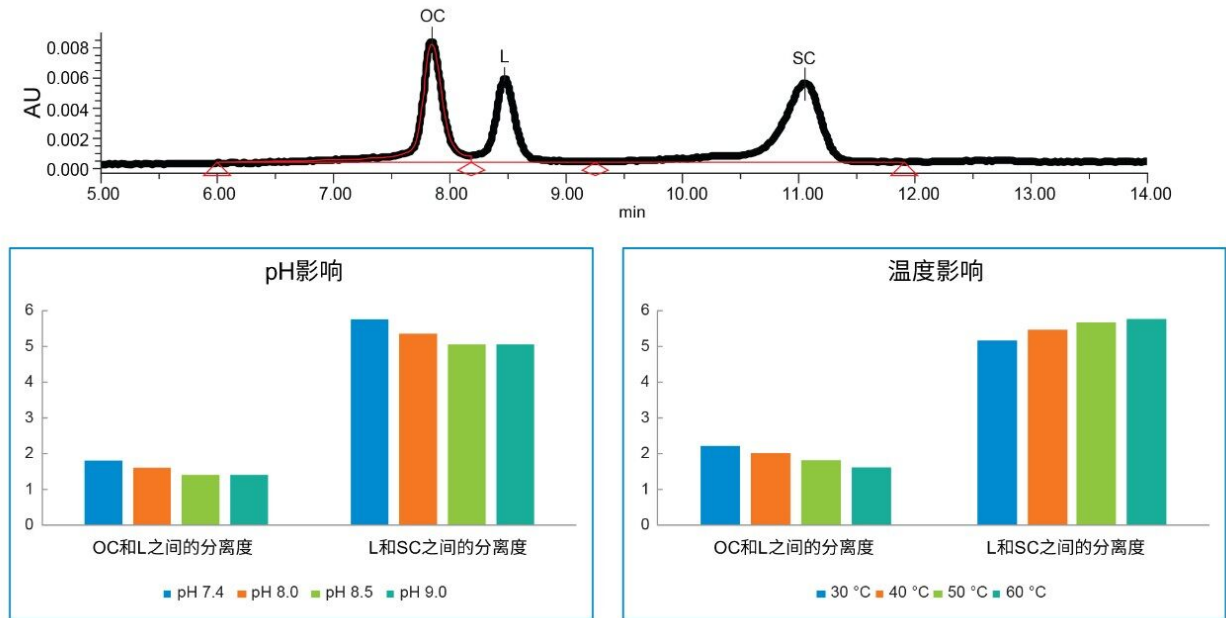


图3.pH和柱温对ΦX174质粒亚型分离的影响

连续稀释亚型混合物并在Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上进行分离 (图4A)，以评估该方法的定量线性。柱上总载样量在59 ng~1875 ng的范围内。改变载样量时，未观察到选择性差异。对单个亚型的峰面积与亚型混合物的总量进行绘图，以构建校准曲线 (图4A，插图)。所有三种亚型均获得了优异的线性。图4B展示了每种亚型的峰面积百分比。总载样量低至约117 ng时即获得一致的结果，并且未观察到任何亚型发生特定损失。总之，结果表明使用Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱能够实现质粒亚型的相对定量。

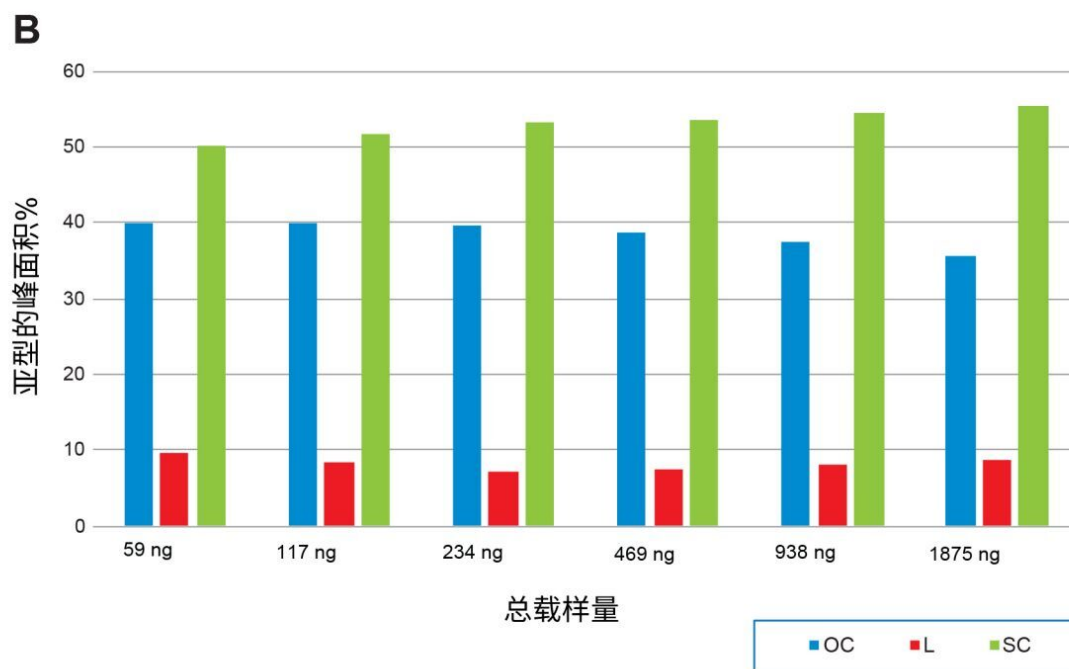
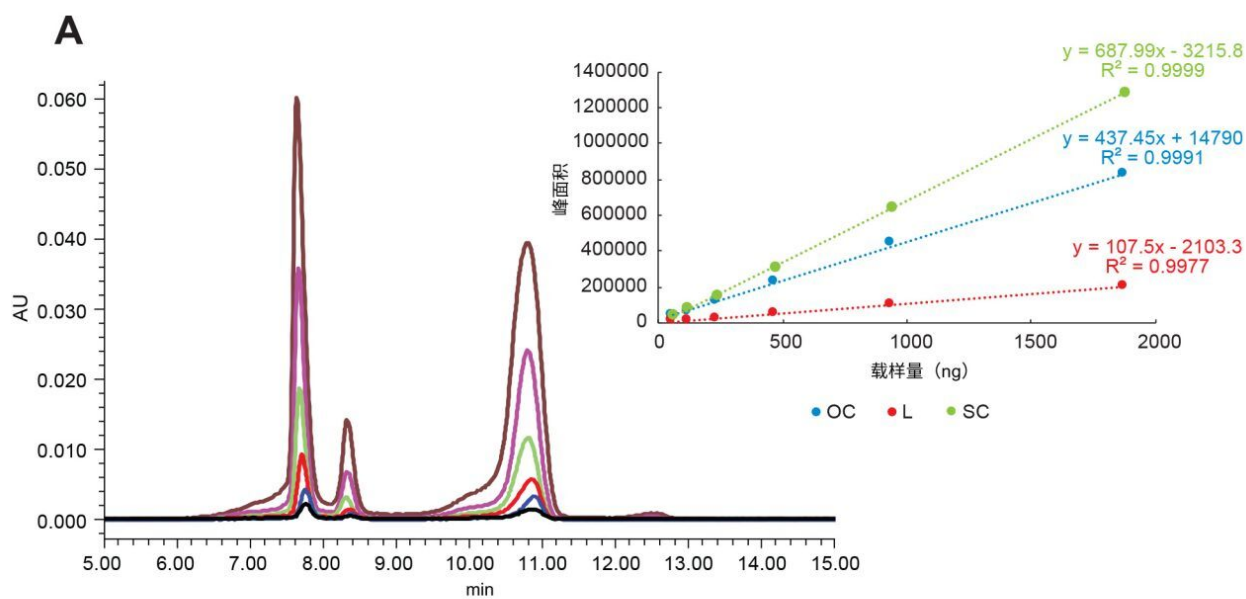


图4A.将不同含量的ΦX174质粒亚型混合物上样至Protein-Pak Hi Res Q色谱柱并进行分离。总载样量在59 ng~1875 ng的范围内。插图：对单个亚型的峰面积与亚型混合物的总量进行绘图。所有三种亚型均获得了出色的线性。在超螺旋质粒之后观察到一个峰，推测其为二聚体。

图4B.混合物中质粒亚型的实测相对丰度随柱上总载样量的变化。

结论

阴离子交换色谱法的优点在于样品消耗量小，且能够使用标准液相色谱仪器得到稳定且可重现的结果。该技术虽已广泛用于质粒纯化/制备^{1,2}，但它作为一种分析技术，在分离和定量质粒亚型方面具有非常大的潜力，可提供一种简单的质粒纯度检测方法。事实上，虽然在本研究中未专门研究，但质粒DNA与所用色谱柱的季铵键合相之间牢固的结合强度，有利于分析低纯度裂解物中的质粒，无需额外的样品净化步骤或使用DNA特异性染料。本文报告了一种使用Waters Protein-Pak Hi Res Q强阴离子交换色谱柱分离超螺旋、开环和线性形式的5.4 kbp质粒的分析方法。在约117 ng~1875 ng的总载样量范围内，三种主要质粒形式的相对定量结果一致。

参考资料

1. Abdulrahman, A.; Ghanem, A. Recent Advances in Chromatographic Purification of Plasmid DNA for Gene Therapy and DNA Vaccines: A Review. *Analytica Chimica Acta*. 2018, 1025, 41–57.
2. Hitchcock, A. G.; Sergeant, J. A.; Rahman, S. F.; Tharia, H. A.; Blom, H. Scale-Up of a Plasmid DNA Purification Process. *BioProcess International*. 2010, 8(11), 46–54.
3. CBER, Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Modifications. US Food and Drug Administration, November 2007.
4. Molloy, M. J.; Hall, V. S.; Bailey, S. I.; Griffin, K. J.; Faulkner, J.; Uden, M. Effective and Robust Plasmid Topology Analysis and the Subsequent Characterization of the Plasmid Isoforms Thereby Observed. *Nucleic Acids Research*. 2004, 32(16), e129.
5. Smith, C. R.; DePrince, R. B.; Dackor, J.; Weigl, D.; Griffith, J.; Persmark, M. Separation of Topological Forms of Plasmid DNA by Anion-Exchange HPLC: Shifts in Elution Order of Linear DNA. *J. Chromatogr. B*. 2007, 854, 121–127.

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>>

720007207ZH, 2021年3月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.