

アプリケーションノート

陰イオン交換クロマトグラフィー（AEX）による dsDNA フラグメントの分離およびサイズ評価

Hua Yang, Stephan M. Koza, Weibin Chen

Waters Corporation



要約

dsDNA 分子種を高信頼度で分離し、そのサイズを評価することは、細胞・遺伝子治療およびワクチンの分野での重要な分析タスクです。1つのアプリケーション例は、治療用、または治療用導入遺伝子を導入するためのベクターとして使用する、プラスミド DNA の存在と同一性を確認する必要があることです。制限酵素消化プラスミド DNA から得られる dsDNA フラグメントを分離し、サイズ決定を行うことが、この特定の目的のための試験の 1 つとして推奨されています。このアプリケーションノートでは、Waters Protein-Pak Hi Res Q カラムで 0.1 ~ 10 kbp の dsDNA ラダーを分離できることを示します。プラスミドの制限酵素消化によって得られる dsDNA フラグメントのサイズは、フラグメントの保持時間を dsDNA ラダーの保持時間と比較することで評価できます。

アプリケーションのメリット

- 最適化された Waters Protein-Pak Hi Res Q カラムによる 1 kb Plus DNA ラダーの分離
- Waters Protein-Pak Hi Res Q カラムで AEX メソッドを用いた dsDNA サイズの推定

はじめに

ヒトの遺伝子治療用製品では、遺伝子発現の操作や、生きている細胞の生物学的特性を変えることが行われます¹。これらの製品は、プラスミド DNA などの裸の核酸、または治療用遺伝子が含まれているアデノ随伴ウイルス（AAV）などの組換え微生物のいずれかの可能性があります。新薬臨床試験開始申請（IND）では、治験依頼者は遺伝子治療用製品の独自性を実証する必要があります。規制当局は、遺伝子配列を、促進剤や制限酵素切断点などの関連する規制対象要素のマッピングが含まれている概略図として提示することを推奨しています。製造プロセスで、治療用プラスミド DNA または導入遺伝子の製造に使用するプラスミド DNA の存在とその同一性について試験し、開始材料、中間医薬品、最終医薬品が適切に管理されていることを実証する必要があります。推奨されている試験の 1 つは制限酵素消化であり、プラスミド DNA が特異な制限酵素によって様々な長さのフラグメントに切断されます¹。プラスミド DNA の同一性は、フラグメントを分離してサイズを評価することによって評価できますが、これは従来、アガロース電気泳動またはポリアクリルアミドゲル電気泳動で行われていました。ただし、この手法はロースルーブットで、多くの手動処理ステップが必要です。

陰イオン交換クロマトグラフィー（AEX）では、分析種にある負の表面電荷の数および場所の違いに基づいて、分子が分離されます。この分析手法には、頑健で、再現性があり、定量情報が得られ、自動化が簡単で、サンプル消費量が少ないなど、多くの利点があります。dsDNA フラグメントは、主鎖のリン酸基により負に帯電しているため、dsDNA フラグメントの分離について AEX を調査しました。

このアプリケーションノートでは、0.1 キロベースペア（kbp）～ 10 キロベースペア（kbp）の dsDNA ラダーが、ACQUITY UPLC H-Class Bio システムに装着された Waters Protein-Pak Hi Res Q 強陰イオン交換カラムで分離できることを示します。さらに、ラダーの分離を使用して、制限酵素消化プラスミドから得られる dsDNA フラグメントのサイズを推定することができます。

実験方法

サンプルの説明

1 kb Plus DNA ラダー (N3200L) および pBR322 プラスミド BstNI 消化物 (N3031L) は New England Biolabs から購入しました。

LC 条件

LC システム:	ACQUITY UPLC H-Class Bio システム
検出:	ACQUITY UPLC TUV 検出器5 mm チタン製フローセル (波長 260 nm) 付き
バイアル:	ポリプロピレン 12 × 32 mm スクリューネックバイアル (キャップ付きおよびスリット入り PTFE/シリコーンセブタム付き)、容量 300 μ L、100 個入り (製品番号: 186002639)
カラム:	Protein-Pak Hi Res Q カラム、5 μ m、4.6 × 100 mm (製品番号: 186004931)
カラム温度:	30 \square C
サンプル温度:	10 \square C
注入量:	0.3 L
流速:	0.4 mL/分
移動相 A:	100 mM トリス塩酸
移動相 B:	100 mM トリス塩基
移動相 C:	3 M 塩化テトラメチルアンモニウム (TMAC)
移動相 D:	水

送液するバッファー濃度:

20 mM

グラジエントテーブル (AutoBlend Plus メソッド、 Henderson-Hasselbalch の式で算出)

時間 (分)	流速 (mL/分)	pH	塩 (mM)	塩曲線
0	0.4	7.4	0	-
1	0.4	7.4	0	11
2	0.4	7.4	1620	6
4	0.4	7.4	1620	6
24	0.4	7.4	1780	6
26	0.4	7.4	2400	6
26.1	0.4	7.4	0	11
42	0	7.4	0	11

上記のグラジエントテーブルでは、バッファーは 20 mM トリス pH 7.4 です。初期塩濃度を 0 mM に設定し、すべての分析種がカラムに強く結合するようにします。次に塩濃度を 1,620 mM まで急速に上昇させ、2 分間平衡化してから分離のためのグラジエントを開始します。塩濃度は、1 kb DNA ラダーを分離するために、20 分間で 1,780 mM まで直線的に上昇させます。次に、残っている結合分子を除去するために、2 分間で 2,400 mM まで急速に上昇させます。最後に、初期状態への平衡化ステップを行い、次の注入に備えます。

汎用クオータナリー LC システムのためのグラジエントテーブルを以下に示します。

時間 (分)	%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

データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア:

Empower 3 FR 4

結果および考察

図 1B に示されているように、0.1 kbp ~ 10 kbp の範囲の一連の dsDNA フラグメントで構成される 1 kb Plus DNA ラダーが、Waters Protein-Pak Hi Res Q 強陰イオン交換カラムで分離されました。幅広いサイズのさまざまな dsDNA を分離する能力は、制限酵素消化物の分析に不可欠です。

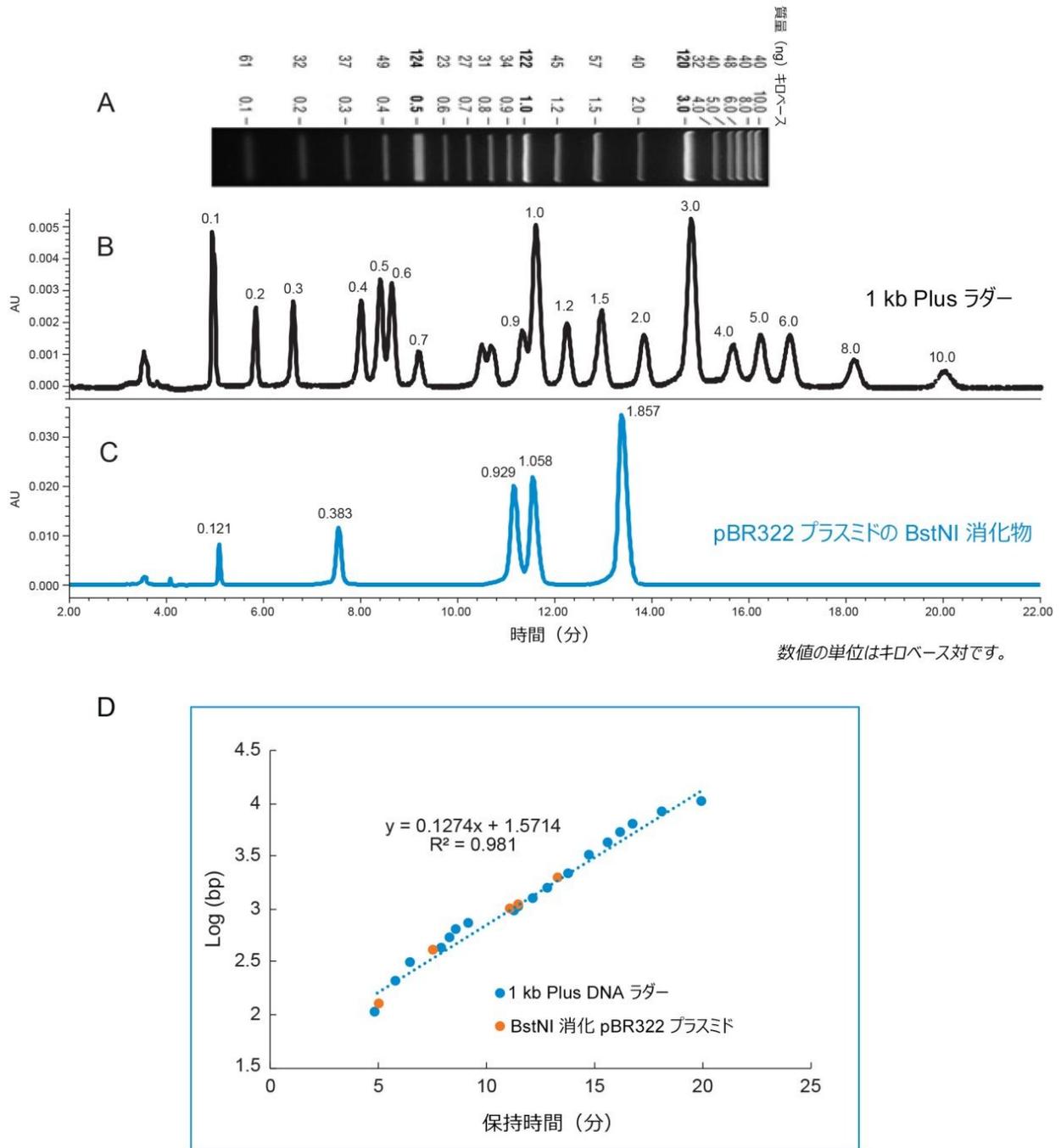
このクロマトグラフィー分離は、New England Biolabs のウェブサイト（図 1A および 1B）に掲載されているアガロースゲル分離と一致しています。フラグメントのサイズを簡単に特定できるように、1 kb Plus dsDNA ラダー中の 1 kbp および 3 kbp のフラグメントの量を他のフラグメントの量よりも意図的に多くしました。これは、ゲル上で 1 kbp と 3 kbp のバンドが濃く明るいことから、観察できます。これに一致して、陰イオン交換クロマトグラムでの 1 kbp フラグメントと 3 kbp フラグメントのピーク面積も、他のフラグメントのピーク面積より大きくなっています。

負に帯電しているホスホジエステル基の数はヌクレオチドの数に比例するため、DNA フラグメントはそのサイズに応じて溶出するはずですが、一般に、これは DNA フラグメントが短い場合（100 bp 未満）に当てはまります。DNA のサイズが大きくなると、DNA の組成が AEX 分離に影響を与える可能性があります。たとえば、A-T 含量が高いフラグメントは、鎖の長さに基づく予想時間よりも後に溶出することが示されています^{2,3}。一部のケースでは、A-T 含量が高い短いフラグメントは、A-T 含量が低い長いフラグメントよりも後に溶出しました⁴。DNA は長さの順に溶出しないため、これによってサイズ評価で問題になる場合があります。これらの試みでは、AEX 分離での溶出用の

塩として NaCl を使用しました。興味深いことに、NaCl 中では、A-T が多く含まれている DNA の方が、G-C が多く含まれている DNA よりも融解温度が高いことが示されています。この実験を塩化テトラメチルアンモニウム (TMAC) 中で行うと、A-T が多く含まれている DNA と G-C が多く含まれている DNA の間の融解温度の差は解消されます。仮説によれば、TMAC が DNA 構造の溝に適合し、A-T 塩基対に選択的に結合して、融解温度は DNA の組成に依存しなくなります^{5,6}。

当社での以前の研究では、核酸が含まれている分析物の溶出塩として、TMAC の方が NaCl よりも優れた分離が得られました^{7,8}。今回の試験では、さまざまな長さの dsDNA フラグメントを分離するための塩として、TMAC を再び実験します。多角度光散乱 (MALS) で得られた予備的データでは、クロマトグラムのピークの分子量が保持時間とともに増加することが示唆されています (データは示されていません)。TMAC によって、フラグメント組成とは無関係に、サイズに基づいて DNA フラグメントを分離できる理由は、完全には明らかではありませんが、最終的な AEX 分離の結果に対する dsDNA フラグメントの組成の影響を解消する重要な役割を、TMAC が果たすと推測されます。

従来、DNA フラグメントサイズの評価は、アガロースゲルでフラグメント DNA を泳動し、バンドの位置を、同じゲルで同じ条件下でレファレンス物質として機能する DNA ラダーの位置と比較することで行います。同様に、今回の実験では、AEX メソッドでは、1 kb Plus DNA ラダーと一緒に同じクロマトグラフィー条件で分析することによって、保持時間を用いて DNA フラグメントのサイズを評価できることを実証します (図 1B と 1C)。図 1D に、dsDNA フラグメントの $\log(\text{bp})$ 対保持時間のプロットが示されています。青色の点は 1 kb Plus DNA ラダーのデータポイントで、オレンジ色の点は BstNI 消化 pBR322 プラスミドのデータポイントです。1 kb Plus DNA ラダーによる線形回帰では、サイズの対数と保持時間の間に強い相関関係が示されています ($R^2 = 0.981$)。このプロットを使用して、制限酵素フラグメントのサイズが保持時間から計算されます。パーセント誤差 (%) は、式 { (計算サイズ - 理論サイズ) / 理論サイズ } を用いて計算されます。pBR322 プラスミド由来のほとんどの制限酵素フラグメントの測定は、誤差が 11% 未満でした。このことは、プロットのトレンドライン上または非常に近接しているオレンジ色の点によって強調されています。最初の制限酵素フラグメント (0.121 kbp) の % 誤差は、他の DNA フラグメントの % 誤差よりも大きくなっています。この偏差は、1 kb Plus DNA ラダー (0.1 kbp) で早く溶出するフラグメントのデータポイント (トレンドラインからも遠く離れている) に起因する可能性があります。



数値の単位はキロベース対です。

図 1. A) 1 kb Plus DNA ラダーのアガロースゲル分離 (New England Biolabs の許可を得て www.neb.com [2021] から転載)、B) 1 kb Plus DNA ラダーの Waters Protein-Pak Hi Res Q カラムでの陰イオン交換分離、C) BstNI 消化 pBR322 プラスミド由来の DNA フラグメントの Waters Protein-Pak Hi Res Q カラムでの陰イオン交換分離、D) dsDNA フラグメントの log(bp) 対保持時間のプロット

結論

陰イオン交換クロマトグラフィーは頑健で、再現性があり、定量情報を提供し、自動化が容易です。ここでは、1 kb Plus DNA ラダー（0.1 kbp ～ 10.0 kbp の範囲の dsDNA フラグメント）を Waters Protein-Pak Hi Res Q カラムで分離できることを示しました。AEX 分離の結果は、アガロースゲル分離の結果と非常によく一致しています。dsDNA のサイズの評価は、dsDNA の保持時間を 1 kb Plus DNA ラダーの保持時間と比較することで行えます。この分析法を使用して、プラスミドの制限酵素消化から得られた DNA フラグメントを分離してサイズ評価することができますが、分析法の用途はこれに限定されません。このような分析は、遺伝子治療製品の製造プロセス全体を通じて、プラスミドの存在と同一性を実証するための分析法として使用できます。

参考文献

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, [720006825 < 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 >](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. Plasmid Isoform Separation and Quantification by Anion-Exchange Chromatography (AEX). Waters Application Note, [720007207 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/plasmid-isoform-separation-and-quantification-by-anion-exchange-chromatography-aex.html >](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/plasmid-isoform-separation-and-quantification-by-anion-exchange-chromatography-aex.html) , 2021.

ソリューション提供製品

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

ACQUITY UPLC チューナブル UV 検出器 <<https://www.waters.com/514228>>

Empower クロマトグラフィーデータシステム <<https://www.waters.com/10190669>>

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

720007321JA、2021 年 7 月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.