

利用阴离子交换色谱法(AEX)评估单向导RNA的大小和纯度

Hua Yang, Stephan M. Koza, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

单向导RNA (sgRNA)是CRISPR/Cas9技术中用于基因编辑的关键要素，大小通常在100~150个碱基之间。本应用纪要表明，可以使用在Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上开发的优化阴离子交换方法，通过比较Low Range ssRNA Ladder（50-500个碱基）估算多个sgRNA的大小。此外，可以使用相同的阴离子交换方法评估sgRNA样品的纯度，为保证sgRNA产品一致性提供一种信息丰富且简便的方法。

优势

- Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱能够分离大小介于50~500个碱基之间的Low Range ssRNA Ladder
- Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱能够分离ssRNA及其杂质
- 在相同的梯度条件下使用AEX方法和Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱估算ssRNA（大小范围100–150 mer）的大小和纯度

简介

成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR相关(Cas)细菌免疫系统的发现,以及RNA向导CRISPR/CRISPR相关蛋白9 (Cas9)技术在哺乳动物细胞中的快速应用对基因编辑领域产生了重大影响¹⁻³。Cas9蛋白是一种非特异性核酸内切酶,由向导RNA (gRNA)引导至特定的DNA位点,使该位点的目标DNA发生双链断裂。gRNA由两部分组成: CRISPR RNA (crRNA)和反式激活crRNA (tracrRNA)。crRNA通常是与目标DNA互补的17-20个核苷酸序列, tracrRNA是Cas9核酸酶的结合支架。虽然crRNA和tracrRNA在自然界作为两个独立的RNA分子存在,但将crRNA序列和tracrRNA序列结合成单个RNA分子的单向导RNA (sgRNA)已成为一种常用形式。sgRNA的长度在100-150个核苷酸范围内。表征sgRNA至关重要,因为它是CRISPR/Cas9技术的核心。

阴离子交换色谱法(AEX)根据分子表面负电荷的差异分离分子。这种分析技术可以提供稳定、可重现的定量结果。该方法也极易自动化,仅需少量样品,并且可以分离馏分供进一步分析。AEX已被用于与基因治疗相关的多个领域,包括腺相关病毒空衣壳与全衣壳分离、质粒亚型分离和dsDNA片段分离⁴⁻⁶。由于骨架上的磷酸基团使sgRNA带负电荷,因此我们考察了AEX法在sgRNA大小和纯度评估中的应用。

本应用纪要表明,在ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上使用Waters Protein-Pak Hi Res Q强阴离子交换柱可以分离大小介于50~500个碱基之间的单链RNA (ssRNA) Ladder,此外还可用于估计ssRNA的大小(大约100-150个碱基范围内),包括CRISPR/Cas9系统中的sgRNA。此外,可以使用相同的梯度条件估计这些ssRNA的纯度。

实验

样品描述

HPRT (纯化和粗制)是一种预先设计的CRISPR/Cas9 sgRNA (Hs.Cas9.HPRT1.1AA, 100 mer)。GUAC是一种定制的ssRNA (150 mer),包含GUAC重复序列。HPRT sgRNA和GUAC ssRNA均购自Integrated DNA Technologies (IDT)。Rosa26和Scrambled #2都是预先设计的CRISPR/Cas9 sgRNA,购自Synthego (100 mer)。Low Range ssRNA Ladder购自New England Biolabs (N0364S)。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统:

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:	60 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	1-10 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

时间 (min)	流速 (mL/min)	pH	盐 (mM)	盐曲线
0	0.4	9.0	0	
5	0.4	9.0	1400	11
9	0.4	9.0	1400	11
29	0.4	9.0	2100	6
31	0.4	9.0	2400	6
33	0.4	9.0	2400	6
33.1	0.4	9.0	0	11
45	0	9.0	0	11

梯度表 (AutoBlend Plus方法, 采用亨德森-哈塞尔巴尔赫方程计算得出)

在上面的梯度表中, 缓冲液为20 mM Tris (pH 9.0)。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。5分钟后, 盐浓度增加到1400 mM, 根据先前的研究, 大部分杂质将在此时洗脱。平衡4分钟后, 分离梯度开始。对于Low Range ssRNA Ladder以及各ssRNA的分离, 盐浓度在20分钟内从1400 mM线性增加到2100 mM。然后升至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。

时间 (min)	%A	%B	%C	%D
0	3.3	16.7	0.0	80.0
5	3.3	16.7	46.7	33.3
9	3.3	16.7	46.7	33.3
29	3.3	16.7	70.0	10.0
31	3.3	16.7	80.0	0.0
33	3.3	16.7	80.0	0.0
33.1	3.3	16.7	0.0	80.0
45	3.3	16.7	0.0	80.0

通用四元液相色谱系统的等效梯度表如上所示。

数据管理

色谱软件：

Empower 3 (FR 4)

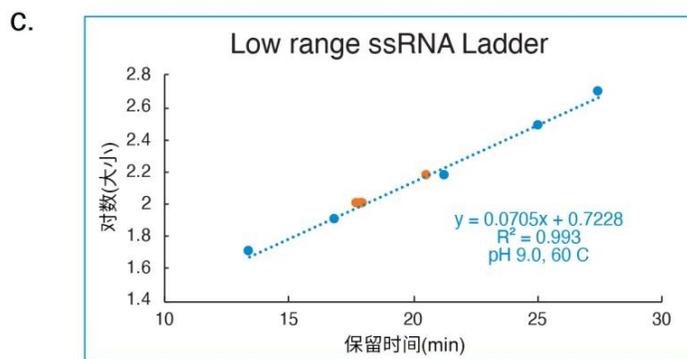
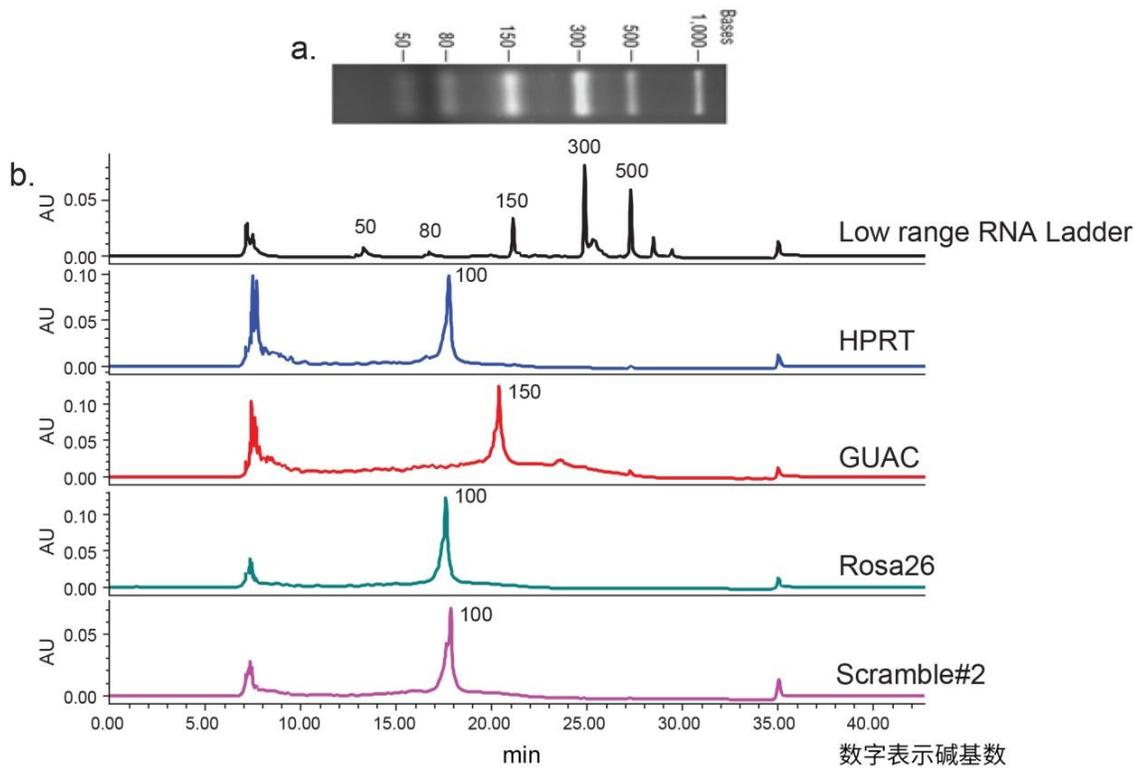
结果与讨论

大小评估

在ssRNA的大小评估研究中使用Low Range ssRNA Ladder测试各种流动相条件，包括pH（7.4和9.0）、柱温（30 °C和60 °C）和盐（NaCl和TMAC）。

优化条件的结果如图1B所示。使用pH 9.0的Tris缓冲液结合60 °C柱温和TMAC盐梯度，在Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上分离Low Range ssRNA Ladder（50–500个碱基）以及四种预制sgRNA（100 mer）和一种定制的

ssRNA (150 mer)。Low Range ssRNA Ladder在这种强阴离子交换柱上的分离结果与在琼脂糖凝胶柱上的分离结果非常相似，如图1A所示。根据保留时间和Ladder中每个ssRNA的碱基数对数构建校准曲线（图1C，蓝点）。由Low Range ssRNA Ladder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($R^2 = 0.993$)。使用此图，根据ssRNA各自的保留时间计算大小。使用下式计算百分比(%)误差： $\{(\text{计算大小} - \text{理论大小}) / \text{理论大小}\}$ 。所有被测RNA的百分比误差均小于6%（图1d），橙色数据点位于校准曲线的趋势线上或非常接近校准曲线的趋势线证明了这一点。请注意，两个不同制造商的四个预制sgRNA和带有人工序列的定制ssRNA的百分比误差均较小。虽然没有测试短于100个碱基和大于150个碱基的ssRNA，但这种方法有望用于50-500个碱基范围内的ssRNA大小评估。



d.

	理论大小 (mer)	计算大小 (mer)	%误差
HPRT	100	97	-3.28%
GUAC	150	149	-0.99%
Rosa26	100	94	-5.82%
Scramble#2	100	98	-1.85%

图1A.Low Range ssRNA Ladder的琼脂糖凝胶柱分离结果 (经New England Biolabs许可后转载自www.neb.com)

(2021)) ; 1B.Low Range ssRNA Ladder和ssRNA在Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上的阴离子交换分离结果 ; 1C.Low Range ssRNA Ladder (蓝点) 和各ssRNA (橙点) 的对数(大小)与保留时间关系图; 1D.根据保留时间和校准曲线估计各ssRNA的大小。所有ssRNA的百分比误差都较小。

值得注意的是, pH 7.4的Tris缓冲液、60 °C柱温和TMAC盐梯度的流动相条件也获得了良好的大小估计结果, 所有预制sgRNA (100 mer)的百分比误差小于5%, 人工制造的GUAC ssRNA (150 mer)的百分比误差约为12%。总体而言, 60 °C柱温导致每个ssRNA有一个单峰, 这是确定峰的保留时间用于大小评估所需的。30 °C柱温会产生一个以上的主峰, 可能是ssRNA的异构体。无论pH值和柱温如何, 当盐梯度使用NaCl时, 也观察到多个峰。

纯度评估

使用与大小评估相同的梯度条件, 在Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上分离纯化和粗制的HPRT sgRNA (图2)。基于所示的峰面积, 粗制和纯化样品的相对纯度分别测量为37.4%和88.0%。大多数杂质在含50个碱基的物质之前洗脱, 尽管似乎存在大小接近HPRT sgRNA的低丰度杂质。

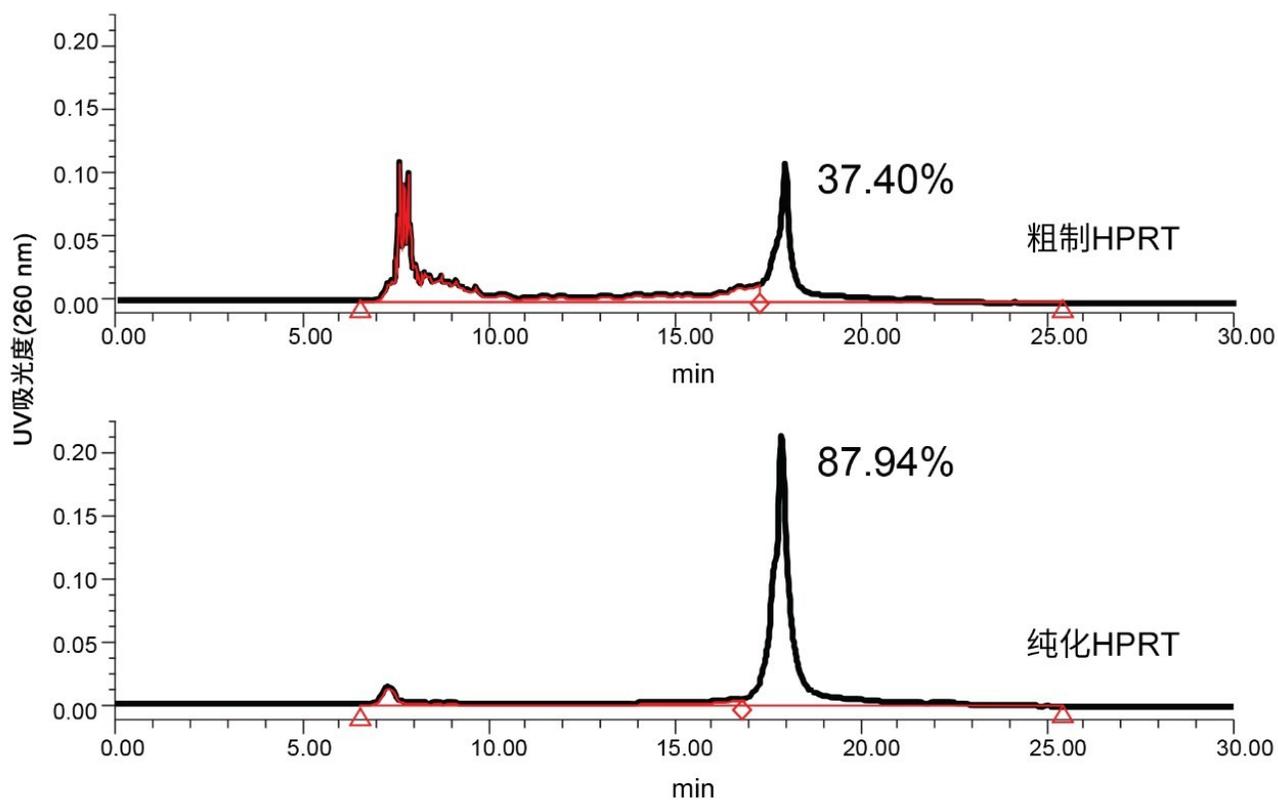


图2.使用与图1B中相同的条件，在Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱上分离用于CRISPR/Cas 9系统的粗制和纯化HPRT sgRNA（详见实验部分）。

结论

阴离子交换色谱法稳定、可重现、易于自动化、可产生定量信息，并且仅需少量样品。本研究证明，Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱能够分离Low Range ssRNA Ladder（50~500个碱基）的组分，使用TMAC作为洗脱盐时，碱基数对数与实测保留时间之间存在线性相关性。通过比较ssRNA的保留时间与Low Range ssRNA Ladder的保留时间，可以估计ssRNA的大小（范围介于100-150个碱基之间）。此外，还可以通过相同的色谱分离观察sgRNA的纯度。此方法有望应用于CRISPR/Cas9基因编辑技术的关键要素sgRNA的分析。

参考资料

1. Dunbar C E, High K A, J. Joung K, Kohn D B, Ozawa K, Sadelain M. Gene Therapy Comes of Age. *Science* 2018; 359: 175.
2. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas Immune System: Biology, Mechanisms and Applications. *Biochimie* 2015; 117: 119–128.
3. Patrick D. Hsu P D, Eric S. Lander E S, and Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 2014; 157: 1262–1278.
4. Yang H, Koza S and Chen W. Anion-Exchange Chromatography for Determining Empty and Full Capsid Contents in Adeno-Associated Virus. *Waters Application Note*. 2020, [720006825EN](#).
5. Yang H, Koza S和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*. 2021, [720007207ZH](#).
6. Yang H, Koza S和Chen W. 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. *沃特世应用纪要*. 2021, [720007321ZH](#).

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>>

720007428ZH, 2021年11月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.