

陰イオン交換クロマトグラフィーによる長鎖プラスミド DNA pHelper の異性体の分離

Separation of long chain plasmid DNA pHelper isoforms by anion-exchange chromatography

テクニカルインフォメーション No. 205 では、鎖長が 4361 bp のプラスミド DNA (pDNA) pBR322 異性体の分離例を紹介しましたが、近年では、mRNA ワクチン製造などで使用される 10 kbp 超の pDNA の純度解析への要求が増加しています。しかし、長鎖 pDNA の HPLC 分析では、カラム内の充填剤間流路の大きさが溶出に影響することが知られています¹。本報では、種々の粒子径の陰イオン交換クロマトグラフィーカラムを用いて、長鎖 pDNA の異性体の分離について検討した結果を報告します。

試料には、スーパーコイル pDNA が多く含まれる鎖長 11.6 kbp の pDNA pHelper を使用しました。開環型 pDNA 及び直鎖型 pDNA は、この試料をそれぞれ制限酵素 Nt.BspQI (Biolabs, #R0644S) 及び NdeI (Biolabs, #R0111S) で切断することにより調製しました。イオン交換クロマトグラフィーによる溶出挙動の確認には、非多孔性充填剤を基材とした 4 種類のカラム(表 1) を使用しました。

核酸分離用として汎用されている TSKgel DNA-NPR®(粒子径 2.5 µm) 及び TSKgel DNA-STAT (粒子径 5 µm) を用いて分離を試みましたが、いずれのカラムにおいてもスーパーコイル pDNA、直鎖型 pDNA は溶出するものの、開環型 pDNA の溶出は確認できませんでした。これは、カラム内の試料が通過する流路の大きさ(充填剤間の空隙)が寄与しているものと考えられました。流路の大きさは、充填剤の粒

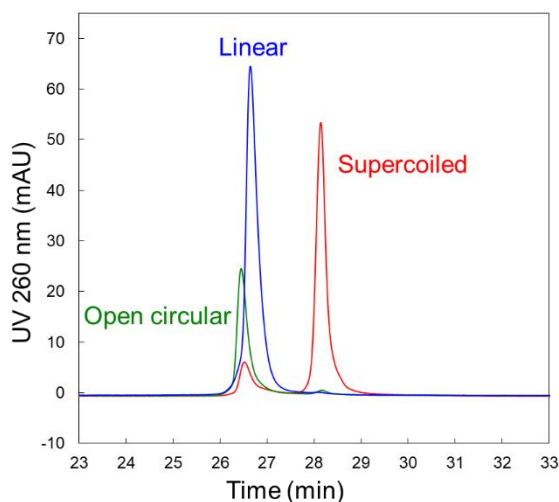
子径及び充填状態に依存し、最密充填された場合、空隙径は充填剤径の 15~35 % 程度になることが知られています²。粒子径 2.5 µm では空隙径は 0.375~0.875 µm、粒子径 5 µm では 0.75~1.75 µm となります。これに比較して、pDNA pHelper は、サイズが大きく、開環型 pDNA は、常に 2 次元のループ構造を維持することから立体的な障害を受け、溶出が制限されていることが推測されます¹。一方、スーパーコイル pDNA 及び直鎖型 pDNA はカラム内の空隙を通過する際にせん断力で引き延ばされ、充填剤の間をひも状となって流れるため、空隙を通過することが出来るものと考えられます²。

粒子径の大きい 2 種類のカラム TSKgel Q-STAT (7 µm 及び 10 µm) を用いて pDNA pHelper の異性体の溶出挙動について検証を行った結果、いずれの粒子径のカラムにおいても開環型 pDNA の溶出が確認されました。粒子径 10 µm の TSKgel Q-STAT (3.0 mm I.D.×3.5 cm) では、開環型 pDNA および直鎖型 pDNA をスーパーコイル pDNA から分離できました(図 1)。さらに、粒子径 7 µm の TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm) を用いることで、3 種類の異性体をすべて分離することが出来ました(図 2)。

本検討より、長鎖 pDNA の異性体分析において、充填剤の粒子径の影響が大きく、適切な粒子径のカラムを選択する必要があることがわかりました。

参考文献

1. E.I. Trilisky, H. Koku, K.J. Czymmek, A.M. Lenhoff, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6365.
2. Hirabayashi J et al. J Chromatogr A. 2000; 893(1): 115-22.

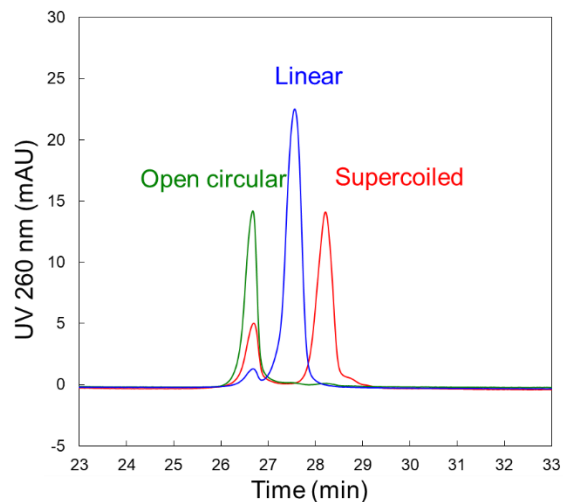


OC/SC 分離度	Lin/SC 分離度
3.74	3.59

図1 pDNA pHHelper 異性体のクロマトグラムの重ね描き (カラム: TSKgel Q-STAT、サイズ: 3.0 mm I.D. x 3.5 cm、粒子径: 10 μ m)

Conditions:

Column: TSKgel Q-STAT (3.0 mm I.D. x 3.5 cm, 10 μ m)
 Mobile phase: A; 0.02 mol/L Tris-HCl pH 8.5
 B; 0.02 mol/L Tris-HCl+1.5 mol/L NaCl pH 8.5
 Gradient : B %; 49 % (0 min)- 49 % (2 min)- 64 % (47 min)
 Flow rate : 0.1 mL/min
 Temperature: 25 $^{\circ}$ C
 Inject volume: 10 μ L (0.02 mg/mL)
 Sample : pDNA pHHelper
 (Supercoiled, Open circular, Linear)



OC/SC 分離度	Lin/SC 分離度
2.63	1.04

図2 pDNA pHHelper 異性体のクロマトグラムの重ね描き (カラム: TSKgel Q-STAT、サイズ: 4.6 mm I.D. x 10 cm、粒子径: 7 μ m)

Conditions:

Column: TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D. x 10 cm, 7 μ m)
 Mobile phase: A; 0.02 mol/L Tris-HCl pH 8.5
 B; 0.02 mol/L Tris-HCl+1.5 mol/L NaCl pH 8.5
 Gradient : B %; 49 % (0 min)- 49 % (2 min)- 64 % (47 min)
 Flow rate : 0.2 mL/min
 Temperature: 25 $^{\circ}$ C
 Inject volume: 10 μ L (0.02 mg/mL)
 Sample : pDNA pHHelper
 (Supercoiled, Open circular, Linear)

表1 使用したカラムの情報

品番	品名	官能基	導入方法	粒子径	カラムサイズ
0018249	TSKgel DNA-NPR	三級アミン	単層	2.5 μ m	4.6 mm I.D. x 7.5 cm
0021962	TSKgel DNA-STAT	四級アミン	グラフト	5 μ m	4.6 mm I.D. x 10 cm
0021960	TSKgel Q-STAT	四級アミン	グラフト	10 μ m	3.0 mm I.D. x 3.5 cm
0021961	TSKgel Q-STAT	四級アミン	グラフト	7 μ m	4.6 mm I.D. x 10 cm



※“TSKgel”、“NPR”は日本、米国、欧州共同体、中国等における東ソー株式会社の登録商標です。
 ※掲載のデータ等は数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください。

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎ (03) 6636-3733 〒104-0028 東京都中央区八重洲2-2-1
 大阪支店 営業部 ☎ (06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
 名古屋支店 営業部 ☎ (052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
 福岡支店 ☎ (092) 710-6694 〒812-0011 福岡市博多区博多駅前3-8-10
 仙台支店 ☎ (022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
 カスタマーサポートセンター ☎ (0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1

お問い合わせe-mail tskgel@tosoh.co.jp
 バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>