

CRISPR-Cas9・核酸複合体の SEC 分離はこれで決まり！

(文献紹介)

TSKgel UP-SW3000 を用いた、たんぱく質、sgRNA および複合体の凝集体分析



(引用文献)

J. Camperi et al., Physicochemical and Functional Characterization of Differential CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes, *Anal. Chem.* 2022, 94, 2, 1432–1440, CC BY NC ND

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04795?urlappend=%3Fref%3DPDF&jav=VoR&rel=cite-as>

(要旨)

DNA の反復配列である CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) に関連したゲノム DNA 切断酵素 (CRISPR-associated protein; Cas) とシングルガイド RNA (sgRNA) が複合体 (RNP) を形成し、DNA の特殊な塩基配列を認識し、精密に切断、さらに修復するという画期的な技術が開発されました。この技術は、遺伝子治療薬から農作物の遺伝子改変や診断試薬など、さまざまな分野で応用開発が進んでいます。

著者らは、CRISPR-Cas と sgRNA、およびその複合体を超高性能サイズ排除クロマトグラフィー (UP-SEC) と複数検出器により分析し、各成分に凝集体が存在することを示しました。また、陰イオン交換クロマトグラフィー (AEC/AEX) により、CRISPR/Cas9 における酵素活性を、切断された DNA 断片の分析から評価しました。その結果、凝集体が複合体形成に影響し、酵素活性を低下させていることが見出され、クロマトグラフィー分析が、CRISPR-Cas や sgRNA などの遺伝子編集用試薬の品質評価に有用であることがわかりました。

●CRISPR-Cas9、sgRNA およびその複合体の SEC 分離

CRISPR/Cas9、sgRNA およびその複合体を TSKgel UP-SW3000 による UP-SEC で分析しました。各成分およびその複合体 (分子量約 180 kDa) には凝集体が見られ、特に sgRNA (約 100 塩基) には、二量体、三量体、四量体が多く存在することが判明しました (裏面データ参照)。これらの凝集体が CRISPR/Cas9 との複合体形成や、DNA 切断活性に影響を与えていることが示唆されました。

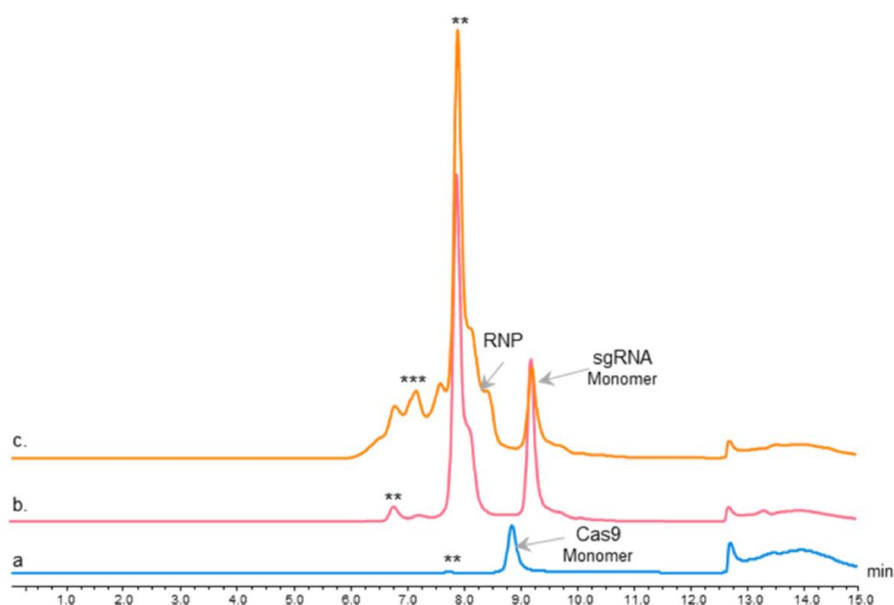
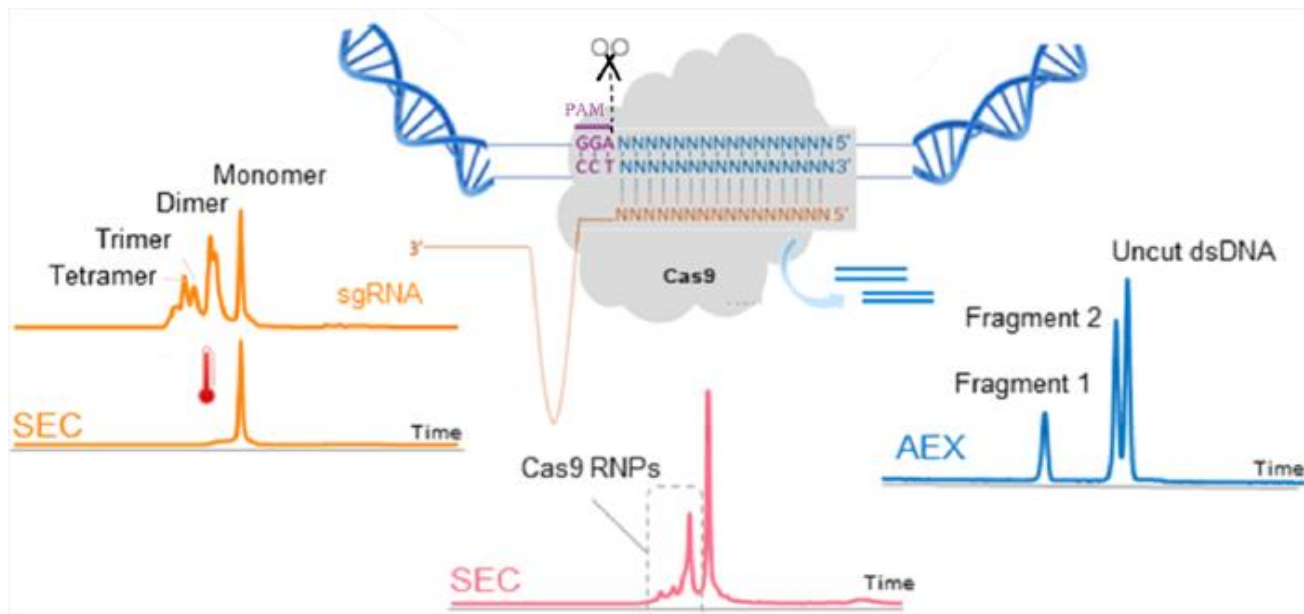


Figure 1. Examples of size exclusion chromatograms obtained for (a) Cas9 protein, (b) sgRNAs, and (c) Cas9 RNP complexes. UV detection at 280 nm for Cas9 and at 260 nm for sgRNAs and Cas9 RNP complexes was used. The Cas9 RNP complex was prepared by incubating a 1:3 M ratio of Cas9 protein and sgRNA. The monomeric forms of the Cas9 protein and sgRNA are indicated. (**) shows their respective aggregates. (***) shows the possible complex formation of Cas9 with aggregated sgRNAs.

●sgRNA の凝集体分析および CRISPR/Cas9 による DNA 切断活性

sgRNA の凝集体について、TSKg_{el} UP-SW3000 を 2 本接続した UP-SEC でさらに詳細分析がなされました。sgRNA は 70 °C で加熱処理すると凝集体が消失し、ほぼ単量体となり、CRISPR/Cas9 との複合体も凝集体が少なくなることがわかりました。また、加熱処理した sgRNA を用いると、CRISPR/Cas9 による DNA 切断活性も高くなるのが AEC/AEX による生成 DNA 断片の分析により示されました。



Ref.; J. Camperiet al., Anal. Chem. 2022, 94, 2, 1432–1440, CC BY NC ND

●まとめ、考察

UP-SEC カラムを用いることで、CRISPR/Cas9 および sgRNA の凝集体などの物理的な性質を高分離能で分析することができました。また、CRISPR/Cas9 による DNA 切断活性も AEC/AEX による DNA 断片の分析で評価できることがわかりました。このように医療応用にも使用される遺伝子編集用試薬としての CRISPR/Cas9 や sgRNA の品質管理や酵素活性への評価では、UP-SEC や AEC/AEX が非常に有用であることが示唆されました。

●TSKg_{el} UP-SW3000 や AEC/AEX (弊社類似品 ; TSKg_{el} DNA-NPR) に関する技術情報

TSKg_{el} UP-SW 3000 ; <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/productjp/columns/sec/upsw>

; https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit_JP/SepaReport/SR_116_UP-SW3000.pdf

TSKg_{el} DNA-NPR ; https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit_JP/SepaReport/sr090.pdf

※たんぱく質、ペプチド、核酸等の SEC 分析に関する技術資料は、弊社ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/litjp> からアクセスできます



TOSOH

※ “TSKg_{el}” は日本等における東ソー株式会社の登録商標です

※ 掲載のデータ等はその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) 5427-5180	〒105-8623	東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオサイエンスG	☎(06) 6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオサイエンスG	☎(052) 211-5730	〒460-0008	名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店	☎(092) 781-0481	〒810-0001	福岡市中央区天神1-13-2
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12743-1

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>

HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>

お問い合わせE-mail hlc@tosoh.co.jp