TSKgel® TECHNICAL INFORMATION No.205

陰イオン交換クロマトグラフィーによるプラスミド DNA pBR322 の立体構造異性体の分離

Separation of plasmid DNA pBR322 isoforms by anion-exchange chromatography

遺伝子治療においては、遺伝子を効率的に細胞に導入するため、ウイルスベクターが多用されます。しかしながら、ウイルスベクターはウイルスの感染力を利用して目的遺伝子を細胞内に導入/発現させるため、安全性が懸念されます。一方、非ウイルス性ベクターとして開発が進められているプラスミドベクター（プラスミド DNA）は、ウイルスベクターに比較して遺伝子の発現効率は低いものの、核内の DNA に組み込まれず、免疫原性がないなど安全性に優れていることから期待を集めています。

一般的に、プラスミド DNA は大腸菌培養液からの精製により得られます [1]。培養液中には、夾雑成分である宿主由来のゲノム DNA や RNA、たんぱく質などの他、目的とするプラスミドの立体構造異性体である開環 DNA(Open circular)、直鎖 DNA(Linear)も存在します。これらは遺伝子の発現効率を低下させるため、臨床用のプラスミド DNA ではスーパーコイル DNA の純度が 90%以上であることが求められています [2]。HPLC を用いてスーパーコイル DNA を分離する方法として、サイズ排除クロマトグラフィーや疎水クロマトグラフィーによる分離例 [3),4)] が報告されていますが、いずれの分離モードにおいても、立体構造異性体をすべて分離することは困難でした。そこで今回、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いてプラスミド DNA pBR322 の立体構造異性体の分離を検討しましたので、紹介します。

試料はアルカリ溶解法にて調製されたスーパーコイル DNA、制限酵素 EcoRI で切断した直鎖 DNA（Linear）およびトポイソメラーゼ I で処理した開環 DNA (Open circular) を用いました。カラムは非多孔性充塡剤を用いた核酸分離用陰イオン交換カラム TSKgel DNA-STAT®及び TSKgel DNA-NPR®を使用しました。$NaClO_4$ を用いた塩濃度グラジエント溶離法による分離を試みたところ、グラジエント条件の最適化により分離は確認できたものの、各プラスミド異性体の溶出時間の差は十分ではありませんでした。そこで、用いる塩の種類を $NaClO_4$ から NaCl へ変更した結果、いずれのカラムにおいても分離が向上することがわかりました。NaCl を用いて測定した 2 種類カラムのクロマトグラムを図 1、図 2 に示します。TSKgel DNA-STAT と TSKgel DNA-NPR ではわずかに選択性が異なっており、プラスミド DNA pBR322 の異性体分離においては、TSKgel DNA-NPR を用いることで、3 種類の異性体を全て分離することができました。

参考文献

1) Ptazeres et al. *J Chromatogr A*, 1998 May 8; 806(1): 31-45
2) Schleef M et al. *J Gene Med,* 2004 Jun, S45-S53
3) Horn et al. *Hum Gene Ther,* 1995 May; 6(5): 565-73
4) Diogo et al. *Biotechnol Bioeng*, 2000 Jun 5; 68(5): 576-83

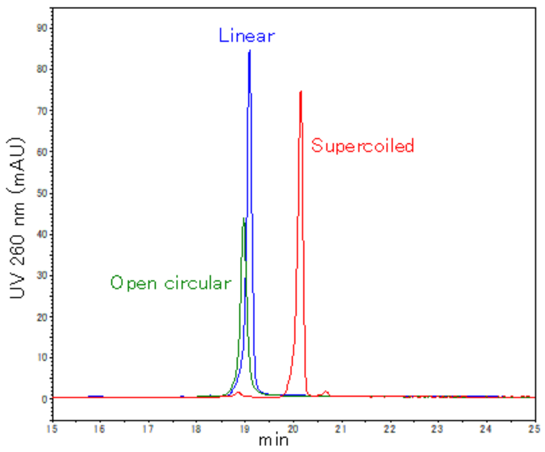

図１ プラスミドDNA pBR322の立体構造異性体の分離の重ね描き(TSKgel DNA-STAT)

Conditions:

Column : TSKgel DNA-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm)
Mobile Phase : A) 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5)
B) 20 mmol/L Tris-HCl +1mol/L NaCl (pH 8.5)
Gradient : B %: 75 % (0 min) -75 % (2 min) - 95 % (32 min)
Flow Rate : 0.5 mL/min
Column Temp.: 25 ℃
Detector : UV 260 nm
Inj. Vol. : 2 µL
Sample : a) Linear 0.2 mg/mL
b) Open circular 0.2 mg/mL
c) Suprecoiled 0.1 mg/mL

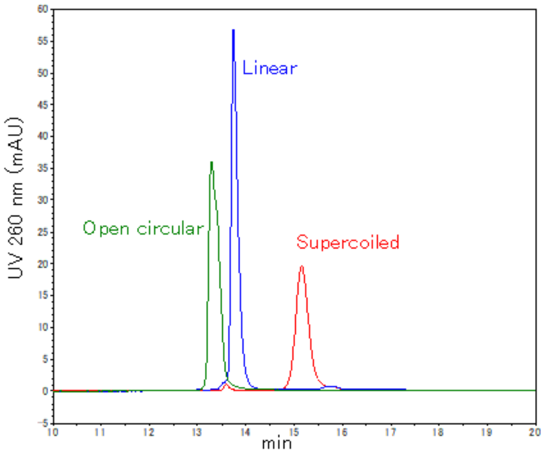

図２ プラスミドDNA pBR322の立体構造異性体の分離の重ね描き(TSKgel DNA-NPR)

Conditions:

Column : TSKgel DNA-NPR (4.6 mm I.D. × 7.5 cm)
Mobile Phase : A) 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5)
B) 20 mmol/L Tris-HCl +1mol/L NaCl (pH 8.5)
Gradient : B %: 50 % (0 min) -50 % (2 min) - 70 % (32 min)
Flow Rate : 0.5 mL/min
Column Temp.: 25 ℃
Detector : UV 260 nm
Inj. Vol. : 2 µL
Sample : a) Linear 0.2 mg/mL
b) Open circular 0.2 mg/mL
c) Suprecoiled 0.1 mg/mL

品番	品名	イオン交換基	導入方法	粒子径	カラムサイズ
0018249	TSKgel DNA-NPR	第三級アミン	単層	2.5 µm	4.6 mmI.D. × 7.5 cm
0021962	TSKgel DNA-STAT	第四級アンモニウム	グラフト	5 µm	4.6 mmI.D. × 10 cm

TOSOH

※"TSKgel","TSKgel STAT", "NPR"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2743-1

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
お問合わせE-mail hlc@tosoh.co.jp