

生物惰性液相色谱分析三种构型的质粒样品

LC-366

摘要： 本文使用生物惰性液相色谱仪分析质粒三种构型，通过优化色谱柱温度，使 3 种状态质粒分离度均大于 1.5，实现基线分离。质粒样品重复分析 6 次，保留时间 RSD 小于 0.1%，峰面积 RSD 小于 1.80%，重复性结果佳。此方法适用于质粒样品的分析。

关键词： 生物惰性液相色谱 质粒 分离度 重复性

技术特点：

- ❖ 通过色谱柱温度优化，使 3 种状态质粒分离度大于 1.5，实现基线分离。
- ❖ 使用惰性液相色谱仪分析质粒样品，最大程度减少样品在系统中残留，峰面积和保留时间重复性佳。

质粒是存在于细胞质中的一类独立于染色体的遗传因子（绝大部分为 DNA）。其可以进行自主复制，并能在细胞分裂时恒定的传给子代细胞。所以，质粒作为简单易操作的基因载体，广泛用于细胞与基因治疗和核酸药物领域。

标准的质粒 DNA 具有 3 种基本构型：超螺旋 (Supercoiled, 简称 SC)、线性 (Linear) 和开环 (Opencircular, 简称 OC)。其中超螺旋被认为是一种能够最有效地提高转染效率和目的基因表达量的质粒形态。在基因治疗的研究中更是对药用质粒的超螺

旋含量做了明确要求 (FDA:>80%, NMPA: \geq 90%, SMPA:>85%)。所以很有必要将三种质粒分离，并对其含量进行确定。

质粒为含磷酸基团的 DNA，查阅文献得知，含磷酸基团样品易在常规液相色谱仪中残留，从而影响分析的重复性。本文采用生物惰性液相色谱仪分析质粒样品，去除了质粒样品在仪器中的残留。同时通过方法优化，将三种构型质粒完全分离，此方法比常规的电泳法有更高的分辨率和重复性。

实验部分

1.1 仪器

生物惰性超高效液相色谱仪，具体配置信息如下：

系统控制器：	CBM-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40D XSi×2	自动进样器：	SIL-40C XSi
柱温箱：	CTO-40C	检测器：	SPD-M40
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114		

1.2 分析条件

色谱柱： SHIMSEN Ankylo SAX-PM (150×4.6 mm I.D., 5 μ m, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 380-01215-64)

流动相： A相 -20mM Tris-HCl (pH=8.5),
B相 -1M NaCl in 20mM Tris-HCl (pH=8.5)

进样体积： 10 μ L

柱温： 25°C

洗脱方式： 梯度洗脱，B相初始浓度为 60%，
时间程序见表 1。

流速： 1 mL/min

波长： 260 nm

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
10.00	Pumps	Pump B Conc.	90
10.01	Pumps	Pump B Conc.	60
15	Control	Stop	

■ 结果与讨论

2.1 分离度优化

质粒有三种状态，分别为超螺旋、开环和线性，在分析过程中需要优化液相方法将其分离。在确定了流动相和色谱柱条件后，通过调整色谱柱温度对分离度进行优化。色谱柱温度为 40、30 和 25℃ 时采集得到的色谱图如图 1 所示，分离度结果如表 2 所示。结果表明，随着色谱柱温度的降低，分离度提高。温度为 25℃ 时，分离度均大于 1.5，实现基线分离。确认最终色谱柱温度为 25℃。

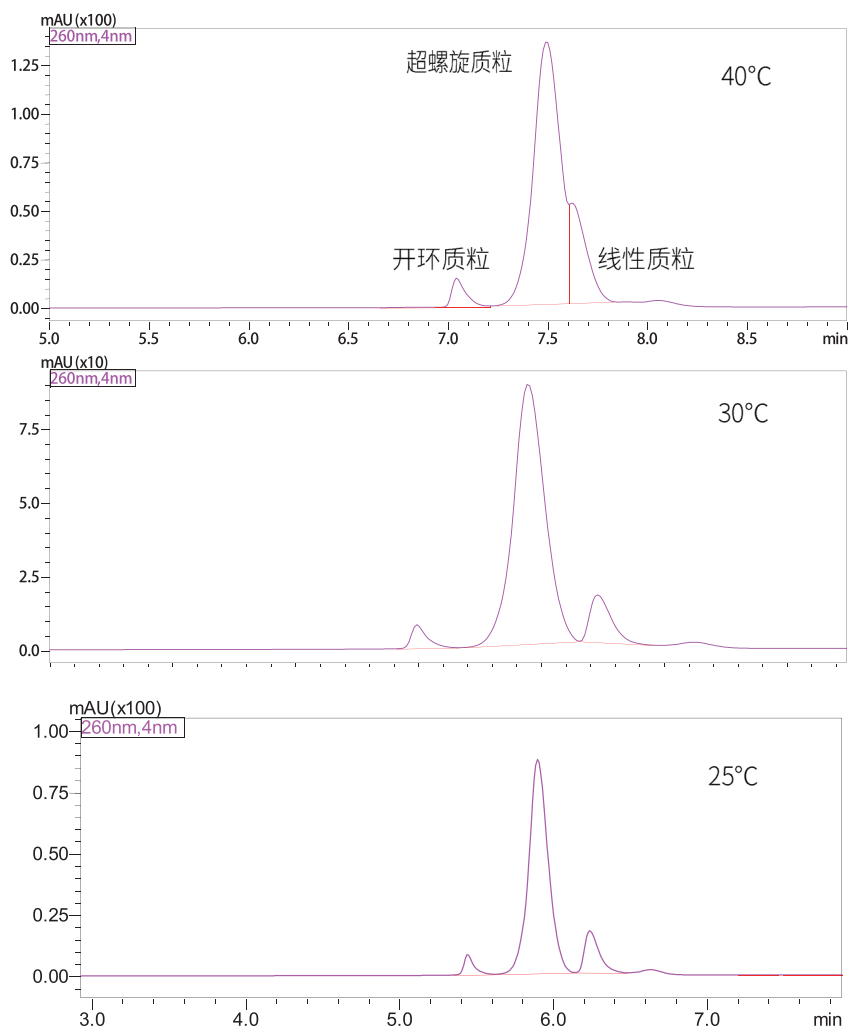


图 1 不同色谱柱温度下的色谱图

表 2 不同色谱柱温度下三种质粒的分离度

色谱柱温度	分离度		
	开环质粒	超螺旋质粒	线性质粒
40℃	/	2.098	0.194
30℃	/	2.381	1.362
25℃	/	2.563	1.554

2.2 重复性实验结果

本实验采用惰性液相色谱，将 3 种状态质粒重复分析 6 次，考察方法重复性。结果显示，保留时间 RSD 小于 0.09%，峰面积 RSD 小于 1.72%，重复性结果良好。

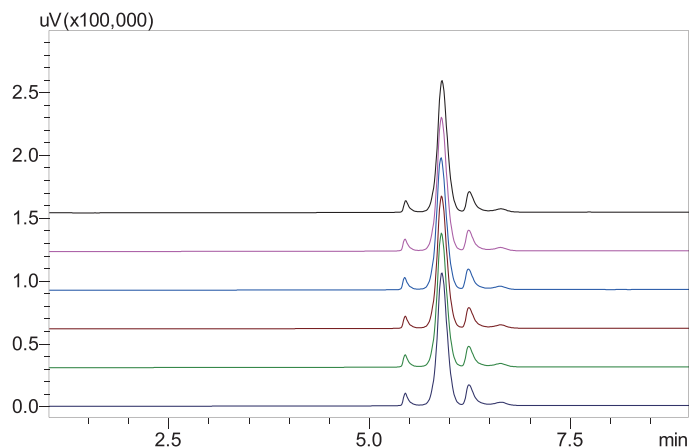


图 2 三种状态质粒重复分析色谱图比较 (n=6)

表 3 三种状态质粒重复性实验结果 (n=6)

质粒状态	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
开环质粒	0.08	1.72
超螺旋质粒	0.09	1.10
线性质粒	0.09	0.69

■ 结论

本文使用生物惰性液相色谱仪分析质粒样品，发现温度对 3 种不同构型质粒的分离影响明显。通过调整温度，可以实现 3 种构型的分离度均大于 1.5。质粒样品重复性分析 6 次，保留时间和峰面积重复性结果均佳。此方法适用于质粒样品的三种构型分析。

岛津应用云

