

CGE-LIF方法中使用中性涂层毛细管对质粒进行快速纯度分析

Rapid purity analysis of plasmid using neutral coated capillary in CGE-LIF method

刘冬科, 高铁, 陈泓序, 郭立海

Liu Dongke, Gao Tie, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX, 中国

SCIEX, China

关键词: 毛细管凝胶电泳; 激光诱导荧光检测器; 中性涂层毛细管; 质粒; 超螺旋; 线性; 开环

1. 前言

作为基因/细胞治疗中的重要载体, 质粒的拓扑结构和纯度分析至关重要, 毛细管凝胶电泳匹配激光诱导荧光检测器 (CGE-LIF) 在核酸分离及纯度分析中表现出了极大的应用优势。本文介绍了在CGE-LIF方法中使用中性涂层毛细管对质粒的拓扑结构进行分离和纯度分析, 1) 方法平台化, 3.7-11kbp不同长度的质粒均可实现良好的分离分析。2) 方法快速, 8分钟内可实现不同长度质粒拓扑结构 (超螺旋, 二聚体, 线性, 开环) 的基线分离。3) 方法重复性好, 各质粒样品6针重复性中, 超螺旋结构的迁移时间, 校正峰面积百分比, 与二聚体的分离度RSD值均 < 1.5 %。毛细管运行共计100针时, 仍能表现出良好的分离重现性。4) 该方法使用与BioPhase 8800™系统兼容的毛细管, 如有高通量检测需求, 可转移至BioPhase 8800™系统进行高通量分析。该方法可作为质粒纯度分析、稳定性研究等质量控制的有力分析工具。

2. 仪器及方法

SCIEX PA 800 Plus药物分析系统, 匹配激光诱导荧光检测器 (LIF)。中性涂层毛细管 (SCIEX, PN 477441): 20/30.2 cm (有效/总长度), 50 μm 内径; LIF检测器激发波长: 488 nm, 发射波长: 520 nm。样品室温度: 10 °C; 毛细管温度: 25 °C, CGE-LIF分离方法时间程序见图1。

3. 试剂及样品

dsDNA 1000 Gel (SCIEX, PN 477628), SYBR Gold nucleic acid (Invitrogen™, PN S11494), Tris Borate EDTA (10 × TBE, PN Sigma T4323)。背景电解质配置: 将20 mL去离子水加入dsDNA 1000 Gel 固体凝胶中, 搅拌直到固体凝胶完全溶解, 使用1 × TBE 缓冲液对上述溶液进行10倍稀释, 得到分离凝胶缓冲液; 取10 mL凝胶缓冲液与1 μL SYBR Gold染料混合均匀, 即得。

质粒标准品, 中国食品药品检验研究院, 长度10 kbp。质粒样品由相关企业提供, 包括一组同一长度 (6 kbp) 的超螺旋,

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	50.0 psi	3.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 6	fill with dsDNA gel
2		Wait		0.00 min	SI:D1	BO:D1	In / Out vial inc 6	ddH2O dip
3		Inject - Pressure	0.5 psi	5.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, forward	sample inject
4		Wait		0.00 min	SI:E1	BO:E1	In / Out vial inc 6	ddH2O dip
5	0.00	Separate - Voltage	9.0 KV	8.00 min	BI:C1	BO:C1	0.17 Min ramp, reverse polarity, both, In / Out vial inc 6	separation
6	1.00	Autozero						
7	8.00	End						
8								

图1. CGE-LIF分离方法时间程序

线性，开环三种拓扑结构；不同长度的超螺旋结构，分别为 3.7 kbp, 5 kbp, 7 kbp, 11 kbp, 初始浓度不等，均使用去离子水稀释至 1 ng/μL 左右。

4. 结果

利用 CGE-LIF 方法对同一长度质粒的三种拓扑结构进行分析，在 SYBR™ Gold 染料条件下出峰顺序依次为超螺旋 (SC)，线性 (L)，开环 (OC)，见图 2A。

分别考察了 5 个不同长度的超螺旋质粒样品：3.7 kbp, 5 kbp, 7 kbp, 10 kbp, 11 kbp, 结果见图 2B, 根据文献报道^[1-3], 图 2B 中 11 kbp 样品 2 号峰为超螺旋二聚体。每个样品均能检出超螺旋及其二聚体，线性，开环等结构，且超螺旋与二聚体均能实现良好的分离。质粒长度越长，超螺旋、线性结构迁移时间越晚。利用 32 Karat 软件中校正峰面积百分比表示样品中各峰纯度。各质粒样品超螺旋结构的迁移时间、纯度和分离度数据见表 1。

利用 CGE-LIF 方法对 5 个不同长度的质粒样品分别运行连续 6 针重复性 (图 3A)，超螺旋结构与二聚体的分离度、迁移时间和校正峰面积百分比 RSD 值均 < 1.5%，见表 1。中性涂层毛细管运行 100 针时，仍表现出良好的分离重现性，见图 3B。

表 1. 不同长度质粒样品的 6 针重复性数据统计 (n=6)

MT: 迁移时间, min; CAP%: 校正峰面积百分比; R: 超螺旋与二聚体分离度

Plasmid (bp)		3.7 k	5 k	7 k	9 k	11 k
MT	Mean	4.74	4.81	4.89	4.97	5.06
	RSD	0.71%	0.93%	0.99%	0.73%	0.69%
CAP%	Mean	77.20	53.15	59.37	94.51	71.46
	RSD	1.04%	0.47%	0.67%	0.25%	0.46%
R	Mean	1.98	2.15	2.39	2.40	2.41
	RSD	1.00%	0.92%	1.28%	0.51%	0.77%

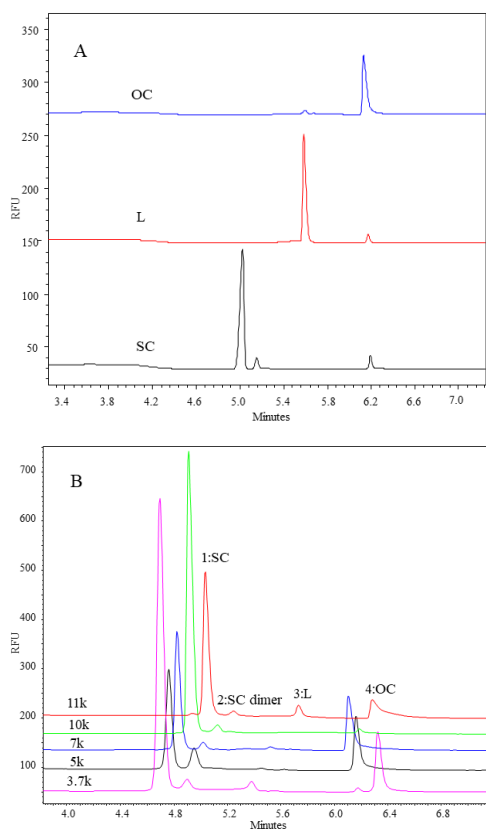


图 2. CGE-LIF 方法分析质粒样品电泳叠加图。A: 同一长度质粒样品的三种拓扑结构 (SC: 超螺旋, L: 线性, OC: 开环, 长度均为 6 kbp); B: 不同长度的质粒样品。

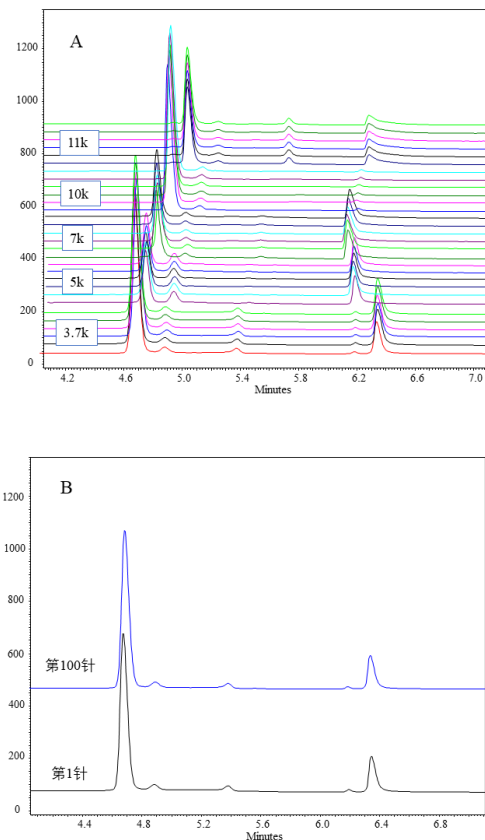


图 3. 不同质粒样品的重复性电泳叠加图 (A: 各质粒样品连续 6 针重复性; B: 3.7 kbp 质粒样品第 1 针和第 100 针重复性)

5. 结论

本文介绍了使用中性涂层毛细管对质粒进行拓扑结构分离和纯度分析的CGE-LIF方法，该方法平台化、快速、重复性好，如有高通量检测需求，也可转移至BioPhase 8800™系统进行高通量分析，可作为质粒纯度分析、稳定性研究等质量控制的有效分析方法。

6. 参考文献

- [1] Williams JA, Carnes AE, Hodgson CP. 2009. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Bio technol Adv* 27:353–370.
- [2] Summers D. Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Mol Microbiol* 1998;29:1137–45.
- [3] Summers DK, Beton CW, Withers HL. Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol Microbiol* 1993;8:1031–8.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15438-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)