

使用阴离子交换色谱法(AEX)对腺相关病毒(AAV)样品中的核酸组分进行粗略分析

Hua Yang, Stephan M. Koza, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

腺相关病毒(AAV)治疗药物中的污染性核酸杂质可能会影响药物的有效性和安全性，因此我们必须对其进行分析。应检查AAV基因组的完整性，确认是否存在缺口和截断。此外，应监测AAV样品中是否存在泄露的基因组和宿主细胞核酸杂质。本应用纪要介绍了一种分析AAV样品中核酸组分的独特方法，并使用蛋白酶K酶解AAV衣壳蛋白，以帮助阐明在非掺杂的天然样品中观察到的物质来源。天然样品与蛋白酶K酶解样品之间的峰重叠，证实这些物质本质上是潜在的游离基因组物质。上述初步结果表明，Protein-Pak™ Hi-Res Q色谱柱有望建立AEX分析方法，用于检测AAV样品中的未包封的核酸组分，甚至有望用于基因组完整性检查。

优势

- Waters™ Protein-Pak Hi Res Q色谱柱可用于检测AAV物质和核酸杂质
- AAV样品经过蛋白酶K酶解后可释放出ssDNA基因组材料，用于鉴定天然样品的峰并进一步表征AAV基因组完整性

简介

重组AAV已成为基因治疗中最依赖的病毒载体之一。在基因组包装过程中，受到污染的基因组可能会错误地包装到AAV衣壳中¹。因此，我们有必要分析AAV基因组完整性以确保AAV产品的安全性和有效性。

基因组大小的传统测定方法有琼脂糖凝胶电泳和DNA印迹法¹。这些方法虽然经济有效，但准确度和精密度有限。

阴离子交换色谱法(AEX)根据分子表面负电荷的差异分离分子。这种分析技术可以提供稳定、可重现的定量结果。该方法仅需少量样品，且易于实现自动化。此外，还可以分离馏分以供进一步分析。AEX已在与基因治疗相关的多个领域得到应用，包括AAV空衣壳和完整衣壳分离、质粒亚型分离、dsDNA片段分离以及单向导RNA的大小和纯度估计²⁻⁵。由于包封在AAV衣壳蛋白内的单链DNA(ssDNA)表现出强负净电荷，我们考察了AEX在分离衣壳、游离基因组物质甚至其他类型核酸组分方面的固有能力和

本应用纪要介绍了一种分析AAV样品基因组物质和核酸组分的独特AEX方法。我们同时分析了天然样品和蛋白酶K酶解样品，发现两者中都存在重叠的强保留峰。这一观察结果表明，在天然样品中观察到的物质可能确实是未包封或泄露的基因组物质。上述初步结果表明，Protein-Pak Hi-Res Q色谱柱有望建立AEX分析方法，用于检测AAV样品中的未包封核酸组分，以及用于研究基因组完整性。

实验

样品描述

AAV9-CamkIIa-GFP购自Vigene Biosciences，滴度为 1.61×10^{14} GC/mL。蛋白酶K购自New England Biolabs (P8107S)。

样品前处理

用1 μ L蛋白酶K在56 °C下将4 μ L AAV9衣壳酶解2 h。将反应混合物上样到Protein-Pak Hi Res Q色谱柱进行分离。此方案只能视为未来研究的起点。应考虑进一步优化以确认酶解的稳定性。

液相色谱条件

液相色谱系统：

ACQUITY UPLC H-Class Bio

检测：

ACQUITY UPLC TUV检测器，配备5 mm钛合金流

通池

波长:	260 nm和280 nm
样品瓶:	聚丙烯12 × 32 mm螺口瓶，带瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫，容积300 μL，100个/包(P/N: 186002639)
柱温:	30 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	3 μL，用于初始分析； 40 μL，用于馏分收集
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	100 mM Tris-HCl
流动相B:	100 mM Tris碱
流动相C:	3 M四甲基氯化铵(TMAC)
流动相D:	水
提供的缓冲液浓度:	20 mM

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	pH	盐 (mM)	盐曲线
0.0	0.4	7.4	0	
4.0	0.4	7.4	0	6
14.0	0.4	7.4	2300	6
16.0	0.4	7.4	2400	6
16.1	0.4	7.4	0	11
30.0	0	7.4	0	11

(梯度表) *AutoBlend Plus*™方法，采用亨德森-哈塞尔巴尔赫方程计算得出。

在上面的梯度表中，缓冲液为20 mM Tris (pH 7.4)。将初始盐浓度设置为0 mM，确保所有分析物均牢固地结合在色谱柱上。平衡4 min后，对于游离基因组分析，盐浓度在10 min内线性增加至2300 mM。

通用四元液相色谱系统的等效梯度表如下所示：

时间 (min)	%A	%B	%C	%D
0.0	17.8	2.2	0.0	80.0
4.0	17.8	2.2	0.0	80.0
14.0	17.8	2.2	76.7	3.3
16.0	17.8	2.2	80.0	0.0
16.1	17.8	2.2	0.0	80.0
30.0	17.8	2.2	0.0	80.0

数据管理

色谱软件：

Empower™ 3 (FR 4)

结果与讨论

本研究使用蛋白酶K酶解衣壳蛋白，释放出AAV9衣壳内的ssDNA基因组。这种方法来自基因组滴度测定中的程序^{6,7}。阴离子交换分离结果表明（图1），蛋白酶K酶解后，完整衣壳洗脱区域的峰面积显著减小，而两个主要峰出现在较晚的保留时间。UV检测采用两种波长：260 nm和280 nm。 A_{260}/A_{280} 的比率用于鉴定峰的性质。例如，在蛋白酶K酶解之前， A_{260}/A_{280} 的比率约为1.3。这是衣壳蛋白和ssDNA共同吸收的结果。由于ssDNA在260 nm处具有更高的吸光度，而衣壳蛋白在280 nm处的吸收更强，因此 A_{260}/A_{280} 结果的总体比率最终处于1.2–1.3范围内。蛋白酶K酶解后，衣壳区域的 A_{260}/A_{280} 比率（保留时间6~8 min）降至0.9。这表明280 nm处的吸光度略高于260 nm处的吸光度，表明衣壳蛋白或肽开始在峰中占主导地位，并且过去位于衣壳内部的基因组物质现在被保留并洗脱到其他位置。另一方面，对于在后洗脱区域（保留时间约13-15 min）观察到的峰， A_{260}/A_{280} 比约为1.8，表明就核酸组成而言，内部物资的纯度相对较高。

其他实验（包括对AEX馏分进行电荷检测MS (CDMS)分析）进一步证实，保留时间13~15 min处的峰可能是从AAV衣壳释放的ssDNA，包括在上样过程中可能已经部分退火的ssDNA（数据未显示）。此外，随着蛋白酶K酶解时间变长，衣壳蛋白洗脱窗口的峰面积继续减小，而游离DNA区域继续增加。酶解AAV空衣壳后，DNA区域的峰面积未增加。最后，荧光检测在DNA区域几乎没有信号，与DNA不表现出内在荧光这一事实一致。

结论

阴离子交换色谱法可以提供稳定、可重现的定量结果，并且只需少量样品。鉴于AEX已经证实可用于完整AAV的空/完整分析，我们认为也有必要测试该方法是否可用于分析AAV基因组材料并确定每种组分洗脱的保留窗口。我们已经证明，蛋白酶K酶解可以释放AAV衣壳内包封的ssDNA，并且使用Waters Protein-Pak Hi Res Q色谱柱可以将基因组物质与衣壳和衣壳蛋白完全分离。该色谱柱还可以用于观察天然AAV样品中存在的游离、未包封的核酸组分。虽然这只是一项初步研究，但我们发现，Protein-Pak Hi-Res Q色谱柱有望用于建立AEX分析方法，在蛋白酶K消化后检测AAV中的核酸组分和基因组完整性。

参考资料

1. Hajba L and Guttman A. Recent Advances in the Analysis of Full/Empty Capsid Ratio and Genome

Integrity of Adeno-associated Virus (AAV) Gene Delivery Vectors.*Current Molecular Medicine* 2020; 20: 1–8.

2. Yang H, Koza S and Chen W. 阴离子交换色谱法测定腺相关病毒中空衣壳和完整衣壳的含量. 沃特世应用纪要. 2021; [720006825ZH](#).
3. Yang H, Koza S和Chen W. 利用阴离子交换色谱法(AEX)分离并定量质粒亚型. 沃特世应用纪要. 2021; [720007207ZH](#).
4. Yang H, Koza S和Chen W. 利用阴离子交换色谱法(AEX)分离双链DNA (dsDNA)片段并进行大小评估.沃特世应用纪要.2021; [720007321ZH](#).
5. Yang H, Koza S和Yu Y Q。 利用阴离子交换色谱法(AEX)评估单向导RNA的大小和纯度. 沃特世应用纪要 .2021; [720007428ZH](#).
6. Werling N J, Satkunanathan S, Thorpe R, and Zhao Y. Systematic Comparison and Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for the Quantitation of Adeno-Associated Viral Products.*HUMAN GENE THERAPY METHODS* 2015; 26:82–92.
7. Ai J, Ibraheim R, Tai P W L, and Gao G. A Scalable and Accurate Method for Quantifying Vector Genomes of Recombinant Adeno-Associated Viruses in Crude Lysate.*HUMAN GENE THERAPY METHODS* 2017; 28 (3): 139–147.

特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <https://www.waters.com/10166246>](https://www.waters.com/10166246)

[ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

[Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720007907ZH, 2023年6月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)