

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nikolaja JANEŽ

**PRIMERJAVA PROCESOV ZA ČIŠČENJE PLAZMIDNE DNK V
TERAPEVTSKE NAMENE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF PLASMID DNA PURIFICATION PROCESSES
FOR GENE THERAPY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v podjetju BIA Separations d.o.o. Teslova 30, 1000 Ljubljana.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina. Za somentorja je bil imenovan dr. Matjaž Peterka in za recenzenta doc. dr. Blaž Cigić.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Somentor: dr. Matjaž Peterka

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Članica:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nikolaja Janež

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 602.44: 543.544 (043) = 163
KG	zaključni procesi/bioseparacije/ čiščenje plazmidne DNK /kalcijev klorid/anionsko izmenjevalna kromatografija/ /hidrofobna kromatografija/IMAC
AV	JANEŽ, Nikolaja
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica) / PETERKA, Matjaž (somentor)/CIGIČ, Blaž (recenzent)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2009
IN	PRIMERJAVA PROCESOV ZA ČIŠČENJE PLAZMIDNE DNK V TERAPEVTSKE NAMENE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 58 str., 6 pregl., 10 sl., 57 vir.
IJ	si
JJ	si / en
AI	Zahteve po učinkovitih procesih za proizvodnjo plazmidne DNK (pDNK) so se v zadnjih letih povečale zaradi naglega razvoja genskega zdravljenja, ki temelji na pDNK. Da bi bila terapija zares uspešna, je potrebno razviti ekonomičen in širše uporaben proces čiščenja plazmidov. Kromatografske tehnike so za zagotavljanje kakovosti končnega produkta ključnega pomena. V diplomskem delu smo primerjali štiri različne anionske izmenjevalce: membrano M 75Q, Fractogel EMD DEAE (M), Fractogel EMD DMAE in CIM DEAE glede na dinamične vezavne kapacitete za pDNK v prisotnosti amonijevega sulfata in NaCl pri različnih koncentracijah. Kapaciteta kolone Fractogel EMD DEAE (M) se je ob dodatku soli povečala, pri 1,8 M amonijevem sulfatu je bila največja 3,8 mg/ml. Najvišjo kapaciteto med vsemi je imel nosilec CIM DEAE 8,7 mg/ml v mediju brez soli. Dinamično vezavno kapaciteto smo določili tudi delčnemu (Toyopearl butil 650M) in monolitnemu (CIM C4 HDL) hidrofobnemu nosilcu. Učinkovito ločitev pDNK in RNK na kromatografskih nosilcih dosežemo le, če RNK predhodno odstranimo. Tako smo preučili vpliv koncentracije CaCl ₂ na količino oborjene RNK. Z 1 M CaCl ₂ smo oborili večji delež RNK kot z 0,5 M. Optimizirano pripravo lizata smo vključili v proces čiščenja z anionskim izmenjevalcem (Fractogel EMD DEAE (M), CIM DEAE) v prvem in hidrofobnim nosilcem (Toyopearl butil 650M, CIM C4 HDL) v drugem koraku, v katerem smo izboljšali čistost in odstotek superzvite DNK. Oba procesa sta pripeljala do produkta visoke kakovosti. V tretjem procesu smo lizat tretirali z amonijevim sulfatom in ga očistili na delčnem hidrofobnem nosilcu Toyopearl butil 650M, na katerem smo ločili RNK, proteine in odprto krožno obliko plazmida od superzvite. Sledilo je čiščenje na nosilcu Fractogel EMD DEAE (M). Produktivnost, ki je ključnega pomena pri proizvodnji na industrijski ravni, smo izračunali za vse tri procese. Največjo med njimi ima dvostopenjski proces z nosilcem CIM DEAE v prvem in CIM C4 HDL v drugem koraku.

KEY WORDS INFORMATION

DN Dn
DC UDC 602.44: 543.544 (043) = 163
CX downstream processing/bioseparations/purification of pDNA/calcium chloride/anion exchange chromatography/hydrophobic interaction chromatography/IMAC
AU JANEŽ, Nikolaja
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor) / PETERKA, Matjaž (coadvisor)/ CIGIĆ, Blaž (reviewer)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2009
TI COMPARISON OF PLASMID DNA PURIFICATION PROCESSES FOR GENE THERAPY
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 58 p., 6 tab., 10 fig., 57 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The demand for efficient production methods of plasmid DNA (pDNA) has increased vastly in response to rapid advances in the use of plasmids for therapeutic purposes. A prerequisite for success of plasmid based therapies is the development of cost effective and generic production processes of pDNA. Most of the current processes include at least one chromatographic step, which constitutes as the key step in the purification sequence. In this study four different anion exchange media were compared (membrane M 75Q, Fractogel EMD DEAE (M), Fractogel EMD DMAE and CIM DEAE) regarding their dynamic binding capacity in presence of ammonium sulphate or NaCl at different concentrations. Dynamic binding capacity of Fractogel EMD DEAE (M) was increased by addition of salt, reaching maximum at 3,6 mg/ml at 1,8 M ammonium sulphate in solution. Monolithic media CIM DEAE showed the highest dynamic binding capacity 8,7 mg/ml in absence of salt. Additionally, conventional hydrophobic support Toyopearl butyl 650M and monolith CIM C4 HDL were tested for their ability to bind pDNA. Further, removal of RNA from cell lysate by adding CaCl₂ at different concentrations was investigated. Increase in added CaCl₂ from 0,5 M to 1,0 M gave also better removal of RNA. Optimized conditions for CaCl₂ precipitation were then introduced to the plasmid purification process consisting from anion exchange support (CIM DEAE, Fractogel EMD DEAE (M)) as capture step followed by hydrophobic adsorbent (CIM C4 HDL, Toyopearl butyl 650M) to increase purity and obtain higher percentage of supercoiled plasmid DNA. Both processes yielded in high-quality product and free of all key contaminants. In third process cell lysate was conditioned with ammonium sulphate and purified by hydrophobic media Toyopearl butyl 650M followed by anion exchange on Fractogel EMD DEAE (M). Hydrophobic interaction step results in the removal of RNA, proteins and open circular DNA from supercoiled form. Productivity, as key issue in large scale processes, was calculated for all three procedures. Process with CIM DEAE for capture step followed by CIM C4 HDL gave the highest productivity.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS INFORMATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 CILJ RAZISKOVANJA.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KARAKTERIZACIJA PLAZMIDNE DNK	3
2.2 BIOSINTEZA IN PRIMARNA IZOLACIJA PLAZMIDNE DNK.....	4
2.3 ČIŠČENJE PLAZMIDNE DNK S KROMATOGRFSKIMI TEHNIKAMI.....	5
2.3.1 Tipi kromatografije v procesu čiščenja plazmidne DNK.....	6
2.3.1.1 Ionsko izmenjevalna kromatografija	6
2.3.1.2 Kromatografija s hidrofobnimi interakcijami.....	7
2.3.1.3 Kovinsko – kelatna afinitetna kromatografija	8
2.3.2 Omejitve pri čiščenju plazmidne DNK in rešitve	9
2.3.2.1 Stacionarne faze, ki so primerne za čiščenje biomolekul.....	10
2.3.2.2 Odstranjevanje nečistoč pred čiščenjem s kromatografskimi nosilci.....	11
2.3.2.3 Zmanjševanje vpliva povišane viskoznosti	12
2.3.2.4 Čiščenje plazmidne DNK na metakrilatnih monolitnih nosilcih (CIM [®])	12
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 SHEMA DELA	14

3.2 MATERIALI	15
3.2.1 Kemikalije	15
3.2.2 Bakterijski sev	16
3.2.3 Plazmidna DNK	16
3.2.4 Gojišče	16
3.2.5 Kolone	16
3.3 METODE	18
3.3.1 Priprava bakterijske biomase	18
3.3.2 Priprava bakterijskih celičnih lizatov z in brez obarjanja RNK po nevtralizaciji.....	18
3.3.3 Osamitev bakterijske genomske DNK.....	19
3.3.4 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	20
3.3.4.1 Sistem HPLC	20
3.3.4.2 Ionsko izmenjevalna kromatografija na delčnem nosilcu Fractogel EMD DEAE (M)	20
3.3.4.3 Ionsko izmenjevalna kromatografija na monolitnem nosilcu CIM DEAE	20
3.3.4.4 Kromatografija s hidrofobnimi interakcijami na delčnem nosilcu Toyopearl butil 650M.....	20
3.3.4.5 Kromatografija s hidrofobnimi interakcijami na monolitnem nosilcu CIM C4.....	21
3.3.4.6 Analiza vhodnega in izhodnega materiala na CIM DEAE disku	21
3.3.4.7 Določevanje dinamičnih vezavnih kapacitet	22
3.3.4.8 Primerjava zadrževalnih časov plazmidne DNK na anionskih nosilcih.....	22
3.3.4.9 Kovinsko kelatna afinitetna kromatografija	23
3.3.4.9.1 Določevanje odvisnosti vezave genomske DNK na CIM IDA –Cu ²⁺ v odvisnosti od pretoka	23
3.3.4.9.2 Čiščenje pDNK frakcije s CIM DEAE diska IMAC IDA-CU ²⁺	23
3.3.4.10 Analitska kromatografija	23

3.3.5 Tangencialna filtracija	24
3.3.6 Agarozna elektroforeza.....	24
3.3.7 Merjenje koncentracije DNK in proteinov	24
3.3.7.1 UV spektrometrija	24
3.3.7.2 Bradford ultra metoda.....	25
4 REZULTATI.....	26
4.1 PREVERJANJE LASTNOSTI KROMATOGRFSKIH NOSILCEV	26
4.2 OBARJANJE RNK V CELIČNIH LIZATIH S KALCIJEVIM KLORIDOM	29
4.3 PRIMERJAVA PROCESOV ZA ČIŠČENJE PLAZMIDNE DNK.....	32
4.4 ČIŠČENJE PLAZMIDNE DNK NA CIM IDA-CU ²⁺	37
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	39
5.1 RAZPRAVA.....	39
5.1.1 Preverjanje lastnosti kromatografskih nosilcev	39
5.1.2 Obarjanje RNK v celičnih lizatih s CaCl₂.....	42
5.1.3 Primerjava procesov za čiščenje plazmidne DNK.....	43
5.1.3.1 Vrednotenje procesov čiščenja	45
5.1.3.2 Čiščenje plazmidne DNK na CIM IMAC IDA-Cu ²	46
5.2 SKLEPI.....	48
6 POVZETEK.....	49
7 VIRI	51

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Osnovna priporočila in/ali zahteve za vrednotenje kakovosti plazmidne DNK, ki zajemajo čistost, varnost in primernost za uporabo kot DNK cepiva ali za gensko terapijo (Ferreira in sod., 2000; FDA, 2007).	6
Preglednica 2. Fizikalne lastnosti kromatografskih nosilcev, ki smo jih testirali.	26
Preglednica 3. Dinamične vezavne kapacitete anionskih nosilcev v odvisnosti od ionske moči raztopine plazmidne DNK in pretoka (delčna nosilca).	28
Preglednica 4. Dinamične vezavne kapacitete hidrofobnih nosilcev.	28
Preglednica 5. Vrednotenje končnega produkta in procesa čiščenja plazmidne DNK.	36
Preglednica 6. Vezava plazmidne DNK in genomske DNK na kolono CIM IMAC IDA-Cu ²⁺	37

KAZALO SLIK

Slika 1. Vloga tekočinske kromatografije pri proizvodnji plazmidne DNK za gensko terapijo na industrijskem nivoju (Ferreira in sod., 2000).	5
Slika 2. Shema poteka dela.	14
Slika 3. Primerjava zadrževalnih časov pDNK na izbranih nosilcih.....	27
Slika 4. Selektivno obarjanje RNK v celičnem lizatu po nevtralizaciji s CaCl ₂	31
Slika 5. Selektivno obarjanje RNK v celičnih lizatih ter separacija pDNK in RNK na CIM DEAE disku.....	31
Slika 6. Vpliv prevodnosti vzorca na separacijo RNK in pDNK na CIM DEAE disku.	33
Slika 7. Čiščenje plazmidne DNK na CIM DEAE in Fractogel EMD DEAE (M).....	34
Slika 8. Čiščenje pDNK frakcije s CIM DEAE na CIM C4 koloni.	35
Slika 9. Čiščenje pDNK frakcije s Fractogel EMD DEAE (M) na Toyopearl butil 650 M.38	
Slika 10. Čiščenje pDNK (bHNcbrT (4kbp)) eluata s CIM DEAE diska na koloni CIM IMAC IDA-Cu ²⁺	38

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

NaDS	natrijev dodecil sulfat
NaOH	natrijev hidroksid
AEC	anionsko izmenjevalna kromatografija
NTA	angl. anion exchange chromatography nitrilotriocetna kislina
AIEX	angl. nitrilotriacetic acid anionski izmenjevalec
oc pDNK	angl. open circle pDNK s prekinjeno krožno verigo
BCA test	test z bikinkonsko kislino
pDNK	angl. pichoninic acid assay plazmidna deoksiribonukleinska kislina
cccDNA	kapaciteta pri 10% preboja angl. covalently closed circular deoxyribonucleic acid
q50%	kapaciteta pri 50% preboja
CMA	stacionarne faze, ki omogočajo masni prenos s konvekcijo angl. convective interaction media
DEAE	diethylaminoetilna kislina
DMAE	(SBD priporoča uporabo angleške ustreznice RNA) dimetilaminoetil
sc pDNK	superzvita pDNK
DNK	deoksiribonukleinska kislina (SBD priporoča uporabo angleške ustreznice DNA)
TFE	tangencialna filtracija
EMA	Evropska agencija za zdravila angl. tangential flow filtration angl. European Medicines Agency
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija
EU	endotoksinske enote angl. World Health Organisation
FDA	Urad za zdravila in prehrano angl. Food and Drug Administration
gDNK	genomska deoksiribonukleinska kislina
HIC	hidrofobna kromatografija angl. hydrophobic chromatography
IDA	iminodiocetna kislina angl. iminodiacetic acid
IMAC	kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija angl. immobilized-metal affinity chromatography
IMAC IDA-Cu ²⁺	Kovinsko-kelatni afinitetni kromatografski nosilec z kelatorjem iminodiocetno kislino in bakrovim kovinskim ionom
LAL test	Test na bakterijske endotoksine angl. Limulus amoebocyte lysate

1 UVOD

Nagli premiki v razvoju biotehnoloških znanosti se dogajajo ravno v času, ko se zdravstvo sooča s finančnimi in ekonomskimi problemi, ki sodijo med najpomembnejše dejavnike pri uporabi in uspešnosti novih medicinskih tehnologij (Kollasa, 2002). Genska terapija in DNK cepiva predstavljajo eno izmed njih. Za te namene so potrebne čedalje večje količine plazmidne DNK, govori se o kilogramih ali celo tonah le-te (Prather in sod., 2003).

Ključno za uspeh terapij, ki temeljijo na plazmidih, je razvoj ekonomičnega in splošno uporabnega proizvodnega procesa (Stadler in sod., 2004). Končni produkt pa mora ustrezati strogim predpisom o čistosti, homogenosti in biološki aktivnosti. Takšen produkt zahteva večstopenjski proizvodni proces, ki vključuje tehnike z visoko ločljivostjo. To je razlog za zelo razširjeno uporabo kromatografije, kljub temu, da imajo konvencionalni nosilci celo vrsto pomanjkljivosti, kot so nizke kapacitete in počasen masni prenos, ki temelji na difuziji (Diogo in sod., 2005). Nove tehnologije, kot so membrane, monoliti in druge stacionarne faze s superporami, omogočajo delo pri višjih pretokih in imajo visoke dinamične vezavne kapacitete, kar pripelje do bistveno višjih produktivnosti (Urthaler in sod., 2005c; Štrancar in sod., 2002). Slednje je rezultat optimizacije kompleksnih procesnih parametrov in ima pri proizvodnji na industrijskem nivoju odločilno vlogo (Stadler in sod., 2004).

1.1 CILJ RAZISKOVANJA

Primerjati izbrane anionske izmenjevalce in hidrofobne nosilce glede na lastnosti, ki so pomembne pri proizvodnji plazmidne DNK na industrijskem nivoju (dinamična vezavna kapaciteta, separacija plazmidne DNK in RNK, kakovost končnega produkta).

Proučiti vpliv koncentracije CaCl_2 na delež oborjene RNK v celičnem lizatu in določiti pogoje, pri katerih je možno ločiti RNK in plazmidno DNK brez poslabšanja dinamične vezavne kapacitete in produktivnosti.

Ovrednotiti posamezne procese čiščenja z izračunom produktivnosti.

Preveriti, ali je monolitna metakrilatna IMAC IDA- Cu^{2+} primerna za uporabo v procesu čiščenja plazmidne DNK.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Morfologija superzvite plazmidne DNK je odvisna od pogojev v okolju. Posledica tega so lahko razlike v dinamičnih vezavnih kapacitetah (Tarmann in Jungbauer, 2008). Mediji z različnimi ionskimi jakostmi, doseženimi z dvema različnima solema, imajo vpliv na povečanje / zmanjšanje dinamične vezavne kapacitete izbranih nosilcev.

Delež oborjene RNK je odvisen od koncentracije CaCl_2 v končnem volumnu in od inkubacijskega časa. V testiranem koncentracijskem območju ne bo prihajalo do koprecipitacije plazmidne DNK; pri višjih koncentracijah se obori tudi genomska DNK.

Večina kromatografskih tehnik lahko le delno loči plazmidno DNK in RNK. To je posebej značilno za anionske izmenjevalce, hidrofobne nosilce in kromatografijo z reverzno fazo. (Eon – Duval in sod., 2003a). Popolno separacijo RNK in plazmidne DNK na anionskem izmenjevalcu bomo dosegli s predhodnim obarjanjem RNK v celičnem lizatu in uravnavanjem ionske jakosti vzorca. Slednja ima močan vpliv na dinamično vezavno kapaciteto in posledično na produktivnost.

Na monolitno metakrilatno IMAC IDA- Cu^{2+} kolono se vežeta genomska DNK in RNK, plazmid pa ne.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KARAKTERIZACIJA PLAZMIDNE DNK

Plazmid je dvovijačna DNK molekula, sklenjena v krog s kovalentno vezjo (ang. cccDNK). Vsaka od verig je linearen polimer, sestavljen iz deoksiribonukleotidov, povezanih s fosfodiesterjsko vezjo. Fosfatne skupine so negativno nabite v širokem pH območju. Notranjost molekule je močno hidrofobna zaradi tesnih stikov med aromatskimi bazami (Bates in Maxwell, 2005).

Antiparalelni DNK verigi z ovijanjem med seboj in okoli skupne osi ustvarita desnosučno usmerjeno vijačnico. Ta se naprej zasučje v nasprotni smeri ter tako tvori še bolj urejeno strukturo, imenovano superzvita (sc) pDNK. To je njena fiziološko aktivna oblika in kot taka je najbolj učinkovita pri transfekciji evkariontskih celic (Xie in sod., 1992). Celični lizati vsebujejo tudi druge izoformne vrste plazmida: prekinjeno krožno (oc) (ena izmed verig se odpre), linearno (prekinitev vezi na obeh verigah), denaturirano, oligomerno pDNK (Diogo in sod., 2005). Te so posledica priprave lizata z alkalno lizo, encimatskega ali kemičnega razkroja molekule, skrajnih pH in temperaturnih okoliščin ter strižnih sil (Sousa in sod., 2008).

Plazmidi za terapevtsko uporabo vsebujejo gene humanega in nehumanega izvora in so v primerjavi s proteini precej velike molekule (Diogo in sod., 2005). Sestavljeni so iz 3 – 20 kbp (Urthaler in sod., 2005c; Prazeres in sod., 1999), njihova molekulska masa pa je v območju 10^6 Da (Meyers in sod., 1976). Hidrodinamski radij je približno 10 – 50 krat večji kot pri povprečnem proteinu (Jungbauer, 2008). V nasprotju z velikostjo je difuzivnost plazmida približno 1/10 tiste pri proteinih (Jungbauer, 2008).

2.2 BIOSINTEZA IN PRIMARNA IZOLACIJA PLAZMIDNE DNK

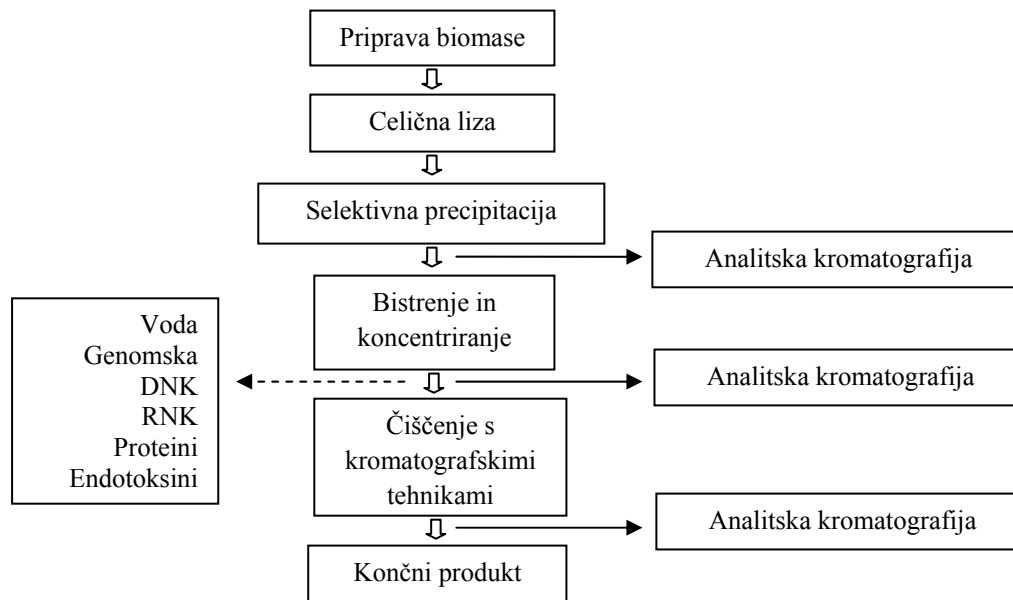
V veliki večini primerov za pripravo plazmidne DNK uporabljajo dokazano varnega gostitelja bakterijo *Escherichia coli* (Diogo in sod., 2005).

Za razkroj celic gostitelja je na voljo več tehnik; med njimi se je najbolj uveljavila alkalna liza (Birnboim in Doly, 1979). Gre za obdelavo celične mase pri visoki pH vrednosti (NaOH) v prisotnosti detergenta (NaDS), pri kateri pride do denaturacije genomske DNK, sestavin celične membrane in celičnih proteinov. Pri tem pride tudi do nezaželenih poškodb superzvite DNK zaradi prekinitev vodikovih vezi v alkalnem okolju. Pri pH vrednosti pod 12,5 bazni pari komplementarnih verig ostanejo povezani in kasneje služijo kot jedro renaturacije pri nevtralizaciji (Vasquez in sod., 2005). Alkalno raztopino v naslednjem koraku nevtraliziramo s kalijevim acetatom in pri tem oborimo SDS, genomsko DNK in celični debris. Zbistren celični lizat vsebuje proteine, RNK, lipopolisaharide, fragmente genomske DNK in manj kot 1% (w/w) pDNK (Diogo in sod., 2005).

Za nadaljnje čiščenje in pridobivanje plazmidne DNK iz celičnega lizata je na voljo več učinkovitih tehnik, vendar so omejene na izolacijo količin v μg ali mg. Kakovost takega plazmida je daleč pod biofarmaceutskimi zahtevami (Urthaler in sod., 2005c). Ti protokoli vključujejo celično lizo z lizocimom, razgradnjo RNK z RNAzo (encim ribonukleaza), ekstrakcijo in obarjanje z organskimi topili (etanol, izopropanol) ter ultracentrifugiranje v gostotnih gradientih. Pri teh postopkih uporabljamo toksične kemikalije, npr. celzijev klorid, etidijev bromid, fenol, kloroform in encime živalskega izvora (ribonukleazo A, lizocim, proteinazo K). Smernice, ki jih postavljajo regulatorne institucije (FDA, EMEA), odsvetujejo ali celo prepovedujejo uporabo zgoraj naštetih reagentov v dobri proizvodni praksi. Poleg tega teh protokolov ni mogoče prenesti na industrijski nivo za pripravo gramskih količin pDNK (Eon – Duval in Burke, 2004; Urthaler in sod., 2005c).

Industrijski proizvodni proces plazmidne DNK je sestavljen iz priprave biomase, celične lize, bistrenja, čiščenja, finega čiščenja, končne formulacije in polnjenja produkta. Ključnega pomena pri pridobivanju produkta zelene kakovosti je tekočinska kromatografija, ker omogoča učinkovito separacijo občutljivih molekularnih vrst iz

kompleksnih mešanic pri kemijsko in fizikalno blagih pogojih (Diogo in sod., 2005; Urthaler in sod., 2005a; Prazeres in sod., 1999).



Slika 1. Vloga tekočinske kromatografije pri proizvodnji plazmidne DNK za gensko terapijo na industrijskem nivoju (Ferreira in sod., 2000).

2.3 ČIŠČENJE PLAZMIDNE DNK S KROMATOGRAFSKIMI TEHNIKAMI

Pri razvoju metod izolacije pDNK izhajamo iz lastnosti začetnega materiala, to je običajno lizat *E. coli*, v katerem je visoka vsebnost nečistoč, ki jih je potrebno odstraniti (Sousa in sod., 2008). Čistost končnega produkta je predpisana s strani regulatornih organov npr. FDA, EMEA, WHO (Prazeres in sod. 1999; Diogo in sod., 2005). Ti kriteriji določajo maksimalne dovoljene količine nečistoč: endotoksinov, RNK, proteinov, gostiteljeve DNK, delež linearne in superzvite DNK ter vsebnost toksičnih kemikalij (Levy in sod., 2000). Primer specifikacij za plazmidno DNK, namenjeno za gensko terapijo: RNK ne sme biti vidna na 0,8% agaroznem gelu; genomske DNK je največ 0,01 µg/mg, proteinov 1 µg/mg; endotoksinov ne sme biti več kot 0,1 EU/mg; razmerje med plazmidno DNK in krožno DNK mora biti vsaj 95% (Levy in sod., 2000).

Preglednica 1. Osnovna priporočila in/ali zahteve za vrednotenje kakovosti plazmidne DNK, ki zajemajo čistost, varnost in primernost za uporabo kot DNK cepiva ali za gensko terapijo (Ferreira in sod. 2000; FDA, 2007).

tip nečistoče	priporočena metoda detekcije	priporočila oz. zahteve (Ferreira in sod., 2000)	priporočila oz. zahteve (FDA, 2007)
Proteini	test z bikinkonsko kislino (BCA)	pod mejo detekcije	<1%
RNK	gelska elektroforeza	pod mejo detekcije na 0,8 % agaroznem gelu	<1%
Genomska DNK	gelska elektroforeza Southern blot	pod mejo detekcije 0,01 mg/mg plazmida	<1%
endotoksini	LAL test	0,1 EU/mg plazmida	< 40EU/mg pDNK
izoformne oblike plazmida	gelska elektroforeza	pod 5 %	pod 20 %

EU – endotoksinske enote

2.3.1 Tipi kromatografije v procesu čiščenja plazmidne DNK

Poleg že uveljavljenih tehnik kot so anionski izmenjevalci (AIEC) (Eon – Duval in Burke, 2004; Štrancar in sod., 2002), hidrofobne interakcije (HIC) (Diogo in sod. 2000; Urthaler in sod., 2005c) in kromatografija z ločevanjem po velikosti so dokazano uporabne tudi druge: afinitetna kromatografija trojnega heliksa (Stadler in sod., 2004; Urthaler in sod., 2005c), tiofilna kromatografija (ligand je aromatični tioeter) (Sandberg in sod., 2003), kromatografija z reverzno fazo, polimerna in hidroksiapatitna kromatografija (Urthaler in sod., 2005b) ter kovinsko – kelatna afinitetna kromatografija (Murphy in sod., 2003).

2.3.1.1 Ionsko izmenjevalna kromatografija

Anionsko izmenjevalna kromatografija je še zmeraj največkrat izbrana tehnika za čiščenje pDNK zaradi izrazitega naboja DNK, zmožnosti hitre separacije, odsotnosti topil in sanitizacije z natrijevim hidroksidom ter široke palete industrijskih kolon (Eon – Duval in Burke, 2004). Separacija temelji na interakcijah med fosfatnimi skupinami na DNK in pozitivno nabitimi ligandi na stacionarni fazi. Moč interakcije med kationskim ligandom in negativno nabito skupino je premosorazmerna z gostoto naboja same molekule. Poročajo tudi o vplivu baznega zaporedja in sestave na retenzijski čas (Diogo in sod., 2005). Veliko

gostoto naboja imajo izoformne oblike plazmidne DNK, visokomolekularna RNK in genomska DNK. Nukleinske kisline se zadržijo na nosilcu, kadar je koncentracija soli v vzorcu sorazmerno nizka; eluiramo jih v gradientu, v katerem postopoma povečujemo koncentracijo soli. Anionske izmenjevalce lahko uporabljamo že v samem začetku čiščenja, ko je plazmidna DNK še v celičnem lizatu ali v nadaljnjih korakih procesa. Pri monitoringu procesov jo uporabljamo tako na preparativnem kot tudi na analitskem nivoju. Anionsko izmenjevalne kolone omogočajo dobro ločitev pDNK in najpomembnejših kontaminantov (RNK, genomske DNK, endotoksinov). V tem oziru sta odločilna predpriprava in izvorni podatki o vzorcu (gostitelj, število podvojitev, predhodna ultrafiltracija, uporaba RNAze, kompaktirajoča sredstva) (Stadler in sod., 2004). Kadar delamo z materiali, ki vsebujejo veliko RNK, le-ta tekmuje za vezavna mesta s pDNK. To velja tudi pri visoki ionski jakosti (nad 50 mS/cm), pri kateri se večina RNK ne veže na anionske kolone. Endotoksini se lahko koeluirajo s pDNK, vendar jih večina ostane na koloni (Stadler in sod., 2004). Zaradi tega sta sanitizacija in rekondicioniranje nujno potrebna pred novim nanosom.

2.3.1.2 Kromatografija s hidrofobnimi interakcijami (IMAC)

Čiščenje s hidrofobnimi kromatografskimi nosilci temelji na razlikah v hidrofobnosti dvoverižne plazmidne DNK, enoverižne RNK, denaturirane gDNK in endotoksinov (Diogo in sod., 2005).

Vezava molekul na hidrofobnih nosilcih poteka pri visokih koncentracijah soli, ki jih tvorijo ioni z močno izraženim liotropnim značajem (amonijev sulfat, kalijev fosfat). Za biopolimere, ki so obdani z vodnimi molekulami (hidratacijska lupina), je v takem okolju energijsko bolj ugodno, da ta hidratacijski sloj delijo s tistim, ki pripada nosilcu. Če so nanj vezani hidrofobni ligandi (fenil, heksil, butil), je ta vez še močnejša in bolj stabilna zaradi hidrofobnih vezi s skupinami s hidrofobnimi lastnostmi (Gagnon, 1996). Eluiramo jih v gradientu z zmanjševanjem ionske moči pufru. Razlike v velikosti, bazni sestavi in sekundarni strukturi molekule prispevajo k različno močnemu zadrževanju na nosilcu (Ferreira in sod., 2000). Plazmidi imajo za razliko od RNK in denaturirane genomske DNK hidrofobne baze skrite v notranjosti dvojne vijačnice. To omogoča šibkejšo vez z nosilcem kot pri drugih dveh in posledično učinkovito ločitev. Endotoksini, tretji v skupini ključnih

nečistoč, so del lipopolisaharidov. Ti so polianionske amfifilne molekule, ki lahko tvorijo multimolekularne agregate s kompleksno supramolekularno strukturo (Li in sod., 2005).

Na nosilec se vežejo z lipidnimi ostanki (lipid A) (Prazeres in sod., 2007).

Diogo in sod. (1999) so ugotovili, da se na hidrofobni nosilec vežejo precej močnejše kot plazmidna DNK, zato so jih v veliki meri odstranili.

Razlike v hidrofobnosti najdemo tudi med superzvito in denaturirano obliko plazmida. Diogu in sod. (2000) je uspelo ločiti nativno in denaturirano obliko plazmida, saj je slednja bolj hidrofobna zaradi predelov z enoverižno DNK.

Hidrofobne nosilce so uporabili tudi za čiščenje celičnih lizatov, kondicioniranih z amonijevim sulfatom, tako da se je plazmid vezal na nosilec (Urthaler in sod., 2005a; Diogo in sod., 2000) ali pa je ostal nezadržan (Li in sod., 2005).

Z vidika industrijske proizvodnje je uporaba hidrofobnih delčnih nosilcev problematična, ker le-ti nimajo visokih kapacitet za pDNK in je nujno uporabljati velike kolone, katerih polnjenje je zahtevno opravilo (Huber in sod., 2008). Prav tako je sporna tudi uporaba soli v visokih koncentracijah, kar je potratno in okolju neprijazno (Sousa in sod., 2008).

2.3.1.3 Kovinsko – kelatna afinitetna kromatografija

Kovinsko – kelatna afinitetna kromatografija je uveljavljena metoda za čiščenje rekombinantnih proteinov (Sousa in sod., 2008). Največkrat uporabljena kelatorja sta iminodiocetna kislina (IDA) in nitrilotriocetna kislina (NTA), nabiti z Cu^{2+} ali Ni^{2+} ioni. Slednji tvorijo vez z aminokislinami, izpostavljenimi na površini proteina.

Interakcije med kovinskimi ioni in nukleinskimi kisljinami so že dolgo predmet aktivnega raziskovanja, ki se ni nikoli razširilo na področje čiščenja le-teh (Murphy in sod., 2003). Min in Verdine (1996) sta uspešno očistila oligonukleotide s histidinskimi repki in mononukleotide na IMAC (immobilized-metal affinity chromatography) kolonah. Murphy in sod. (2007) pa so to aplikacijo razširili na separacijo plazmidne DNK. Kelatni ioni se selektivno vežejo z imidazolno skupino v purinih, ki so izpostavljeni (enoverižne molekule). Tako se na IMAC koloni zadrži RNK in poškodovana plazmidna DNK, superzvita oblika pa ne (Murphy in sod., 2003). Endotoksini kot zelo fleksibilne molekule

izkazujejo največjo afiniteto do interakcije s prehodnimi kovinami (Tan in sod., 2007). Separacija med genomsko DNK in plazmidom je mogoča le v primeru, ko je struktura genomske DNK destabilizirana; baze so bolj izpostavljene in se lahko vežejo na kovinske ione (Cano in sod., 2005). Variacije v pH, v strukturi liganda, v vrsti kovinskega iona ter v koncentraciji kompetitivnega liganda omogočajo optimizacijo vezave in selektivnosti glede na zahteve določenega procesa (Murphy in sod., 2003).

Tan in sod. (2007) so ugotovili, da se za čiščenje pDNK najbolje obnesejo Cu^{2+} ioni, vezani na iminodiocetno kislino. Uspelo jim je odstraniti RNK in endotoksine, ne pa tudi plazmidnih izoform, o čemer poročajo Murphy in sod. (2003).

Z vseh tipov IMAC kolon se kovinski ioni spirajo v večji ali manjši meri (Gaberc – Porekar in Menart, 2001). Ti imajo lahko negativen učinek na človeško telo, na primer nikljeve spojine, ki so karcinogene (Bal in sod., 2000). Učinkovita rešitev za to je zaporedna vezava kolone s kelatorjem (IDA, NTA), na katerem je prosto mesto za vezavo spranega iona. Druga možnost pa je zamenjava liganda s takim, ki ima višjo afiniteto za določen ion (Murphy in sod., 2003).

2.3.2 Omejitve pri čiščenju plazmidne DNK in rešitve

Pri uporabi kromatografskih metod za čiščenje in ločevanje plazmidne DNK se soočamo s težavami, ki imajo izvor v strukturi naravi konvencionalnih stacionarnih faz ter v podobnostih med plazmidno DNK in nečistočami (Levy in sod., 2000). Slednje se kaže v zmanjšani selektivnosti in koeluciji nečistoč skupaj s plazmidno DNK (Diogo in sod., 2005; Eon – Duval in Burke, 2004). Manjši masni prenos in dinamične kapacitete konvencionalnih delčnih nosilcev (Diogo in sod., 2005; Tarmann in Jungbauer, 2008) so posledica difuzivnosti, ki je v območju $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$, za razliko od proteinskih, ki so desetkrat večje (Diogo in sod., 2005; Sousa in sod., 2008). K obojemu prispeva tudi velikost plazmidne DNK, ki se pri proteinih dvigne iz nano območja na mikrometrске dimenzije (Urthaler in sod., 2005a), večje so tudi molekulske mase, zaradi katerih plazmidne DNA pri velikih koncentracijah skupaj z nečistočami tvorijo zelo viskozne raztopine.

Do sedaj ugotovljene rešitve za tovrstne prepreke obsegajo spreminjanje strukturnih lastnosti stacionarnih faz, kompaktiranje plazmidne DNK in odstranjevanje nečistoč pred čiščenjem s kromatografskimi tehnikami (Diogo in sod., 2005).

2.3.2.1 Stacionarne faze, ki so primerne za čiščenje biomolekul

V zadnjih nekaj letih je bilo vloženega veliko dela v razvoj procesov za čiščenje plazmidne DNK z delčnimi nosilci (Urthaler in sod., 2005c). Ti so bili narejeni za separacijo proteinov, ki imajo drugačne biofizikalne lastnosti kot pDNK. Pore teh stacionarnih faz so manjše od 0,2 μm . Za pDNK so taki delci navidezno neporozni, saj se plazmidi zadržijo na površini, ker so preveliki, da bi difundirali v pore (Tarmann in Jungbauer, 2008; Stadler in sod., 2004). Na podlagi teh dejstev so Gusstavson in sod. (2004) naredili delce z nenabito površino, na katere se plazmid ni vezal.

Alternativa poroznim delcem so monoliti in membrane (Urthaler in sod., 2005c), saj je za separacijo plazmidov potrebna ekstremna geometrija por (Jungbauer, 2005). Njihova prednost so izboljšane hidrodinamske lastnosti, saj pri njih prevladuje masni prenos s konvekcijo, za razliko od delčnih kolon, kjer prevladuje difuzija (Teeters in sod., 2003; Podgornik in sod., 2004). Padeč tlaka na koloni je manjši, kar omogoča delo pri višjih pretokih in tako zviša produktivnost (Urthaler in sod., 2005c; Podgornik in sod., 2004). Membrane so zelo tanki sloji ojačane in stabilizirane celuloze z makroporami. Poleg vseh naštetih prednosti in velike površine, namenjene izmenjavi, se pri delu z membranami soočamo z velikimi mrtvimi volumni, slabo porazdelitvijo vzorca in oteženim prenosom v večje merilo (Roper in Lightfoot, 1995). Ugotovljeni so bili tudi slabi izkoristki pri čiščenju pDNK na membranah z močnimi anionskimi izmenjevalci (Teeters in sod., 2003; Syren in sod., 2007). Monoliti združujejo dobro separacijo, ki odlikuje delčne nosilce in delo pri visokih pretokih, ki ga omogočajo membrane. Metakrilatne monolitne nosilce opisujejo kot homogene, rigidne, visoko zamrežene, porozne polimere (Štrancar in sod., 2002). Komercialno dostopni CIM metakrilatni nosilci so optimizirani za separacijo velikih molekul (Barut in sod., 2008). Makropore zagotavljajo majhen padeč tlaka, mezopore pa nudijo dovolj veliko površino za izmenjavo in posledično visoke dinamične vezavne kapacitete.

Izboljšave že obstoječih delčnih nosilcev obsegajo nosilce z gigaporami (Eon – Duval in Burke, 2004), hidrogelne v keramičnih delcih z gigaporami (Urthaler in sod., 2005a) ter grafitirane polimere (Diogo in sod., 2005). Vsi trije tipi imajo višje dinamične vezavne kapacitete za pDNK kot konvencionalne stacionarne faze (Urthaler in sod., 2005c). Grafitirane ali pripajkane stacionarne faze dobimo tako, da osnovnim delcem v nadaljnjih modifikacijah pripojimo še dodaten sloj. Gre za kemijsko reakcijo, izzvano z radikali v kovalentni vezi med monomerom in matriksom (Frankovič in sod., 2008). Monomeri, ki so pripajkani na polimerni matriks, tvorijo polimerne verige, katere opisujejo kot ščetke ali lovke. Največji doprinos tovrstne modifikacije je velika količina sterično dosegljivega liganda za vezavo biomolekul (Frankovič in sod., 2008).

2.3.2.2 Odstranjevanje nečistoč pred čiščenjem s kromatografskimi nosilci

Nečistoče lahko odstranjujemo s filtracijo preko diatomejske zemlje, nitroceluloze (Levy in sod., 2000), acetatne celuloze (Diogo in sod., 2005) ali s tangencialno filtracijo (Eon – Duval in sod., 2003b). Drugi načini so: razgrajevanje nečistoč z RNAzo, obdelava lizata pri visokih temperaturah in/ali z magnezijevimi ioni, ter obarjanje (Diogo in sod., 2005; Eon – Duval in sod., 2003a; Ferreira in sod., 2000). Tangencialna filtracija je pogosto uporabljena pri proizvodnji proteinov, vendar so njeno uporabo razširili na čiščenje plazmidov. Pri optimiziranih pogojih (velikost por membrane, transmembranski pritisk in koncentracije plazmida v začetnem materialu) lahko postopoma odstranimo RNK brez dodajanja RNAze (Eon – Duval in sod., 2003b).

Obarjanje je preprosta tehnika za separacijo RNK in pDNK. Poznamo dva pristopa k temu: lahko obarjamo plazmid ali pa le-ta ostane nedotaknjen v raztopini. Plazmid precipitiramo z dodajanjem isopropanola, spermina in heksamin kobalta (Murphy in sod., 1999), polietilenglikola (Sauer in sod., 2008), cetiltrimetilamonijevega bromida (Eon – Duval in sod., 2003a). Ta metoda je težavna za prenos v večje merilo, ker je treba plazmid po precipitaciji odcentrifugirati in ga za nadaljno obdelavo resuspendirati. Druga možnost je obarjanje nečistoč, pri katerem plazmid ostaja v raztopini. Za precipitacijo RNK se uporabljajo soli v visokih koncentracijah: litijev klorid, natrijev acetat, amonijev acetat, magnezijev klorid, kalcijev klorid in amonijev sulfat (Eon – Duval in sod., 2003a; Voss,

2008). CaCl_2 se je pri danih pogojih izkazal kot najboljše sredstvo za selektivno obarjanje RNK, saj reakcija poteče hitro in brez izgub plazmida (Eon – Duval in sod., 2003a). Urthaler in sod. (2003b) pa so ugotovili, da je obarjanje s tri in več molarnim amonijevim sulfatom prav tako učinkovito in zaščitno deluje na plazmid. Kombinacija selektivne precipitacije z 1,4 M CaCl_2 , zatem z isopropanolom ter končno z 10% polietilenglikolom in 250 mM NaCl je Sauerja in sod. (2008) pripeljala do enostavne, hitre in poceni izolacije plazmida.

2.3.2.3 Zmanjševanje vpliva povišane viskoznosti

Viskoznost alkalnega lizata je lahko 15 – 60 MP, odvisno od strižnih sil (Diogo in sod., 2005). Tako pri čiščenju s konvencionalnimi delčnimi nosilci tlak postane omejujoč dejavnik. Zaradi tega sta precej manjša pretok in hitrost proizvodnje. Viskoznost zmanjšamo z razredčevanjem, z izbiro delcev, ki imajo večje premere por ali s kromatografijo z lebdečimi delci (Diogo in sod., 2005).

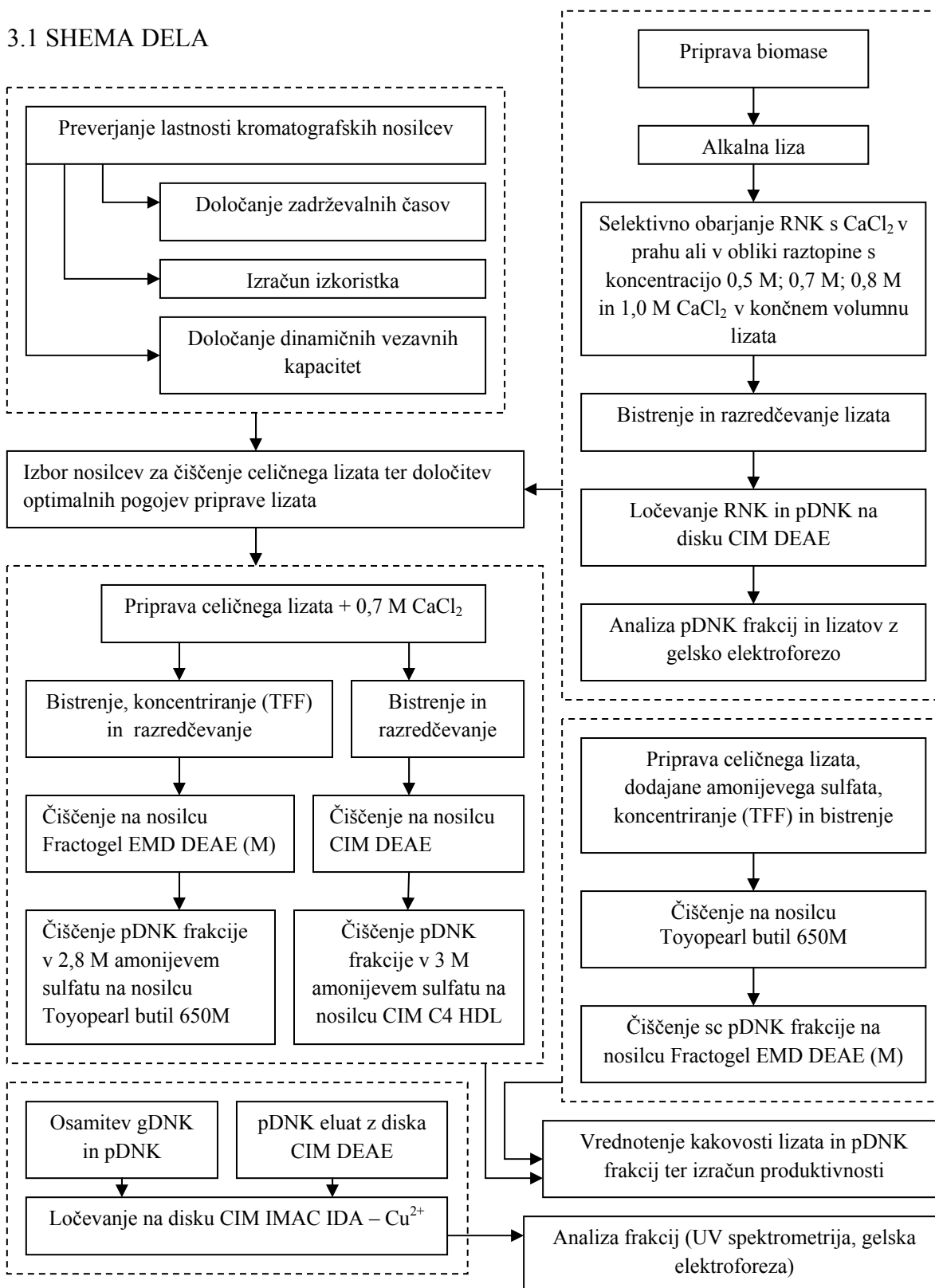
2.3.2.4 Čiščenje plazmidne DNK na metakrilatnih monolitnih nosilcih (CIM[®])

CIM nosilce lahko uporabljamo za čiščenje biomolekul na laboratorijskem ali industrijskem nivoju. To so visoko porozne stacionarne faze, ki imajo vezane ligande predvsem na površini por in so lahko dosegljivi za vezavo biomolekul (Štrancar in sod., 2002). Zaradi širokih in pretočnih kanalov je mogoče delo pri visokih pretokih, ne da bi to imelo vpliv na resolucijo in kapaciteto (Podgornik in sod., 2004). Slednja narašča skupaj z velikostjo biomolekule (Yamamoto in Kita, 2006). Tako se giblje med 9 in 14 mg/ml za plazmidno DNK na CIM anionskem izmenjevalcu (Benčina in sod., 2004). CIM monolitne nosilce so za čiščenje plazmidne DNK prvi uporabili Branovič in sod. (2004). Dosegli so separacijo med RNK in pDNK brez uporabe RNAze. Forčič in sod. (2005) so uporabo CIM DEAE diskov razširili še na dokazovanje prisotnosti genomske DNK v vzorcih, kar bi lahko omogočilo hitro procesno kontrolo. Čiščenje plazmidne DNK na industrijski ravni v treh korakih opisujejo Urthaler in sod. (2005b): začetni separaciji na delčnem hidrofobnem nosilcu je sledilo čiščenje na CIM DEAE koloni, na koncu pa še kromatografija z ločevanjem po velikosti. Optimizacijo procesa čiščenja pDNK na monolitnih nosilcih so

nadaljevali Peterka in sod. (2004) s procesom sklapljanja dveh kolon z različnima ligandoma, hidrofilnim in kationskim. Končni produkt je bil ustrezno čist in biološko aktiven. V nedavnem delu so Smrekar in sod. (2008) proces izpopolnili z uporabo anionsko izmenjevalne in hidrofobne kromatografije. Uspeli so odstraniti vse ključne nečistoče ter dosegli nad 99% superzvite pDNK. Proces je bil končan v nekaj urah in prenos na industrijski nivo naj ne bi povzročal večjih težav. Slednje skupaj z visokimi dinamičnimi vezavnimi kapacitetami in nizko porabo pufrov omogoča bolj ekonomično proizvodnjo DNK cepiv.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SHEMA DELA



Slika 2. Shema poteka dela.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Kemikalije

BMA:

- SeaKem LE agarose (50004)

Fluka:

- $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (61245)

Kemika:

- kompleksal III (1136808)

Invitrogen:

- 1 kb plus DNK Ladder

Merck:

- 2 – propanol (1.09634.1000)
- amonijev sulfat (1.01217.1000)
- borova kislina (1.00165.0500)
- dinatrijev hidrogen fosfat (1.06580.0500)
- etanol 96 % (1.59010.0500)
- guanidinijev tiocianat (3.689751.00GM)
- HEPES (1.10110.1000)
- imidazol (1.04716.0250)
- kalcijev klorid (1.02378.0500)
- kalijev acetat (1.04820.1000)
- kalijev dihidrogen fosfat (1.04873.0250)
- klorovodikova kislina (1.00217.1000)
- natrijev hidroksid (1.06498.1000)
- natrijev klorid (1.06404.1000)

- tris (hidroksimetil)-aminometan (1.08382.1000)

Sigma – Aldrich:

- mešanica kloroform-fenol-izoamilalkohol (77617)
- RNAza A (R5250)

3.2.2 Bakterijski sev

Uporabljali smo *E. coli* sev DH5 α .

3.2.3 Plazmidna DNK

- pEGFP-N1 (4.9 kbp)
- bHNcbrT (4 kbp)

3.2.4 Gojišče

Bakterijsko kulturo smo gojili v tekočem gojišču LB (Merck, 1.10285). To je vsebovalo: 10 g/l peptona iz kazeina, 5 g/l kvasnega izvlečka in 10 g/l natrijevega klorida.

Gojišča smo pripravljali tako, da je bila koncentracija LB v 250 ml deionizirane vode 25 g/l. Sledila je sterilizacija pri 121 °C in tlaku 2,1 bar, 20 min.

3.2.5 Kolone

Za primerjavo procesov čiščenja plazmidne DNK smo uporabljali: stacionarne faze Fractogel EMD DMAE (M) (1.16884), Fractogel EMD DEAE (M) (1.16883) (Merck), Toyopearl butil 650M (Tosoh) polnjene na Atoll (Nemčija) v 1 ml kolone dimenzij 8 x 20 mm; membrano MA 75Q (Q 75X) (Sartorius), CIM DEAE (100.000-5114) in CIM C4 (100.0001-8136) (Bia Separations) ter BIO-Monolith DEAE analitsko kolono (Agilent).

Izmenjavo pufrov v frakcijah s soljo smo naredili z PD – 10 Desalting column (17-0851-01) (Amersham Bioscience, GE Healthcare).

Na monolitne kolone s kelatorsko molekulo IDA (CIM IDA) (Bia Separations) smo vezali Cu^{2+} po navodilih proizvajalca.

Pri tangencialni filtraciji smo uporabili Pellicon XL filter 300K (PXB300C50) (Millipore).

3.3 METODE

3.3.1 Priprava bakterijske biomase

V predhodno pripravljeno gojišče LB smo dodali antibiotik kanamicin do končne koncentracije 10 mg/ml ter nacepili izbrano bakterijsko kulturo (shranjeno na -20 °C v glicerolu in gojišču LB).

Po 16 -20 urni inkubaciji pri 37 °C in stresanju pri 120 obratih na minuto smo opravili žetev s centrifugiranjem alikvotov namnožene kulture. Supernatant smo zavrgli in avtoklavirali. Pelet smo shranili na -20 °C ali ga uporabili za nadaljnje postopke osamitve plazmidne in genomske DNK.

Rast smo spremljali z merjenjem optične gostote pri 600 nm. Za razredčevanje vzorca in slepo probo smo uporabili t.i. OD 600 pufer (0,04 M KH_2PO_4 ; 0,07 M Na_2HPO_4 ; 0,2 M NaCl).

3.3.2 Priprava bakterijskih celičnih lizatov z in brez obarjanja RNK po nevtralizaciji

Bakterijske celice smo razgradili v postopku alkalne lize. V uporabljenem protokolu je predvidena liza največ 2 l prekonočne kulture. Le-to smo najprej v alikvotih po 125 ml centrifugirali 10 minut pri 5500g v štirih centrifugirkah. Slednje smo naredili štirikrat; po vsakem centrifugiranju smo zavrgli supernatant in preko peleta nalili nov alikvot. Po zadnji ponovitvi smo celično pasto v posamezni centrifugirki resuspendirali v 32 ml pufru 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,5). Od tu naprej je delo potekalo na ledu. Lizo smo naredili z dodajanjem 32 ml mešanice 0,2 M NaOH in 1% NaDS v 32 ml celične suspenzije. Previdno smo mešali eno minuto. Dobljeni alkalni lizat smo nevtralizirali z 32 ml mrzlega 3M kalijevega acetata pH 5,5 ter previdno mešali 1 minuto. Potem smo mešanico inkubirali 10 minut pri 4 °C.

Na tej točki smo lizate tretirali na dva različna načina, glede na to, katera kromatografska tehnika je bila uporabljena v prvem koraku čiščenja plazmidne DNK.

V lizatih, namenjenih za čiščenje na anionskih izmenjevalcih, smo obarjali RNK s CaCl_2 v prahu ali z 5 M raztopino CaCl_2 . Koncentracija v končnem volumnu ni bila pri vseh poskusih enaka, zato je vedno navedena posebej. Po dodatku CaCl_2 smo pustili centrifugirke na 4 °C še nadaljnih 20 min. Potem smo mešanico centrifugirali 1 uro pri 5500g in 4 °C. Na koncu smo odlili supernatant in ga shranili na -20 °C. Kadar pa je sledilo čiščenje na hidrofobnih nosilcih, smo preskočili korak z obarjanjem in nadaljevali s centrifugiranjem.

3.3.3 Osamitev bakterijske genomske DNK

Bakterijsko genomsko DNK smo čistili v dveh delih. Najprej smo celice razbili in osamili s kloroform – fenolno ekstrakcijo. Po encimski razgradnji RNK smo vzorec nanegli na CIM DEAE disk in gDNK eluirali z 1 M NaCl.

10 ml prekonočne kulture *E. coli* DH5 α smo centrifugirali 10 min pri 9500g. Supernatant smo zavrgli ter usedlino resuspendirali v 4,5 ml pufru TSE. Ponovno smo centrifugirali 10 min pri 9500g. Usedlino smo resuspendirali z lizocimom v pufru TE (koncentracija lizocima je bila 50 mg/ml). Sledila je polurna inkubacija pri 37 °C. Nato smo dodali 1,5 ml pufru GES ter mešali. Potem smo centrifugirke položili na led za 10 min. Ob mešanju smo dodali 750 μL ohlajene 7,5 M raztopine amonijevega acetata ter še enkrat inkubirali na ledu za 10 min. Lizatu smo dodali 1 ml mešanice kloroforma, fenola in izoamilalkohola ter premešali. Po 15 minutnem centrifugiranju pri 9500g smo odvzeli zgornjo vodno fazo in ji dodali 0,5 ml mešanice kloroforma, fenola in izoamilalkohola. Rahlo smo premešali in zopet centrifugirali 10 min pri 9500g. Odvzeli smo zgornjo vodno fazo in ponovili postopek. Po zadnjem centrifugiranju smo v vodni fazi oborili genomsko DNK tako, da smo enemu volumnu raztopine z gDNK dodali 0,54 volumna 2 – propanola. Potem smo centrifugirali 10 min pri 9500g. DNK smo trikrat sprali z 1 ml 80% etanola, ki smo ga na koncu popolnoma odstranili. Oborino smo posušili pri sobni temperaturi in nato raztopili v 150 μl sterilne deionizirane vode. Potem smo dodali še RNAzo do koncentracije 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ter inkubirali 30 minut pri 37 °C.

Tako pridobljen material smo čistili na CIM DEAE diskih, kot je opisano v Benčina in sod. (2004).

3.3.4 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

3.3.4.1 Sistem HPLC

Sistem HPLC je bil sestavljen iz dveh črpalk K-1000 z 10 ml glavama, dinamične mešalne komore, injektorja, injekcijske zanke, spektrofotometra K-2501 (Knauer) s spremenljivo valovno dolžino, merilca prevodnosti (Amersham Bioscience), računalniškega vmesnika (Knauer). Deli so bili med seboj povezani s kapilarami. Sistem smo upravljali preko programskega paketa Eurochrom2000 za Windows.

3.3.4.2 Ionsko izmenjevalna kromatografija na nosilcu Fractogel EMD DEAE (M)

Bister lizat (filtracija preko 0,2 μ m Sartobran P filtra) smo najprej koncentrirali (za faktor 10) s tangencialno filtracijo pri 12 ml/min in transmembranskem pritisku 1 bar. Tako pripravljen vzorec, ki smo mu uravnali prevodnost na 35 mS/cm s hladno vodo, smo nanašali pri pretoku 1 ml/min na kolono, ki smo jo kondicionirali pri delovnem pretoku z osnovnim pufrom (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5). Z njim smo sprali nosilec po končanem nanašanju. Sledilo je spiranje s pufrom, ki smo mu dodali 0,6 M NaCl ter elucija plazmidne DNK z 1 M NaCl. Oboje smo naredili pri pretoku 1 ml/min. Pobrli smo frakcije, eluirane z 0,6 M in 1M soljo.

Pri čiščenju frakcije s superzvito pDNK, eluirano s Toyopearl butil (M), je nanašanje, spiranje in eluiranje potekalo tako, kot smo opisali zgoraj.

3.3.4.3 Ionsko izmenjevalna kromatografija na monolitnem nosilcu CIM DEAE

Lizat smo najprej zbistrili preko 0,2 μ m Sartobran P filtra. Potem smo uravnali prevodnost s hladno vodo na 37 mS/cm in ga pri pretoku 16 ml/min nanesli na predhodno kondicioniran nosilec (enako kot delčni nosilec). Po nanašanju smo kolono sprali z osnovnim pufrom (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5) pri 16 ml/min. Pri spiranju s pufri z 0,6 M in 1M NaCl smo pretok znižali na 8 ml/min. Ti dve frakciji smo shranili in analizirali.

3.3.4.4 Kromatografija s hidrofobnimi interakcijami na nosilcu Toyopearl butil 650M

Vezavo vzorca na hidrofoben nosilec smo dosegli z dodatkom dveh volumnov 4 M amonijevega sulfata enemu volumnu lizata, pripravljenega brez obarjanja po nevtralizaciji. Mešanico smo inkubirali 60 min. Potem smo oborino odstranili z 10 min centrifugiranjem pri 9500g ter dokončno zbistrili lizat s filtracijo preko 0,2 μm Sartobran P filtra. Koncentrirali (za faktor 10) smo ga s tangencialno filtracijo pri pretoku 12 ml/min in pri transmembranskem pritisku 1bar. Pri pretoku 1ml/min smo ga nanegli na nosilec. Potem smo sprali s pufrom z 2,8 M amonijevim sulfatom. Pri eluciji v optimiziranem linearnem gradientu od 2,8 M do 0 M amonijevega sulfata smo pretok znižali na 0,7 ml/min. Pobrli smo frakcijo s superzvito plazmidno DNK in poškodovano plazmidno DNK.

Pufra, katera smo uporabljali: pufer 1: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5; in pufer 2: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 2,8 M amonijev sulfat, pH 7,5.

Ko smo čistili pDNK frakcijo s Fractogel EMD DEAE (M), smo ji dodali 4 M amonijev sulfat do 2,8 M v končnem volumnu. Metoda nanosa in elucije je bila enaka, kot je opisano zgoraj.

3.3.4.5 Kromatografija s hidrofobnimi interakcijami na monolitnem nosilcu CIM C4

Na CIM C4 smo čistili pDNK frakcijo s CIM DEAE. Dodali smo ji tri volumne 4 M amonijevega sulfata in jo pri 8 ml/min nanegli na nosilec. Sledilo je spiranje s pufrom z 1,7 M amonijevim sulfatom ter elucija superzvite oblike s pufrom z 0,4 M amonijevim sulfatom. Pobrli smo obe frakciji.

Pufri, ki smo jih uporabljali pri separaciji: pufer 1: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 3 M amonijev sulfat, pH 7,5; pufer 2: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1,5 M amonijev sulfat, pH 7,5; pufer 3: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,4 M amonijev sulfat, pH 7,5.

3.3.4.6 Analiza vhodnega in izhodnega materiala na CIM DEAE disku

Lizat in pobrane frakcije smo - če je bilo potrebno - redčili, zato da smo dosegli vezavo na anionski izmenjevalec. Na disk smo nanegli znano količino vzorca in ločili RNK od plazmidne DNK v optimiziranem linearnem gradientu med 0,4 M in 1 M NaCl. Iz

predhodno pripravljene umeritvene krivulje s plazmidom pEGFP-N1 (4.9 kbp) smo iz površin vrhov izračunali koncentracijo plazmidne DNK v preiskovanem vzorcu.

Pufra, ki smo ju uporabljali pri analizi: puffer 1: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5; in puffer 2: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7,5.

3.3.4.7 Določevanje dinamičnih vezavnih kapacitet

Raztopino z znano koncentracijo plazmida smo nanegli na nosilec do ustalitve prebojne krivulje. Pri testiranju hidrofobnih nosilcev smo raztopini dodali tri volumne 4 M amonijevega sulfata enemu volumnu koncentrirane raztopine plazmida. Koncentracijo soli v napajalni tekočini za anionske nosilce smo spreminjali z dodajanjem amonijevega sulfata in NaCl.

Iz podatkov o koncentraciji plazmida (c), pretoka (Φ_v), mrtvega volumna (V_m), volumna kolone (V_k) in retenzijskih časih (t_r) smo izračunali kapaciteto (q) pri 10% in 50% preboja (enačba 1).

$$q = \frac{(\Phi_v \times t_r - V_m) \times c}{V_k}$$

... (1)

Dinamična vezavna kapaciteta je definirana kot količina plazmida, ki se veže na nosilec pri določenem pretoku in lastnostih napajalne raztopine. Izračun kapacitete ustreza količini vezanega plazmida preden slednjega detektiramo v ostanku, ki teče skozi kolono brez zadrževanja na njej. Kapaciteta pri 50% preboja je tista količina plazmida, ki je vezana na nosilec, ko signal detektorja doseže polovično vrednost maksimalnega signala.

Izkoristek smo izračunali tako, da smo količino plazmida (mg), ki smo jo izmerili po prečrpavanju skozi kolono delili s količino plazmida, ki smo jo nanegli nanjo.

3.3.4.8 Primerjava zadrževalnih časov plazmidne DNK na anionskih nosilcih

100 μ L vzorca pDNK v pufri z 0,4 M NaCl smo iniciirali na kolono in eluirali v linearnem gradientu med 0,4 – 1 M NaCl pri pretoku 8 ml/min.

Pufra, ki smo ju uporabljali pri analizi: pufar 1: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5 in pufar 2: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7,5.

3.3.4.9 Kovinsko- kelatna afinitetna kromatografija

Nanašalni pufar: 20 mM HEPES, 250 mM NaCl, pH 7.

Elucijski pufar: 20 mM HEPES, 250 mM NaCl, 100 mM imidazol, pH 7.

3.3.4.9.1 Določevanje odvisnosti vezave genomske DNK na CIM IDA –Cu²⁺ v odvisnosti od pretoka

100 µL znane koncentracije genomske DNK v nanašalnem pufaru smo iniciirali na CIM IDA-Cu²⁺ disk v toku nanašalnega pufara ter eluirali s 100 mM imidazolom pri pretokih 8 ml/min, 4ml/min, 1ml/min. Shranili smo nevezani vzorec in eluat.

3.3.4.9.2 Čiščenje pDNK frakcije s CIM DEAE diska IMAC IDA-CU²⁺

Frakcijo s plazmidom bHNcbrT (4 kbp) in RNK v nanašalnem pufaru smo pri pretoku 1 ml/min črpali na CIM IDA-Cu²⁺ disk. Po nanašanju smo sprali s pufarom brez imidazola. Potem smo eluirali RNK s 100 mM imidazolom. Pobrati in analizirali smo vhodni material, frakcijo, ki se je sprala in eluat.

3.3.4.10 Analitska kromatografija

Z analitsko BIO-Monolith DEAE kolono (Agilent) smo določali odstotek superzvite DNK. Pri pretoku 1ml/min smo v linearnem gradientu med 0,6 M in 1 M NaCl ločili se in oc obliko ter iz površin vrhov obeh izračunali razmerje med njima.

Pufra, ki smo ju uporabljali: pufar 1: 20 mM Tris, pH 8,5; in pufar 2: 20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7,5.

3.3.5 Tangencialna filtracija (TFF)

Sistem za tangencialno filtracijo je bil sestavljen iz peristaltične črpalke (SciLog Tandem 1018), dveh manometrov, membrane (Millipore), zbiralnika za permeat in posode z napajalno tekočino, kamor se je vračal retentat po plastičnih ceveh. Pred začetkom dela smo membrano kondicionirali po navodilih proizvajalca (Millipore).

Uporabljali smo jo za koncentriranje celičnih lizatov pred nanašanjem na delčna nosilca.

3.3.6 Agarozna elektroforeza

Priprava vzorcev za analizo na gelu: 1 volumnu vzorca smo dodali 0,7 volumna 2-propanola in inkubirali 20 min pri 4°C. Oborino smo po 30 minutnem centrifugiranju pri 13000 g raztopili v pufru (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5).

Vzorci smo analizirali na 0,8% agaroznih gelih. Te smo pripravljali z raztapljanjem agaroze v 1 x TBE pufru (Tris, borat, EDTA). Poleg vzorcev smo na gel nanesti tudi standard (1kb plus DNK Ladder, Invitrogen). Separacija je potekala 60 min pri 80V v pufru 1 x TBE na elektroforeznem sistemu Bio-rad. Gele smo barvali z etidijevim bromidom.

3.3.7 Merjenje koncentracije DNK in proteinov

3.3.7.1 UV spektrometrija

Koncentracijo DNK smo določili z merjenjem absorbance pri 260 nm (50µg/ml ima absorbanco enako 1) in iz razmerja med absorbancama pri 260 nm in 280 nm ocenili čistost vzorca (relativno čist vzorec je imel razmerje med 1,8 in 2).

Vzorci smo razredčili, da smo dosegli absorbanco 0,5 in meritev ponovili vsaj dvakrat.

3.3.7.2 Bradford Ultra metoda

Koncentracijo proteinov smo določali s metodo Bradford Ultra.

Pred kvantifikacijo smo opravili izmenjavo pufov na kolonah PD – 10 (Amersham Bioscience) po navodilih proizvajalca.

Standarde za umeritveno krivuljo smo pripravili iz govejega serumskega albumina v koncentracijah 2,5; 5,0; 10,0; 12,5; 20,0; 25,0; 50,0; 100 µg/ml. Priprava vzorcev za merjenje je potekala po navodilih proizvajalca (Sigma, B 6916).

4 REZULTATI

4.1 PREVERJANJE LASTNOSTI KROMATOGRAFSKIH NOSILCEV

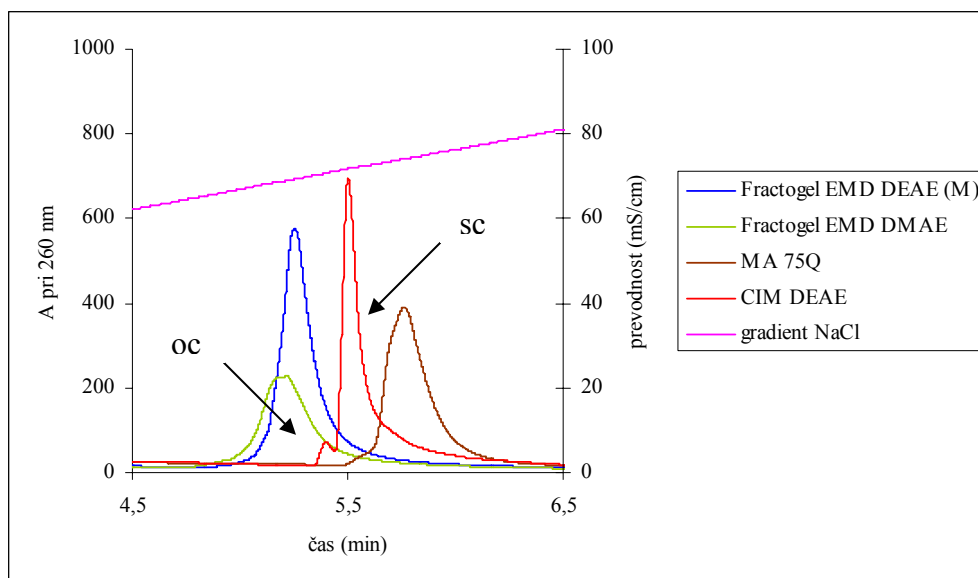
Nov pristop k čiščenju plazmidne DNK je spreminjanje lastnosti stacionarnih faz tako, da bi omogočale boljši masni prenos ter hitrejšo delo. V diplomski nalogi smo primerjali nosilce, ki predstavljajo potencialno rešitev za težave pri separacijah večjih biomolekul z delčnimi nosilci. Vsi ustrezajo kriterijem za uporabo v preparativni kromatografiji. Funkcionalne skupine DMAE (dimetilaminoetil), DEAE (dietilaminoetil) in Q (kvartarni amin) omogočajo izmenjavo anionov. Q ligand je močan, DEAE in DMAE pa sodita med šibke anionske izmenjevalce. Oba hidrofobna nosilca sta imela na metakrilatno osnovo vezano butilno skupino. Osnovna razlika med nosilci je v strukturi naravi stacionarne faze. Primerjali smo membrano (MA 75Q), grafitirana polimera (Fractogel), monolita (CIM DEAE, C4 HDL) ter konvencionalni delčni nosilec (Toyopearl), da bi ugotovili njihove prednosti in pomanjkljivosti.

Ugotovili smo, da se je plazmid različno dolgo zadržal na nosilcih z DEAE ligandom. Tako je med šibkimi anionskimi izmenjevalci najmočnejši CIM DEAE, na katerem je prišlo do separacije med oc in sc pDNK (slika 3). Podobno smo opazili tudi pri hidrofobnih kolonah. Plazmid se je s CIM C4 HDL eluiral pri precej nižji ionski jakosti kot s Toyopearl butil 650 M (rezultati niso prikazani).

Preglednica 2. Fizikalne lastnosti kromatografskih nosilcev, ki smo jih testirali.

nosilec	funkcionalna skupina	matriks	velikost delcev (μm)	velikost por (μm)
CIM DEAE	DEAE	metakrilat	/	0,7 – 0,96*
Fractogel EMD DEAE	DEAE	metakrilat	40 – 90	0,08
Fractogel EMD DMAE	DMAE	metakrilat	40 – 90	0,08
MA 75Q	Q	stabilizirana in ojačana celuloza	/	> 0,3
Toyopearl butil 650 M	butil	metakrilat	65	0,01
CIM C4 HLD	butil	metakrilat	/	0,7 -0,96*

*velikost kanalov



Slika 3. Primerjava zadrževalnih časov pDNK na izbranih nosilcih. Testirali smo kolone Fractogel EMD DEAE (M), Fractogel EMD DMAE, MA Q75 in CIM DEAE.

100 μ l vzorca pDNK v pufru z 0,4 M NaCl smo iniciirali na kolone pri pretoku 8 ml/min. Eluirali smo ga v linearnem gradientu med 0,4 M – 1 M NaCl. Pufru, ki smo ju uporabili: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5 in 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7,5.

Dinamično vezavno kapaciteto anionskih izmenjevalcev za pDNK smo določali s prečrpavanjem raztopine plazmida pEGFP-N1 skozi kolone. Koncentracija plazmida v raztopini je bila 65 μ g/ml. Izbrali smo linearne hitrosti (cm/h), ki so omogočale zadosten masni prenos snovi (preglednica 3). Linearna hitrost se je izkazala za pomemben parameter pri delčnih nosilcih, kjer se je kapaciteta pri 10% preboja z zmanjšanjem pretoka trikrat povečala (preglednica 3). Prisotnost 0,4 M NaCl je povzročila 30% povečanje kapacitete za Fractogel EMD DEAE (M) in enak padec pri CIM DEAE (preglednica 3). Pri ostalih nosilcih ni prišlo do sprememb v dinamični vezavni kapaciteti. Ionsko moč raztopine s plazmidno DNK smo spreminjali tudi z amonijevim sulfatom. Trend povečevanja kapacitete z dodajanjem soli se je na graftiranem polimeru nadaljeval in pri koncentraciji 1,8 M amonijevega sulfata smo dosegli vrednost, ki je bila dvakrat večja kot tista pri osnovni ionski jakosti medija. Pri isti koncentraciji je bila dinamična kapaciteta CIM DEAE najnižja (preglednica 3).

Izkoristek, izražen v odstotkih, odraža masno bilanco vezave. Razen pri membrani je imel vrednost nad 94%.

Preglednica 3. Dinamične vezavne kapacitete anionskih nosilcev v odvisnosti od ionske moči raztopine plazmidne DNK in pretoka (delčna nosilca). Osnovna sestava medija (pufra): 50 mM Tris, 10 mM EDTA pri pH 7,5. Plazmid: pEGFP-N1 (4,7 kbp).

nosilec	linearna hitrost (cm/h)	dodana sol	kapaciteta pri 10 % preboja (mg/ml)	kapaciteta pri 50 % preboja (mg/ml)	izkoristek (%)
Fractogel EMD DEAE (M)	477	/	0,4	0,9	94
	119*	/	1,2	1,6	100
	119	0,4 M NaCl	1,8	2,5	97
	119	2,8 M amonijev sulfat	2,1	2,9	98
	119	1,8 M amonijev sulfat	2,5	3,6	97
Fractogel EMD DMAE (M)	477	/	0,2	0,5	100
	119*	/	1	1,4	97
	119*	0,4 M NaCl	1	1,4	98
CIM DEAE	156**	/	7,8	8,7	96
	156	0,4 M NaCl	5,7	6,3	100
	156	2,8 M amonijev sulfat	7	7,6	98
	156	1,8 M amonijev sulfat	5,1	5,5	99
MA 75 Q	48***	/	5,4	7,4	92
	48	0,4M NaCl	5,4	7,4	92

*1 ml/ min **4 ml/ min *** 4 ml/ min

Dinamično vezavno kapaciteto smo določili po enakem postopku tudi na hidrofobnih nosilcih (preglednica 4). Da bi dosegli vezavo, smo izhodni raztopini plazmida dodali tri volumne 4 M amonijevega sulfata. Kapaciteti delčnega in monolitnega nosilca se precej razlikujeta (preglednica 4). Prav tako je opazna razlika v jakosti, kljub istemu ligandu. Z monolitnega nosilca se plazmidna DNK eluira pri 1,4 M in pri delčnem nosilcu pri 2,6 M amonijevem sulfatu (ni prikazano).

Preglednica 4. Dinamične vezavne kapacitete hidrofobnih nosilcev. Raztopini s plazmidno DNK smo dodali dva volumna amonijevega sulfata, da smo dosegli pogoje optimalne vezave molekule. Plazmid: pEGFP-N1 (4,7 kbp).

nosilec	linearna hitrost (cm/h)	kapaciteta pri 10 % preboja (mg/ml)	kapaciteta pri 50 % preboja (mg/ml)	izkoristek (%)
Toyopearl butil 650 M	238	0,3	0,6	100
CIM C4	78	2,3	2,5	95

4.2 OBARJANJE RNK V CELIČNIH LIZATIH S CaCl_2

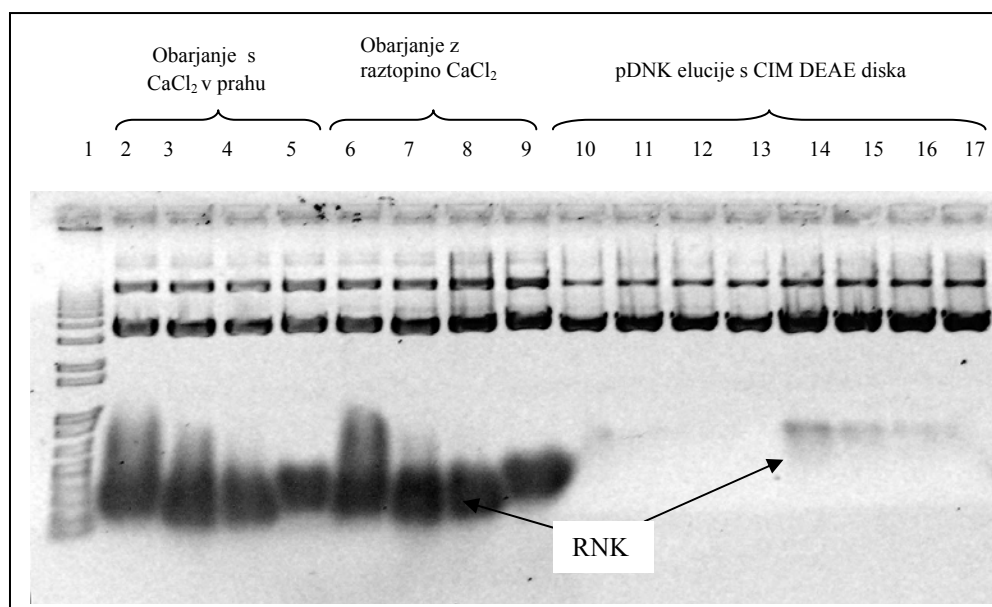
Ugotavljali smo vpliv koncentracije CaCl_2 na delež oborjene RNK v vzorcu. Gre za selektivno precipitacijo, pri kateri plazmid ostaja v raztopini.

Celičnemu lizatu (plazmid pEGFP-N1 (4.9 kbp)) smo po nevtralizaciji s kalijevim acetatom dodali CaCl_2 , tako da smo v končnem volumnu dosegli naslednje koncentracije: 0,5; 0,7; 0,8; 1,0 M. Reagent smo dodajali v obliki prahu in 5 M izhodne raztopine. Čas obarjanja je bil pri vseh vzorcih 20 minut. Po bistrenju s centrifugiranjem in filtracijo smo lizat razredčili do prevodnosti, ki jo je imel lizat z 0,5 M CaCl_2 po dodatku treh volumnov vode (34 mS/cm pri obarjanju z raztopino ter 37 mS/cm s prahom), in očistili na CIM DEAE disku. V linearnem gradientu od 0,4 do 1 M NaCl smo ločili preostalo RNK in pDNK (Slika 5A). Elucijski vrh slednje smo poleg lizatov, pripravljenih z različno koncentracijo CaCl_2 , dodatno analizirali z gelsko elektroforezo (slika 4).

Delež oborjene RNK se je zmanjševal s povečevanjem koncentracije CaCl_2 , ne glede na to, v kateri obliki smo ga dodali (slika 4 in 5). pDNK in RNK v lizatih smo ločili na CIM DEAE disku. Separacija je bila nepopolna pri lizatu z 0,5 M in 0,7 M CaCl_2 v prahu (slika 3, liniji 10 in 11) in 0,5 M, 0,7 M ter 0,8 M CaCl_2 v obliki raztopine (slika 4, linije 14, 15, 16). Koelucija RNK pri obarjanju z raztopino je posledica tega, da so imeli ti vzorci 3 mS/cm nižjo prevodnosti kot tisti, katerim smo dodali CaCl_2 v prahu. Pri takih pogojih se več RNK veže na nosilec in jo je tudi težje ločiti od pDNK. Pri enakih veznih pogojih (t.j. 37 mS/cm) je bila separacija med RNK in pDNK v lizatu z 0,7 M CaCl_2 popolna.

Vpliv prevodnosti vzorca pri nanašanju smo proučili na lizatih (plazmid bHNcbrT, 4 kbp), oborjenih z 0,5; 0,7 in 1,0 M CaCl_2 v obliki raztopine. Na CIM DEAE disk smo vzorce naložili pri treh različnih prevodnostih (slika 6). Opaziti je bilo jasnen trend zmanjševanja RNK vrha (slika 6). Analiza pDNK vrhov na gelu je pokazala, da je bila separacija popolna le pri obarjanju z 1,0 M CaCl_2 ter pri nanašanju pri 40 mS/cm in 45 mS/cm. Poleg RNK je pomembno, da je v končnem produktu odstranjena tudi genomna DNK. Slednjo smo v lizatu s plazmidom pEGFP-N1 (4.9 kbp) odstranili že na nivoju lizata, pri najnižji koncentraciji CaCl_2 (slika 4, linije 1–9), za razliko od plazmida bHNcbrT (4 kbp), kjer je nismo uspeli odstraniti, zaznali pa smo jo tudi v pDNK eluatih (rezultati niso prikazani).

Z vsako molekulo CaCl_2 pridobimo v lizatu dva kloridna iona več. Slednji tekmujejo z pDNK, RNK in gDNK za vezavo na anionski nosilec. Zato je potrebno vzorce redčiti, da pride do vezave plazmida na kolono. Čimvečji je razredčitveni faktor oz. čim nižja kot je koncentracija ionov, tem več je prostih mest za plazmid, in tako je večja tudi kapaciteta. To smo dokazali s poskusi z lizatom s plazmidom bHNcbrT (4 kbp), ki smo ga tretirali z 1 M CaCl_2 in s hladno destilirano vodo razredčili do 40 mS/cm. Kapaciteta je bila 4 mg/ml in separacija med RNK in pDNK popolna. Istemu vzorcu smo dodali toliko destilirane vode, da je prevodnost padla na 32 mS/cm. Do preboja je prišlo pri 7 mg/ml, vendar separacija ni bila več zadostna (rezultati niso prikazani).

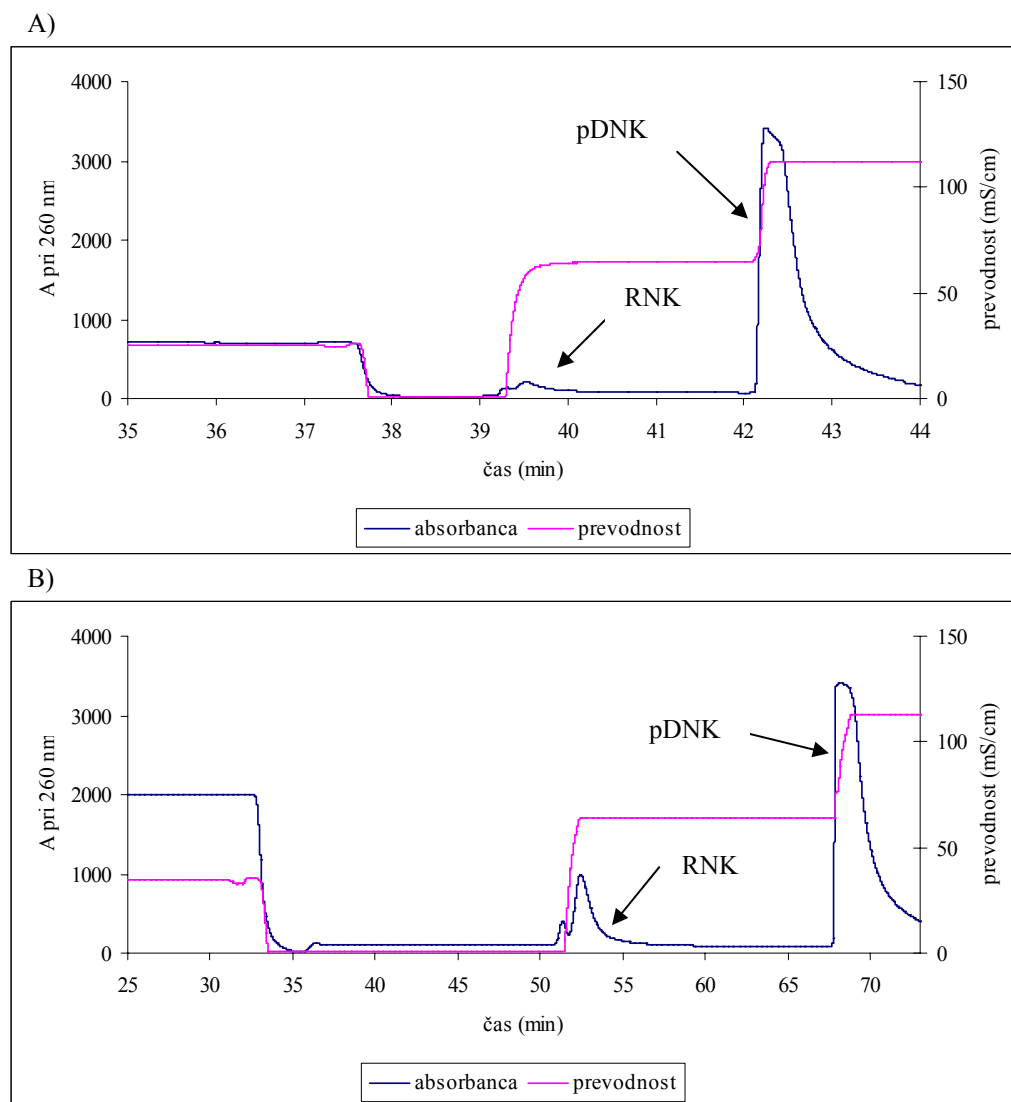


Slika 4. Selektivno obarjanje RNK v celičnem lizatu po nevtralizaciji s CaCl_2 (plazmid pEGFP-N1 (4.9 kbp)). CaCl_2 smo v lizate dodajali v prahu (vzorci v linijah 2-5) ali kot ustrezne volumne izhodne 5 M raztopine (vzorci v linijah 6-9). Koncentracije, ki smo jih uporabljali, so bile 0,5 M (2,6), 0,7 M (3,7), 0,8 M (4,8) in 1,0 M (5, 9). Tako pripravljene lizate smo čistili na CIM DEAE disku ter analizirali pDNK vrhove (10-17). pDNK eluati lizatov s CaCl_2 v prahu (10-13) in v obliki raztopine (14-17). Koncentracije CaCl_2 v začetnem lizatu naraščajo: 0,5 M (10, 14); 0,7 M (11, 15); 0,8 M (12, 16); 1,0 M (13, 17). Linija 1: standard 1 kb.

4.3 PRIMERJAVA PROCESOV ZA ČIŠČENJE PLAZMIDNE DNK

Na podlagi rezultatov poskusov s čisto plazmidno DNK smo izbrali dva anionska izmenjevalca, Fractogel EMD DEAE (M) in CIM DEAE, saj sta imela relativno visoke dinamične kapacitete ter izkoristek nad 95%. Uporabili smo ju za primerjalno čiščenje lizata, ki je bil pripravljen tako, da smo lahko učinkovito ločili pDNK in RNK, ne da bi vplivali na kapaciteto.

Za lizat s plazmidom pEGFP-N1 (4.9 kbp), ki smo ga nameravali uporabiti pri primerjavi procesov, smo v prejšnjih poskusih določili optimalne pogoje čiščenja. Zato smo ga pripravili tako, da smo mu dodali 0,7 M CaCl₂ takoj po nevtralizaciji s kalijevim acetatom in inkubirali 20 minut. Zbistrili smo ga s centrifugiranjem in filtracijo. Sledilo je čiščenje na CIM DEAE in Fractogel EMD DEAE (M). Slednjemu smo predhodno določili kapaciteto pod enakimi pogoji, kot smo jih uporabili kasneje za čiščenje: pri 10% preboja je znašala 2 mg/ml. Ker je nanašanje nekonzentriranega lizata na delčni nosilec časovno potratno, smo vzorec desetkrat koncentrirali s tangencialno filtracijo. Slednja je doprinesla tudi k večji čistoči lizata (manj RNK, proteinov). Zaradi visoke ionske jakosti vzorca po dodatku soli smo ga razredčili s hladno destilirano vodo do 35 mS/cm za Fractogel EMD DEAE (M) ter 37mS/cm za CIM DEAE. Nanašanje je potekalo pri optimalnih pogojih za oba nosilca; RNK in plazmid smo eluirali v gradientu s soljo: z 0,6 M NaCl smo sprali RNK in z 1 M NaCl eluirali plazmidno DNK (slika 7A in 7B). Metoda je bila pri obeh nosilcih enaka.



Slika 7. Čiščenje plazmidne DNK na CIM DEAE in Fractogel EMD DEAE (M).

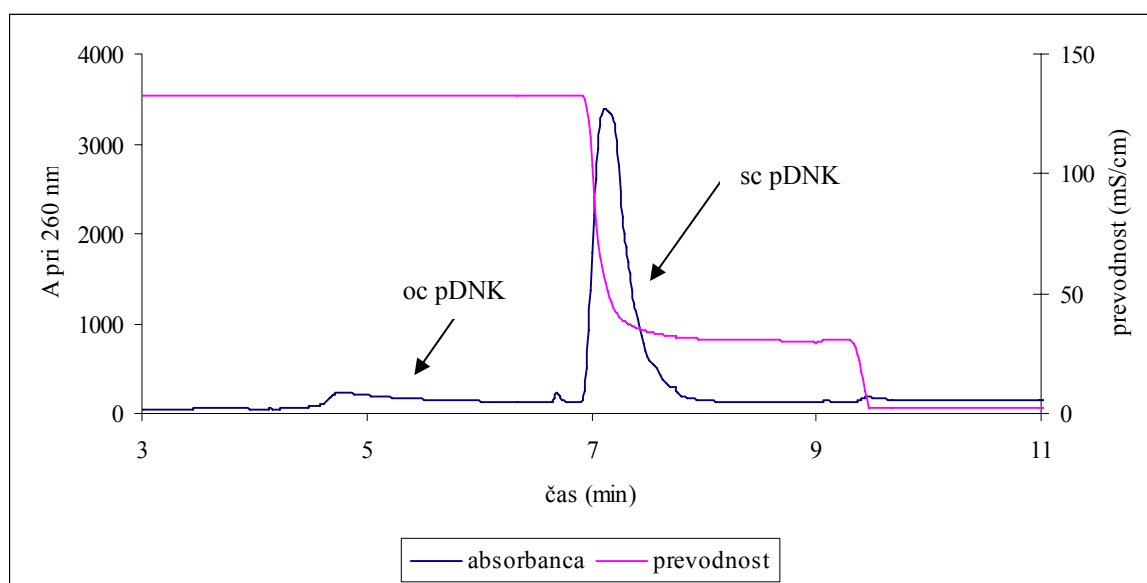
A) Na CIM DEAE smo naložili celični lizat z 0,7 M CaCl_2 pri 37 mS/cm. RNK smo sprali z 0,6 M NaCl in eluirali pDNA z 1 M NaCl.

B) Na Fractogel EMD DEAE (M) smo naložili predhodno skoncentriran celični lizat z 0,7 M CaCl_2 pri 35 mS/cm. Uporabili smo enako metodo kot pri A).

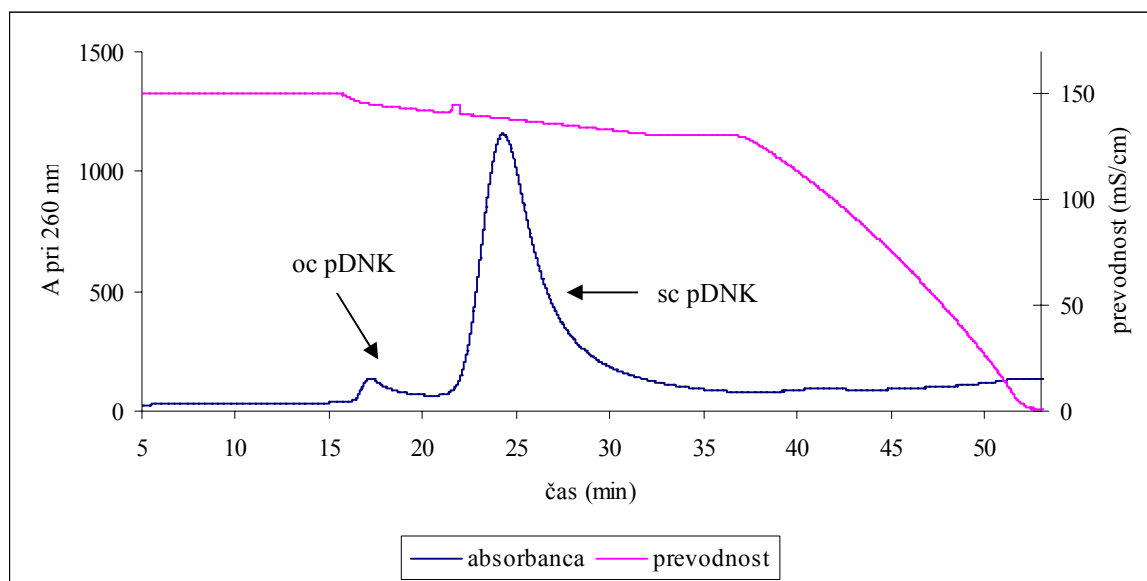
Pufri, ki smo jih uporabljali: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5; 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,6 M NaCl, pH 7,5; 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1,0 M NaCl, pH 7,5.

Fracije, eluirane z AIEX kolon s plazmidno DNK, smo naprej čistili na nosilcih s hidrofobnimi ligandi. Dodali smo jim tri volumne 4 M amonijevega sulfata ter eluat s Fractogela nanесли na predhodno kondicioniran nosilec Toyopearl butil 650 M (slika 9), s CIM DEAE pa na CIM C4 kolono (slika 8).

V nobeni od frakcij po čiščenju na anionskem izmenjevalcu nismo več detektirali RNK. Manjšo koncentracijo proteinov je imel eluat s Fractogela, vendar je potrebno upoštevati, da jih je bilo manj tudi v začetnem materialu, in sicer zaradi predhodne tangencialne filtracije. Razmerje med superzvito in drugimi izoformami je bilo boljše v eluatu s CIM kolone (96% superzvite proti 89% z nosilca Fractogel). Tudi slednje je posledica razlike v kakovosti začetnega materiala, saj se je pri tangencialni filtraciji navkljub prisotnosti dvovalentne soli plazmid delno poškodoval. Superzvito obliko smo od ostalih plazmidnih oblik ločili na hidrofobnih nosilcih. Na Toyopearl butil 650 M smo odstranili večji delež poškodovanega plazmida kot na CIM C4 HLD (preglednica 5). S slednjega smo superzvito obliko eluirali z 0,4 M amonijevim sulfatom, medtem ko smo s Toyopearl kolone nativni plazmid eluirali v linearnem gradientu med 2,8 in 0 M amonijevim sulfatom (Urthaler in sod., 2005b). Ker so kapacitete hidrofobnih nosilcev manjše kot kapacitete anionskih izmenjevalcev, smo čiščenje v drugem koraku večkrat ponovili.



Slika 8. Čiščenje pDNA frakcije s CIM DEAE na CIM C4 koloni. Eluatu smo dodali tri volumne amonijevega sulfata, da smo dosegli vezavo na nosilec. Odprto obliko pDNA (oc) smo sprali z 1,7 M amonijevim sulfatom; superzvito (sc) obliko smo eluirali z 0,4 M amonijevim sulfatom. Pufri, ki smo jih uporabili: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5; mM Tris, 10 mM EDTA, 1,7 M amonijev sulfat, pH 7,5; mM Tris, 10 mM EDTA, 0,4 M amonijev sulfat, pH 7,5.



Slika 9. Čiščenje pDNK frakcije s Fractogel EMD DEAE (M) na nosilcu Toyopearl butil 650 M. Eluatu smo dodali 4 M amonijev sulfat do končne koncentracije 2,8 M. Izofornni obliki smo ločili v linearnem gradientu od 2,8 do 0 M amonijevega sulfata. Pufri, ki smo jih uporabljali: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 2,8 M amonijev sulfat, pH 7,5; 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5.

Tretji proces je zajemal čiščenje celičnega lizata na hidrofobnem nosilcu Toyopearl butil 650M in anionskem izmenjevalcu Fractogel EMD DEAE (M) v drugem koraku. Vezne pogoje in precipitacijo nečistoč smo dosegli z dodatkom dveh volumnov 4 M amonijevega sulfata. Inkubirali smo eno uro na sobni temperaturi ter lizat zbistrili s filtracijo in skoncentrirali s tangencialno filtracijo. Vzorec smo nanašali pri linearni hitrosti 119 cm/h in eluirali pri 72 cm/h v optimiziranem gradientu od 2,8 do 0 M amonijevega sulfata (slika 9). V tem koraku smo učinkovito odstranili preostalo RNK in proteine. Koncentracija proteinov, določena z Bradford ultra metodo, je bila 3,4 $\mu\text{g/ml}$; koncentracija RNK pa je bila pod mejo detekcije na 0,8% agaroznem gelu. Delež poškodovane plazmidne DNK je bil manjši za 70% glede na začetni material, kar pomeni 90% sc pDNK v eluatu. Ta korak smo nekajkrat ponovili in potem frakcije s superzvito plazmidno DNK združili ter naložili na kolono Fractogel EMD DEAE (M). Plazmid smo eluirali z enako metodo kot poprej (slika 7B). Tako smo že relativno čist plazmid še skoncentrirali. Po AIEX koloni ni prišlo do spremembe v odstotku superzvite pDNK. Vzrok za relativno velik odstotek oc pDNK v končnem produktu je bila slaba kakovost samega vhodnega materiala za Toyopearl butil

650M. To gre pripisati sami pripravi lizata in neoptimiziranim pogojem tangencialne filtracije, kjer je prišlo do mehanskega razdrtja sc strukture.

Med izvajanjem procesov smo spremljali izbrane procesne parametre, ki so služili za izračun produktivnosti (enačba 2).

$$p = \frac{c \times y \times p}{t}$$

... (2)

c: dinamična vezavna kapaciteta (g/l)

y: izkoristek

p: delež sc pDNK

t: čas (TFF, nanos in elucija na obeh nosilcih) (h)

Preglednica 5. Vrednotenje končnega produkta in procesa čiščenja plazmidne DNK. Odstotek odstranjene poškodovane pDNK smo določili z analitsko CIM DEAE kolono, koncentracijo proteinov pa z Bradford Ultra metodo. Produktivnost smo izračunali iz zbranih procesnih parametrov.

čiščenje plazmidne DNK v dveh zaporednih korakih		kakovost končnega produkta (po drugem koraku)				
nosilec v prvem koraku čiščenja	nosilec v drugem koraku čiščenja	prisotnost RNK na 0,8 % agaroznem gelu	odstotek odstranjene poškodovane pDNK	končni odstotek sc pDNK	koncentracija proteinov (µg/ ml)	produktivnost (g/l·h)
CIM DEAE	CIM C4 HDL	Pod mejo detekcije	55	98	13	3,78
Fractogel EMD DEAE (M)	Toyopearl butil 650 M	Pod mejo detekcije	70	97	3	0,32
Toyopearl butil 650 M	Fractogel EMD DEAE (M)	Pod mejo detekcije	69	90	4	0,26

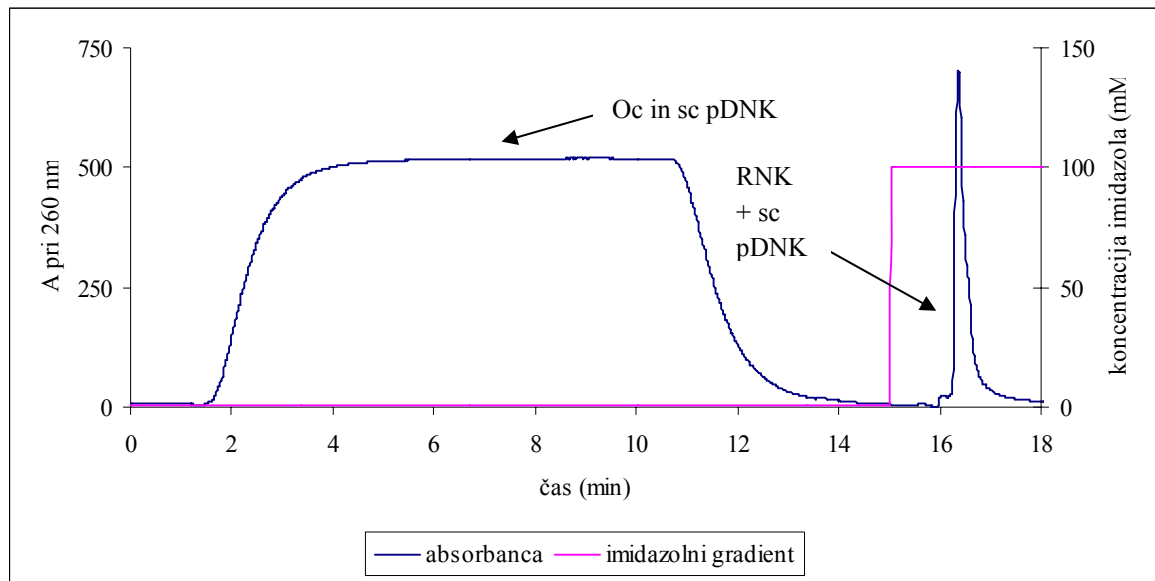
4.4 ČIŠČENJE PLAZMIDNE DNK NA CIM IMAC IDA-Cu²⁺

Testirali smo vezavo čiste genomske in plazmidne DNA (pEGFP-N1 (4,7 kbp) na disku CIM IMAC IDA-Cu²⁺ in ugotovili, da so interakcije med nukleinskimi kislinami in Cu²⁺ odvisne od pretoka (preglednica 6). Pri nižjem pretoku (1 ml/min) se je vezalo 10% več genomske DNA kot pri 4 ml/min. Vendar se je tudi pri nižjem pretoku vezalo samo 15% genomske DNK. Prav tako se je na kolono vezalo 5% plazmidne DNK (preglednica 6). Ta vezava ni selektivna, saj se vežeta superzvita in poškodovana oblika (rezultati niso prikazani).

Preglednica 6: Vezava plazmidne DNK in genomske DNK na CIM IMAC IDA-Cu²⁺. Genomska DNK: 100 µl vzorca gDNK s koncentracijo 5,6 µg/ml smo iniciirali na IMAC disk pri omenjenem pretoku in eluirali z 100 mM imidazolom. Plazmidna DNK: 100 µl vzorca pDNK s koncentracijo 5,5 µg/ml smo iniciirali na IMAC disk pri pretoku 4 ml/min in eluirali s 100 mM imidazolom. Pufri: nanašalni puffer: 20 mM HEPES, 250 mM NaCl, pH 7; elucijski puffer: 20 mM HEPES, 250 mM NaCl, 100 mM imidazol, pH 7.

Vzorec	Pretok (ml/min)	Delež nukleinske kisline, ki se ni vezala na disk (%)	Delež nukleinske kisline, ki smo jo sprali z 100 mM imidazolom (%)
Genomska DNK	1	14,0	14,0
	4	25,9	1,7
Plazmidna DNK	4	72,0	5,5

Dokazali smo učinkovito odstranitev RNK v eluatu plazmida bHNcbrT (4kbp)) s CIM DEAE diska, kjer se je koeluirala RNK (Slika 10). Vendar je pri danih pogojih prišlo tudi do zadrževanja superzvite oblike plazmida na koloni.



Slika 10. Čiščenje pDNA (bHNcbrT (4kbp)) eluata s CIM DEAE diska na CIM IMAC IDA-Cu²⁺. V frakciji je bila prisotna tudi RNK. Vzorec v osnovnem pufu (20 mM HEPES, 250 mM NaCl, pH 7) smo nanašali pri 1 ml/min na IMAC disk. Kar se je vezalo, smo eluirali s 100 mM imidazolom. Vse frakcije smo analizirali z gelsko elektroforezo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Za doseganje visoke kakovosti in čistosti produkta, namenjenega za terapijo, se uporabljajo večstopenjski procesi, ki vključujejo tehnike z visoko ločljivostjo. To je razlog za tako razširjeno uporabo kromatografije kljub nizkim kapacitetam in slabemu masnemu prenosu. Določeni premiki v to smer so bili že narejeni. V diplomskem delu smo se ukvarjali ravno z njimi, in sicer z vidika izboljšanih ali alternativnih stacionarnih faz.

5.1.1 Preverjanje lastnosti kromatografskih nosilcev

Testirali smo različne anionske izmenjevalce ter hidrofobna nosilca. Podatke o veznih, elucijskih pogojih in dinamičnih vezavnih kapacitetah smo dobili iz poskusov s čisto plazmidno DNK. Slednjo smo predhodno očistili v dvostopenjskem procesu čiščenja s CIM monolitnimi nosilci, kot navajajo Smrekar in sod. (2008).

Elucijski diagrami AIEX kolon kažejo na pričakovano razliko v zadrževalnih časih med šibkim (DEAE) in močnim (Q) anionskim izmenjevalcem, saj je vez med slednjim in pDNK močnejša in zato potrebujemo višjo ionsko jakost, da jo prekinemo (slika 3). Razliki v zadrževanih časih Fractogel DEAE in CIM DEAE najverjetneje botruje razlika v strukturi matriksa. Poleg tega se na monolitnem nosilcu ločita oc in sc oblika plazmida (slika 3). Pogoji pri katerih smo preverjali vezavo pDNK, niso bili optimalni za delčne nosilce, ker je za nje značilna odvisnost med hitrostjo pretoka in višinskim ekvivalentom teoretičnega prekata (HETP). Pri visokih linearnih hitrostih je zaradi tega resolucija precej slabša (slika 3). Tega pri monolitih in membranah ni, ker masni prenos snovi temelji na konvekciji in ne na difuziji (Jungbauer in Hahn, 2008). Slednja zahteva čas, ki pa je eden izmed pomembnih dejanikov pri industrijski proizvodnji. Poleg tega ima velik pomen tudi dinamična vezavna kapaciteta (Urthaler in sod., 2005c). Le-ta vsaj za večino izbranih nosilcev ne bi smela biti omejujoč dejavnik. Dejstvo, da je masni prenos časovno odvisen proces pa ostaja v primeru delčnih nosilcev. Opazne razlike v kapaciteti Fractogel kolon pri dveh različnih linearnih hitrostih to tudi potrjujejo (preglednica 3).

Med testiranimi kolonami najdemo tri nosilce, ki jih pogosteje omenjajo v literaturi v povezavi s čiščenjem pDNK. To so: CIM DEAE, MA 75Q ter Fractogel EMD DEAE.

Urthaler in sod. (2005) jih uvrščajo v skupino nosilcev z visoko kapaciteto za plazmide, t.j. 3–9 mg/ml. Znano je, da je slednja odvisna od koncentracije in tipa soli (Teeters in sod., 2004). To je razvidno tudi iz rezultatov v preglednici 2. Pri Fractogel EMD DEAE (M) se je kapaciteta povečevala, če smo napajalni raztopini s plazmidom povečali ionsko jakost. Rezultati kažejo, da se grafitiran delčni nosilec pri osnovnih pogojih (brez soli) obnaša kot neporozen medij za pDNK ($q_{50\%} = 1,6$ mg/ml). Po dodatku 0,4 M NaCl smo opazili skoraj dvakratno povečanje kapacitete ($q_{50\%} = 2,5$ mg/ml). Mehanizem vezave na grafitirane medije še ni popolnoma razložen (Stone in sod., 2007). Višje kapacitete so lahko delno posledica zmanjšanja odbojnih sil med molekulami plazmida ob prisotnosti pozitivno nabitih ionov ter strukturnih sprememb samega nosilca pri povečani ionski jakosti (Tarmann in Jungbauer, 2008). Ena izmed možnih razlag je tudi ta, da dodana sol spremeni mehanizem masnega prenosa, ker nosilec postane bolj propusten za pDNK (Tarmann in Jungbauer, 2008).

V nekaterih dostopnih virih poročajo o kapacitetah, ki so dvakrat večje kot vrednosti, ki smo jih dobili v tem delu, kar je lahko posledica nizke koncentracije plazmida v napajalni raztopini. Odvisnost količine vezanega plazmida od koncentracije topljenca v izhodni raztopini sta opazila tudi Tarmann in Jungbauer (2008). Slednje se močno odraža na nosilcu Fractogel EMD DEAE (M) in precej manj na nosilcu CIM DEAE. Z njihovimi rezultati sovpada tudi 30% znižanje kapacitete monolita ob dodatku NaCl (preglednica 3). Urthaler in sod. (2005c) navajajo kapacitete za Fractogel EMD DEAE nad 5 mg/ml. Razlog za to je lahko tudi velikost delcev, saj so uporabljali t.i. S (20 - 40 μ m) in ne M (40 - 90 μ m) velikost. Če so dimenzije plazmida take, da lahko prodrejo v pore, se bo to poznalo v količini vezanega plazmida. Upoštevati pa je potrebno, da delcev velikosti S ne moremo uporabljati v začetnem koraku čiščenja, ker bi prišlo do pretiranega porasta tlaka, kar bi poškodovalo nosilec. Fractogelu EMD DEAE (M) smo določili tudi kapaciteto z realnim vzorcem (celičnim lizatoma). Preboj je bil dokazan pri 2 mg/ml. O podobnih številkah poročajo tudi Eon – Duval in Burke (2004), četudi niso delali pri enakih pogojih.

MA 75Q membrana je imela visoko kapaciteto, ampak še vedno nižjo od tiste na CIM DEAE koloni (preglednica 3). Syren in sod. (2007) poročajo o podobnih vrednostih za dinamične vezavne kapacitete, kot smo jih določili pri naših poskusih. Od vseh testiranih

kolon je imela le MA 75Q izkoristek pod 94%. Slabi izkoristki so splošna pomanjkljivost membran z močnimi kationskimi ligandi (Teeters in sod., 2004).

Fractogel EMD DMAE (M) ima pri osnovnih pogojih podobno kapaciteto kot Fractogel z DEAE ligandom, ki pa je ostala nespremenjena po dodatku soli.

Poleg NaCl smo testirali tudi učinek amonijevega sulfata na dinamične vezavne kapacitete pri dveh različnih koncentracijah. Kapacitete smo določili na CIM DEAE in Fractogel EMD DEAE. Pri 2,8 M soli se je kapaciteta CIM DEAE sicer zmanjšala, vendar manj kot pri dodatku 0,4 M NaCl. Velik padec smo opazili, ko smo znižali koncentracijo amonijevega sulfata na 1,8 M. Obratno se je zgodilo s kapaciteto Fractogel EMD DEAE: pri 1,8 M smo dobili najvišjo kapaciteto med vsemi testiranimi pogoji. Do podobnega zaključka so prišli tudi Urthaler in sod. (2005b), ki so v optimiziranih pogojih in z dodajanjem amonijevega sulfata dosegli izenačenje kapacitete grafitiranega in monolitnega nosilca. Navajajo vrednost 6,3 mg pDNK/ml in pravijo, da je za ohranitev visoke kapacitete potrebno razredčiti eluat s hidrofobnega nosilca, s katerega so eluirali plazmid pri visoki koncentraciji amonijevega sulfata. Slednje ni bilo potrebno za nanos na CIM DEAE.

Ugotovili smo, da ko na anionski izmenjevalec nanašamo plazmid v raztopini z amonijevim sulfatom, ga moramo po nanosu najprej sprati s pufrom z višjo ionsko jakostjo in šele nato s pufrom brez soli (rezultati niso prikazani). V nasprotnem primeru se plazmid pri spiranju s pufrom brez soli eluira z nosilca. Urthaler in sod. (2005b) ravno tako opisujejo ta pojav, vendar ne ponudijo nobene razlage zanj. Lahko, da so posredni mehanizmi kohidracije, ki botrujejo tudi hidrofobnim interakcijam. Gre za deljenje hidratacijskih lupin nosilca in biopolimera pri visoki koncentraciji soli, saj je to energijsko najbolj ugodno v takih okoliščinah. Možno je tudi, da ima spiranje s soljo vpliv na način vezave plazmida na nosilec.

Vzporedno smo testirali tudi dva hidrofobna nosilca z enakim ligandom: Toyopearl butil 650M in CIM C4 HDL. Poskusi kažejo, da je CIM nosilec močnejši, ker se pDNK eluira pri nižji koncentraciji amonijevega sulfata. Pri danih pogojih ima slednji tudi precej višjo kapaciteto. Na delčnem nosilcu je bilo pri 10% preboja vezano 0,3 mg/ml plazmida. Urthaler in sod. so določili kapaciteto Toyopearl butila 2 g/l. Vzrok zato bo najverjetneje

delo pri drugačnih pogojih, ki imajo velik vpliv na kapaciteto, na primer koncentracija plazmida v vhodnem materialu.

5.1.2 Obarjanje RNK v celičnih lizatih s CaCl_2

Poleg visoke dinamične vezavne kapacitete je pomembna tudi dobra separacija med plazmidno DNK in nečistočami, še posebej v primeru visokomolekularne RNK, ko gre za čiščenje na anionskem izmenjevalcu (Ferreira in sod., 2000). Učinkovito sredstvo za hitro in selektivno obarjanje RNK je CaCl_2 (Eon – Duval in sod., 2003a). V celični lizat smo po nevtralizaciji dodali CaCl_2 v prahu ali alikvot izhodne 5 M raztopine. Obarjanje z reagenti v prahu pripelje do lokalne supersaturacije in neenakomerne precipitacije, vendar pa z dodatkom prahu ne pridobimo dodatnega volumna. Toda dodajanje kemikalij v obliki prahu ni sprejemljivo v dobri proizvodni praksi.

Obarjanje lahko izvedemo takoj po lizi ali pa po tangencialni filtraciji, pri kateri odstranimo precej nečistoč (Eon – Duval in sod., 2003b). Odločili smo se za obarjanje takoj po nevtralizaciji, saj je v tem primeru potrebno lizat bistriti le enkrat.

RNK smo obarjali v območju koncentracij od 0,5 do 1,0 M CaCl_2 , v katerem ne pride do izgube plazmidne DNK (Eon – Duval in sod., 2003a). Delež odstranjene RNK je rasel s povečevanjem koncentracije CaCl_2 v končnem volumnu (slika 4). Drugi parametri, ki vplivajo na obarjanje so čas inkubacije, temperatura, pH in koncentracije plazmidne DNK; nekaterih parametrov ni mogoče nadzorovati, če odstranjujemo RNK v nevtraliziranem lizatu (Eon – Duval, 2003a).

Analiza pDNK, očiščene na DEAE disku je pokazala, da RNK v danih pogojih nikoli ne odstranimo popolnoma. Eon – Duval in sod. (2003a) so odstranili 84,6% RNK pri 1M kalcijevem kloridu v končnem volumnu in 10 minutni inkubaciji na sobni temperaturi. Ko pa so pod enakimi pogoji obarjali RNK v retentatu po tangencialni filtraciji, so dosegli odstranitev, višjo od 99,65%, ker je že TFF odstranil 75% RNK-ja. Dodatna prednost tovrstne precipitacije je tudi odstranjevanje nečistoč, kot so genomska DNK, endotoksini in proteini (Eon – Duval in sod., 2003a). Ugotovili smo, da se je velik delež genomske DNK odstranil že pri 0,5 M CaCl_2 , v celičnem lizatu s plazmidom pEGFP-N1 (4,7 kbp) (slika 4), za razliko od lizata s bHNcbrT (4 kbp), kjer tega nismo dosegli niti pri 1 M

CaCl₂. Čiščenje lizata s plazmidom bHNcbrT (4 kbp) se je izkazalo za precej težavno zaradi visokega razmerja RNK proti pDNK. Popolno ločitev RNK in plazmidne DNK smo lahko dosegli le s kombinacijo obarjanja z 1 M kalcijevim kloridom in uravnavanjem prevodnosti materiala za nanašanje do 40 mS/cm. Prisotnost kloridnih ionov v večjih koncentracijah ima velik vpliv na dinamično vezavno kapaciteto, ker ti tekmujejo z nukleinskimi kislinami za vezavna mesta na nosilcu. Nanašanje pri prenizki ionski jakosti pa pripelje do tega, da se na nosilec veže veliko RNK, ki odvzema mesto pDNK, poleg tega ju je kasneje težje ločiti. To ponazarjajo rezultati določevanja prebojev na CIM DEAE za lizat plazmida bHNcbrT (4kbp), v katerem smo oborili RNK z 1 M CaCl₂ in ga pri dveh različnih prevodnostih naložili na disk. Pri prevodnosti 40 mS/cm je kapaciteta znašala 4 mg/ml. Po dodatku petih volumnov vode (32 mS/cm) istemu vzorcu je kapaciteta narasla na 7 mg/ml. Vendar pa nismo več dosegli popolne separacije med pDNK in RNK.

Rezultati jasno kažejo, da je potrebno poiskati kompromis med danimi dejavniki za optimalen izkoriste procesa. Dejstvo pa je, da ima čistost na industrijskem nivoju velikokrat prednost pred ostalimi dejavniki (Stadler in sod., 2004).

5.1.3 Primerjava procesov za čiščenje plazmidne DNK

V primerjavo smo zajeli tri procese za čiščenje plazmidne DNK. Začeli smo z dvostopenjskim procesom čiščenja na monolitih (Smrekar in sod., 2008), nadaljevali s kombinacijo AIEX kolone Fractogel EMD DEAE (M) v prvem koraku in HIC kolone Toyopearl butil 650M v drugem. Tretji proces smo povzeli po Urthaler in sod. (2005b), kjer gre za čiščenje s hidrofobnim nosilcem Toyopearl butil 650M v prvem koraku, ki mu sledi ionsko izmenjevalna kromatografija na koloni Fractogel EMD DEAE (M).

V lizatu, ki smo ga v prvem koraku čistili na anionskem izmenjevalcu, smo visokomolekularno RNK delno odstranili z 0,7 M CaCl₂ (Eon – Duval in sod., 2003a).

Za čiščenje na hidrofobnem nosilcu je potrebno lizat tretirati z amonijevim sulfatom, da bi dosegli vezne pogoje in delno odstranitev nečistoče (RNK in proteine) (Urthaler in sod., 2005b). Tako smo enemu volumnu lizata dodali 2 volumna 4 M amonijevega sulfata.

Pred nanosom na delčne nosilce smo vzorce desetkrat skoncentrirali s tangencialno filtracijo (TFF). Eon – Duval in sod. (2003b) so opazili, da se pri tem postopku odstranijo

nizkomolekularna RNK in proteini. To je posledično lahko tudi razlaga za to, zakaj je pri procesih na delčnih nosilcih koncentracija proteinov v končnem produktu nekoliko manjša, saj že sam vhodni material vsebuje manj nečistoč in na nosilcu lahko poteče boljša separacija, ker ne naložimo velike količine kontaminantov.

Opazili smo, da je zaradi TFF delež poškodovane pDNK narasel iz 4% na 10% oc v lizatu s CaCl₂. Slednje lahko vpliva na kakovost končnega produkta, če separacija izoform na hidrofobnem nosilcu ni zadostna. Poškodbe plazmida bi bilo mogoče zmanjšati z optimizacijo transmembranskega pritiska, pretoka in velikosti por membrane (Eon – Duval in sod., 2003b).

Nadaljnje čiščenje na hidrofobnih nosilcih je omogočilo separacijo med sc pDNK in oc pDNK v frakcijah, eluiranih iz anionskih nosilcev. Separacija na Toyopearl butil 650M je bila boljša kot na CIM C4 HDL (preglednica 5). Opazili smo, da je separacija na Toyopearl koloni zelo dobra tudi, če je v začetnem materialu nad 30% oc pDNK. Učinkovitost se je ohranila pri separaciji materiala, ki je imel 10% oc. Če primerjamo delež odstranjene poškodovane pDNK v vzorcu s 3,5% oc, očiščenem na testiranih nosilcih, je separacija na delčnem nosilcu še vedno boljša. Velika omejitev Toyopearl butil 650M nosilca je kapaciteta za plazmidno DNK, ki je že tako majhna, če pa smo hoteli doseči boljše separacijo, je bilo potrebno naložiti še manj materiala. O tem poročajo tudi Urthaler in sod. (2005b). To je še posebej pomembno, kadar delamo s precej poškodovanim materialom, tako kot v našem primeru. Zaradi strižnih sil je med procesom izdelave in obdelave prišlo do poškodbe superzvite oblike, ki smo jo sicer v veliki meri odstranili, vendar je bil sc delež v končnem produktu še vedno 90% (preglednica 5). Iz bolj kakovostnega vhodnega materiala bi dobili tudi bolj homogen produkt.

Četudi separacija na CIM C4 HDL ni tako dobra, ima slednji večjo kapaciteto kot Toyopearl butil 650 M, in delo poteka pri višjih pretokih. Poleg tega smo elucijo izvedli s stopenjskim spreminjanjem ionske jakosti pufra (angl. step-wise) in ne v linearnem gradientu, kot pri delčnem nosilcu. Poenostavljanje metode, kadar sta si retenzijska časa topljencev zelo blizu, pomeni, da je potrebno žrtvovati čistost, da bi imeli boljši izkoristek, ali pa znižati slednjega in pridobiti bolj homogen produkt. Pri 95% izkoristku je bil delež superzvite plazmidne DNK v končnem produktu še vedno 98%. To je mogoče tudi zaradi

tega, ker med pripravo lizata in v prvem koraku čiščenja na CIM DEAE koloni ni prišlo do mehanskih stresov, ki bi dodatno poškodovali plazmid. Material, ki smo ga nanegli na hidrofolni nosilec, je bil dejansko zelo dobro ohranjen v primerjavi s tistim po TFF in zato je 55% odstranitev oc pDNK še zmeraj dovolj dobra, da pridobimo produkt odlične kakovosti.

Razlike v koncentraciji proteinov smo pojasnili že pri razlagi TFF postopka. Dejstvo pa je, da vse izmerjene vrednosti sodijo v mejno območje detekcije dane metode (Bradford Ultra). Večinoma se v te namene uporablja BCA test, ki je bolj občutljiv kot metoda po Bradfordu (preglednica 1).

V času predposkusov se je izkazalo, da je nemogoče čistiti plazmidno DNK na vseh nosilcih pod enakimi pogoji. Toda čim večje kot so razlike, tem težje je primerjati procese med sabo. Že velikokrat omenjena priprava materiala za nanašanje je ena izmed takih točk, ki je lahko ključnega pomena za produktivnost procesa. Pri delu z delčnimi nosilci smo se odločili za uporabo TFF zaradi zmanjšanja volumna lizata za nanašanje. Ta korak bi brez koncentriranja trajal na nosilcu Fractogel EMD DEAE (M) pet ali več ur za testirano 1 ml kolono. Bolj smiselno je vključiti tangencialno filtracijo, ki traja približno eno uro in tako skrajšati nanos na kolono na 30 minut. Podobno velja za kolono Toyopearl; tam imamo opravka s še večjimi volumni, saj je potrebno enemu volumnu lizata dodati dva volumna 4 M amonijevega sulfata. V primeru čiščenja na monolitnih nosilcih to ni potrebno, saj so pretoki bistveno višji in delo poteka hitreje. TFF bi bilo morda smiselno izvesti v primeru, da bi bilo potrebno lizat zaradi visoke prevodnosti izdatno redčiti, kar bi pomenilo precej daljše nanašanje na kolono in bi se koncentriranje časovno izplačalo. Poleg tega bi bil vhodni material bolj čist in v optimiziranih pogojih nepoškodovan, kar ima lahko vpliv na končno kakovost produkta. Majhne volumne lahko bolj redčimo in tako dosežemo višje kapacitete. Dejstvo pa je, da bi morale biti v vhodnem materialu relativno malo RNK, sicer separacija ne bi bila popolna. Če se odločimo za TFF, moramo upoštevati, da sta membrana in sistem dodaten strošek v procesu.

5.1.3.1 Vrednotenje procesov čiščenja

Proces ovrednotimo z izračunom produktivnosti, ki pridobi na pomenu pri proizvodnji v večjem merilu. Med izbranimi parametri sta imela največji vpliv dinamična vezavna

kapaciteta in čas, potreben za koncentriranje in izvedbo separacije. Monolitni nosilci so s tega vidika daleč najboljši, ker ohranjajo kvaliteto separacije in visoko kapaciteto pri višjih pretokih. Delčni nosilci zahtevajo čas, ki je potreben za zadosten masni prenos. Delo pri nizkih pretokih preprečuje tudi poškodbe delcev, ki nastanejo pri porastu pritiska zaradi visoke viskoznosti vzorcev. Po drugi strani pa delčne nosilce - za razliko od monolitov - uporabnik sam napolni v kolone z dimenzijami, ki ustrezajo njegovim potrebam.

Razlike v produktivnostih, ki smo jih izračunali na podlagi parametrov iz naših procesov, so tudi posledica dela pri neoptimalnih pogojih za dane delčne nosilce. To je zelo opazno pri čiščenju na Toyopearl butil 650M, saj smo pri enem čiščenju dobili precej manj plazmida kot Urthaler in sod. (2005b), ki so proces optimizirali in dosegli višje kapacitete brez izgube selektivnosti. V nasprotju s tem je čiščenje na monolitnih nosilcih daleč najboljše, ker so bili znani optimalni pogoji in metode, ki so se odrazili tudi pri izračunu produktivnosti, petnajstkrat večji od tiste pri procesu s HIC v prvem koraku in desetkrat večji od tiste za čiščenje na delčnem nosilcu z isto metodo. Pri optimalnih pogojih bi določena razlika v produktivnosti monolitov in delčnih nosilcev najverjetneje ostala. Urthaler in sod. (2005c) na podlagi svojih poskusov poročajo o petnajstkrat večji produktivnosti CIM kolon v primerjavi z delčnimi nosilci. Dokazali so, da bi razlika ostala kljub enaki kapaciteti nosilcev, ker je separacija na monolitih bistveno hitreje opravljena.

5.1.3.2 Čiščenje plazmidne DNK na CIM IMAC IDA-Cu²

Ena izmed alternativnih tehnik za čiščenje plazmidne DNK v drugem koraku je kovinsko – kelatna afinitetna kromatografija. Preverili smo, če se genomska DNK veže na CIM IDA-Cu²⁺. Določen delež se v odvisnosti od pretoka zadrži na koloni (preglednica 6); enako se zgodi s plazmidom, ne glede na stopnjo poškodovanosti. Murphy in sod. poročajo o selektivni separaciji med oc in sc pDNK na delčnih IMAC kolonah. Na iste kolone se genomska DNK ni vezala, ker je dvoverižna molekula brez izpostavljenih baz, ki bi se lahko vezale na Cu²⁺ (Cano in sod., 2005). To je mogoče le, če verigo gDNK denaturiramo (Cano in sod., 2005). Tan in sod. (2007) tako kot že omenjena avtorja poročajo o učinkoviti separaciji med pDNK in RNK, ne pa tudi o povečanju homogenosti končnega produkta. Tudi mi smo dobili enak rezultat pri čiščenju pDNK eluata z AIEK kolone, kjer je bila prisotna RNK. Slednjo smo v pDNK frakciji znižali pod mejo detekcije na 0,8%

agaroznem gelu, vendar smo v eluatu, dobljenem pri eluciji s 100 mM imidazolom, zaznali superzvito pDNK. Te pomanjkljivosti ni mogoče tolerirati pri procesnem čiščenju pDNK, saj je edina prednost CIM IMAC kolon le v tem, da učinkovito vežejo RNK. Slednje pa lahko dosežemo tudi z drugimi tehnikami (hidrofobna), poleg tega pa na njih dosežemo še separacijo med oc in sc pDNK. V primeru dodatnih pridobitev z uporabo določene kolone lažje toleriramo morebitne pomanjkljivosti. NA CIM IMAC kolonah bi optimizacija dejavnikov, kot so tip liganda, kovinskega iona, pH in koncentracije kompetitivnega eluata, morda prinesla boljše rezultate.

5.2 SKLEPI

Koncentracija in tip soli vplivata na dinamično vezavno kapaciteto izbranih anionskih izmenjevalcev. Dinamična vezavna kapaciteta nosilca Fractogel EMD DEAE (M) se je dvakrat povečala, ko smo dodali NaCl, in je še naprej naraščala z dodajanjem amonijevega sulfata. Največja je bila pri dodatku 1,8 M amonijevega sulfata. Obratno je veljalo za monolitni nosilec CIM DEAE. Ta je imel največjo kapaciteto med vsemi preverjenimi nosilci; vrednost kapacitete je bila 8,7 mg/ml v pufru brez soli.

Za visoko dinamično vezavno kapaciteto in ohranjanje dobre selektivnosti med pDNK in RNK je potrebno optimizirati pripravo vzorca in proces čiščenja na kromatografskih nosilcih. Obarjanje RNK s CaCl_2 je učinkovita metoda za odstranjevanje visokomolekularne RNK, genske DNK in proteinov. Pri obarjanju 1 M CaCl_2 smo odstranili več RNK kot pri 0,5 M CaCl_2 . Vendar smo morali lizat tudi bolj redčiti zaradi večje koncentracije kloridnih ionov, ki tekmujejo za vezavo na nosilec z nukleinskimi kislinami. Pri nanašanju vzorca pri visoki ionski jakosti je bila kapaciteta nižja; pri nizki ionski jakosti pa smo izgubili sposobnost učinkovite ločitve med RNK in pDNK.

Na CIM IDA- Cu^{2+} smo lahko ločili RNK in plazmidno DNK. Ločitev med superzvito in poškodovano obliko ni bila možna brez izgube določenega dela superzvite pDNK.

Pričakovano najboljša je produktivnost monolitnih nosilcev, saj imajo visoke dinamične vezavne kapacitete in omogočajo delo pri visokih pretokih.

6 POVZETEK

Zahteve po učinkovitih procesih za proizvodnjo plazmidne DNK so se v zadnjih letih povečale zaradi naglega razvoja genskega zdravljenja, ki temelji na pDNK. Da bi bila terapija zares uspešna, je potrebno razviti ekonomičen in širše uporaben proces čiščenja plazmidov. Kromatografske tehnike so za zagotavljanje kakovosti končnega produkta ključnega pomena. V diplomskem delu smo primerjali štiri različne anionske izmenjevalce: membrano M 75Q, Fractogel EMD DEAE (M), Fractogel EMD DMAE in CIM DEAE. Določali smo njihove dinamične vezavne kapacitete za pDNK v prisotnosti amonijevega sulfata in NaCl pri različnih koncentracijah. Kapaciteta kolone Fractogel EMD DEAE (M) se je ob dodatku soli povečala, pri 1,8 M amonijevem sulfatu je bila največja: 3,8 mg/ml. Najvišjo kapaciteto med vsemi je imel nosilec CIM DEAE: 8,7 mg/ml v mediju brez soli.

Obarjanje s kalcijevim kloridom robustno in ponovljivo odstrani večino visokomolekularne RNK in delno tudi ostale nečistoče (Eon – Duval in sod., 2003). Vzorec je pred nanosom na anionski izmenjevalec potrebno redčiti, zato da dosežemo vezne pogoje za pDNK in da ohranimo visoke dinamične vezavne kapacitete.

Za doseganje čistosti, ki ustreza predpisom, je potrebno v čiščenje vključiti vsaj dve različni kromatografski tehniki (anionsko izmenjevalno, hidrofobno itd.) v kombinaciji z učinkovito pripravo vzorcev. Z obarjanjem RNK v celičnem lizatu z 0,7 CaCl₂ in nanosom pri 35 oz. 37 mS/cm, smo lahko ločili preostalo RNK in pDNK na anionskih izmenjevalcih. V nadaljnjem koraku smo čistost in odstotek superzvite pDNK izboljšali na hidrofobnih nosilcih. Ko metodo razvijamo ali jo prenašamo v večje merilo, moramo imeti pred očmi tudi ekonomski vidik. Tako je produktivnost ključnega pomena pri industrijskih procesih. Dejstva, ki so povezana s posameznim tipom nosilca (stacionarna faza, dizajn, ligand, hidrodinamske lastnosti itd.) imajo močan vpliv nanjo. Produktivnost je rezultat vseh procesnih dejavnikov in odnosov med njimi. Na ta način ovrednotimo procese in jih med seboj lažje primerjamo. Z dvostopenjski procesom na nosilcu CIM DEAE in CIM C4 lahko v eni uri očistimo 3,78 g plazmidne DNK na 1 l koloni. Proces, izvedena na delčnih nosilcih, imata bistveno slabši produktivnosti zaradi nižjih kapacitet in dela pri nizkih pretokih, kar pomeni daljši proces.

Kromatografska tehnika IMAC se je izkazala kot neprimerna za čiščenje plazmidne DNK v testiranih pogojih.

7 VIRI

Bal W., Kozłowski H., Kasprzak K.S. 2000. Molecular models in nickel carcinogenesis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 79, 1-4: 213 - 218

Barut M., Podgornik A., Urbas L., Gabor B., Brne P., Vidič J., Plevčak S., Štrancar A. 2008. Methacrylate-based short monolithic columns: Enabling tools for rapid and efficient analyses of biomolecules and nanoparticles. *Journal of Separation Science*, 31, 11: 1867 - 1880

Bates A.D., Maxwell A. 2005. *DNA topology*. 2nd ed. New York, Oxford University Press : 198 str.

Benčina M., Podgornik A., Štrancar A. 2004. Characterization of methacrylate monoliths for purification of DNA molecules. *Journal of Separation Science*, 27, 10-11: 801 - 10

Birnboim H.C., Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7: 1513 - 1523

Branovič K., Forcic D., Ivancic J., A., Barut M., Kosutic Gulija T., Zgorelec R., Mazuran R. 2004. Application of short monolithic columns for fast purification of plasmid DNA. *Journal of Chromatography B*, 801: 331–337

Cano T., Murphy J.C., Fox G.E., Willson R.C. 2005. Separation of genomic DNA from plasmid DNA by selective renaturation with immobilized metal affinity capture. *Biotechnology Progress*, 21, 5: 1472 - 1477

Diogo M.M., Queiroz J.A., Monteiro G.A., Martins S.A.M., Ferreira G.N.P., Prazeres D.M.F. 2000. Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 5: 576 – 583

Diogo M.M., Queiroz J.A., Prazeres D.M.F. 2005. Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*, 1069: 3 – 22

Diogo M.M., Queiroz M.M., Monteiro G.A., Prazeres D.M.F. 1999. Separation and analysis of plasmid denatured forms using hydrophobic interaction chromatography. *Analytical Biochemistry*, 275: 122–124

Eon – Duval A., Burke G. 2004. Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion exchange chromatography in an Rnase-free process. *Journal of Chromatography B*, 804: 327 – 335

Eon – Duval A., Gumps K., Ellett C. 2003a. Precipitation of RNA impurities with high salt in a plasmid DNA purification process: Use of experimental design to determine reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 83, 5: 544 - 553

Eon – Duval A., MacDuff R.H., Fisher C.A., Mark J.H., Brook C. 2003b. Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an Rnase-free plasmid DNA purification process. *Analytical Biochemistry*, 316: 66 – 73

FDA. 2007. Guidance for industry considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. Rockville, FDA - Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/ucm091968.pdf> (september 2009): 19 str.

Ferreira G.N.M., Monteiro G.A., Prazeres D.M.F., Cabral J.M.S. 2000. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends in Biotechnology*, 18, 9: 380 – 388

Forčič D., Branovic Cakanic K., Ivancic J., Jug R., Barut M., Strancar A., Mazuran R. 2005. Chromatographic detection of residual cellular DNA on short monolithic columns. *Analytical Biochemistry*, 336: 273 – 278

Frankovič V., Podgornik A., Lendero Kranjc N., Smrekar F., Kranjc P., Štrancar A. 2008. Characterisation of grafted weak anion-exchange methacrylate monoliths. *Journal of Chromatography A*, 1207: 84 – 93

Gaberc – Porekar V., Menart V. 2001. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 1-3: 335 - 360

Gagnon P. 1996. Purification tools for monoclonal antibodies. 1st ed. Tucson, Validated Biosystems Inc: 254 str.

Gustavsson P-E., Lemmens R., Nyhammar T., Busson P., Larsson P-O. 2004. Purification of plasmid DNA with a new type of anion-exchange beads having a non-charged surface. *Journal of Chromatography A*, 1038, 1 – 2: 131 – 140

Huber H., Buchinger W., Diewok J., Ganja R., Keller D., Urthaler J., Necina R. 2008. Industrial manufacturing of plasmid DNA. *Genetic Engineering and Biotechnology News*, 28, 4: 44 – 45

Jungbauer A. 2005. Chromatographic media for bioseparation. *Journal of Chromatography A*, 1065: 3 – 12

Jungbauer A., Hahn R. 2008. Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies. *Journal of Chromatography A*, 1184: 62 – 79

Kollasa E.M. 2002. Economic considerations in medical biotechnology. V: *Pharmaceutical biotechnology*. Crommelin D. J. A., Sindelar R. D. (eds.). London, Routledge: 53 - 71

Levy M.S., O’Kennedy R.D., Ayazi-Shamlou P., Dunnill P. 2000. Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA. *Trends in Biotechnology*, 18, 7: 296 – 305

Li Y., Dong X-Y., Sun Y. 2005. High speed chromatographic purification of plasmid DNA with customized biporous hydrophobic adsorbent. *Biochemical Engineering Journal*, 27: 33 – 39

Meyers J.A., Sanchez D., Elwell L.P., Falkow S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 127, 3: 1529 – 1537

Min C., Verdine G. 1996. Immobilized metal affinity chromatography of DNA. *Nucleic Acid Research*, 24, 19: 3806 – 3810

Murphy J.C., Jewell D.L., White K.I., Fox G.E., Willson R.C. 2003. Nucleic acid separations utilizing immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnology Progress*, 19: 982 – 98

Murphy J.C., Wibbenmeyer J.A., Fox G.E., Willson R.C. 1999. Purification of plasmid DNA using selective precipitation by compaction agents. *Nature Biotechnology*, 17: 822 - 823

Peterka M., Banjac M., Podgornik A., Štrancar A. 2004. RNase free purification of plasmid DNA by CIM columns. V: ISPPP 2004, International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides, October 19-22, 2004, Aachen, Germany. Frankfurt am Main, Dechema: 59 - 59

Podgornik A., Jančar J., Merhar M., Kozamernik S., Glover D., Čuček K., Barut M., Štrancar A. 2004. Large-scale methacrylate monolithic columns: Design and properties. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 60: 179–189

Prather K.J., Sagar S., Murphy J., Chartrain M. 2003. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 7: 865 - 883

Prazeres D.M.F., Diogo M.M., Queiroz J.A. 2000. Purification of plasmid DNA by hydrophobic interaction chromatography. US Patent 7169917: 14 str.

Prazeres D.M.F., Ferreira G.N.M., Monteiro G.A., Cooney C.L., Cabral J.M.S. 1999. Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: Problems and bottlenecks. *Trends in Biotechnology*, 17, 4: 169-174

Roper D.K., Lightfoot E.N. 1995. Chromatography of biomolecules using adsorptive membranes. *Journal of Chromatography A*, 702: 3 – 26

Sandberg L. M., Bjurling Å., Busson P., Vasi J., Lemmens R. 2003. Thiophilic interaction chromatography for supercoiled plasmid DNA purification. *Journal of Biotechnology*, 109: 193 - 199

Sauer M.-L., Kollars B., Geraets R., Sutton F. 2008. Sequential CaCl₂, polyethylene glycol precipitation for RNase-free plasmid DNA isolation. *Analytical Biochemistry*, 380: 310 – 314

Smrekar F., Podgornik A., Peterka M. 2008. A platform for purifying pharmaceutical-grade plasmid DNA using CIM[®] monolithic columns. *BioProcess International*, 6,7: 86 – 87

Sousa F., Prazeres M.F.D., Queiroz J.A. 2008. Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends in Biotechnology*, 26, 9: 518 - 525

Stadler J., Lemmens R., Nyhammar T. 2004. Plasmid DNA purification. *Journal of Gene Medicine*, 6, Suppl. 1: S54 – S56

Stone M.C., Carta G. 2007. Protein adsorption and transport in agarose and dextran-grafted agarose media for ion exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1146, 2: 202 - 15

Syren P.-O., Rozkov A., Schmindt S.R., Strömberg P. 2007. Milligram scale parallel purification of plasmid DNA using anion-exchange membrane capsules and a multi-channel peristaltic pump. *Journal of Chromatography B*, 856: 68 – 74

Štrancar A., Podgornik A., Barut M., Necina R. 2002. Short monolithic columns as stationary phases for biochromatography. V: *Modern advances in chromatography*. Freitag R. (ed.), Berlin, Springer: 49 – 85

Tan L., Kim D.-S., Yoo I.-K., Choe W.-S. 2007. Harnessing metal ion affinity for the purification of plasmid DNA. *Chemical Engineering Science*, 62: 5809 – 5820

Tarmann C., Jungbauer A. 2008. Adsorption of plasmid DNA on anion exchange chromatography media. *Journal of Separation Science*, 31: 2605 – 2618

Teeters M. A., Conrardy S. E., Thomas B. L., Root T. W. , Lightfoo E. N. 2003. Adsorptive membrane chromatography for purification of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*, 989, 1: 165 – 173

Teeters M.A. , Root T.W., Lightfoot E.N. 2004. Adsorption and desorption behavior of plasmid DNA on ion-exchange membranes: Effect of salt valence and compaction agents. *Journal of Chromatography A*, 1036, 1: 73 - 78

Urthaler J., Buchinger W., Necina R. 2005a. Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy. *Acta Biochimica Polonica*, 52, 3: 703 – 711

Urthaler J., Buchinger W., Necina R. 2005b. Industrial scale cGMP purification of pharmaceutical grade plasmid-DNA. *Chemical Engineering and Technology*, 28, 11: 1408 – 1420

Urthaler J., Schlegel R., Podgornik A., Strancar A., Jungbauer A., Necina R. 2005c. Application of monoliths for plasmid DNA purification: Development and transfer to production. *Journal of Chromatography A*, 1065: 93 – 106

Vasquez R., Brito J.E., Perez M., Silva R., Seralena A., Dueñas – Carrera S., Frontela M.C., Herrera A.M. 2005. Plasmid DNA production for gene therapy and therapeutic or preventive vaccination in humans: a challenge for the pharmaceutical industry. *Biotechnologia Aplicada*, 22: 251–255

Voss C. 2008. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and genetic vaccination. *Chemical Engineering & Technology*, 31, 6: 858–863

Xie T.D., Sun L., Zhao H.G., Fuchs J.A., Tsong T.Y. 1992. Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection. IV. Effects of DNA topology on cell uptake and transfection efficiency. *Biophysical Journal*, 63, 4: 1026–1031

Yamamoto S., Kita A. 2006. Rational design calculation method for stepwise elution chromatography of proteins. *Food and Bioproducts Processing*, 84, C1: 72 – 77

ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorju dr. Matjažu Peterki za strokovno vodstvo, pomoč in usmerjanje pri eksperimentalnem delu ter izdelavi diplomskega dela.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina in recenzentu doc. dr. Blažu Cigiću za strokovne popravke diplomskega dela.

Hvala Franciju Smrekarju, ki mi je s koristnimi nasveti velikokrat priskočil na pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela in ostalim neimenovanim, ki ste mi kakorkoli pomagali.

Hvala tudi Simoni Janež za razumevanje, lektoriranje in pomoč pri oblikovanju diplomskega dela.