

1 PENDAHULUAN

Dalam dua dekade terakhir, pemurnian molekul DNA plasmid (pDNA) menjadi prosedur rutin di lingkungan laboratorium maupun industri. Pertama, pengenalan dan perkembangan teknologi DNA rekombinan sebagai alat biologi molekuler umum meningkatkan kebutuhan akan protokol skala laboratorium untuk isolasi pDNA. Pengembangan paling akhir dalam pendekatan terapeutik (pengobatan), seperti vaksinasi DNA dan terapi gen telah mendorong pengembangan proses pemurnian pDNA skala besar. Singkatnya, vaksin DNA berdasarkan gen dapat mempertahankan imunitas terhadap musuh besar seperti malaria, dimana terapi gen berperan dalam mengenalkan satu atau lebih fungsi gen untuk pencegahan, penentuan, atau perawatan kerusakan genetik, seperti *fibrosis cystic*, atau penyakit seperti kanker dan AIDS. Meskipun gen terapeutik dapat ditransfer melalui beberapa jenis vektor virus, vektor pDNA telah dipertimbangkan karena lebih aman, sederhana untuk digunakan dan lebih mudah diproduksi pada skala besar. Konsekuensi penggunaan vektor pDNA dalam terapi klinis dan preklinis meningkatkan kebutuhan pDNA dengan kemurnian tinggi dengan grade farmasi.

1.1 Karakteristik Fisika dan Kimia pDNA

Plasmid adalah molekul DNA *double stranded*. Untuk aplikasi terapeutik, dapat mengandung gen manusia atau non manusia, dan berukuran sangat besar ($M_r > 10^6$) jika dibandingkan dengan protein. Masing-masing untai molekul pDNA adalah polimer linier dari asam deoksiribonukleat dihubungkan dengan ikatan fosfodiester. Gugus fosfat bermuatan negatif pada $pH > 4$. Untai anti paralel DNA membentuk struktur *double helix* yang distabilkan dengan ikatan hidrogen Watson-Crick antara pasangan basa AT dan GC, dan gaya pengikat. Di bagian dalam heliks bersifat sangat hidrofobik, berisi basa-basa aromatik. Axis heliks pDNA dapat juga membentuk coil, yaitu membentuk molekul pDNA supercoiled (SC). Fraksi populasi molekul pDNA dapat pula berada dalam bentuk non supercoil atau bentuk *open circular* (OC). Varian yang lain yaitu linier, pDNA terdenaturasi atau oligomerik dapat pula ditemukan dalam lisat sel. Bentuk linier dihasilkan dari pemutusan kimia atau enzimatik dari ikatan fosfodiester dalam untai

DNA, bentuk terdenaturasi menggambarkan konformasi dimana ikatan hidrogen antara untai yang komplementer pada lokasi tertentu telah rusak, dan oligomer adalah akibat dari rekombinasi homolog.

1.2. Biosintesis dan Isolasi

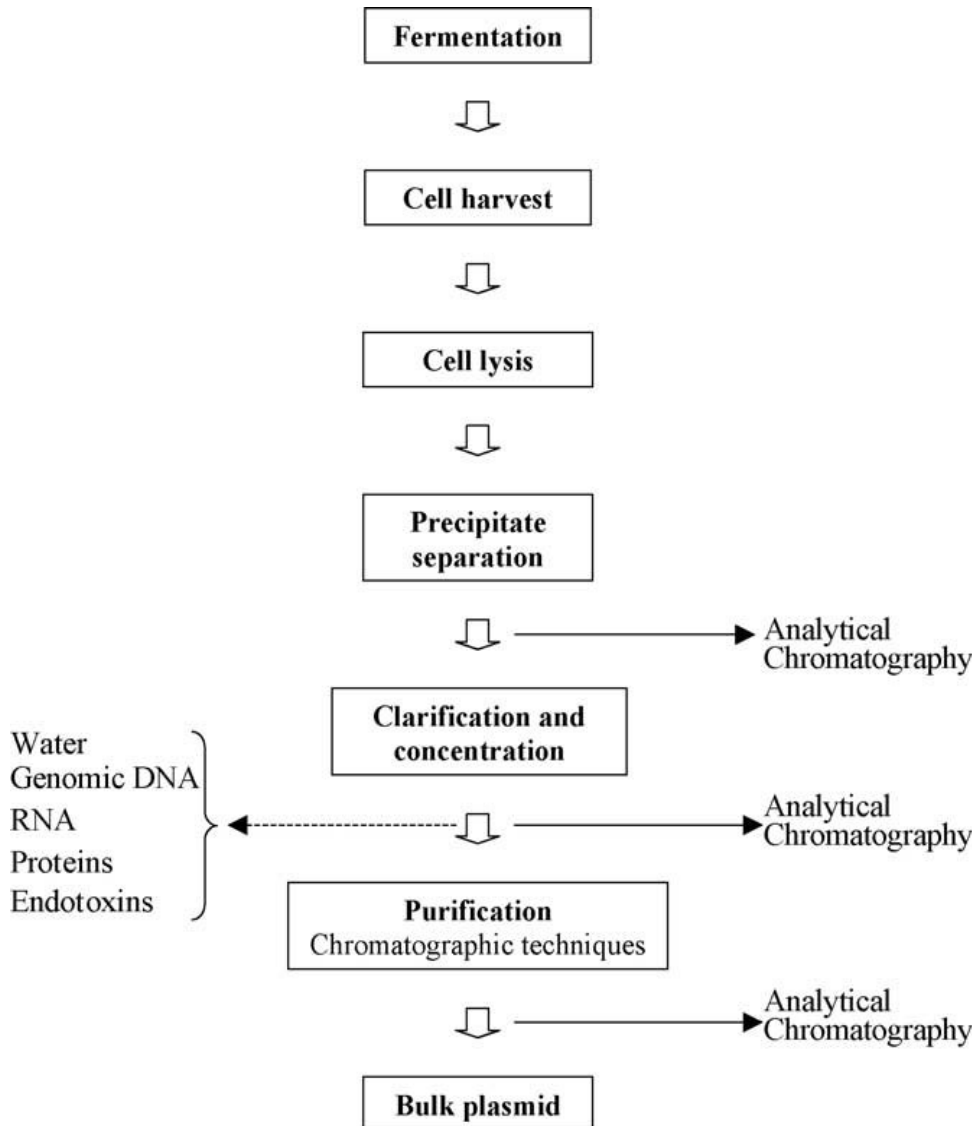
Plasmid dibiosintesis secara replikasi otomatis dalam *Escherichia coli*, suatu bakteri yang aman digunakan dalam bio-industri sebagai produser beberapa protein rekombinan. Meskipun beberapa teknik dapat digunakan untuk merusak sel *E. coli*, untuk melepaskan molekul pDNA (<1% massa sel kering), metode yang paling banyak digunakan adalah lisis basa. Lisis basa adalah perusakan sel pada pH tinggi dengan NaOH dan SDS, diikuti dengan pelepasan dan denaturasi DNA genomik (gDNA), material dinding sel, dan kebanyakan protein seluler. Meskipun pDNA SC juga terpengaruh karena rusaknya ikatan hidrogen akibat promosi basa, jika pH dijaga di bawah 12,5, pasangan basa terjaga dari pemisahan sempurna untai komplementer. Basa-basa berperan sebagai *nuclei* untuk renaturasi sempurna molekul pDNA selama tahap netralisasi [10]. Jika lisis sel dilakukan pada pH di atas 12,5, atau jika pH ekstrim dalam larutan, pasangan basa plasmid dapat lepas dan terjadi denaturasi, membentuk pDNA *single stranded*. Setelah tahap lisis, larutan dinetralisasi dengan kalium asetat, yang mengendapkan SDS bersama-sama dengan gDNA terdenaturasi dan debris seluler. Pengerjaan berbeda dapat menghilangkan material tidak larut ini, sedangkan mayoritas pDNA tinggal dalam supernatan. Selama manipulasi, harus dijaga supaya tidak terjadi pemutusan gDNA membentuk fragmen-fragmen kecil yang tidak akan membentuk agregat. Hasil klarifikasi lisat alkali biasanya mengandung protein, RNA, lipopolisakarida (LPS), fragmen gDNA, dan kurang dari 1% (b/b) pDNA.

Recovery dan pemurnian molekul pDNA dari lisat sel melibatkan beberapa teknik. Para ahli biologi molekuler mengembangkan metode skala lab dengan ultrasentrifugasi atau ekstraksi pelarut [11]. Beberapa protokol biasa menggunakan reagen-reagen seperti fenol, ethidium bromida, CsCl atau enzim-enzim dari hewan, yang tidak cocok untuk pembuatan terapeutik [12]. Kelemahannya lagi, kapasitas yang terbatas, recovery rendah, dan biaya yang mahal. Dalam konteks ini bahwa LC berdiri sebagai teknik pemurnian sentral, untuk skala lab dan skala proses.

2. PERANAN KROMATOGRAFI DALAM PEMURNIAN pDNA

2.1. Pendahuluan

Kromatografi cairan (LC) merupakan bagian penting dalam pembuatan skala proses pDNA terapeutik (Gambar 1).



Gambar 1. Peranan kromatografi dalam skala proses pembuatan pDNA terapeutik.

Keseluruhan proses harus menghasilkan produk pDNA, dengan kualitas spesifikasi terkontrol seperti oleh *Food and Drug Administration* (FDA) dan *European Agency for the Evaluation of Medical Products* (EMA)[4]. Produk pDNA harus bebas dari gDNA inang ($<0.05 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ pDNA), protein inang (tidak terdeteksi), RNA(tidak terdeteksi) dan endotoxin ($<0.1 \text{ EU}/\mu\text{g}$ pDNA) [4]. Selain itu, lebih dari 90% pDNA harus SC, karena bentuk ini adalah dianggap yang paling efektif pada transfer ekspresi gen dibanding bentuk yang lain [4,5]. Untuk menghilangkan endotoxin sangat penting, karena komponen LPS dari dinding sel *E. coli* [13] dapat memproduksi sindrom toksik dalam jumlah tertentu [13]. Selanjutnya endotoxin dapat mengurangi efisiensi transfeksi dalam beberapa sel dan memberi efek *cytotoxic* pada sel mamalia [13].

Meskipun percobaan telah melibatkan kromatografi setelah lisis, umumnya dilakukan juga setelah ketidak murnian dikurangi dengan pengerjaan klarifikasi dan pemekatan berurutan (Gambar 1) [14]. Peranan kromatografi adalah menghilangkan komponen sel seluler (RNA, protein, fragmen gDNA, endotoxin) dan varian pDNA non-SC, yang sebenarnya tidak mungkin untuk dihilangkan dengan pengerjaan lain (Gambar 1) [4]. Metode kromatografi seperti *size-exclusion* (SEC), *anion-exchange* (AEC), *hydrophobic interaction* (HIC), *reversed-phase* (RPLC), *ion-pair reversed phase* (RPIPC), *thiophilic adsorption* (TAC) dan *affinity* (AC) telah diintegrasikan, secara tunggal atau kombinasi, ditunjukkan pada Tabel 1[12].

LC juga sangat berperan sebagai *tool* analitik untuk memonitor pembuatan dan kontrol kualitas pDNA selama proses dan formulasi akhir (Gambar 1). Jenis analisis ini merupakan dasar untuk menjamin produksi dari produk tetap dengan spesifikasi yang diharapkan [15]. Jika tujuannya adalah memurnikan pDNA pada skala lab untuk aplikasi biologi molekuler secara umum, adalah mungkin untuk memilih antara sejumlah kolom kromatografi *gravity-flow* atau "*spin*" *disposable* yang dijual di pasaran [25]. *Throughput* tinggi dan protokol automasi serta prosedur yang menggunakan kolom-kolom *cartridge* juga dapat diperoleh, dengan proses *multiple samples* dengan minimalisasi preparasi biasa dan mengurangi resiko tercampurnya sampel [26].

Tabel 1 . Penggunaan kromatografi dalam proses pembuatan pDNA terapeutik

Proses	Keterangan	Referensi
I	Isopropanol pp Ammonium acetate pp Polyethylene glycol-8000 pp SEC	[16,17]
II	Ethanol pp RNase digestion Bag Filtration EB AEC	[18]
III	Isopropanol pp Ammonium acetate pp Isopropanol pp RPIPC	[19]
IV	Isopropanol pp Ammonium sulphate pp HIC Dialysis	[20]
V	RNase digestion Diafiltration AEC RPLC	[21]
VI	RNase digestion AEC 1 AEC 2 HIC	[22]
VII	CaCl ₂ pp AEC 1 AEC 2	[23]
VIII	Conditioning with 2M (NH ₄) ₂ SO ₄ SEC TC AEC	[24]

Singkatan: pp, precipitation; SEC, size-exclusion chromatography; EBAEC, expanded bed anion-exchange chromatography; RPLC, reversed phase chromatography; RPIPC, ion-pair reversed-phase chromatography; HIC, hydrophobic interaction chromatography; TAC, thiophilic adsorption chromatography.

2.2. Keterbatasan Kromatografi pDNA dan Kemungkinan Pemecahannya

Pemisahan dan pemurnian pDNA secara kromatografi berhadapan dengan sejumlah keterbatasan (Tabel 2), yang berkaitan dengan sifat struktur fasa diam, molekul pDNA yang terlibat dan campuran pengotor.

Tabel 2 Keterbatasan kromatografi pDNA dan kemungkinan pemecahan

Spesifisitas pemisahan pDNA dan keterbatasannya	Pemecahan
<p>Kemiripan sifat fisika dan kimia antara pDNA dan pengotor</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kurangnya selektivitas terhadap kompetisi - Ko-elusi pengotor dalam pDNA 	<p>Mengurangi pengotor, sebelum kromatografi</p>
<p>Viskositas tinggi larutan sampel</p> <ul style="list-style-type: none"> - Peningkatan dalam tekanan - Kec. alir linier dan <i>throughput</i> rendah 	<p>Menghindari bead kecil Dilute feed streams Penggunaan <i>expanded bed</i></p>
<p>Ukuran pDNA besar, Ukuran besar RNA Mr tinggi, ukuran pori kecil</p> <ul style="list-style-type: none"> - Koefisien difusi kecil dan transfer massa internal kurang - Puncak melebar, recovery rendah - kecepatan alir kecil, waktu pemisahan lama - Kapasitas pDNA kuran, kurang aksesibilitas 	<p>Pemadatan pDNA Menurunkan ukuran bead Gunakan bead dg “superpores” atau “tentacles” Gunakan format, seperti lapisan membran dan monolith Pre-digestion RNA Mr tinggi dg RNase Gunakan fasa diam micropellicular</p>

Rendahnya selektivitas dan ko-elusi adalah masalah secara langsung dari kemiripan sifat fisika dan kimia antara pDNA dan pengotor (Tabel 3). Masalah ini dapat diatasi dengan mengurangi pengotor sebelum kromatografi, atau menggunakan sejumlah pengerjaan (Tabel 4). Proses kromatografi dapat dipilih. Mr pDNA yang tinggi dan

pengotor asam nukleat (Tabel 3) menyebabkan viskositas larutan yang tinggi dengan kandungan beberapa solut [39]. Viskositas lisat basa dapat mencapai 15–60 MPa, bergantung pada kecepatan penghancuran [40]. Untuk kromatografi yang dilakukan pada mode packed bed konvensional, viskositas tinggi dapat diubah menjadi tekanan tinggi, konsekuensinya, diperoleh rentang linear kecepatan alir dan throughput yang terbatas.

Masalah ini dapat dikurangi dengan pelarutan feed process, dengan menghindari penggunaan partikel kromatografi dengan diameter kecil atau dengan melakukan kromatografi dalam mode bed yang diperluas. Koefisien difusi dari pDNA dalam larutan lebih rendah dibandingkan dengan protein [41], karena bukan hanya perbedaan massa tetapi juga perbedaan size dan struktur.

Tabel 3. Karakterisasi asam nukleat dan komponen lain dalam sel *E. coli* [27]

Species	Sspesies/sel berbeda	Mr rata-rata $\times 10^{-3}$	Pengamatan
Air	1	0,018	-
Asam nukleat			
Genomic DNA	1 ^a	2.8×10^6	Polianionik, terfragmentasi tinggi, <i>single/double stranded</i>
Transfer RNA	40	28	Polianionik, <i>single stranded</i>
Ribosomal RNA	3	500–1000	Polianionik, <i>single stranded</i>
Messenger RNA	400–800	660–90	Polianionik, <i>single stranded</i>
Plasmid DNA	1	3300^b	Polianionik, <i>double stranded</i> , isoforms padat
Protein	1100	8–200	Anionik, kationik, netral, hidrofobik, hidrofilik
Endotoxin		10	Anionik, bagian lipid
Molekul kecil dan ion	800–2000	<1	–

^a Pertumbuhan cepat sel *E. coli* memiliki rata-rata 4 molekul gDNA.

^b Molekul pDNA dengan rata-rata 5 kb dipertimbangkan.

Tabel 4. Beberapa teknik yang digunakan untuk mengurangi pengotor sebelum kromatografi

Pengerjaan	Referensi
Filtrasi	
Tanah diatomae	[28]
Selulosa asetat nitroselulosa	[29]
nitroselulosa	[30,31]
Filtrasi aliran tangensial	[32–34]
Tahap pemecahan RNase	[18,35]
Temperatur tinggi (≈ 70 °C)	[29]
Treatment Mg^{2+} panas	[36]
Pengendapan dengan:	
Isopropanol (0.6, v/v)	[14,35]
Polietilen glikol (PEG)	[14,16,17]
Agent pematid (ch. spermine, spermidine)	[37]
Garam <i>chaotropic</i> (ch. LiCl, KAc dan NH ₄ Ac)	[14]
Ion logam alkali tanah divalen	[23,38]

Secara efektif, kebanyakan protein adalah globular, berukuran 2–10 nm [42] sementara struktur plasmid berukuran mikron ($>0.2 \mu\text{m}$), yang merupakan intermediet antara suatu struktur *flexible coil* dan rigid [41]. Jenis koefisien difusi pDNA SC adalah $10\text{--}8 \text{ cm}^2/\text{s}$, sementara protein dengan massa yang ekuivalen, lebih besar [42]. Pengotor asam nukleat yang lebih besar juga ditunjukkan dengan koefisien difusi yang kecil. Dalam kromatografi, koefisien difusi yang kecil akan mengakibatkan transfer massa internal yang rendah, suatu situasi dimana diperjelas dengan kenyataan bahwa pori kebanyakan fasa diam tidak dikemas untuk makromolekul yang besar. Pembatasan dalam transfer massa internal mengakibatkan pita menyebar dan recovery rendah [43]. Selanjutnya, konsekuensinya dibutuhkan untuk menggunakan kecepatan alir yang rendah dan gradien yang dangkal membutuhkan waktu pemisahan yang lama [43].

Kontaminasi dari puncak pDNA dapat juga diakibatkan dari keterbatasan dalam difusi makromolekul dalam pori partikel. Contohnya, difusi molekul RNA yang rendah melewati pori dapat menahan molekul-molekul sehingga mengotori fraksi pDNA. Puncak pDNA juga dapat dikontaminasi oleh pengotor yang secara normal terelusi lebih dulu.

Salah satu dari kebanyakan latar belakang kromatografi pDNA adalah kurangnya kapasitas fasa diam untuk pengikatan pDNA, seperti yang digambarkan oleh data kapasitas pertukaran anion dari literatur yang ditunjukkan dalam Tabel 5. Batasan ini diakibatkan dari suatu kekurangan pori dari kebanyakan fasa diam ($<0.2 \mu\text{m}$) [53], yang awalnya didisain untuk protein, digunakan untuk makromolekul seperti pDNA [35]. Suatu visualisasi mikroskopik dari pDNA dalam pertukaran anion Q-Sepharose XL [54] dan DEAE *Streamline* [55] mengkonfirmasi bahwa pDNA mengadsorpsi terutama dalam lapisan terluar bead. Studi dengan bead pertukaran anion dari ukuran yang berbeda lebih jauh menunjukkan eksistensi korelasi kebalikannya antara jari-jari bead dengan kapasitas pengikatan statik pDNA [44,45] dan dinamik pDNA [46], selanjutnya mengkonfirmasi bahwa adsorpsi adalah superficial. Saran bahwa kapasitas dapat ditingkatkan dengan menurunkan ukuran bead [54]. Kapasitas bead kromatografi untuk pDNA juga dapat bergantung pada topografi permukaan atau kekasaran, “roughness” [46,55,56].

Keterbatasan difusi dan kapasitas dapat kedua-duanya diatasi secara parsial dengan pemadatan pDNA atau dengan meningkatkan ukuran pori dalam fasa diam. Strategi pertama dengan menggunakan kation multivalen atau zat pematat yang menurunkan refulsi antara fosfat DNA, yang selanjutnya mengkondensasi molekul pDNA dari keadaan coil terelongasi menjadi keadaan globular terpadatkan [37]. Dengan menggunakan pematat kationik spermidine dan spermine, kapasitas penukar anion Q-Sepharose (Amersham Biosciences) untuk pDNA ditingkatkan hingga 40% [57]. Kenaikan ini menyebabkan akses pDNA lebih mudah terhadap pori dan juga untuk menyatukan packing pDNA pada permukaan adsorben, dan ditemukan kerja yang paling baik pada kekuatan ionik yang rendah [57]. Kondensasi molekul DNA juga dapat dihitung untuk sifat-sifat yang homogen selama kromatografi, untuk menentukan puncak yang lebih tajam, hasil yang lebih tinggi, dan selektivitas yang tinggi pula. Untuk tujuan ini, penggunaan PEG dalam AEC dengan Q-Sepharose meningkatkan recovery dari 20–80% [58], sementara dengan menggunakan buffer 2M ammonium sulfat selama SEC dihasilkan produktivitas tinggi [24,53].

Tabel 5. Kapasitas pengikatan pDNA statik dan dinamik pada adsorben pertukaran anion

Fasa diam	Ukuran <i>bead</i> (μm)	Ukuran pori(μm)	Kapasitas (mg/ml)		pDNA (kb)	Referensi
			pDNA	Protein		
Bead						
Q-Sepharose						
besar	200	n.a.	0.7	70	4.8	[44]
Fast Flow	90	0.19	1.3	120	4.8	[44]
	90	0.19	0.72†	120	5.9	[33]
High Performance	34	n.a.	2.5	70	4.8	[44]
Streamline QXL	200	n.a.	3	>110	4.8	[44]
Q Hyper D	80	0.30	1.2	n.a.	3.5	[45]
	60	0.30	2	~106	3.5	[45]
	60	0.30	3.3†	(106	7.1	[46]
	50	0.30	>5.3†	(90	5.9	[33]
	20	0.30	5.4	(85	3.5	[45]
	10	0.30	10.0	(90	3.5	[45]
Fractogel EMD DEAE	40–90	0.80	2.45†	100	5.9	[33]
	40–90	0.80	2.0†	100	7.1	[46]
Poros 50 HQ	50	<0.80	(10.0	60	3.5	[47]
	50	<0.80	2.12†	60	5.9	[33]
Monoliths						
DEAE-CIM	–	0.01–4	10.0	n.a.	n.a.	[48]
Membranes						
Mustang-Q	–	0.8	10.0	56	6.1	[49]
	–	0.8	15.0†	56	6.3	[50]
	–	0.8	6.0†	56	4.5	[51]
Cell microcarrier						
Cytopore	230	30	~31	n.a.	4.8	[52]

Data kapasitas untuk protein ditunjukkan untuk perbandingan

Penggunaan fasa diam dirancang dengan akomodasi “superpores” atau konfektif aliran pori ($>0.2 \mu\text{m}$) adalah strategi lain untuk memecahkan masalah kapasitas dan difusi pDNA [59]. “*Superporosity*” tidak hanya meningkatkan akses pDNA terhadap halangan internal tetapi juga menghasilkan aliran pori konfektif untuk mencapai tempatnya, dan meningkatkan transfer massa [60,61]. Satu dari gambaran kapasitas pengikatan pDNA tertinggi dalam bead pertukaran anion ($\sim 10 \text{ mg/ml}$) [47] telah diperoleh dengan pendukung Poros (Applied BioSystems), disebut kromatografi perfusi. Kapasitas dicapai

hingga penetrasi molekul pDNA ukuran besar 0.6–0.8 μm “superpores” yang karakteristik dari arsitektur Poros [46,61]. Suatu keuntungan lain dari kromatografi perfusi adalah kecepatan pemisahan 10–100 kali lebih cepat dari teknik HPLC konvensional.

Eksperimen dilakukan dengan sel microcarrier penukar anion Cytopore (diameter pori 30 μm) menghasilkan kapasitas DNA 1240 mg/g (~31 mg/ml), lebih tinggi dibandingkan kapasitas pendukung kromatografi konvensional [52]. Kapasitas luar biasa ini digabungkan dengan penetrasi dalam pDNA ke dalam “superpores” bead Cytopore seperti ditunjukkan oleh mikroskop [53]. Meskipun media Cytopore tidak dapat digunakan dalam kromatografi yang stabilitas mekaniknya kurang [53], kapasitas yang mirip digambarkan jika bead agarosa superporous (diameter pori 25–75 μm), seperti yang digambarkan oleh Gustavsson dan Larsson [60].

Aksesibilitas tinggi untuk sisi pengikatan dan penurunan dalam keterbatasan transfer massa internal, juga merupakan sifat dari pendukung monolitik dan membran adsorptif, membuat mereka atraktif untuk kromatografi pDNA [48–51,62,63]. Monolith (Bia Separations) adalah material tunggal berpori yang dikarakterisasi dengan jaringan interconnected network of channels (0.01–4 μm) [48], sementara membran adsorptif dikembangkan oleh Pall memiliki pori 0.8 μm pores [49]. Peningkatan kapasitas pengikatan statik pDNA dalam pertukaran anion (Tabel 5) merupakan kelebihan dari “superpores”.

Topografi permukaan dapat juga dirancang dengan struktur tentaclelike yang menonjol keluar dari permukaan dan membuat pDNA diraih lebih mudah oleh partikel exterior [46]. Contohnya dalam Streamline QXL, yang menggunakan rantai dextran dipasangkan dengan matriks agarosa. Dalam hal ini hubungan antara kapasitas statik dan diameter bead telah dilaporkan (3 mg/ml untuk 200 μm bead; Table 5).

Masalah transport massa dapat juga dieliminasi menggunakan bead mikropellicular, non porous [43]. Fasa-fasa diam dikarakterisasi dengan suatu core material fluid-impervious ditutup dengan suatu lapisan tipis adsorptif. Meskipun daerah total permukaan rendah, pendukung yang ada sangat mendorong sifat transfer massa dan

memberikan pemisahan yang cepat dan resolusi tinggi untuk molekul DNA *double stranded* [43]. Kapasitas volumetrik, bagaimanapun, rendah.

3. APLIKASI KROMATOGRAFI DALAM PEMURNIAN pDNA

3.1. Kromatografi berdasarkan Ukuran

3.1.1. Kromatografi *size-exclusion*

Size-exclusion chromatography (SEC) telah dikembangkan untuk pDNA (Tabel 6). Eksperimen yang lebih awal tidak menghasilkan hasil yang signifikan dengan fasa diam yang ada untuk pemisahan asam nukleat dengan konformasi yang kompleks dan Mr yang besar [64,65]. Keadaan berubah dengan dikembangkannya fasa diam rigid dan berpori tinggi, komposit poliakrilamida/dekstran.

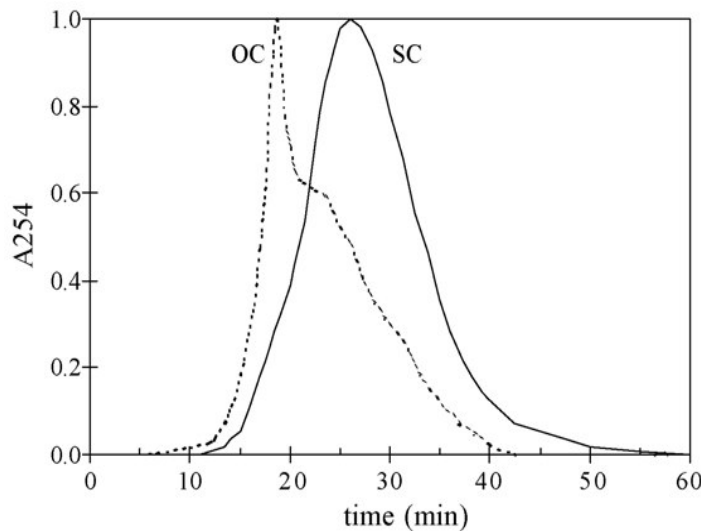
Tabel 6. Kromatografi berdasarkan ukuran pDNA

Jenis	Fasa Diam	Supplier	Referensi
SEC	Sephacryl S-1000	Amersham Biosciences	[16,17,64,66–70]
	Sephacryl S-500	Amersham Biosciences	[18]
	Superose 6B	Amersham Biosciences	[67,69,71]
	Sepharose 6 FF	Amersham Biosciences	[24]
	Zorbax GF 250	Agilent Technologies	[72]
	Fractogel TSK	Merck	[73]
SLC	Asahipak GS-310	Asahi Chemical	[74]

Sephacryl S-1000 (Amersham Biosciences) adalah salah satu fasa diam yang banyak digunakan dalam SEC pDNA [14,16,17,64,66–70]. Fasa diam ini memiliki batas eksklusi 20 kbp untuk DNA linier dan 400 nm untuk partikel *spherical*. SEC dengan Sephacryl S-1000 dilaporkan sangat sederhana, tidak mahal dan *reproducible*, menghasilkan sejumlah milligram pDNA SC kemurnian tinggi dari lisat *E. coli*. Tidak bergantung dari pDNA target, kromatogram yang diperoleh setelah lisat dibersihkan dalam kolom Sephacryl S-1000 selalu ditunjukkan dengan dua puncak terpisah dengan

baik. Puncak pertama biasanya melebar dan non-Gaussian, dan mungkin mengandung bahu. Puncak besar ini merupakan keseluruhan bentuk DNA dalam lisat: gDNA, DNA linier, terdenaturasi, pDNA OC dan SC. Fraksi berurutan adalah puncak dari gDNA dengan Mr tinggi, pDNA multimer dan OC pDNA. Fraksi setelah itu mengandung pDNA esensial dan fraksi terakhir kaya dengan isoform SC. Kemampuan Sephacryl S-1000 untuk memfraksinasi pDNA OC dan SC ditunjukkan pada Gambar 2, suatu superimposisi kromatogram yang diperoleh setelah injeksi pDNA OC dan SC standar dalam kolom 30 cm. Fraksinasi isoform pada puncak pertama bergantung pada Mr pDNA. Dengan pDNA kecil (4.4 kbp) isoform secara parsial *overlap*, untuk ukuran di atas 10 kbp pemisahan sempurna [69]. Dinyatakan bahwa bentuk OC terelusi lebih dulu dibanding bentuk SC karena halangan sterik [69]. Beberapa penulis melaporkan bahwa pDNA diperoleh 80–90%, dengan menggunakan konsentrasi rendah pDNA (0.5–1.0 µg/ml) dalam sampel [64,68,70]. Dalam hal ini, gDNA dapat dibedakan sebagai bahu. Jika lisat mengandung konsentrasi tinggi pDNA (2–4µg/ml) [64], bahu gDNA tidak dapat dibedakan. Yang mana pun kasusnya, akan selalu perlu untuk memotong dan membuang bagian depan puncak untuk memperoleh pDNA bebas dari sejumlah gDNA yang dapat diukur. Hasilnya mendekati 70% [67]. Overlapping antara gDNA dan pDNA juga dilaporkan ketika memproses plasmid dengan Mr tinggi [75].

Puncak kedua dalam kromatogram Sephacryl S-1000 berhubungan dengan molekul Mr kecil, seperti oligonukleotida, RNA dan protein. Puncak ketiga berhubungan dengan RNA Mr rendah. Dalam kasus lisat yang terkontaminasi RNA, beberapa *overlapping* dapat terjadi antara puncak DNA dan RNA dan terjadi penurunan hasil [75]. Kromatografi dengan Sephacryl S-1000 adalah lama hingga 200–300 menit diperlukan untuk pemisahan sempurna, jika menggunakan tekanan kolom rendah. Latar belakang secara parsial dapat diatasi dengan operasi kolom pada tekanan medium, 20 bar, maksimum ditoleransi Sephacryl S-1000 [69]. Meskipun dalam kasus ini elusi sempurna pDNA selama 45 menit, pemisahan isoform kurang baik.



Gambar 2. Kromatografi *size exclusion* 2,7 kb pDNA open circular (OC) dan supercoil (SC) standar (8 μg) dalam kolom Sephacryl S-1000 (30 cm \times 1 cm). Kecepatan alir, 0.5 ml/menit; volume injeksi, 1 ml; buffer elusi, 10mM Tris, 1mM EDTA, 100mM NaCl; pH 8.0 (D.M.F. Prazeres, tidak dipublikasikan).

Media lain yang banyak digunakan untuk pemurnian pDNA adalah Superose 6B (Amersham Biosciences) [67,69,71]. Fasa diam ini memiliki batas size-ekslusi lebih rendah untuk DNA (450 bp) dibandingkan Sephacryl S-1000. Bagaimanapun, karena bead Superose 6B lebih resisten terhadap tekanan, elusi pDNA dapat dicapai hanya 20 menit pada konsentrasi yang lebih tinggi [69]. Di samping itu, treatment lisat dengan RNase sangat penting untuk menghindari *overloading* kolom. Untuk menghilangkan gDNA dan non-SC isoform sangat sulit dengan pendukung ini. Prosedur yang dioptimasi untuk memperoleh resolusi dan waktu elusi; elusi plasmid dengan ukuran yang berbeda (4.12–150 kbp) dicapai kira-kira 8 menit. Kemudian volume retensi pDNA tidak dipengaruhi oleh ukuran. Untuk meningkatkan resolusi puncak pDNA, kapasitas kolom untuk pDNA ditingkatkan. Studi komparatif untuk kinerja Sephacryl S-1000 dan Superose 6 menunjukkan bahwa kedua fasa diam ini dapat memecahkan 4.8 kbp pDNA dan gDNA, dari pengotor molekul dengan Mr rendah [67]. Kinerja Superose 6 superior, karena menghasilkan proses yang lebih baik dengan diperolehnya kecepatan alir yang lebih tinggi. Bagaimanapun, Sephacryl S-1000 lebih baik dalam memisahkan pDNA isoform. Meskipun perbedaan diameter pori antara Sephacryl S-1000 dan Superose 6 (400 versus 40 nm) juga akan membuat Sephacryl S-1000 lebih baik memisahkan gDNA dari

pDNA, pemisahan kurang baik dan tidak reproducible. Hal ini menyarankan untuk memecahkan gDNA selama lisis alkali, suatu teknik yang sulit dikontrol [67].

SEC dengan Sephacryl 500 (Amersham Biosciences) juga memerlukan tahap akhir dalam proses produksi pDNA terapeutik, yaitu penggunaan RNase untuk membersihkan pDNA dari molekul RNA [18].

Selektivitas pDNA versus RNA telah ditingkatkan dengan mengkombinasikan Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences) dengan suatu buffer elusi dengan ammonium sulfat konsentrasi tinggi (>1.5 M) [24,53]. Efek ammonium sulfat berbeda terhadap pDNA dan RNA. Lebih dari sepertiga volume kolom dapat dimasukkan per elusi, menyebabkan produktivitas tinggi dalam tahap SEC.

SEC menggunakan media kinerja tinggi Zorbax GF250 sangat cepat (6 menit untuk elusi pDNA) dan diperoleh pDNA bebas dari RNA dan protein. Tetapi *pre-digestion* dengan RNase diperlukan untuk menghindari *overlapping* puncak RNA dan DNA [72].

Fractogel TSK (Merck), suatu matriks SEC dibuat dari polimer vinil hidrofilik memiliki sifat mekanik yang sangat baik [73], kombinasi kapasitas tinggi dengan resolusi tinggi untuk pemurnian pDNA. Seperti untuk Sephacryl S-1000, suatu kolom Fractogel TSK dinyatakan untuk pemisahan SC pDNA dari pengotor dan isoform pDNA lain. Metode ini bagaimanapun sangat lama. Hasil yang ditunjukkan Vo-Quang et al. [69], *overlapping* antara isoform SC dan OC lebih tinggi untuk pDNA lebih besar (26.5 kbp) jika dibandingkan dengan yang lebih kecil (4.4 kbp).

Dengan semua sistem yang digambarkan di atas dapat diperoleh recovery pDNA yang cukup untuk aplikasi biologi molekuler. Dalam kebanyakan studi, kemurnian PDNA dievaluasi hanya dengan elektroforesis gel agarosa dan analisis restriksi. Kemungkinan menggunakan SEC dengan Sephacryl S-1000 dalam proses pemurnian pDNA terapeutik dievaluasi lebih teliti dengan monitorisasi pengotor, seperti endotoksin dan gDNA [16,17].

Dalam proses yang digambarkan di atas, (proses I daralam Tabel I), pDNA diisolasi, pre-purifikasi dan dipekatkan dengan SEC secara berurutan, dilakukan lisis alkali, presipitasi isopropanol, presipitasi amonium sulfat, presipitasi amonium asetat, presipitasi PEG-8000 dan filtrasi. Efek pemadatan dengan PEG menjadikan pDNA lebih

homogen dalam tahap SEC [58]. Profil eluen Sephacryl S-1000 menghasilkan 51% hasil, diperoleh: Puncak pertama dengan bahu gDNA, diikuti pDNA difraksionasi menjadi beberapa isoform CS dan OC. Produsibilitas proses, suatu yang karakteristik untuk mengontrol proses, ditingkatkan dengan menempelkan kromatogram dari tiga kali pemisahan [17]. Perbedaan besar dalam Mr antara pDNA yang digunakan (3×10^6) dan endotoksin (10^4 hingga 3×10^5), bersama-sama dengan rentang fraksionasi Sephacryl S-1000 ($10^5 - 10^8$) dihasilkan reduksi 3000–8000 kali lipat dalam melewati endotoksin [17]. Pengotor seperti protein dan RNA tidak terdeteksi dalam hasil akhir pDNA, tetapi residu gDNA *E. coli* berada dalam taraf yang diperlukan sebagai farmasetikal rekombinan.

3.1.2. Kromatografi Slalom

Slalom chromatography (SLC) adalah suatu non-typical, teknik kromatografi berdasarkan ukuran yang dapat digunakan untuk pemurnian pDNA [74]. Metode ini pertama kali dikembangkan dengan HPLC paking microbeads (diameter $< 20 \mu\text{m}$) dan dielusikan relatif pada kecepatan alir cepat ($> 0.3 \text{ ml/min}$) [74]. SEC [76] dan kolom HPLC fasa terbalik [77] keduanya telah digunakan dalam SLC. Teknik ini hanya applicable untuk molekul DNA besar ($> 5 \text{ kbp}$) yaitu, tidak seperti dalam SEC, elusi diharapkan untuk meningkatkan ukuran molekuler. Meskipun presisi mekanisme pemisahan belum jelas dipahami, efek hidrodinamik kemungkinan yang paling memainkan peranan. Apa yang diketahui adalah penggunaan kecepatan alir awal yang tinggi dengan kecepatan alir gradien dalam ruang kecil pembatas antara mikro bead, yang menyebabkan molekul DNA mengembang. Karena molekul DNA memiliki waktu reorientasi lebih lama, lintasan antara partikel menjadi lebih panjang. Hasilnya ditunjukkan dengan penahanan yang terjadi dalam panjang DNA dan bukan massa. Kenyataannya, bentuk OC ditahan hanya setengahnya dibandingkan bentuk linier, dengan ukuran yang sama. Viskositas pelarut, temperatur, ukuran partikel dan kecepatan alir juga ditemukan berperan penting.

3.2. Kromatografi berdasarkan Muatan

3.2.1. Kromatografi pertukaran anion

Kromatografi pertukaran anion, *anion-exchange chromatography* (AEC) merupakan salah satu teknik untuk memperoleh, pemurnian, dan kuantisasi pDNA (Tabel 7), yang menawarkan keuntungan kecepatan pemisahan, tidak diperlukan pelarut, sanitasi dengan NaOH dan pilihan fasa diam yang banyak untuk skala proses [33]. Kromatografi ini berdasarkan interaksi antara gugus fosfat yang bermuatan dalam *backbone* DNA dengan ligan positif pada fasa diam [35]. Suatu garam bergradien, digunakan untuk mengganti asam nukleat yang berbeda yang harus terelusi untuk meningkatkan densitas muatan, suatu sifat yang menunjukkan fungsi dari panjang dan konformasi untai [4]. Dalam beberapa kasus, urutan dan komposisi basa berpengaruh dalam pola elusi asam nukleat dalam pertukaran anion [88]. Beberapa penelitian menunjukkan hubungan kebalikan antara waktu retensi dengan panjang untai dengan kandungan AT tinggi, molekul lebih tertahan [43]. Hubungan ini dengan tekukan/*bending* asam nukleat pada urutan poliA dapat mendorong alterasi dalam seluruh konformasi molekul dan juga dalam densitas muatannya [6].

Dalam penggunaan AEC untuk pemisahan pDNA, sampel lisat yang telah diklarifikasi harus selalu disertai dengan konsentrasi garam yang tinggi (>0.5M NaCl) untuk menghindari adsorpsi yang tidak diperlukan dari pengotor dengan densitas muatan rendah, seperti RNA Mr rendah, oligonukleotida, dan protein. Di bawah kondisi tersebut sejumlah pengotor terelusi dalam aliran dan kapasitasnya dapat secara penuh untuk adsorpsi pDNA [33,78]. Molekul dengan densitas muatan yang tinggi, seperti isoform pDNA, RNA dengan Mr tinggi, dan gDNA akan tertahan dan kemudian terelusi dengan naiknya kekuatan ion dari fasa gerak. Beberapa fasa diam AEC menunjukkan selektivitas kurang baik terhadap pDNA dan pengotor (RNA Mr tinggi, pDNA concatamer, gDNA, non-SC pDNA isoforms, endotoxin) karena kemiripan afinitas ikatannya. Dalam hal gDNA, pemisahan akan lebih sulit jika lisis alkali menghasilkan fragmen dengan ukuran hampir sama dengan pDNA [5]. Kekurangan selektivitas ini membuat pemurnian pDNA sangat sulit untuk dicapai dengan tahap AEC tunggal [89]. Dalam kebanyakan kasus, diperlukan kromatografi tahap kedua (Tabel 1), atau tahap pre-purifikasi (Tabel 4). Contoh terkini adalah mengkombinasikan presipitasi kalsium klorida dan aliran filtrasi

tangensial untuk menaikkan rasio pDNA terhadap RNA dari 0.042 (w/w) hingga 2.57 (w/w) dalam AEC [33].

Tabel 7 Kromatografi berdasarkan muatan pDNA

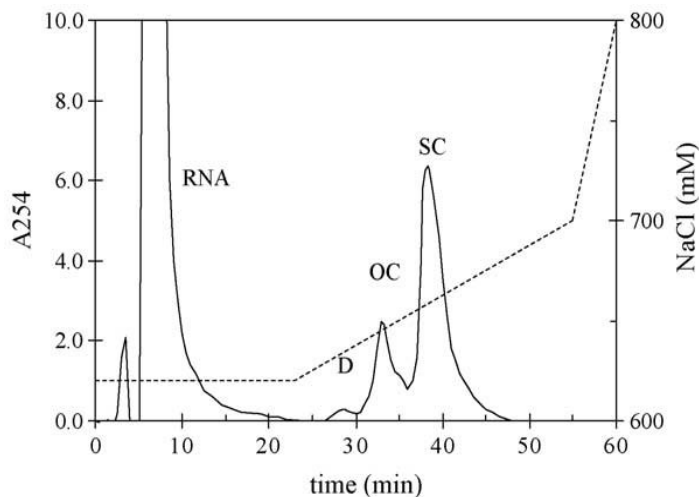
Jenis	Fasa Diam	Supplier	Referensi
AEC (analitik)	Nucleogen-DMA-4000	Macherey-Nagel	[78]
	DEAE-NPR,	Tosoh	[79]
	DEAE-5PW	Tosoh	[79]
	DEAE-PS-DVB	Non-commercial	[80]
	DMAE-LiChrospher	Merck	[17]
	Poros HQ, QE, PI	PerSeptive Biosystems	[20,35,81,82]
AEC (preparatif)	QIAGEN	QIAGEN	[83]
	Protein-Pak DEAE 8HR	Waters	[84]
	Protein-Pak DEAE 5PW	Waters	[85]
	Gen-Pak FAX	Waters	[85]
	Mono Q-Sepharose	Amersham Biosciences	[29]
	HI-Load Q-Sepharose	Amersham Biosciences	[29]
	Q-Sepharose Big Beads	Amersham Biosciences	[14]
	Q-Sepharose XL	Amersham Biosciences	[23]
	Q-Sepharose FF	Amersham Biosciences	[33,35]
	Q-Sepharose	Amersham Biosciences	[86]
	Source15Q, 30Q	Amersham Biosciences	[23,24]
	Poros HQ, PI	PerSeptive Biosystems	[21,33,47]
	Fractogel DEAE	Merck	[33]
	Q Ceramic HyperD F	BioSeptra	[33]
	Q Sephacryl S500 HR	Non-commercial	[87]
	Streamline QXL	Amersham Biosciences	[44]
	DEAE Streamline	Amersham Biosciences	[18]
	CIM monoliths	Bia Separations	[48]
Mustang-Q membranes	Pall	[49–51]	

Kolom berdasarkan polimer Protein-Pak DEAE 8HR (Waters) memberikan pemurnian hingga 5mg pDNA total tunggal selama 50 menit, tanpa perluasan kapasitas [84]. Suatu kolom preparatif Protein-Pak DEAE 5PW (Waters) juga dapat membuat 7.5 mg total pDNA tunggal selama 1 jam [85].

Q-Sepharose (Amersham Biosciences) telah digunakan pula untuk AEC pDNA (Tabel 7). Penukar anion kuat ini dibuat dari partikel agarosa 6% dengan cross-linked tinggi yang diturunkan dari gugus amino kuarternar. Perbandingan kinerja kolom Mono Q- dan Hi-load Q-Sepharose pada skala kecil dan besar pemurnian pDNA menunjukkan bahwa kedua kolom dapat memisahkan isoform SC dan OC [29]. Dengan kolom Mono Q-Sepharose, pDNA lebih besar dari 8 kbp tidak dapat dielusi dan menyebabkan backpressure (tekanan belakang). Sebaliknya, dalam kolom Hi-load Q-Sepharose dapat digunakan untuk pDNA yang sangat besar dan dapat ditangani untuk volume yang (equivalen 0.5–2.0 L kultur bakteri) tanpa menyebabkan backpressure. Media lain berdasarkan Q-Sepharose seperti Q-Sepharose Big Beads [14,66], Q-Sepharose XL [23], Source 15Q [23,24] telah diuji untuk pemurnian preparatif dari pDNA SC terapeutik. Penggunaan Q-Sepharose *Big Beads* memungkinkan untuk penerapan langsung dari hasil lisis sel dengan AEC untuk memperoleh pDNA kualitas tinggi/murni [14]. Pengurangan konstanta dielektrik dari buffer yang digabung alkohol, seperti isopropanol atau etanol telah menunjukkan untuk selektivitas pengikatan pDNA dan [86].

Proses yang berkaitan untuk pemurnian preparatif pDNA SC menggunakan Q-Sepharose Fast Flow (FF) telah dilakukan dengan kolom 1, 10 dan 40 ml [35]. Kolom lebih kecil pertama digunakan untuk menetapkan optimasi pemisahan. Gambar 3. menunjukkan jenis kromatogram yang diperoleh setelah loading dengan lisat dibersihkan RNA-se. Karakteristik aliran puncak diawali RNA Mr rendah dan protein, diikuti isoform pDNA (terdenaturasi, OC dan SC) yang selektif dielusi dengan gradien garam. Interaksi gDNA dengan Q-Sepharose FF sangat kuat dan hanya dihilangkan setelah *treatment* NaOH [35]. Hubungan konformasi dan muatan/bentuk jelas memainkan peranan dalam pemisahan isoform pDNA [43,88]. Ikatan yang lebih kuat dari pDNA SC yang lebih padat dapat ditunjukkan terhadap keseluruhan yang lebih tinggi, densitas muatan yang

relatif terhadap isoform yang lain [29,78,84] atau terhadap interaksi yang lebih baik dengan ligan dalam curvature pori fasa diam [78].



Gambar 3. Pemurnian DNA plasmid dengan kromatografi pertukaran anion dalam kolom 1ml Q-Sepharose (5 cm×0.5 cm). Kec alir: 1 ml/min; sampel: 1ml lisat, mengandung 22 µg 2.7 kb pDNA; buffer pencuci dan pengelusi: 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0 dengan NaCl pada konsentrasi ditunjukkan dengan garis putus-putus. Puncak menunjukkan isoform pDNA SC, OC, dan terdenaturasi [35].

Scale-up (10 dan 40 kali) telah memperoleh hasil dengan lurus, dan konsisten dalam hasil, kemurnian, kualitas, dan profil elusi. Tidak bergantung skala, gradien digunakan untuk elusi pDNA dan loading, rata-rata diperoleh $62\pm 8\%$ pDNA SC [35]. Kapasitas dinamik dari 40 µg pDNA SC / ml telah ditentukan, sedangkan kapasitas gel serum albumin manusia adalah 120 mg/ml [35]. Kapasitas yang rendah ini menunjukkan fakta bahwa hanya fraksi kecil dari volume pori internal (limit eksklusi ≈ 1900 Å) adalah dapat mengakses molekul pDNA SC yang panjang (≈ 3700 Å) dan tipis (≈ 113 Å) [35].

Fasa diam Anion-exchange perfusion chromatography “superporous” Poros PI/M telah dilakukan untuk skala proses [21]. Hasil pDNA 80% diperoleh dengan melakukan lisat tersaring, mengandung 5 g SC pDNA ke dalam kolom 3.6 L. Faktor pemisahan 2, 5.3, 22.1 dan 283 untuk gDNA, protein dan RNA dan endotoxin, berturut-turut [21].

Laporan baru-baru ini menggambarkan rentang evaluasi dari penukar anion di pasaran untuk kemampuan mereka dalam memisahkan pDNA total dan RNA, kapasitas tinggi, dan kekuatannya [33]. Fractogel DEAE dioperasikan pada kondisi yang dioptimasi

(loading pada 0.63M NaCl, elusi dengan gradien linier 1M NaCl) diidentifikasi sebagai penukar anion dalam kemurnian pDNA (100%), kapasitas dinamik (2.45 mg/ml), recovery (94%), kekuatan dan reproducibilitas diperlukan untuk pembuatan pDNA terapeutik skala besar.

Suatu jenis bead pertukaran anion dibuat dari matriks Sephacryl S-500 HR (Amersham Biosciences) diturunkan dari gugus amin kuarterner digambarkan untuk membedakan RNA dan pDNA [87]. Sifat yang dapat dibedakan dari bead adalah tipis (2–3µm) lapisan yang lebih luar tanpa gugus pertukaran ion. Pori dalam lapisan ini mencegah molekul pDNA besar dari kontak dengan interior bermuatan, sementara RNA dan protein melewati pori dan diadsorpsi. Strategi pemurnian pDNA dikembangkan yang menggunakan kolom pertama yang dipak dengan bead yang mengakses terestriksi, dan kedua dengan kolom AEC normal. Prosedur dapat menghilangkan 99.5% RNA dan 96% protein dan menghasilkan 89% pDNA [87].

Beberapa kolom AEC dalam kit pemurnian pDNA seperti salah satunya Qiagen adalah berdasarkan resin DEAE dimodifikasi [25,83]. Resin Qiagen mengandung bead silika dengan ukuran partikel 100 m, ukuran pori besar dan dilapisi permukaan hidrofilik. Resin Qiagen dapat mengikat kuat molekul pDNA. Pada kekuatan ion rendah (<1.0M NaCl) protein dan RNA tercuci keluar, elusi pDNA hanya pada kondisi garam tinggi (1.6M NaCl, pH 7.0) [83]. Seleksi molekul pDNA double stranded dan beberapa DNA single stranded juga bisa dilakukan. AEC dengan resin Qiagen juga telah digunakan untuk skala pilot (7-1 kolom dipak dengan 2.8 kg resin) sebagai bagian dari proses yang digunakan untuk macam-macam pembuatan klinis tahap I/II [83]. Kelemahan proses ini adalah memerlukan RNase selama lisis alkali.

Penggunaan AEC untuk kuantitasi pDNA telah digambarkan dalam sejumlah publikasi ([17,20,35,78-82]; Tabel 7). Dalam percobaan terdahulu, kolom HPLC macroporous Nucleogen- DMA-4000 (Macherey-Nagel) dilaporkan untuk memisahkan RNA dan gDNA dari pDNA, yang dielusi sebagai puncak yang mengandung 95% isoform SC [78]. Analisis pDNA total dalam konteks pembuatan pDNA telah digambarkan lebih akhir dengan penukar anion, Poros HQ [66], Poros QE [35], Poros PI [20,81,82] dan DMAE-LiChrospher [17].

Meskipun tidak dapat memecahkan pDNA OC, SC dan linier, kolom Poros cocok untuk menguji kemurnian dan kuantisasi pDNA total dalam proses [20,35,66,81,82]. Menariknya, kolom Poros QE dapat memisahkan bentuk native dan terdenaturasi dari pDNA- bentuk terdenaturasi terelusi setelah puncak pDNA total, dengan beberapa overlapping parsial [35]. Ekstra retensi dari pDNA terdenaturasi berkaitan dengan interaksi non-spesifik dari basa aromatik hidrofobik dalam pDNA terdenaturasi dengan matriks Poros polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB) yang sangat hidrofobik. Interaksi ini kurang intensif dengan pDNA native, dimana basa hidrofobik terlindungi di bagian dalam double helix. Meskipun polimer hidrofilik (PEI) digunakan sebagai pelapis material Poros, hal ini tidak melindungi sempurna sifat hidrofobik dari matriks [35]. Pemisahan dan kuantitasi isoform OC dan SC telah dicapai dengan kolom DEAE-NPR dan DEAE-5PW (Tosoh) [79]. Keberadaan ng pDNA OC dapat ditentukan dalam 30 menit [79]. Analisis lebih cepat isoform pDNA diperoleh dengan penukar anion non-porous, micropelicular DEAE berdasarkan cross-linked tinggi partikel PS-DVB [80]. Sifat transfer massa dari pendukung jenis ini memberikan resolusi isoform pDNA dalam kurang dari 3 menit.

Anion-exchange expanded bed chromatography (AEEBC) adalah suatu alternatif yang efisien untuk AEC bed packed. Dalam EBC suatu fasa diam terbuat dari partikel tebal dengan distribusi ukuran tertentu yang difluidisasi dengan fasa gerak langsung untuk membentuk bed stabil [56]. Dengan meningkatnya extrapartikel menghambat volume membuat kemungkinan viskositas larutan tinggi yang menunjukkan pemisahan pDNA dengan high-throughput tetapi tanpa membentuk tetesan tekanan tinggi [39]. Selanjutnya, di bawah keadaan tertentu, bed yang diperluas dapat memproses sampel dengan material partikulat kecil, hal itu memungkinkan untuk mempersingkat pengerjaan pembersihan dan pemekatan [4].

Streamline QXL (Amersham Biosciences) telah digunakan untuk pemurnian pDNA dari lisat crude sel dengan AEC in expanded bed mode [39]. Kolom lebih dari satu volume tersedimentasi dari sampel terhadap agregasi dan lepasnya bed, mengakibatkan penurunan hasil dan kemurnian fraksi yang mengandung pDNA. Untuk menghindari masalah ini, pengendapan dengan isopropanol dilakukan untuk mengurangi pengotor, viskositas larutan dan volume sampel. Dalam kasus ini, tidak ada agregasi media, dan

recovery meningkat. Bagaimanapun tidak ada kelebihan dari kinerja AEC in expanded bed mode. Pemurnian skala besar pDNA terapeutik dengan AEC dalam mode bed yang diperluas (*AEC in expanded bed mode*) juga telah diuji menggunakan DEAE Streamline (Amersham Biosciences) [18]. Proses yang dikembangkan meliputi pengerjaan scaleable, seperti filtrasi kantung yang didisain untuk mengirim dan membersihkan lisat sampel untuk expanded bed AEC (process II dalam [Table 1](#)). Meskipun pembersihan dengan filtrasi kantung tidak cukup untuk packed bed AEC konvensional, hal itu cukup sesuai untuk pengerjaan dalam *expanded bed mode*. Setelah elusi, pDNA dimurnikan buffer diganti dengan SEC menghasilkan produk grade farmasi.

Kenyataan bahwa AE-EBC pDNA dihambat oleh kekurangan cocokan adsorben, telah mendorong disain bead EBC prototipe kecil (diameter 20–40 μm), densitas tinggi ($>3.7 \text{ g/cm}^3$), untuk menangkap molekul biologi yang besar [46]. Material ini diperoleh dengan bead fungsional dibuat dari core stainless steel dipak dalam suatu lapisan tipis agarosa 6% agarose, dengan DEAE dan PEI, yang memiliki kapasitas pengikatan dinamik lebih tinggi (25–70-kali lebih tinggi) untuk pDNA ketika dibandingkan dengan pendukung EBC 200 μm di pasaran. Berlawanan dengan bead PEI, bead yang langsung terikat DEAE dapat menangkap pDNA dengan beberapa pengerjaan sulit yang dipertimbangkan sebagai suatu kemajuan signifikan melampaui pendukung AE-EBC di pasaran. supports. Bead PEI-linked, bagaimanapun memberikan sensitivitas terhadap jembatan antar partikel dengan polimer asam nukleat, memberikan recovery rendah dan sulit diregenerasi. Kenyataannya, polimer dengan muatan tinggi, seperti PEI, adalah diketahui untuk kemampuan mereka untuk memekatkan asam nukleat are [56]. Dalam hal ini, disimpulkan bahwa penggunaan struktur derivatisasi lemah kelihatannya paling baik untuk pemurnian DNA sesuai dengan meningkatnya kapasitas tanpa menaikkan sensitivitas cross-linking antar partikel [56]. Dari sukses awal penggunaan AE-EBC untuk pemurnian pDNA, dapat disimpulkan bahwa teknik ini tidak cukup kuat untuk penggunaan luas di industri [56].

Pemisahan pDNA yang cepat dapat diperoleh dengan mengurangi transfer massa yang resisten terhadap pori/channel dari matriks super-porous [48]. Membran kinerja tinggi [49–51,62,63] dan kolom monolithic [48] telah digambarkan telah berhasil

digunakan. Suatu kapsul kromatografi Mustang-Q (Pall), mengandung suatu membran polyether sulfone membrane dengan gugus amin kuarterner dan dengan core silinder telah digunakan untuk menangkap pDNA dari lisat larut (1.52 g pDNA dalam 71 l) [51]. Setelah pencucian dengan buffer 0.6M NaCl, pDNA dielusi dengan 1.2M NaCl. 95% pDNA diperoleh kembali dalam pool 7.25 l, konsentrasi 10 kali lipat konsentrasi dalam pDNA. Waktu keseluruhan 35 menit dan pemurnian pDNA antara 80 dan 90%.

Suatu proses bebas RNase didisain untuk pemurnian pDNA dari lisat alkali dengan AEC pada monolith CIM (Convective Interaction Media)-DEAE (Bia Separations) telah dikembangkan [48]. RNA ditemukan kebanyakan dalam aliran sementara pDNA dielusi sebagai puncak tajam. Kualitas pDNA, pada saat dites dengan elektroforesis agarosa, penghancuran restriksi dan transformasi, dapat dibandingkan dengan kualitas pDNA yang diisolasi menggunakan Qiagen kit yang dijual di pasaran. Regenerasi telah berhasil dilakukan dengan monolith yang pendek dan waktu pemisahan yang cepat (sekitar 7 menit) [48].

3.2.2. Kromatografi Hidroksiapatit

Senyawa anorganik $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dikenal sebagai hidroksiapatit (HA) efektif untuk pemurnian pDNA [90–93]. Kromatografi hidroksiapatit (HAC) merupakan mode campuran pertukaran ion dengan inklusi dari moieties positif dan negatif. Asam nukleat diasumsikan terikat kepada HA dengan ikatan koordinasi antara fosfat dari backbone DNA dan sisi kalsium pada permukaan fasa [93].

Beberapa prosedur pemurnian DNA menggunakan HA menggunakan elusi bergradien berdasarkan kenaikan konsentrasi fosfat. Ion fosfat berlaku sebagai competing agent untuk sisi pengikatan fasa diam [93]. Metode ini dapat membedakan antara pengotor yang terelusi lebih dulu, dengan pDNA [90,93]. Keberadaan urea berpengaruh kuat pada sifat retensi dan elusi asam nukleat dalam HAC. Dengan naiknya konsentrasi urea, perbedaan antara molaritas elusi fosfat dari pDNA dan RNA menjadi besar [92]. Pengaruh ini kemungkinan karena denaturasi asam nukleat oleh urea. HAC juga ditemukan dapat memecahkan masalah isoform [93]. Suatu kelemahan HAC dalam pemurnian pDNA adalah ion asetat dari lisis sel yang berinteraksi dengan HA menyebabkan pelarutan medium [90]. Untuk menghindari masalah ini lisat yang mengandung pDNA, sebelumnya

di presipitasi, desalting, diafiltration atau dialysis. Atau lisat sel dapat diasamkan dengan asam mineral dengan adanya garam anorganik, daripada dengan buffer asetat [90]. Dalam hal ini, lisat dapat langsung diload ke dalam kolom HA. Kemungkinan pemurnian pDNA dari lisat menggunakan kolom HA dalam continuous annular chromatography (CAC) telah dipelajari dan dibandingkan dengan kolom HA konvensional [93]. Kualitas pDNA yang diperoleh dengan kedua metode adalah mirip.

3.3. Kromatografi berdasarkan Hidrofobitas

Tabel 8. menunjukkan pengerjaan kromatografi untuk pemisahan dan pemurnian pDNA berdasarkan hidrofobitas.

3.3.1. *Reversed-phase liquid chromatography*

Retensi dalam reversed-phase liquid chromatography (RPLC) asam nukleat berdasarkan interaksi hidrofobik antara basa hidrofobik aromatik dan ligan hidrofobik dalam suatu matriks. Molekul yang terikat dielusi dengan kenaikan hidrofobitas, suatu sifat yang didefinisikan oleh komposisi basa, panjang untai, dan struktur [95]. Dalam hal ini, naiknya ukuran asam nukleat akan ditahan lebih lama dalam RPLC. Keberadaan lokasi yang kaya akan basa AT yang biasanya daerah bentuk single stranded dalam molekul DNA menyebabkan terikatnya basa terhadap ligan, meningkatkan kekuatan interaksi hidrofobik [43]. Hipotesis ini berkaitan dengan fakta bahwa oligonukleotida single-stranded terikat lebih kuat pada matriks RPLC dibanding fragmen double-stranded dengan ukuran yang sama [95]. Eksposisi basa hidrofobik juga menjelaskan waktu retensi yang lebih tinggi dari molekul DNA terdenaturasi parsial.

Kolom RPLC-5 (Ashland Chemical Co.) telah berhasil digunakan untuk pemurnian tRNA, oligonukleotida, dan fragmen DNA [78] dan pDNA [94].

Dalam hal pemurnian pDNA, pemisahan yang baik dari tiga isoform diperoleh dengan optimasi gradien (0.05M NaCl/ml, 28–30 °C). Pemisahan lebih baik untuk isoform pDNA SC dari linier dan OC diperoleh pada temperatur rendah. Bagaimanapun, karena kolom tidak dapat dioperasikan pada tekanan tinggi, diperlukan 13-14 jam untuk pemisahan sempurna dan volume puncak yang besar tidak dapat dihindari. Ketika menggunakan kondisi ini, isoform SC terelusi lebih pada konsentrasi garam bersama-

sama dengan sejumlah kecil isoform OC.nBentuk pDNA linier dan OC dan gDNA terelusi terakhir bagian puncak, pada konsentrasi garam yang tinggi. Faktor yang mengatur elusi tRNA dari kolom RPLC telah membawa pada kesimpulan bahwa elusi juga terjadi untuk struktur sekunder dan tersier [94]. Juga terlihat untuk isoform pDNA. Bagaimanapun tidak dapat menjelaskan bagaimana perbedaan struktur dalam isoform pDNA mempengaruhi perilaku elusi.

Tabel 8. Kromatografi berdasarkan hidrofobisitas pDNA

Jenis	Fasa Diam	Supplier	Referensi
RPLC	Adogen 464	Ashland Chemical Co.	[94]
	LiChrosorb RP18	Merck	[95]
	PRP- ∞	Hamilton	[96]
	Poros R1	PerSeptive Biosystems	[97]
	Poros R2	PerSeptive Biosystems	[21]
RPIPC	PolyFlo	Puresyn	[19]
HIC	1,4-Butanediol	Non-commercial	[20,98]
	diglycidyl ether-Sepharose		
	Butyl-6PW/Octyl-6PW	Pharmacia	[99]
	Source 15PHE	Amersham Biosciences	[100]
	TSKgel Butyl-NPR	Tosoh Biosep LLC	[101]
TAC	2-Mercaptopyridine-Sepharose 6 FF	Non-commercial	[24]

Protokol RPLC lain untuk pemurnian pDNA adalah berdasarkan penggunaan bead silika C18 yang lebih hidrofobik. Salah satu yang telah dilaporkan adalah penggunaan amonium sulfat untuk mengendapkan RNA dan protein secara RPLC [102]. Prosedur ini bagaimanapun menghasilkan pDNA dengan kontaminan RNA sekitar 25% karena kolom tidak dapat memilih untuk mengelusi pDNA dan RNA. Suatu kolom LiChrosorb RP18 HPLC-RPLC (Merck) dapat memisahkan pDNA SC dari lisat cel yang sangat tidak murni (RNA Mr rendah, fragmen gDNA dan pDNA linier) tetapi tidak ribosomal RNA [95]. Seperti yang diharapkan dari RPLC, DNA *single stranded* ditahan lebih dari DNA *double-stranded* karena eksposisi basa hidrofobik. Berlawanan dengan hasil yang diperoleh oleh Best dan co-workers [94], pDNA SC terelusi setelah isoform OC dan linier. Fraksi isoform SC diharapkan terelusi kemudian dalam RPLC, karena kekangan pilinan negatifnya, diketahui menyebabkan denaturasi lokal dari DNA, menyebabkan

basa lebih mudah berinteraksi dengan fasa diam. Puncak pDNA yang kurang lebar untuk pDNA SC juga menyarankan suatu pemisahan pDNA SC spesies berbeda berdasarkan jumlah supercoil mereka. Dalam kasus pemisahan RNA, dapat diambil kesimpulan bahwa perbedaan antara ribose dan deoksiribose juga mempengaruhi perilaku retensi, membedakan RNA dari DNA. Teknik ini dapat diterapkan untuk tujuan analisis maupun preparatif.

Teknik RPLC–HPLC lain untuk pemurnian pDNA menggunakan media PRP-∞media (Hamilton) [96]. Kolom dapat digunakan untuk memisahkan RNA dari DNA yang terdapat dalam lisat sel bakteri. Karena DNA diserap ke dalam kolom sementara RNA terelusi.

Reversed-phase perfusion chromatography dengan fasa diam “superporous” Poros telah dilibatkan dalam proses pemurnian pDNA terapeutik [21,97]. Salah satu aplikasi, suatu kolom Poros 50 R1 (PerSeptive Biosystems) telah digunakan [97]. Tahap penting dalam proses adalah presipitasi ammonium sulfat untuk RPLC, yang dapat mengurangi kontaminan gDNA hingga kurang dari 1%. Setelah kesetimbangan kolom dengan buffer asetat lalu dijenuhkan hingga 80% dengan ammonium sulfat, larutan pDNA dilewatkan. Pencucian dan elusi pDNA dilakukan dengan buffer yang sama yang disuplementasi dengan 2.85 dan 11.7% ethanol, berturut-turut. Setelah RPLC, AEC digunakan sebagai tahap akhir polishing.

Dalam aplikasi kedua (proses V dalam Table 1), RPLC dengan Poros R2/M (PerSeptive Biosystems) dilakukan untuk skala proses [21]. Kolom diisi dengan pertukaran anion pDNA pool (dengan pH diatur hingga 8.5 dan isopropanol 1.2%), mengandung 3.2 g SC pDNA ke dalam kolom 7.0 l. Setelah pencucian, gradien isopropanol dari 1.2 hingga 11.2% dilakukan. Fraksi SC pDNA dielusi pada 4% isopropanol dengan hasil 77%. Faktor pemisahan 14.1, >30, >10 dan 194 diperoleh untuk gDNA, protein dan RNA dan endotoxin berturut-turut [21].

3.3.2. *Reversed-phase ion-pair chromatography*

Reversed-phase ion-pair chromatography (RPIPC) menggunakan modifikasi pasangan ion dalam fasa gerak untuk mendapatkan selektivitas dan memberikan pemisahan solut bermuatan. Fasa diam bersifat hidrofobik tetapi fasa gerak mengandung

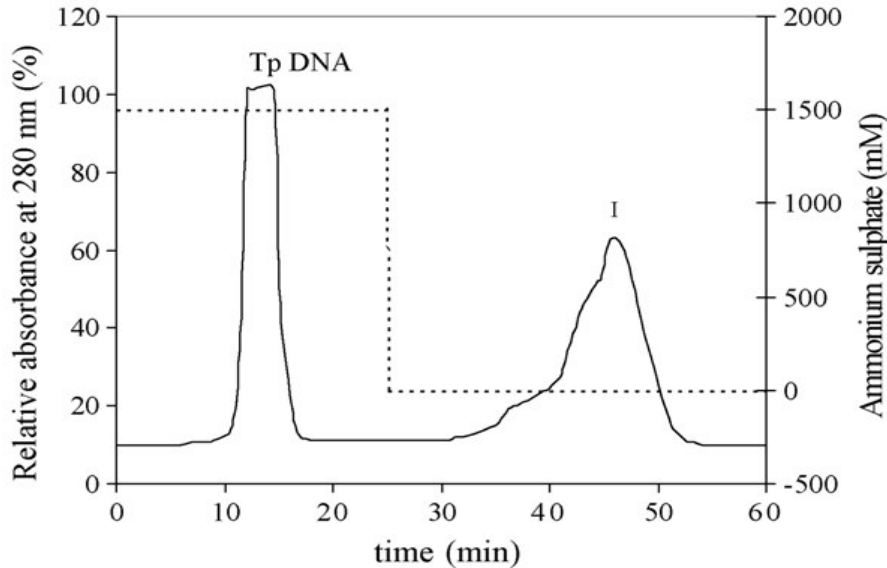
eluen hidroorganik, mengandung ion amfifilik dan sebagian kecil counter ion hidrofilik [43]. Ketika solut bermuatan berikatan dengan ion amfifilik hidrofobitasnya meningkat dengan efektif. Dalam beberapa kasus, hal ini merupakan keperluan mutlak untuk pengikatan dengan fasa diam. Salah satu pasangan ion untuk asam nukleat yang banyak digunakan adalah trietilamin. pDNA SC terapeutik dimurnikan dari lisat sel pada skala pilot dengan RPIPC, menggunakan matriks polimer non porous, inert, PolyFlo (Puresyn) [19]. Kromatogram menunjukkan elusi RNA Mr rendah dalam volume tertentu. Setelah pencucian kolom dengan suatu buffer yang mengandung asetonitril, RNA dengan Mr tinggi, gDNA Mr tinggi dan bentuk non monomer pDNA terelusi sebagai puncak tunggal. Elusi gradien kedua dengan asetonitril konsentrasi tinggi menghasilkan satu puncak yang mengandung terutama monomeric SC pDNA. Hasil kromatografi yang mirip diperoleh ketika pDNA dimurnikan dari 1, 10 atau 100 g pasta sel. Pada tiap skala, lebih dari 90% pDNA SC diperoleh kembali setelah kromatografi. Proses dipertimbangkan agar reproducible dalam hal kromatogram dan hasil. pDNA akhir mengandung pengotor yang tidak terdeteksi dari RNA, protein, gDNA, endotoksin dan isoform pDNA lain. Ketika dibandingkan dengan AEC dan SEC, aktivitas biologi pDNA dimurnikan dengan kromatografi PolyFlo yang menunjukkan peningkatan kemampuannya untuk mentransformasi sel *E. coli* kompeten.

Afinitas kolom yang tinggi terhadap lipid hidrofobik, suatu komponen endotoksin (50000 EU/ml *packed* resin) dihasilkan dalam penurunan 200,000 lipat terhadap 3.3–6.6 EU/mg pDNA. Selanjutnya, endotoksin yang terikat tidak ko-elusi dengan pDNA dan dihilangkan selama regenerasi 0.5M NaOH. Ini merupakan hasil penting, karena muatan yang mirip dari pDNA dan endotoksin menghindari penggunaan AEC sebagai prosedur tunggal untuk penghilangan pengotor ini. Kesimpulan penulis bahwa jika digunakan pengerjaan tunggal atau kombinasi, RPIPC cukup untuk menghasilkan pDNA terapeutik sesuai dengan petunjuk pembuatan cGMP.

3.3.3. Kromatografi Interaksi Hidrofobik

Pemurnian pDNA dengan *hydrophobic interaction chromatography* (HIC) menjelaskan perbedaan hidrofobitas pDNA, pengotor asam nukleat single-stranded, dan endotoksin [101,103]. Eksperimen dilakukan dengan Sepharose CL-6B (Amersham

Biosciences) diderivatisasi dengan ligan hidrofobik (1,4-butanediol diglycidyl ether), menunjukkan kemungkinan memisahkan pDNA SC dari asam nukleat pengotor yang lebih hidrofobik (RNA, gDNA, oligonukleotida, pDNA terdenaturasi) dalam kondisi non-denaturing [103]. Dengan adanya 1.5 M ammonium sulfat, pDNA total terelusi dalam volume tertentu sementara pengotor terelusi kemudian, terpisah dari puncak pDNA (Gambar 4). Sifat ini diterangkan oleh fakta bahwa molekul pDNA memiliki basa hidrofobik di bagian dalam double helix, dan interaksi hidrofobik dengan media HIC adalah minimal. Di sisi lain, pengotor asam nukleat single stranded menunjukkan lebih banyak basa hidrofobiknya yang berinteraksi dengan ligan [103]. Material HIC yang lain berdasarkan selulose dan Sepharose juga menunjukkan terjadinya ikatan dengan poli A, DNA terdenaturasi atau RNA viral [104]. Sifat ligan dan ketergantungan terhadap garam menyarankan bahwa pemisahan berdasarkan interaksi hidrofobik baik dilakukan [104]. Seperti digambarkan untuk RPIPC [19], endotoksin dengan sifat sangat hidrofob tertahan lebih lama dalam kolom HIC dibandingkan pDNA [20,81,98].



Gambar 4. Pemurnian pDNA dengan kromatografi interaksi hidrofobik dalam kolom (20 cm×1.6 cm) dipak dengan 334 ml Sepharose CL-6B diderivatisasi dengan 1,4 butanadiol diglisidil eter. Kecepatan alir 10 ml/menit; sampel 60 ml lisat yang sebelumnya dimurnikan dengan presipitasi amonium sulfat 2,5M, mengandung 4981 µg 6,7 kb pDNA; buffer pencuci dan elusi, 10mM Tris/HCL, pH 8.0 dengan konsentrasi amonium sulfat ditunjukkan garis putus-putus. Puncak berhubungan dengan pDNA (TpDNA) dan pengotor (I) teridentifikasi (M.M. Diogo, tidak dipublikasikan).

Pendukung HIC diperoleh dengan derivatisasi Sepharose CL-6B dengan 1,4 butanediol diglycidyl ether telah dilibatkan dalam proses pemurnian vektor terapi gen cystic fibrosis (pCF1-CFTR) dengan grade klinis [98]. Metode yang dikembangkan meliputi lisis sel alkali diikuti presipitasi dengan amonium sulfat dan HIC. Hasil HIC 70% dan kualitas pDNA yang diperoleh kembali mendekati standar.

Suatu proses pemurnian pDNA telah dikembangkan berdasarkan kinerja HIC dengan kolom hidrofobik Butyl-6PW (Tosoh) dan Octyl-6PW (Tosoh) digunakan dalam tandem [99]. Kolom disetimbangkan dengan garam konsentrasi tinggi (2.0M ammonium sulfat) yang dialiri dengan lisat. Kolom pertama mengadsorpsi protein dan RNA tetapi tidak pDNA. pDNA dalam eluat dilewatkan pada kolom kedua dengan konsentrasi garam yang sama untuk mengikat pDNA dan gDNA. Kolom kemudian tidak disambungkan dan pDNA dalam kolom kedua dielusikan dengan menurunkan konsentrasi garam. Eluat yang mengandung pDNA selanjutnya dimurnikan dengan AEC. Berdasarkan analisis elektroforesis gel agarosa, fraksi pDNA CS kemurnian tinggi diperoleh. Dalam perbandingan, beberapa pengotor terdapat dalam fraksi pDNA yang diperoleh dengan hanya AEC saja. Kapasitas Octyl-6 PW untuk pDNA sekitar 1.1 mg/ml dan hasil recovery diperoleh 90%.

HIC juga telah digunakan untuk monitor dan kontrol analitik kualitas pDNA. Sepharose CL-6B diderivatisasi dengan 1,4-butanediol diglycidyl ether telah berhasil digunakan untuk pemisahan isoform pDNA dengan adanya 1.5M ammonium sulfat [10]. pDNA *native* (SC + OC) dielusikan dalam suatu *flowthrough* diikuti oleh pDNA terdenaturasi. Bentuk terdenaturasi ditahan lebih lama dalam kolom karena interaksi hidrofobik dari regangan DNA *single-stranded* dengan pendukung [100]. Kolom AHPLC Phenyl Sepharose (Amersham Biosciences) telah digunakan untuk pemisahan cepat (7 menit) pDNA *double-stranded* total. Kolom mampu menangani sampel dengan kadar pengotor tinggi (<5% pDNA), tanpa memerlukan penggunaan pretreatment sampel. Pengulangan analisis menghasilkan standar deviasi kurang dari 2% dan limit deteksi metode sekitar 1 µg/ml.

Isoform pDNA SC dan OC dalam rentang 4 sampai 30 kbp telah sukses dipecahkan dalam kolom analitik TSKgel Butyl (Tosoh) [101]. Ligan hidrofobik adalah gugus butil, terikat terhadap *backbone methacrylate non-porous*. Berdasarkan sifat hidrofilik dominan pDNA, konsentrasi garam yang sangat tinggi (3M ammonium sulfat) diperlukan untuk mengikat pDNA ke dalam permukaan resin. Gradien garam kebalikannya digunakan untuk mengelusi urutan isoform OC dan SC. Pemisahan isoform berdasarkan pada naiknya exposition basa hidrofobik karena underwinding S. Molekul pDNA yang lebih besar memerlukan konsentrasi garam yang lebih rendah untuk terikat pada kolom dan terelusi kemudian, ketika menggunakan garam konsentrasi sama. Puncak ketiga yang terelusi setelah bentuk OC dan SC telah diidentifikasi dengan light scattering sebagai bentuk concatamerik dari pDNA. Resolusi ditemukan naik dengan menurunnya kecepatan alir dalam hal ketergantungan pada temperatur tetapi bukan pada ukuran pDNA. Di lain pihak, resolusi juga meningkat dengan temperatur dalam hal ketergantungan terhadap kecepatan alir. Isoform pDNA dapat dianalisis kurang dari 7 menit pada 1 ml/min untuk plasmid hingga 30 kbp.

3.3.4. Kromatografi Adsorpsi Tiofilik

Nama HIC pertama dikenalkan untuk menggambarkan pemisahan dengan media garam untuk protein pada matriks dengan hidrofobik [105]. Akhir-akhir ini, bagaimanapun, semua jenis interaksi dengan keberadaan garam konsentrasi tinggi dikelompokkan: thiophilic adsorption chromatography (TAC), electron donor-acceptor chromatography (EDAC) dan HIC. Suatu proses pemurnian pDNA dengan tiga tahap kromatografi (SEC-TAC-AEC), yang melibatkan TAC telah diajukan [24] (proses VIII dalam Tabel 1). Pertama, pDNA berada dalam lisat sel dipisahkan dari RNA dengan SEC dalam kelompok mode pemisahan menggunakan Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences) dengan 1.5M atau lebih ammonium sulfat. Dibandingkan dengan jenis SEC, kolom dapat dialiri lebih dari 30% volume kolom dan menghasilkan lebih tinggi dari 90% yang diperoleh tanpa pelarutan. Selanjutnya, kecepatan alir linier dapat setinggi 80 cm/jam dan tinggi bed 25 cm. Tahapan TAC, interaksi selektif dari molekul dengan ligan tioeter aromatik, mengandung sulfur vicinal dalam keberadaan garam anti-chaotropic konsentrasi tinggi. Suatu kolom dipak dengan adsorben jenis tioeter berdasarkan

pasangan 2-mercaptopyridine terhadap Sepharose 6 FF dan disetimbangkan dengan amonium sulfat dapat menahan pDNA SC tetapi tidak pDNA OC. pDNA SC dapat dielusi keduanya dengan menurunkan konsentrasi asam sulfat pada fasa gerak atau dengan melakukan gradien NaCl 2M dalam buffer yang mengandung ammonium sulfat. Karena beberapa pengotor berko-elusi dengan pDNA SC ketika diterapkan gradien dengan konduktivitas rendah, elusi bergradien sampai NaCl 2M dipilih. Kenyataannya, sejumlah trace protein, RNA dan endotoxin tidak dapat dielusi dengan penambahan garam ini bahkan jika konsentrasi NaCl dinaikkan hingga jenuh (~3 M). Pengotor-pengotor tersebut telah dihilangkan dari media kromatografi dengan menurunkan konsentrasi amonium sulfat. Penulis berspekulasi bahwa struktur cincin aromatik dari ligan dapat diendapkan dalam intercalasi jenis hidrofobik ($\pi\pi$) dengan pDNA SC, double helix, yang diajukan topoisomerase [24]. Mereka juga mengajukan bahwa atom sulfur berperan sebagai pemberi elektron (charge transfer) dalam interaksi dengan nukleotida spesifik. Kenyataan bahwa mungkin untuk mengelusi pDNA dari kolom dengan gradien NaCl menunjukkan adanya interaksi pasangan ion. Kapasitas pengikatan kolom lebih dari 1 mg pDNA SC/ ml resin dan tahap ini menghasilkan 70% [24]. Tahap akhir dari proses terdiri dari pemekatan dan polishing sampel menggunakan AEC dengan resin Source 30Q (Amersham Biosciences).

3.4. Kromatografi berdasarkan Afinitas

Pengerjaan kromatografi berdasarkan interaksi afinitas antara pDNA dengan pengotor menggunakan ligan spesifik yang diamobilisasi dalam fasa diam belum banyak dikembangkan. Namun demikian aplikasi yang relevan dari literatur ditunjukkan dalam Tabel 9.

3.4.1. Kromatografi afinitas *triple-helix*

Triple-helix affinity chromatography (THAC) adalah berdasarkan pembentukan tripleks antara oligonukleotida yang diikatkan secara kovalen pada matriks kromatografi, dan suatu urutan dupleks spesifik dalam pDNA target [107,108]. Bentuk tripleks ditunjukkan ketika strand oligonukleotida homopyrimidine terikat dengan DNA dupleks

homopurine–homopyrimidine duplex DNA membentuk formasi ikatan hidrogen Hoogsteen: thymine (T) - adenine (A) membentuk tripleks TA-T, dan protonasi cytosine (C+)-guanine (G) membentuk tripleks CG-C+ [106–108,113]. Pembentukan triplex biasanya lambat.

Tabel 9. Kromatografi berdasarkan Afinitas pDNA

Jenis	Fasa Diam	Supplier	Referensi
THAC	Oligo-Sephacryl S1000	Non-commercial	[106,107]
	Oligo-HiTrap NHS	Non-commercial	[108]
	PDNA-AC Zinc finger-glutathione S-transferase-glutathione Sepharose	Non-commercial	[109]
IMAC	Iminodoacetic acid (IDA) resin charged with Cu(II)		[110]
	EndoAC Polymyxin B-Sepharose	Non-commercial	[112,113]

Urutan target yang berulang dipilih untuk memperoleh posisi hibridisasi berlipat dari nukleotida dengan pDNA [108]. Heliks triplek basa stabil pada pH asam mendekati pKa sitosin (4.8), karena protonasi sitosin dalam oligonukleotida diperlukan. Selanjutnya frekuensi dan distribusi triplet CG-C+ dalam urutan target mempengaruhi stabilitas pH tripleks [106]. Lisat sel yang bersifat asam memadai untuk pembentukan tripleks stabil. Tripleks-tripleks juga distabilisasi pada konsentrasi garam yang tinggi, karena selimut repulsi coulombic kation antara gula-fosfat.

pDNA dapat ditangkap langsung dari lisat sel bakteri dengan pembentukan triple-helix dengan oligonukleotida biotinilated 20 basa yang terikat dengan bead magnetik dilapisi streptavidin [114,115]. Bagaimanapun metode pertama memerlukan waktu yang lama, karena dua tahap amobilisasi oligo dan pembentukan triple-helix dibentuk dengan periode 3 jam [114]. Metode kedua, dua tahap dapat dilakukan dalam waktu yang sama, dalam waktu 15 menit. Beberapa plasmid yang diisolasi dan ditemukan sesuai dengan restriksi enzim. Meskipun sangat menarik untuk skala lab, magnetic beads tidak cocok untuk skala proses.

THAC telah dikembangkan untuk skala proses [108]. Urutan polypyrimidine [(CTT)₇, (CT)₁₁, (CCT)₇] secara kovalen digabungkan dengan kolom HiTrap-NHS (Amersham Biosciences). Kolom diekuilibrasikan dengan NaCl konsentrasi tinggi dan digunakan untuk pemurnian plasmid, yang mengandung urutan [(GAA)₁₇, (GGA)₁₅, (GA)₂₅]. Pengikatan plasmid melalui pembentukan tripleks adalah perlahan (2 jam, RT). Elusi plasmid dilakukan dengan menaikkan pH hingga 9 untuk deprotonasi sitosin, selanjutnya disosiasi triple heliks. Hasil terbaik adalah menggunakan 21-mer oligonukleotida (CTT)₇ diikat melalui linker (CH₂)₁₂ [108]. Hasil menurun dengan naiknya persentase sitosin dalam strand ketiga karena triplet CG-C⁺ didestabilisasi dengan adanya CG-C⁺ [108]. 20-mer oligonucleotida menunjukkan efisiensi yang lebih baik dibanding 32-mer [115]. Hasilnya juga lebih tinggi dengan target double strand yang lebih panjang (51 versus 21 nucleotida) yang digunakan untuk membentuk tripleks dengan oligonukleotida yang dikenali 21-mer [108]. Hal ini disebabkan karena posisi hibridisasi yang lebih banyak. Hal lain adalah fraksi murni dengan persentase pDNA SC yang tinggi dari bahan awal. Peneliti lain [114] menerangkan sifat yang berlawanan, kemungkinan yang menunjukkan bahwa pengikatan preferensial dari isoform spesifik sebagai fungsi dari urutan target atau posisi plasmid [106]. Pemurnian plasmid dalam satu tahap dari lisat dengan metode ini menunjukkan puncak tunggal dalam analisis HPLC. Tidak ditemukan RNA dengan elektroforesis gel agarosa dan kontaminan gDNA dan endotoksin dikurangi dengan dua orders of magnitude. Kinerja proses dapat ditingkatkan dengan menyertakan THAC ke dalam proses pemurnian DNA yang melibatkan tahap pemurnian klasik. Dalam hal ini, adalah mungkin untuk memperoleh pDNA dengan level gDNA sangat rendah (0.01%) dan dengan level endotoksin cocok untuk injeksi intravenus. Proses produksi ini akan menghasilkan pDNA grade farmasi untuk pengobatan manusia.

Adsorpsi THA digambarkan kemudian oleh Schlupe *et al.* [106]. Pembentukan tripleks oligonucleotida 5'-TCTTCTTTCTC TTT, diamobilisasi dengan ujung 5' nya pada bead kromatografi Sephacryl S-1000 hydrazide functionalized (batas eksklusi 20 kbp) melalui spacer arm 16 atom hidrofilik. Berdasarkan batas eksklusi pendukung, sekitar 34% ligan diharapkan dapat dicapai plasmid [106]. Beberapa percobaan adsorpsi batch telah

dilakukan menggunakan pDNA murni. Kapasitas bead adalah 28 µg/ml untuk pDNA dan hasil pDNA mencapai 62%. Isolasi pDNA dari lisat dengan penghilangan RNA, gDNA dan protein juga telah berhasil. Selanjutnya, SC pDNA diamati dengan gel elektroforesis agarosa [106].

3.4.2. Kromatografi afinitas protein–DNA

Interaksi protein–DNA juga telah digunakan untuk kromatografi afinitas pDNA. Suatu protein bifungsional dibuat dengan suatu DNA *zinc finger* (ZF) yang mengikat *domain* dengan *glutathione S-transferase* (GST) sebagai *domain* N-terminal [109]. Protein ZF adalah urutan konsensus protein ZF yang mengikat urutan 5'-GGG-GCG-GCT-3', sementara domain GST dapat mengikat matriks glutathion yang diamobilisasi. Dalam hal ini, suatu kompleks dapat dibentuk antara pDNA target, yang mengandung urutan yang dikenali dan *glutathione-Sepharose*. Kompleks protein–pDNA selanjutnya dapat diperoleh dari glutathione-Sepharose dengan elusi kompetitif dengan buffer glutathion tereduksi.

3.4.3. Kromatografi afinitas dengan logam yang diamobilisasi

Immobilised metal affinity chromatography (IMAC) telah digunakan akhir-akhir ini untuk pemurnian pDNA, menggunakan resin asam iminodiasetat, *iminodiacetic acid* (IDA) diberi muatan dengan Cu(II) [110]. Resin ditemukan mengikat basa purin dalam larutan. Dalam hal ini, terjadi ikatan DNA terdenaturasi dan RNA terhadap kolom IMAC sedangkan pDNA tidak ditahan.

3.4.4. Kromatografi afinitas boronat

Salah satu perbedaan RNA dan DNA yang mendasari pemisahan adalah adanya 2',3' *cis*-diol pada ujung 3' molekul RNA [111]. Ligan boronat (seperti asam *m*-aminophenylboronat) diikatkan pada matriks kromatografi yang dapat mengenali dan mengikat molekul RNA melalui sifat ini, tanpa backbone deoksiribosa DNA. Kromatografi afinitas boronat telah digunakan jika RNA yang dikehendaki. Meskipun

penggunaan BAC belum digunakan untuk pemurnian pDNA, dapat digunakan untuk mengurangi RNA sebagai kontaminan [111].

3.4.5. Kromatografi afinitas polimiksin

Polymyxin B adalah antibiotik polipeptida kationik yang memiliki aktivitas bakterisidal terhadap bakteri gram negatif. Aktivitas ini berdasarkan pada kemampuannya mengacaukan dinding sel bakteri dengan interaksi spesifik polimiksin B dengan struktur endotoksin lipid (Lipid A) [116]. Kemampuan ini digunakan untuk kromatografi afinitas dengan mengikatkan polimiksin B terhadap Sepharose untuk menghilangkan kontaminan endotoksin (200-100.000 kali lipat) dalam larutan pDNA [112,113]. Bagaimanapun, kekurangannya adalah interaksi non spesifik ionik antara pDNA dengan polimiksin B [112]. Kekurangan lain dari teknik ini adalah berkaitan dengan *neuro-* dan *nephrotoksitas* polimiksin B dan stimulasi *monocytes* untuk melepaskan *interleukin-1* [116].

4. PEMILIHAN TEKNIK KROMATOGRAFI

Pemilihan satu atau lebih teknik kromatografi untuk pemurnian pDNA SC ditentukan oleh sifat dan distribusi pengotor dan kontaminan, dengan mengantisipasi dosis pDNA [117]. Tabel 10 menunjukkan kelebihan dan kekurangan beberapa teknik kromatografi dan aplikasinya pada proses pemurnian pDNA.

SEC merupakan metode yang unik untuk pemurnian DNA karena kemungkinannya memisahkan dari molekul-molekul pengotor asam nukleat mulai dari massa molekul tinggi ke rendah dalam tahap yang sama (endotoxin, RNA, oligonucleotida, protein, genomik DNA dan non-SC pDNA). Kekurangan SEC adalah loading yang terputus (<2% volume kolom), kehilangan resolusi pada loading yang lebih tinggi dan pelarutan produk pDNA. Lebih jauh, resolusi tinggi biasanya diperoleh dengan waktu pemisahan yang lama. Dengan karakteristik tersebut, SEC sebaiknya dipilih pada tahap akhir proses pemurnian pDNA. Akhir-akhir ini telah dilaporkan dengan loading yang tinggi (30%) langkah SEC dengan Sepharose 6 FF digunakan untuk TAC dan AEC [24].

Tabel 10. Kelebihan dan Kekurangan mode kromatografi untuk pemisahan dan pemurnian pDNA

Jenis	Kelebihan	Kekurangan	Aplikasi
SEC	Memisahkan endotoksin, gDNA, RNA MR tinggi dan rendah, oligonucleotida, protein Fraksionasi isoform pDNA	Vol sampel rendah dan pekat Lama untuk resolusi tinggi Pelarutan produk Skala terbatas untuk produksi	Tahap akhir Pemisahan kelompok Penghilangan endotoksin Fraksionasi isoform
AEC	Pemekatan pDNA Cepat dan sederhana Efisien menghilangkan pengotor dengan densitas muatan rendah Beberapa fasa diam memisahkan isoform pDNA	Resolusi pDNA Sc dari gDNA, isoform lain dan multimer sulit Ko-elusi pDNA dengan endotoksin dan RNA Mr tinggi Kapasitas rendah Elusi pDNA dalam konsentrasi garam tinggi	Menangkap pDNA Pemekatan pDNA kuantitatif
HAC	HA terdapat di alam Memisahkan beberapa pengotor dari pDNA Memisahkan isoform pDNA	Elusi pDNA dalam fosfat pekat Ion asetat menyebabkan disolusi fasa diam	Menangkap pDNA
RPLC dan RPIPC	Elusi pDNA dalam pelarut volatil Memisahkan beberapa pengotor dari pDNA Memisahkan isoform pDNA	Kehilangan integritas pDNA Bahaya pelarut Lama	Menangkap pDNA kuantitatif
HIC	Memisahkan endotoksin dan asam nukleat single stranded Beberapa fasa diam memisahkan isoform pDNA Cepat	Dalam beberapa kasus pDNA dielusi pada konsentrasi garam yang tinggi pDNA terelusi dalam <i>flow through</i>	Menangkap pDNA atau pengotor Pemekatan pDNA kuantitatif
TAC	Memisahkan pDNA dari pengotor dan isoform Pemekatan pDNA	Elusi pDNA dalam larutan garam konsentrasi tinggi	Menangkap pDNA Pemekatan pDNA
THAC	Spesifisitas tinggi Satu tahap pemurnian Pemekatan pDNA	Mahal Versatilitas rendah Kapasitas rendah	Menangkap pDNA Pemekatan pDNA
Polimiksin B	Spesifisitas	Spesifisitas polimiksin B mengikat pDNA non-spesifik Toksisitas polimiksin B	Menghilangkan endotoksin

Media AEC mengikat pDNA dengan kuat terhadap molekul-molekul dengan densitas muatan besar. Teknik ini sangat cepat dan sederhana, dapat untuk volume injeksi sampel yang besar dan untuk elusi konsentrasi pDNA yang tinggi. AEC ideal untuk menghilangkan oligoribonukleotida dan beberapa protein. Meskipun AEC pDNA terbatas oleh rendahnya kapasitas fasa diam di pasaran, sejumlah usaha telah dilakukan untuk disain fasa diam (seperti bead “superporous” , monolith, membran) untuk menangani molekul besar pDNA. Selanjutnya, isolasi varian isoform SC pDNA telah digambarkan beberapa kali. Bagaimanapun, untuk Mr tinggi, molekul bermuatan negatif, seperti concatamer pDNA, RNA, gDNA, non-SC pDNA isoform dan LPS, sering menyeberang puncak SC. Selektivitas yang kurang baik ini menurunkan kapasitas pengikatan pDNA dan mengakibatkan resolusi dan kemurnian rendah. Namun demikian, penggunaan RNase untuk mendegradasi RNA inang dan meningkatkan resolusi, yang diharuskan, sekarang telah ditinggalkan yang dalam strategi prose pre-pemurnian lain harus dilakukan. Keterbatasan lain AEC adalah berkaitan dengan keharusan menghilangkan garam yang digunakan selama kromatografi. Kesimpulannya, AEC sangat berguna untuk pemurnian dan penangkapan pDNA tahap pertama, tetapi lemah dalam selektivitas untuk tahap kromatografi selanjutnya.

RPLC pDNA biasanya memerlukan beberapa pengerjaan prepurifikasi, karena RPLC itu sendiri tidak mampu untuk memurnikan produk. Ketika menggunakan RPLC untuk pemurnian pDNA, hilangnya integritas struktur pDNA dapat ditingkatkan dengan penambahan pelarut organik terhadap fasa gerak. Selanjutnya, beberapa pelarut organik adalah toksik, volatil, bahkan eksplosif, sehingga harus dilengkapi fasilitas keamanan personal [12]. Selain dari itu, ketika memproses pDNA, diperlukan waktu elusi yang lama dan terjadi fraksi terlarut. Kenyataan bahwa pDNA diperoleh dalam pelarut volatil kadang-kadang menguntungkan, karena memberikan formulasi produk akhir menggunakan metode pasca kromatografi (rotaevaporasi, liofilisasi) yang tidak mempengaruhi struktur SC [19].

HIC pDNA menyatakan lebih *advance* di atas AEC biasa. Kenyataannya, HIC dapat memisahkan pDNA dari LPS, gDNA terdenaturasi, RNA dan pDNA terdenaturasi. Lebih jauh lagi, pemisahan isoform pDNA adalah mungkin dengan beberapa fasa diam. Kelebihan HIC di atas RPLC adalah penggunaan fasa mobil yang lebih lunak, tidak

mendenaturasi biomolekul. Jika kondisi yang digunakan untuk pengikatan pDNA, HIC menjadi metode dengan high-throughput yang kompatibel dengan load tinggi dan konsentrasi tinggi pDNA. Bagaimanapun, karena hidrofobisitas pDNA sangat kecil, pengikatan terhadap fasa diam memerlukan penggunaan garam dan harus dihilangkan pada akhir pemisahan, dengan operasi tambahan.

Kromatografi Affinitas (AC) merupakan teknik yang powerful untuk satu tahap pemurnian pDNA dari lisat. Volume yang besar dari lisat dapat diproses dan dapat diperoleh pDNA konsentrasi tinggi. Bagaimanapun, karena masing-masing ligan dalam fasa diam menargetkan suatu urutan basa spesifik, maka kecakapan AC rendah. Hal ini diterjemahkan ke dalam harga yang mahal, menyebabkan teknik yang tidak mudah untuk dijadikan sebagai pilot tahap permurnian skala proses.

5. TREND MASA DEPAN

Sejumlah teknik kromatografi telah dikembangkan untuk tujuan pemurnian pDNA. Bagaimanapun, masih terdapat beberapa masalah yang harus dipecahkan. Jelasnya, untuk penelitian ke depan harus difokuskan terhadap disain fasa diam baru, dengan meningkatkan kapasitas untuk pDNA (seperti bead “superporous”, bead dengan permukaan “hairy”, dsb). Penggunaan format lebih memadai untuk menangani molekul pDNA, seperti membran dan monolith akan menjadi sangat penting dalam kromatografi pDNA, bahkan pengembangan dari format bead tradisional. Selektivitas yang kurang baik dari beberapa pendukung (seperti penukar anion) terhadap pemisahan pDNA dari pengotor, meningkatkan perhatian untuk mengatur perantara masih merupakan hal sangat penting. Penyelesaian imajinatif, seperti penggunaan *restricted access beads*, akan disarankan untuk meningkatkan selektivitas. Pentingnya pemisahan isoform pDNA yang berbeda akan terus menerus mendorong pengembangan fasa diam dan metode kromatografi, untuk tujuan preparatif dan analitik. Kemampuan beberapa teknik kromatografi menopang industri produksi pDNA untuk aplikasi terapeutik menjadi lebih penting di tahun-tahun mendatang, sejak ekspansi besar-besaran vektor pDNA klinis sukses di pasaran.

REFERENSI

- [1] H.L. Davis, M.-L. Michel, R.G. Whalen, *Ann. NY Acad. Sci.* 772 (1995) 21.
- [2] A. Mountain, *Trends Biotechnol.* 18 (2000) 119.
- [3] F.D. Ledley, *Hum. Gene Ther.* 6 (1995) 1129.
- [4] D.M.F. Prazeres, G.A. Monteiro, G.N.M. Ferreira, M.M. Diogo, S.C. Ribeiro, J.M.S. Cabral, in: M.R. El-Gewely (Ed.), *Biotechnology Annual Review*, Elsevier, Amsterdam, 2001, p. 1.
- [5] D.M.F. Prazeres, G.N.M. Ferreira, G.A. Monteiro, C.L. Cooney, J.M.S. Cabral, *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 169.
- [6] R.R. Sinden, *DNA Structure and Function*, Academic Press, San Diego, CA, 1994.
- [7] D.K. Summers, *The Biology of Plasmids*, Blackwell, Oxford, UK, 1996.
- [8] H.C. Birnboim, J. Doly, *Nucl. Acids Res.* 7 (1979) 1513.
- [9] D.S. Holmes, M. Quigley, *Anal. Biochem.* 114 (1981) 193.
- [10] M.M. Diogo, J.A. Queiroz, G.A. Monteiro, D.M.F. Prazeres, *Anal. Biochem.* 275 (1999) 122.
- [11] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [12] D.M.F. Prazeres, G.N.M. Ferreira, *Chem. Eng. Process* 43 (2004) 615.
- [13] H.L. Davis, M. Schleef, P. Moritz, M. Mancini, J. Schorr, R.G. Whalen, *Biotechniques* 21 (1996) 92.
- [14] G.N.M. Ferreira, J.M.S. Cabral, D.M.F. Prazeres, *Biotechnol. Prog.* 15 (1999) 725.
- [15] M. Marquet, N.A. Horn, J.A. Meek, *Bio. Pharm.* (May) (1997) 42.
- [16] M. Marquet, N. Horn, J.A. Meek, G. Budahazi, US Patent No. 5561064, 1 October 1996.
- [17] N. Horn, J.A. Meek, G. Budahazi, M. Marquet, *Hum. Gene Ther.* 6 (1995) 565.
- [18] D.L. Varley, A.G. Hitchcock, A.M.E. Weiss, W.A. Horler, R. Cowell, L. Peddie, G.S. Sharpe, D.R. Thatcher, J.A.J. Hanak, *Bioseparation* 8 (1999) 209.
- [19] A.P. Green, G.M. Prior, N.M. Helveston, B.E. Taittinger, X. Liu, J.A. Thompson, *Bio. Pharm.* (May) (1997) 52.
- [20] M.M. Diogo, S.C. Ribeiro, J.A. Queiroz, G.A. Monteiro, N. Tordo, P. Perrin, D.M.F. Prazeres, *J. Gene Med.* 3 (2001) 577.

- [21] A.L. Lee, S. Sagar, US Patent No. 6197553, 6 March 2001.
- [22] S. Nochumson, R. Durland, A. Yu-Speight, J. Welp, K. Wu, R. Hayes, US Patent No. 2001034435, 25 October 2001.
- [23] R. Bhikhabhai, US Patent No. 6410274 B1, 25 June 2002.
- [24] R. Lemmens, U. Olsson, T. Nyhammar, J. Stadler, *J. Chromatogr. B* 784 (2003) 291.
- [25] G. Athas, *Scientist* 13 (1999) 20.
- [26] H.E. Sussman, *Scientist* 13 (2003) 42.
- [27] B. Atkinson, F. Mavituna (Eds.), *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, Macmillan, New York, 1991.
- [28] N. Horn, M. Marquet, J.A. Meek, G. Budahazi, US Patent No. 5576196, 19 November 1996.
- [29] G. Chandra, P. Patel, T. Kost, J. Gray, *Anal. Biochem.* 203 (1992) 169.
- [30] M.S. Levy, I.J. Collins, J.T. Tsai, P.A. Shamlou, J.M. Ward, P. Dunnill, *J. Biotechnol.* 76 (2000) 197.
- [31] D. Kendall, G.J. Lye, M.S. Levy, *Biotechnol. Bioeng.* 79 (2002) 816.
- [32] D.W. Kahn, M.D. Butler, D.L. Cohen, M. Gordon, J.W. Kahn, M.E. Winkler, *Biotechnol. Bioeng.* 69 (2000) 101.
- [33] A. Eon-Duval, G. Burke, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 327.
- [34] A. Eon-Duval, R.H. MacDuff, C.A. Fisher, M.J. Harris, C. Brook, *Anal. Biochem.* 316 (2003) 66.
- [35] D.M.F. Prazeres, T. Schluep, C. Cooney, *J. Chromatogr. A* 806 (1998) 31.
- [36] V.I. Ugarov, T.R. Samatov, H.V. Chetverina, A.B. Chetverin, *Biotechniques* 26 (1999) 194.
- [37] J.C. Murphy, J.A. Wibbenmeyer, G.E. Fox, R.C. Wilson, *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 822.
- [38] A. Eon-Duval, K. Gumbs, C. Ellet, *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2003) 544.
- [39] G.N.M. Ferreira, J.M.S. Cabral, D.M.F. Prazeres, *Bioseparation* 9 (2000) 1.
- [40] L.A. Ciccolini, P.A. Shamlou, N.J. Titchener-Hooker, J.M. Ward, P. Dunnill, *Biotechnol. Bioeng.* 60 (1998) 768.
- [41] D.M. Fishman, G.D. Patterson, *Biopolymers* 38 (1996) 535.

- [42] M.T. Tyn, T.W. Gusek, *Biotechnol. Bioeng.* 35 (1990) 327.
- [43] C.G. Huber, *J. Chromatogr. A* 806 (1998) 3.
- [44] G.N.M. Ferreira, J.M.S. Cabral, D.M.F. Prazeres, *Biotechnol. Prog.* 16 (2000) 416.
- [45] J. Coffman, J. Eldering, A. Schwarz, E. Boschetti, Poster presented at recovery of biological products VIII, Tucson, AZ, 1996.
- [46] I. Theodossiou, M. Sondergaard, O.R. Thomas, *Bioseparation* 10 (2001) 31.
- [47] Perseptive-Biosystems, *Biochemica* 1 (1996) 9.
- [48] K. Branovic, D. Forcic, J. Ivancic, A. Strancar, M. Barut, T. Gulija, R. Zgorelec, R. Mazuran, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 331.
- [49] M.A. Teeters, S.E. Conrardy, B.L. Thomas, T.W. Root, E.N. Lightfoot, *J. Chromatogr. A* 989 (2003) 165.
- [50] H.N. Endres, J.A.C. Johnson, C.A. Ross, J.K. Welp, M.R. Etzel, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37 (2003) 259.
- [51] S. Zhang, A. Krivosheyeva, S. Nochumson, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37 (2003) 245.
- [52] G.N.M. Ferreira, D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, Processo cromatogr áfico para purificac, ~ao de DNA plasm ídico utilizando suportes superporosos, PT 102,341, 1 January 2003.
- [53] J. Stadler, R. Lemmens, T. Nyhammar, *J. Gene Med.* 6 (2004)54.
- [54] A. Ljunglof, P. Bergvall, R. Bhikhabhai, R. Hjorth, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 129.
- [55] E. Thwaites, S.C. Burton, A. Lyddiatt, *J. Chromatogr. A* 943 (2001) 77.
- [56] I. Theodossiou, O.R.T. Thomas, *J. Chromatogr. A* 971 (2002) 73.
- [57] J.C. Murphy, G.E. Fox, R.C. Willson, *J. Chromatogr. A* 984 (2003) 215.
- [58] N. Horn, G. Budahazi, M. Marquet, US Patent No. 5707812, 13 January 1998.
- [59] A. Lyddiatt, D. O'Sullivan, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (1998) 177.
- [60] P.-E. Gustavsson, P.-O. Larsson, *J. Chromatogr. A* 734 (1996) 231.
- [61] M. McCoy, K. Kalghatgi, N. Afeyan, *J. Chromatogr. A* 743 (1996) 221.
- [62] R. Giovannini, R. Freitag, T.B. Tennikova, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3348.
- [63] W.-C. Tseng, F.L. Ho, T.-Y. Fang, S.Y. Suen, *J. Memb. Sci.* 233 (2004) 161.

- [64] M. Bywater, R. Bywater, L. Hellman, *Anal. Biochem.* 132 (1983) 219.
- [65] D. Micard, M. Sobrier, J. Couderc, B. Dastugue, *Anal. Biochem.* 148 (1985) 121.
- [66] G. Ferreira, J. Cabral, D. Prazeres, *J. Mol. Recognit.* 11 (1998) 250.
- [67] G. Ferreira, J. Cabral, D. Prazeres, *Biotechnol. Technol.* 11 (1997) 417.
- [68] J. Gómez-Márquez, M. Freire, F. Segade, *Gene* 54 (1987) 255.
- [69] T. Vo-Quang, Y. Malpiece, D. Buffard, P. Kaminski, D. Vidal, A. Strsberg, *Biosci. Rep.* 5 (1985) 101.
- [70] A. Suominen, M. Karp, P. Mantsala, *Biochem. Int.* 8 (1984) 209.
- [71] J. McClung, R. Gonzales, *Anal. Biochem.* 177 (1989) 378.
- [72] E. Whisenant, B. Rasheed, Y. Bhatnagar, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 5202.
- [73] N. Moreau, X. Tabary, F. Le Goffic, *Anal. Biochem.* 166 (1987) 188.
- [74] J. Hirabayashi, K.-I. Kasai, *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 115.
- [75] G. Raymond, P. Bryant, A. Nelson, J. Johnson, *Anal. Biochem.* 173 (1988) 125.
- [76] J. Hirabayashi, K.-I. Kasai, *Anal. Biochem.* 178 (1989) 336.
- [77] J. Hirabayashi, K.-I. Kasai, *J. Chromatogr. A* 722 (1996) 135.
- [78] M. Colpan, D. Riesner, *J. Chromatogr.* 296 (1984) 339.
- [79] Y. Onishi, Y. Azuma, H. Kizaki, *Anal. Biochem.* 210 (1993) 63.
- [80] Y.-F. Maa, S.-C. Lin, C. Horváth, U.-C. Yang, D.M. Crothers, *J. Chromatogr.* 508 (1990) 61.
- [81] M.M. Diogo, S. Ribeiro, J.A. Queiroz, G.A. Monteiro, P. Perrin, N. Tordo, D.M.F. Prazeres, *Biotechnol. Lett.* 22 (2000) 1397.
- [82] G. Ferreira, J. Cabral, D. Prazeres, *Pharm. Pharmacol. Commun.* 5 (1999) 57.
- [83] M. Schleef, in: A. Mountain, U. Ney, D. Schomburg (Eds.), *Biotechnology. Recombinant Proteins, Monoclonal Antibodies and Therapeutic Genes*, vol. 5a, Wiley-VCH, Weinheim, 1999 (Chapter 20).
- [84] R. Hines, K. O'Connor, G. Vella, W. Warren, *Biotechniques* 12 (1992) 430.
- [85] M. Merion, W. Warren, *Biotechniques* 7 (1989) 60.
- [86] W.-C. Tseng, F.L. Ho, *J. Chromatogr. B* 791 (2003) 263.
- [87] P.-E. Gustavsson, R. Lemmens, T. Nyhammar, P. Busson, P.-O. Larsson, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 131.
- [88] H. Yamakawa, K.-i. Higashino, O. Ohara, *Anal. Biochem.* 240 (1996) 242.

- [89] G.N.M. Ferreira, G.A. Monteiro, D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, *Trends Biotechnol.* 18 (2000) 380.
- [90] C.S. Alberin, S.G. Franklin, US Patent No. 6406892, 18 June 2002.
- [91] A. Colman, M.J. Byers, S.B. Primrose, A. Lyons, *Eur. J. Biochem.* 91 (1978) 303.
- [92] T.R. Johnson, J. Ilan, *Anal. Biochem.* 132 (1982) 20.
- [93] R. Giovannini, R. Freitag, *Biotechnol. Bioeng.* 77 (2002) 445.
- [94] A.N. Best, D.P. Allison, G.D. Novelli, *Anal. Biochem.* 114 (1981) 235.
- [95] S. Colote, C. Ferraz, J.P. Liautard, *Anal. Biochem.* 154 (1986) 15.
- [96] M.P. Weiner, T.W. Thannhauser, J.H. Laity, M.E. Benning, D.P. Lee, H.A. Scheraga, *Nucl. Acids Res.* 16 (1988) 8183.
- [97] D. McNeilly, US Patent No. 6214586, 10 April 2001.
- [98] M.M. Diogo, J.A. Queiroz, G.A. Monteiro, S.A.M. Martins, G.N.M. Ferreira, D.M.F. Prazeres, *Biotechnol. Bioeng.* 68 (2000) 576.
- [99] T. Kitamura, S. Nakatani, US Patent No. 6441160 B2, 27 August 2002.
- [100] M.M. Diogo, J.A. Queiroz, D.M.F. Prazeres, *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 109.
- [101] S. Iuliano, J.R. Fisher, M. Chen, W.J. Kelly, *J. Chromatogr. A* 972 (2002) 77.
- [102] R.B. Sparks, J.H. Elder, *Anal. Biochem.* 135 (1983) 345.
- [103] M.M. Diogo, J.A. Queiroz, D.M.F. Prazeres, *Bioseparation* 10 (2002) 211.
- [104] P. Cashion, G. Sathe, A. Javed, J. Kuster, *Nucl. Acids Res.* 8 (1980) 1167.
- [105] J.A. Queiroz, C.T. Tomaz, J.M.S. Cabral, *J. Biotechnol.* 87 (2001) 143.
- [106] T. Schluep, C. Cooney, *Nucl. Acids Res.* 26 (1998) 4524.
- [107] T. Schluep, C. Cooney, *Bioseparation* 7 (1999) 317.
- [108] P. Wils, V. Escriou, A. Warnery, F. Lacroix, D. Lagneaux, M. Ollivier, J. Crouzet, J.-F. Mayaux, D. Scherman, *Gene Ther.* 4 (1997) 323.
- [109] J. Woodgate, D. Palfrey, D.A. Nagel, A.V. Hine, N.K.H. Slater, *Biotechnol. Bioeng.* 79 (2002) 450.
- [110] J. Murphy, D. Jewell, K. White, G. Fox, R. Willson, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 982.
- [111] N. Singh, R.C. Willson, *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 205–213.
- [112] P.M. Montbriand, R.W. Malone, *J. Biotechnol.* 44 (1996) 43.

- [113] I.P. Wicks, M.L. Howell, T. Hancock, H. Kohsaka, T. Olee, D.A. Carson, Hum. Gene Ther. 6 (1995) 317.
- [114] T. Ito, C.L. Smith, C.R. Cantor, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89(1992) 495.
- [115] H. Ji, L.M. Smith, Anal. Chem. 65 (1993) 1323.
- [116] D. Petsch, B.F. Anspach, J. Biotechnol. 76 (2000) 97.
- [117] M. Marquet, N.A. Horn, J.A. Meek, Bio. Pharm. (September)(1995) 26.
- [118] M.M. Diogo^a, J.A. Queiroz^b, D.M.F. Prazeres^a, Chromatography of plasmid DNA, Journal of Chromatography A, 1069 (2005) 3–22

KROMATOGRAFI DNA PLASMID (pDNA) [118]

1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Karakteristik Fisika-Kimia pDNA	1
1.2 Biosintesis dan Isolasi	2
2. PERANAN KROMATOGRAFI DALAM PEMURNIAN pDNA.....	3
2.1 Pendahuluan	3
2.2 Keterbatasan Kromatografi pDNA dan Kemungkinan Pemecahannya..	6
3. APLIKASI KROMATOGRAFI DALAM PEMURNIAN pDNA	12
3.1 Kromatografi Berdasarkan Ukuran	12
3.1.1 Kromatografi <i>Size-Exclusion</i>	12
3.1.2 Kromatografi Slalom	16
3.2 Kromatografi Berdasarkan Muatan	17
3.2.1 Kromatografi Pertukaran Anion	17
3.2.2 Kromatografi Hidroksiapatit	24
3.3 Kromatografi Berdasarkan Hidrofobisitas	25
3.3.1 Kromatografi Cair Fasa Terbalik	25
3.3.2 Kromatografi Pasangan Ion Fasa Terbalik	27
3.3.3 Kromatografi Interaksi Hidrofobik	28
3.3.4 Kromatografi Adsorpsi Tiofilik	31
3.4 Kromatografi berdasarkan Afinitas	32
3.4.1 Kromatografi Afinitas <i>triple-helix</i>	32
3.4.2 Kromatografi Afinitas protein-DNA	35
3.4.3 Kromatografi Afinitas logam yang diamobilisasi	35
3.4.4 Kromatografi Afinitas Boronat	35
3.4.5 Kromatografi Afinitas Polimiksin-B	36
4. PEMILIHAN TEKNIK KROMATOGRAFI	36
5. TREND MASA DEPAN	39
6. REFERENSI	40

KROMATOGRAFI DNA PLASMID (pDNA)

TUGAS

Mata Kuliah: Kromatografi untuk *Lifescience*

DOSEN: Prof. Dr. Husein H. Bahti



Oleh:

Yeni Wahyuni Hartati

L3L05155

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS PADJADJARAN

BANDUNG

2006

- "Supercoiled" (or "Covalently Closed-Circular") DNA is fully intact with both strands uncut.
- "Relaxed Circular" DNA is fully intact with both strands uncut, but has been enzymatically "relaxed" (supercoils removed).
- "Supercoiled Denatured" DNA, is not a "natural" form present in vivo. It is a contaminant often produced in small quantities following excessive alkaline lysis; both strands are uncut but are not correctly paired, resulting in a compacted plasmid form.
- "Nicked Open-Circular" DNA has one strand cut.
- "Linearized" DNA has both strands cut site at only one site.

The relative electrophoretic mobility (speed) of these DNA conformations in a gel are as follows:

- Nicked Open Circular (slowest)
- Linear
- Supercoiled
- Supercoiled Denatured
- Relaxed Circular (fastest)