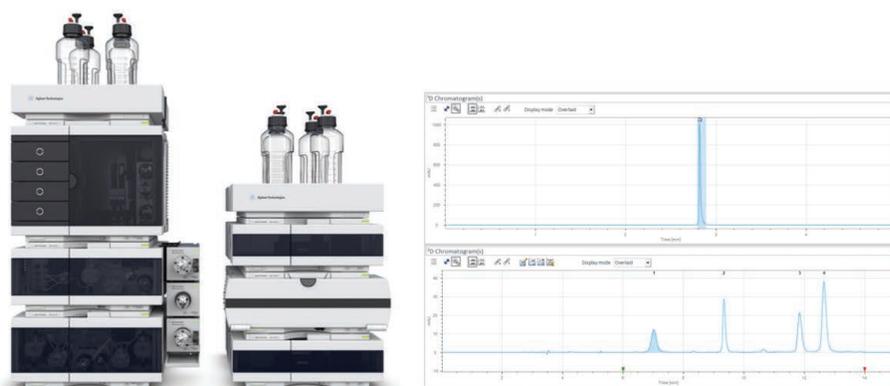


## 无需手动纯化直接分析合成的寡核苷酸

使用 Agilent InfinityLab 二维液相色谱解决方案进行在线脱盐和离子对反相液相色谱分析



### 作者

Sonja Krieger 和  
Clarissa Dickhut  
安捷伦科技有限公司  
Waldbronn, Germany

### 摘要

由亚磷酸胺化学法合成的寡核苷酸通常使用离子对反相液相色谱 (IP-RPLC) 和阴离子交换色谱进行分析和纯化。在 IP-RPLC 分析中，阴离子交换纯化馏分的高含盐量会削弱寡核苷酸参与离子配对的能力。这就需要在 IP-RPLC 分析之前对样品进行脱盐，这一步骤通常使用离心过滤器手动完成。

本应用简报展示了高盐浓度溶液中寡核苷酸的直接二维液相色谱分析：在第一维 (<sup>1</sup>D) 中进行在线脱盐，随后在第二维 (<sup>2</sup>D) 中进行 IP-RPLC 分析。在该设置中，二维液相色谱的使用提高了工作流程速度，同时避免了手动的样品前处理过程。

## 前言

在分子生物学和分子诊断中，聚合酶链式反应 (PCR)、基因沉默以及相关技术<sup>1</sup> 都需要标准的和经修饰的合成寡核苷酸。此外，合成寡核苷酸在作为治疗剂治疗各种疾病（例如癌症和病毒性疾病）方面的重要性日益突显<sup>2</sup>。寡核苷酸类药物包括反义寡核苷酸、小干扰 RNA (siRNA) 和适配体。反义寡核苷酸和 siRNA 均通过阻止 mRNA 翻译从而阻止蛋白质合成。适配体通过形成适配体-蛋白质复合物，从而抑制蛋白质的生物学功能<sup>3</sup>。

寡核苷酸通常通过亚磷酰胺化学法合成<sup>2,4</sup>。可获得的纯度通常大于 70%，合成后存在的常见杂质包括缺失或增加序列的寡核苷酸连同未完全去保护的产物、缺失嘌呤碱基的寡核苷酸以及其他降解产物<sup>2</sup>。通常使用离子对反相液相色谱 (IP-RPLC) 和阴离子交换色谱对合成的去保护寡核苷酸进行分析分离与纯化<sup>2,4</sup>。

阴离子交换纯化馏分通常含有高浓度的盐，如氯化钠 (NaCl) 或溴化钠 (NaBr)。当使用 IP-RPLC 对这些馏分进行分析时，高浓度的盐会削弱寡核苷酸参与离子配对的能力，从而导致保留时间变化、峰分裂以及峰流穿<sup>5</sup>。为了对阴离子交换纯化馏分进行成功的 IP-RPLC 分析，需要在分析前对样品进行脱盐<sup>5</sup>，而这一过程通常手动完成。

本应用简报展示了高盐浓度溶液中寡核苷酸的直接二维液相色谱分析，这一盐浓度与寡核苷酸合成后阴离子交换纯化馏分中的盐浓度相当。二维液相色谱分析的第一维用于在线脱盐，随后在第二维中进行 IP-RPLC 分析。在该设置中，二维液相色谱的使用可以节省时间并避免手动的样品前处理步骤。省去手动样品前处理步骤可以提高重现性，且可以避免样品前处理过程中的样品损失。

## 实验部分

### 设备

Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱系统包括以下模块：

- 两台 Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)，配备冷却装置（选项 #100）
- 两台 Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)
- 两台 Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)，配备 10 mm 最大光强卡套式流通池 (G4212-60008)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，带二维液相色谱阀、主动溶剂调制 (G4243A)
- 两个 Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备带 40  $\mu$ L 定量环的多中心切割阀 (G4242-64000)

### 软件

Agilent OpenLab CDS ChemStation 版，版本 C.01.08 [210] 以及二维液相色谱软件，版本 A.01.04 SR1。

### 色谱柱

- Agilent PLRP-S 100 Å, 2.1  $\times$  50 mm, 3  $\mu$ m (部件号 PL1912-1300)
- Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱，2.1  $\times$  50 mm, 2.7  $\mu$ m (部件号 659750-702)

## 化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。甲醇购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q 超纯实验室水纯化系统 (Millipore, Merck (Darmstadt, Germany))。

乙酸铵和六氟异丙醇 (HFIP) 购自 Merck (Darmstadt, Germany)。三乙胺 (TEA) 和氨水分别购自 Fluka (Steinheim, Germany) 和 VWR (Darmstadt, Germany)。

## 样品与样品前处理

将寡核苷酸分离度标准品、RNA 和 DNA 样品溶于水。得到的储备液用水或 2 mol/L NaCl 溶液按 1:1 进一步稀释，使水或 1 mol/L NaCl 溶液中具有相同浓度的寡核苷酸。1 mol/L NaCl 的寡核苷酸溶液用于模拟具有高盐浓度的阴离子交换纯化馏分。

使用 Microcon YM-3 离心过滤器以及 3 kDa NMWCO (Millipore, Merck (Darmstadt, Germany)) 按以下步骤对 1 mol/L NaCl 的寡核苷酸溶液进行手动脱盐：

- 将 1 mol/L NaCl 的寡核苷酸溶液 (200 μL) 转移到样品储液槽，14000 g 离心 30 分钟，以浓缩寡核苷酸并洗脱盐分
- 将 200 μL 水转移到样品储液槽，14000 g 离心 30 分钟以进行清洗

- 将样品储液槽颠倒放入一个干净的样品瓶，1000 g 离心 3 分钟，以使浓缩物转移到样品瓶中
- 用水将浓缩物复溶，最终体积约为 200 μL

## 寡核苷酸分离度标准品 (部件号 5190-9028) :

**14 mer:** rCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

**17 mer:** rUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

**20 mer:** rUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

**21 mer:** rGrUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

## RNA 样品 (RNA/2'-OMethyl 混合; 安捷伦 NSAD 合成) :

5'-GuGcCaAcCuGaUgCaGcU-3', 大写字母: RNA, 小写字母: OMethyl

## DNA 样品 (完全硫醇化; 安捷伦 NSAD 合成) :

5'-ugcaCCCTGGATACCauuu-3', 大写字母: DNA, 小写字母: OMethyl

## 方法

### 一维分析

参数	值	
色谱柱	AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm	
溶剂	A) 400 mmol/L HFIP + 15 mmol/L TEA 水溶液 B) 溶剂 A/甲醇 (50:50 v.v)	
梯度	<b>寡核苷酸分离度标准品:</b> 0 min 时 B 为 16% 7 min 时 B 为 30% 13 min 时 B 为 34% 14 min 时 B 为 100% 停止时间: 18 分钟 后运行时间: 3 分钟	<b>RNA 和 DNA 样品:</b> 0 min 时 B 为 16% 10 min 时 B 为 70% 10.5 min 时 B 为 100% 停止时间: 14.5 分钟 后运行时间: 3 分钟
流速	0.4 mL/min	
温度	60 °C	
检测	260/4 nm, 参比 360/100 nm, 20 Hz	
进样	进样量: 5 μL 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用水:乙腈 (90:10) 溶液清洗 3 秒钟	

## 二维液相色谱分析

第一维	
色谱柱	PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 3 μm
溶剂	A) 50 mmol/L 乙酸铵水溶液, 用氨水调至 pH 7 B) 甲醇
梯度	0 min 时 B 为 2% 2 min 时 B 为 2% 3 min 时 B 为 70% 5 min 时 B 为 70% 5.1 min 时 B 为 2% 该梯度重复三次以减少交叉污染。 停止时间: 19 分钟 后运行时间: 关闭 在 <sup>2</sup> D 泵中设置停止时间和后运行时间, 软件会自动将停止时间延长至所有切割均完成 <sup>2</sup> D 分析。
流速	0.4 mL/min
温度	60 °C
检测	260/4 nm, 参比 360/100 nm, 20 Hz 为保护流通池不受阀切换产生的压力脉冲的影响, 在 <sup>1</sup> D DAD 和 2D-LC 阀门之间安装压力释放工具包 (G4236-60010)。
进样	进样量: 5 μL 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用水:乙腈 (90:10) 溶液清洗 3 秒钟
第二维	
色谱柱	AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm
溶剂	A) 400 mmol/L HFIP + 15 mmol/L TEA 水溶液 B) 溶剂 A/甲醇 (50:50 v:v)
温度	60 °C
检测	260/4 nm, 参比 360/100 nm, 20 Hz
二维液相色谱	
二维液相色谱模式	中心切割
流速	0.4 mL/min
采样表	用 <sup>1</sup> D 色谱图作为参比色谱图将中心切割设置为基于时间。 寡核苷酸分离度标准品: 2.79 分钟 RNA 样品: 2.88 分钟 DNA 样品: 3.04 分钟
ASM	ASM 毛细管: 5500-1300 (0.12 × 85 mm) 启用 ASM (ASM 因子: 5) 冲洗样品定量环 3 次 (1.54 min)
第二维梯度	寡核苷酸分离度标准品: 0.00 min 时 B 为 10% 1.54 min 时 B 为 10% 1.55 min 时 B 为 16% 8.55 min 时 B 为 30% 14.55 min 时 B 为 34% 15.55 min 时 B 为 100% 第二维梯度停止时间: 19.55 分钟 第二维周期: 22.55 分钟
	RNA 和 DNA 样品: 0.00 min 时 B 为 10% 1.54 min 时 B 为 10% 1.55 min 时 B 为 16% 11.55 min 时 B 为 70% 12.05 min 时 B 为 100% 第二维梯度停止时间: 16.05 分钟 第二维周期: 19.05 分钟

## 结果与讨论

图 1 展示了水 (图 1A) 和 1 mol/L NaCl 溶液 (图 1B) 中寡核苷酸分离度标准品的一维 IP-RPLC 分析。图 1B 清楚地显示注入的寡核苷酸溶液中的高浓度盐会削弱其参与离子配对的能力, 从而导致峰分裂以及峰流穿 (可看见较大的进样峰)。

从图 2 经脱盐的寡核苷酸溶液的 IP-RPLC 分析可以看出, 用离心过滤器对 1 mol/L NaCl 的寡核苷酸分离度标准品溶液进行手动脱盐后可避免峰分裂以及峰流穿。然而, 使用离心过滤器进行手动脱盐是一个费时费力的过程, 通常耗费约 75 分钟。此外, 手动脱盐后单个寡核苷酸的强度比发生了变化, 这很可能是由较小的寡核苷酸部分损失所致。

使用配备主动溶剂调制的 1290 Infinity II 二维液相色谱系统的中心切割二维液相色谱可实现高盐浓度溶液中寡核苷酸的分析。二维液相色谱分析的第一维用于在线脱盐, 随后在第二维中进行 IP-RPLC 分析。

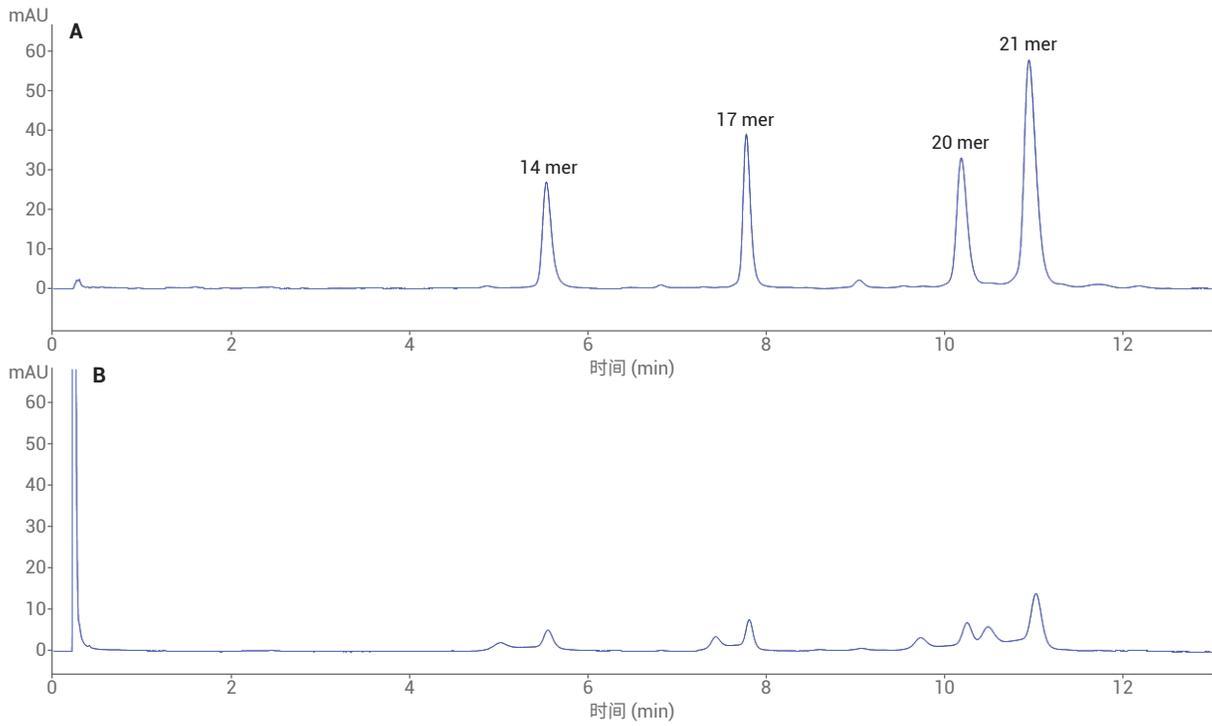


图 1. 寡核苷酸分离度标准品的一维 IP-RPLC 分析；(A) 寡核苷酸分离度标准品水溶液；(B) 1 mol/L NaCl 的寡核苷酸分离度标准品溶液；运行空白并进行基线扣除后获得的色谱图

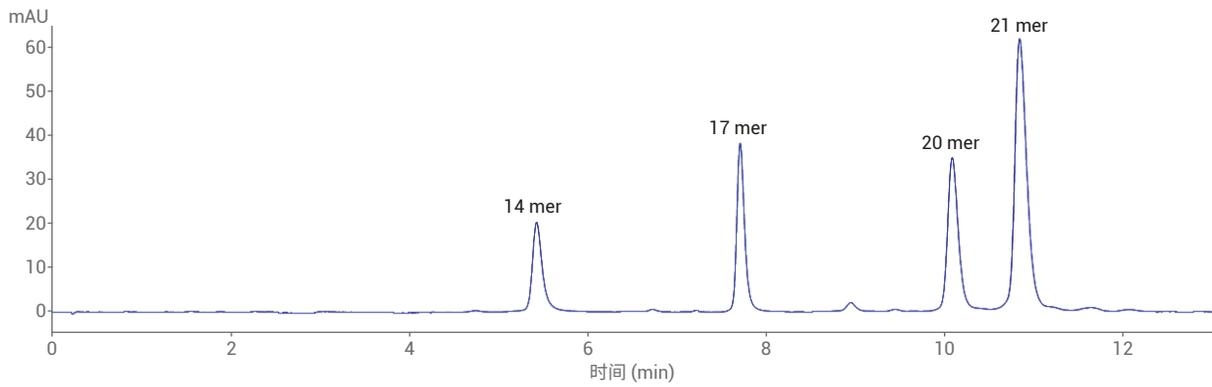


图 2. 使用离心过滤器手动脱盐后 1 mol/L NaCl 的寡核苷酸分离度标准品溶液的一维 IP-RPLC 分析；运行空白并进行基线扣除后获得的色谱图

图3和图4分别展示了水和1 mol/L NaCl溶液中寡核苷酸分离度标准品的分析结果。在第一维中，寡核苷酸在 PLRP-S 色谱柱上有效保留，而盐被洗脱至废液。随

后寡核苷酸作为单峰从第一维中洗脱并转移到第二维进行 IP-RPLC 分析。在第二维中成功地对寡核苷酸进行了 IP-RPLC 分析。二维液相色谱分析在第一维和第二

维中都表现出了良好的保留时间和峰面积精度，如图3和图4的内插表格所示（保留时间和峰面积精度由六次连续分析获得）。

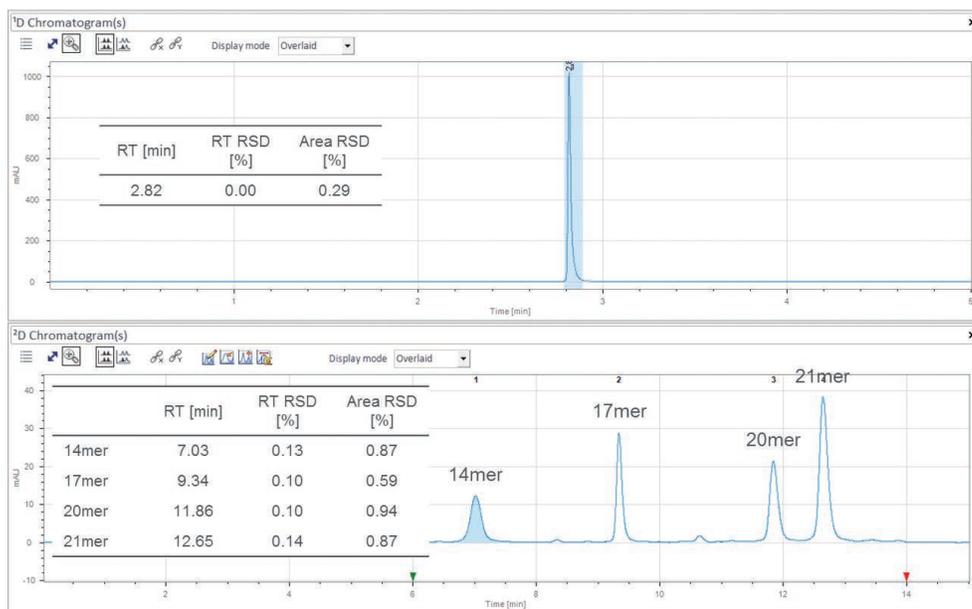


图3. 寡核苷酸分离度标准品水溶液的二维液相色谱分析；A) <sup>1</sup>D 色谱图；B) <sup>2</sup>D 色谱图；保留时间和峰面积精度由六次连续分析获得；运行空白并进行基线扣除后获得的色谱图

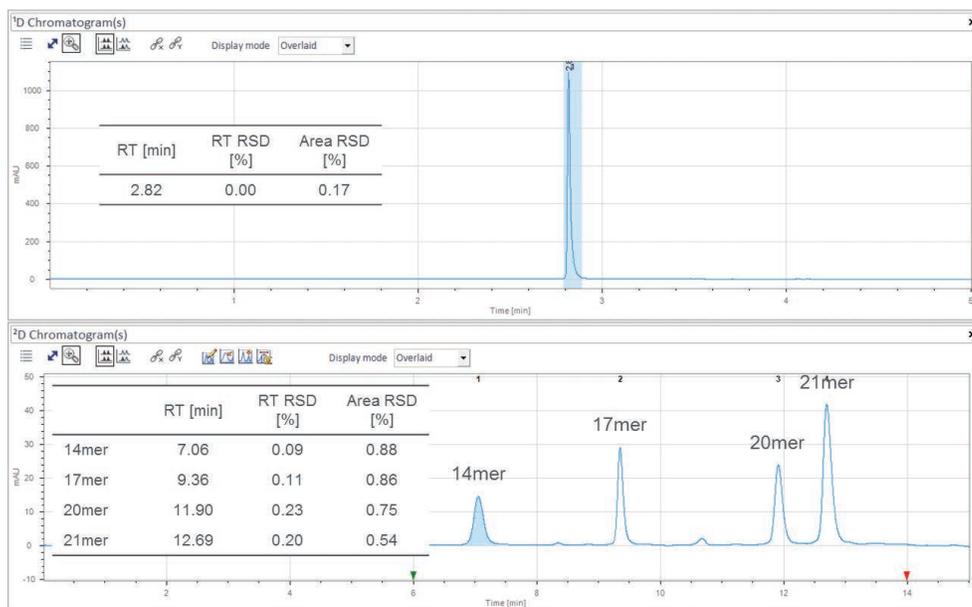


图4. 1 mol/L NaCl 的寡核苷酸分离度标准品溶液的二维液相色谱分析；A) <sup>1</sup>D 色谱图；B) <sup>2</sup>D 色谱图；保留时间和峰面积精度由六次连续分析获得；运行空白并进行基线扣除后获得的色谱图

与一维 IP-RPLC 方法相比，二维液相色谱法包括第一维在线脱盐和第二维 IP-RPLC 分析，耗时增加约 4.5 分钟，但无需样品前处理。而一维 IP-RPLC 分析所需的手动脱盐，耗时接近 75 分钟。同时考虑样品前处理和样品分析所需的时间，二维液相色谱法将给定方案所需的时间从接近 96 分钟减少到了 26 分钟。这相当于将工

作流程的速度提高了三倍以上。此外，二维液相色谱法无需进行样品前处理，从而节省了人力。

图 5 和图 6 分别展示了 RNA 样品和 DNA 样品的一维 IP-RPLC 分析。从图 5B 所示的峰分裂和峰流穿可以看出，当注入 1 mol/L NaCl 的 RNA 样品溶液后，高盐

浓度会削弱寡核苷酸参与离子配对的能力。对 1 mol/L NaCl 的 RNA 样品溶液进行手动脱盐后，可成功进行 IP-RPLC 分析 (图 5C)。对于 1 mol/L NaCl 的 DNA 样品溶液来说，高盐浓度对进样溶液的影响不明显，只能观察到一个小的流穿峰 (图 6B)。

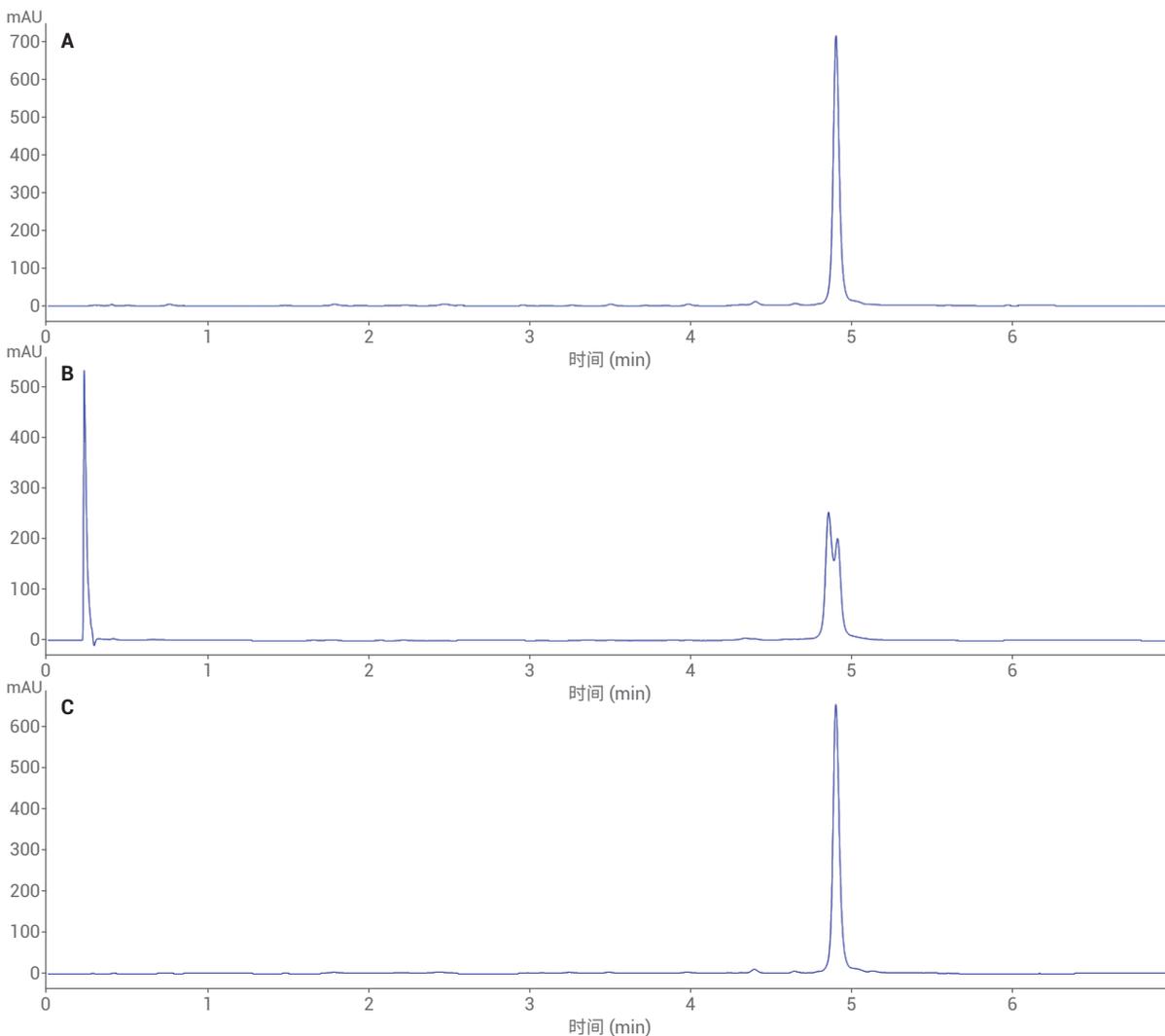


图 5. RNA 样品的一维 IP-RPLC 分析；A) RNA 样品水溶液；B) 1 mol/L NaCl 的 RNA 样品溶液；C) 经离心过滤器手动脱盐后的 1 mol/L NaCl 的 RNA 样品溶液；运行空白并进行基线扣除后获得的色谱图

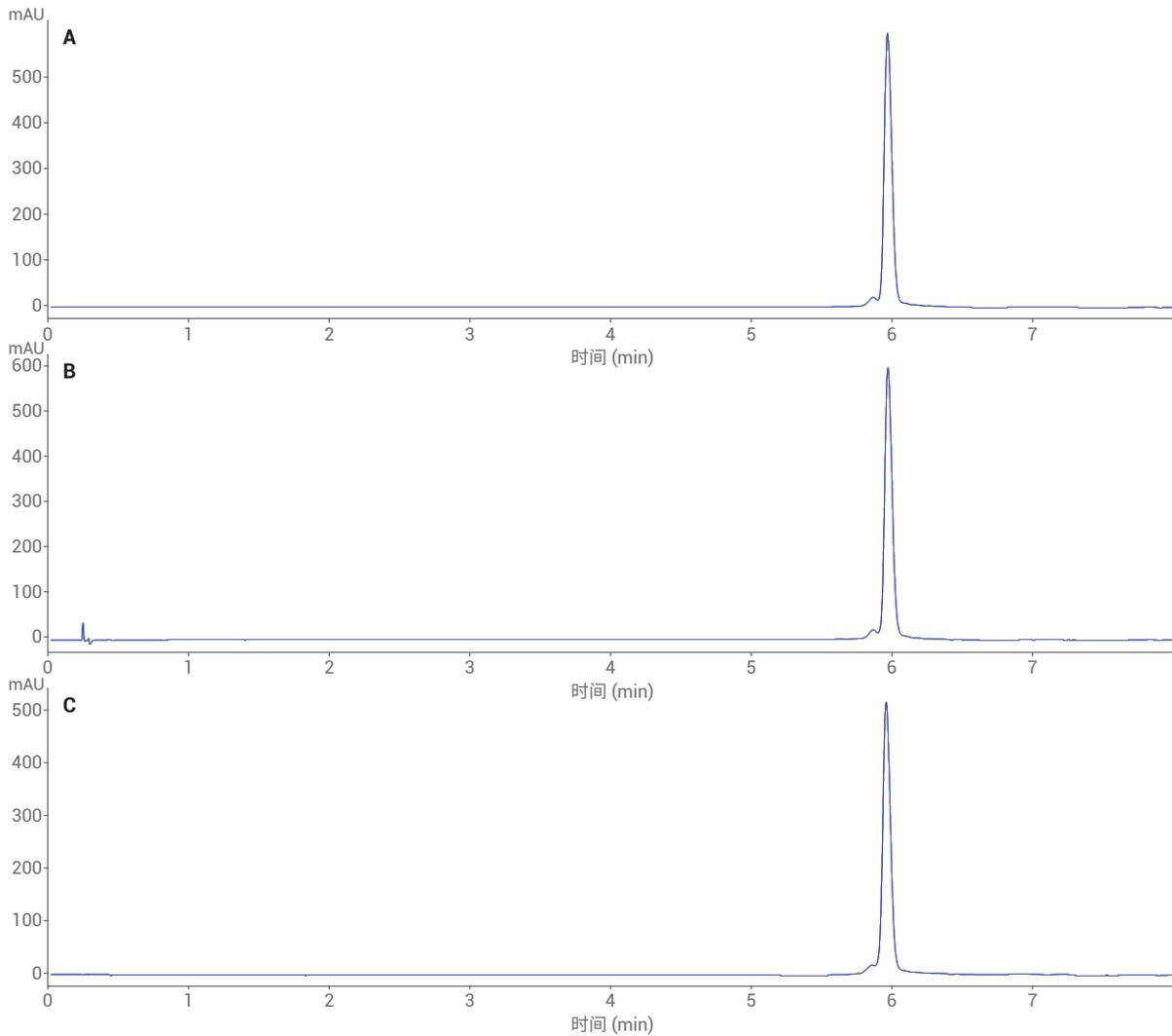


图 6. DNA 样品的一维 IP-RPLC 分析; A) DNA 样品水溶液; B) 1 mol/L NaCl 的 DNA 样品溶液; C) 经离心过滤器手动脱盐后的 1 mol/L NaCl 的 DNA 样品溶液; 运行空白并进行基线扣除后获得的色谱图

图 7 和图 8 分别展示了 1 mol/L NaCl 的 RNA 样品和 DNA 样品溶液的直接二维液相色谱分析结果。在第一维中对 RNA 和 DNA 进行了有效的保留和脱盐, 随后在第二维中成功地进行了 IP-RPLC 分析。

在第二维中可观察到一些杂质从主要化合物中分离出来, 如图 7 和图 8 第二维色谱图中的内插图所示 (将基线放大)。根据对 1 mol/L NaCl 的 RNA 和 DNA 样品溶液进行二维液相色谱分析所得到的主峰

和检测到的杂质的峰面积, 可计算出两种样品的纯度均接近 96%。该值与使用离心过滤器手动脱盐后再进行一维分析并按相同方式进行计算所得出的纯度值一致。

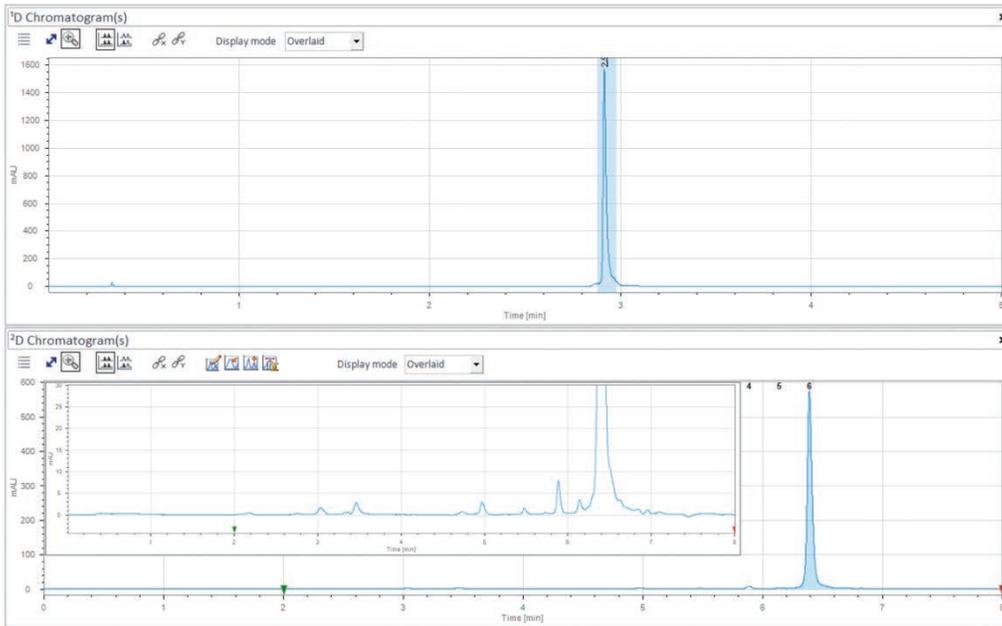


图 7. 1 mol/L NaCl 的 RNA 样品溶液的二维液相色谱分析; A)  $^1D$  色谱图; B)  $^2D$  色谱图,  $^2D$  色谱图中的内插图将基线进行了放大; 运行空白并进行基线扣除后获得的色谱图

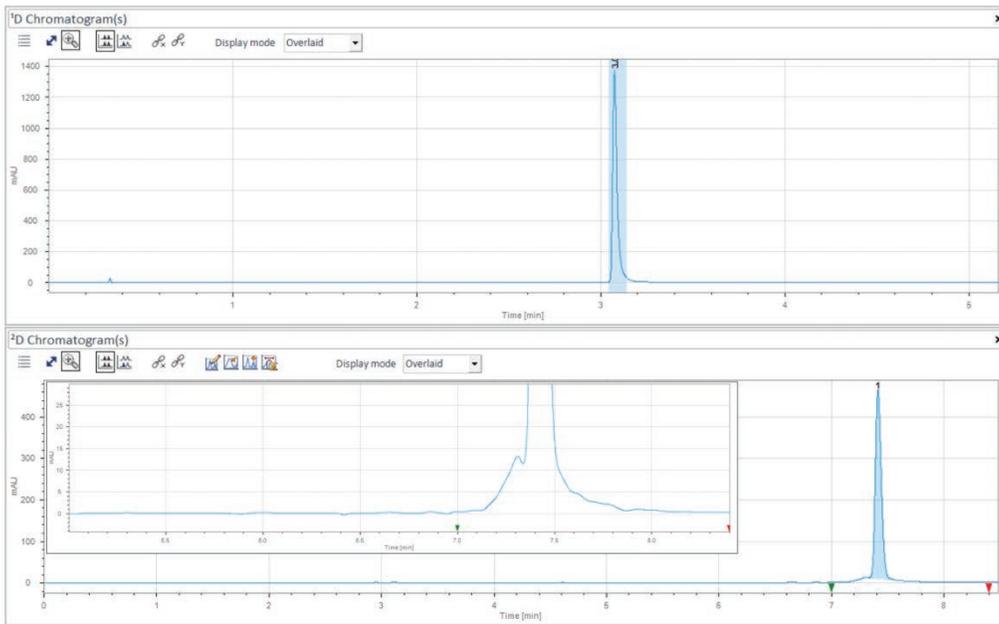


图 8. 1 mol/L NaCl 的 DNA 样品溶液的二维液相色谱分析; A)  $^1D$  色谱图; B)  $^2D$  色谱图,  $^2D$  色谱图中的内插图将基线进行了放大; 运行空白并进行基线扣除后获得的色谱图

## 结论

使用配备主动溶剂调制的 1290 Infinity II 二维液相色谱系统的中心切割二维液相色谱分析可实现高盐浓度溶液（如寡核苷酸合成后得到的阴离子交换纯化馏分）中寡核苷酸的分析。在第一维中实现有效的在线脱盐后，在第二维中进行 IP-RPLC 分析。比起经离心过滤器手动脱盐后再进行一维 IP-RPLC 分析，二维液相色谱法可使工作流程的速度提高三倍以上。此外，无需进行样品前处理可节省人力。

## 参考文献

1. Mangano; *et al.* Composition dependent separation of oligonucleotides by capillary electrophoresis in acidic buffers with application to the quality control of synthetic oligonucleotides. *Journal of Chromatography A*, **1999**, 848, 435–442
2. Zimmermann; *et al.* Synthetic oligonucleotide separations by mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **2014**, 1354, 43–55
3. Mustonen; *et al.* Oligonucleotide-based pharmaceuticals: Non-clinical and clinical safety signals and non-clinical testing strategies, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2017**, 90, 328–341
4. Shanagar. Purification of a synthetic oligonucleotide by anion exchange chromatography: Method optimization and scale-up, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2005**, 64, 216–225
5. Cramer, F.; Herzberg. Purity Analysis and Impurities Determination by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, In: *Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products*; Bonilla and Srivatsa, eds.; CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, **2011**, 28–34

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

**800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)**

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018  
2018 年 6 月 1 日，中国出版  
5991-9490ZHCN