

Agilent HPLC를 이용한 올리고뉴클레오타이드 Ion pairing 역상크로마토그래피, 이온교환크로마토그래피 분석법 접근

저자

유재영
한국애질런트테크놀로지스 (주)

개요

HPLC를 이용한 올리고뉴클레오타이드(Oligonucleotide) 분석에는 주로 Ion pairing 역상크로마토그래피와 이온교환크로마토그래피가 사용됩니다. 분석 대상이 되는 올리고뉴클레오타이드의 크기와 특성에 따라 크로마토그래피 종류와 컬럼, 시약을 선택해야 하며, 세부 조건에 따라 특이성이 달라지기 때문에, 분석법의 초기 설정에 많은 변수를 고려해야 하는 점에서 어려움이 있습니다.

본 응용자료는 각 조건에 따른 시험결과를 소개하였고, 특히, AdvanceBio Oligonucleotides 컬럼과 Bio SAX 컬럼에서 높은 선택성을 확인할 수 있었습니다.

서론

Covid-19의 팬데믹이 장기화되면서, 이에 따른 다양한 감염성 질환을 예방하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있습니다. 특히, mRNA와 Adeno-associated virus(AAV)를 이용한 백신 개발의 중요성이 커지고 있고, 관련 유전자 기술을 기초로 하는 많은 바이오 의약품들이 연구, 보고되고 있습니다.

유전자 정보를 이용한 활용 목적에 따라 크기가 상대적으로 작은 siRNA(20~24nt, nucleotides), Oligonucleotide aptamer(20~80nt), CRISPR/Cas9(~100bp), mRNA(1,000~4,000nt) 등으로 나뉩니다. 올리고뉴클레오타이드를 활용한 바이오 의약품은 생산 방식에 따라 Host cell에서 유래한 불순물과 플라스미드 DNA가 포함될 수 있으며, 최종, 불순물을 Target product와 분리하여 순도를 평가하는 것이 품질 확인에 있어 무엇보다 중요합니다.

분석 대상물질이 RNA인지, DNA인지, 각 뉴클레오타이드의 비율, 3차 구조 및 결합 형태 등에 따라 HPLC에서의 유지시간에 차이를 나타내게 됩니다. 일반적으로 DNA가 RNA보다 유지시간이 길고, 지용성이 C < G < A < T의 순서로 증가하고, double-stranded 형태가 single-stranded 형태보다 지용성이 큰 것으로 알려져 있습니다. 그럼에도, 올리고뉴클레오타이드는 수용성이 강하여, 역상크로마토그래피로 분석하기 위해서는 Ion pair 시약을 사용하여 분석해야 합니다.

올리고뉴클레오타이드의 Ion pairing 역상크로마토그래피 분석에는 tri- 또는 tetraalkylammonium 염이 포함된 이동상을 사용하는데, triethylammonium acetate(TEAA), tetrabutylammonium acetate(TBAA), dibutylammonium acetate(DBAA), hexylamine acetate(HAA), triethylammonium bicarbonate(TEAB), triethylammonium + hexafluoroisopropanol(TEA + HFIP) 등이 이용됩니다. Ion pair 시약의 alkyl chain 길이가 길어질수록 올리고뉴클레오타이드의 유지시간이 길어지는 경향을 보입니다. Ion pair 시약의 농도는 TEAA, DBAA, HAA 조건에서 보통 100mM이 사용되고, 시약의 농도가 낮아질수록 유지시간이 짧아집니다. 이 외에 컬럼 공극의 크기, 컬럼의 온도, 희석용액의 종류 등에 영향을 받으며, 시료에 따라 선택성이 달라지므로 각 조건을 최적화하여 분석목적에 맞는 결과를 도출하는 것이 필요합니다.

올리고뉴클레오타이드는 음전하를 강하게 나타내는 물질로, 음이온교환크로마토그래피를 사용하여 높은 선택성을 갖는 분석 결과를 얻을 수 있습니다. 이동상의 조성은 통상 Tris-HCl 버퍼를 사용하며, NaCl과 NaClO₄를 이용한 염 기운기를 통해 컬럼으로부터 순차적으로 용리하는 방법을 사용하고 있습니다. 이온교환크로마토그래피에서도 컬럼의 종류, 공극의 크기, 컬럼의 온도 등에 따라 결과가 달라지므로, 각 조건이 분석 결과에 대해 미치는 영향을 이해하여 분석법을 설정하는 것이 중요하게 여겨집니다.

실험

시약

실험에 사용된 Alkylamine과 trizma-base, sodium chloride, sodium perchlorate는 Sigma-Aldrich에서 구매했고, acetic acid는 JT Baker에서, acetonitrile은 B&J에서 구매했습니다.

표준품

실험에는 아래의 표준품이 사용되었습니다.

- 올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품(Oligonucleotide resolution standard): RNA, Agilent, part number 5190-9028
- 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품(Oligonucleotide Ladder standard): DNA 100bp ladder: Invitrogen, catalog no. 15628019
- GeneRuler 1kb DNA ladder: Thermofisher scientific, catalog no. SM0311
- PhiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker,9: Thermofisher scientific, catalog no. SM0251

이동상 조제방법

- 1) Ion paring 역상크로마토그래피에 사용한 이동상은 아래의 분량으로 시약을 첨가하였습니다. Acetic acid와 각 alkyl amine을 첨가하여 pH를 조제하였고, 이동상 A와 이동상 B에는 동량의 시약을 첨가하여 충분히 균질하게 섞어준 뒤 사용하였습니다.

표 1. Ion pairing 역상크로마토그래피 이동상의 조성.

종류	조성(L)
100mM TEAA, pH 7	Acetic acid 6g, Triethylamine 10.12g
100mM DBAA, pH 7	Acetic acid 6g, Dibutylamine 12.92g
100mM HAA, pH 7	Acetic acid 6g, Hexylamine 10.12g

- 2) 이온교환크로마토그래피에 사용한 이동상은 아래의 분량으로 시약을 첨가하였고, 최종 pH는 염산을 넣어 8로 조정하였습니다.

표 2. 이온교환크로마토그래피 이동상의 조성.

종류	조성(L)
20 mM Tris-HCl	Tris base 2.42g
20 mM Tris-HCl + 1.5M NaCl	Tris base 2.42g + Sodium chloride 87.66g
20 mM Tris-HCl + 1.5M NaClO ₄	Tris base 2.42g + Sodium perchlorate 183.66g

분석 기기 및 조건

Ion pairing 역상크로마토그래피와 이온교환크로마토그래피에 사용한 주 분석조건은 아래와 같고, 각 시험에서 사용한 조건 중 다른 부분은 각 시험 결과에 표기하였습니다.

표 3. Ion pairing 역상크로마토그래피 분석조건.

파라미터	값		
기기	1260 Infinity II Prime LC		
컬럼	Agilent AdvanceBio Oligonucleotides, 2.1 x 150mm, 2.7µm(p/n 653750-702)		
유속	0.6mL/min		
컬럼 온도	60°C		
주입량	5µL		
샘플러 온도	4°C		
검출기	UV 260nm (G7117B DAD HS, Flow cell 60mm)		
이동상	A: 100mM Alkylamine acetate, pH 7 B: 100mM Alkylamine acetate, pH 7 in acetonitrile		
그라디언트	시간(분)	%A	%B
	0	90	10
	1	90	10
	20	85.5	14.5
	20.1	10	90
	25	10	90
	25.1	90	10
	30	90	10

표 4. 이온교환크로마토그래피 분석조건.

파라미터	값		
기기	1290 Infinity II Bio UHPLC		
컬럼	Agilent Bio SAX, NP5, PEEK, 4.6 x 250mm, 5µm(p/n 5190-2467) Agilent PL-SAX 4000A, 4.6 x 250mm, 10µm(p/n PL1551-5103)		
속	1.0mL/min		
컬럼 온도	65°C		
주입량	5µL		
샘플러 온도	4°C		
검출기	UV 260nm(G7117B DAD HS, Flow cell 60mm)		
이동상	A: 20mM Tris-HCl, pH 8 B: 20mM Tris-HCl + 1.5 M NaCl, pH 8		
그라디언트	시간(분)	%A	%B
	0	70	30
	20	45	55
	25	0	100
	25.1	70	30
	30	70	30

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 2.6

약어

- HPLC: High performance liquid chromatography
- UHPLC: Ultra-high performance liquid chromatography
- TEAA: Triethylamine acetate
- DBAA: Dibutylamine acetate
- HAA: Hexylamine acetate
- SAX: Strong anion exchange
- RNA: Ribo nucleic acid
- DNA: Deoxyribo nucleic acid
- NMP: Nucleoside monophosphate
- dNMP: Deoxynucleoside monophosphate
- Rs: Resolution
- nt: Nucleotides (unit)
- bp: Base pair
- PEEK: Polyether ether ketone

결과

Ion pairing 역상크로마토그래피

Ion pairing 시약별 크로마토그램

이동상을 100mM TEAA, 100mM DBAA, 100mM HAA 조건으로 하여 AdvanceBio Oligonucleotides 컬럼(2.1 x 150mm, 2.7µm)을 사용하여 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품(oligo dT, DNA), 올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품(RNA)을 분석하였습니다.

DNA ladder를 분석한 결과, TEAA 조건(그림 1. a)에서는 15~40nt가 명확히 분리되었으나, n-1, n-2의 피크는 확인하기 어려웠습니다. 반면, DBAA와 HAA 조건에서는 15~40nt 뿐만 아니라, 16, 17, 18, 19nt 등의 피크가 확인되었고, 특히, 19nt와 20nt간의 분리도는 DBAA 조건에서 3.2, HAA 조건에서 3.9로 확인되었습니다(그림 1. b, c).

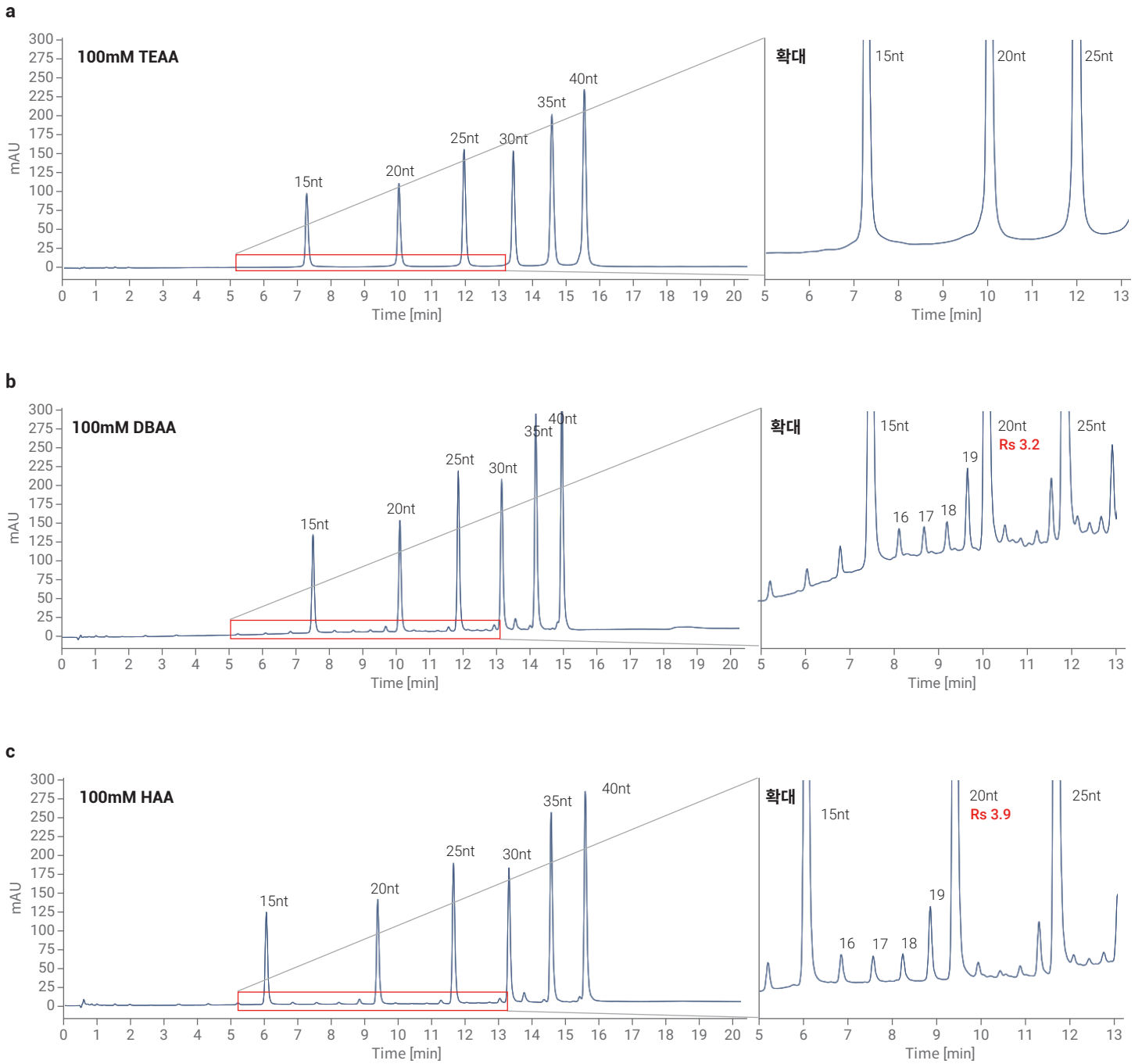


그림 1. Ion pair 시약별 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품 크로마토그램(a: 100mM TEAA 10 to 14.5%B in 19min, b: 100mM DBAA 26 to 46%B in 19 min, c: 100mM HAA 30 to 45%B in 19min).

올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품을 분석한 결과, TEAA 조건(그림 2. a)에서는 RNA가 충분한 머무름을 보이지 않았으나, DBAA, HAA 조건에서는 크기별 피크가 잘 확인되었습니다. 20nt와 21nt간의 분리도를 비교했을 때, DBAA 조건에서 2.3, HAA 조건에서 2.8로, HAA 조건에서의 분리도가 더 높은 것으로 확인되었습니다(그림 2. b, c).

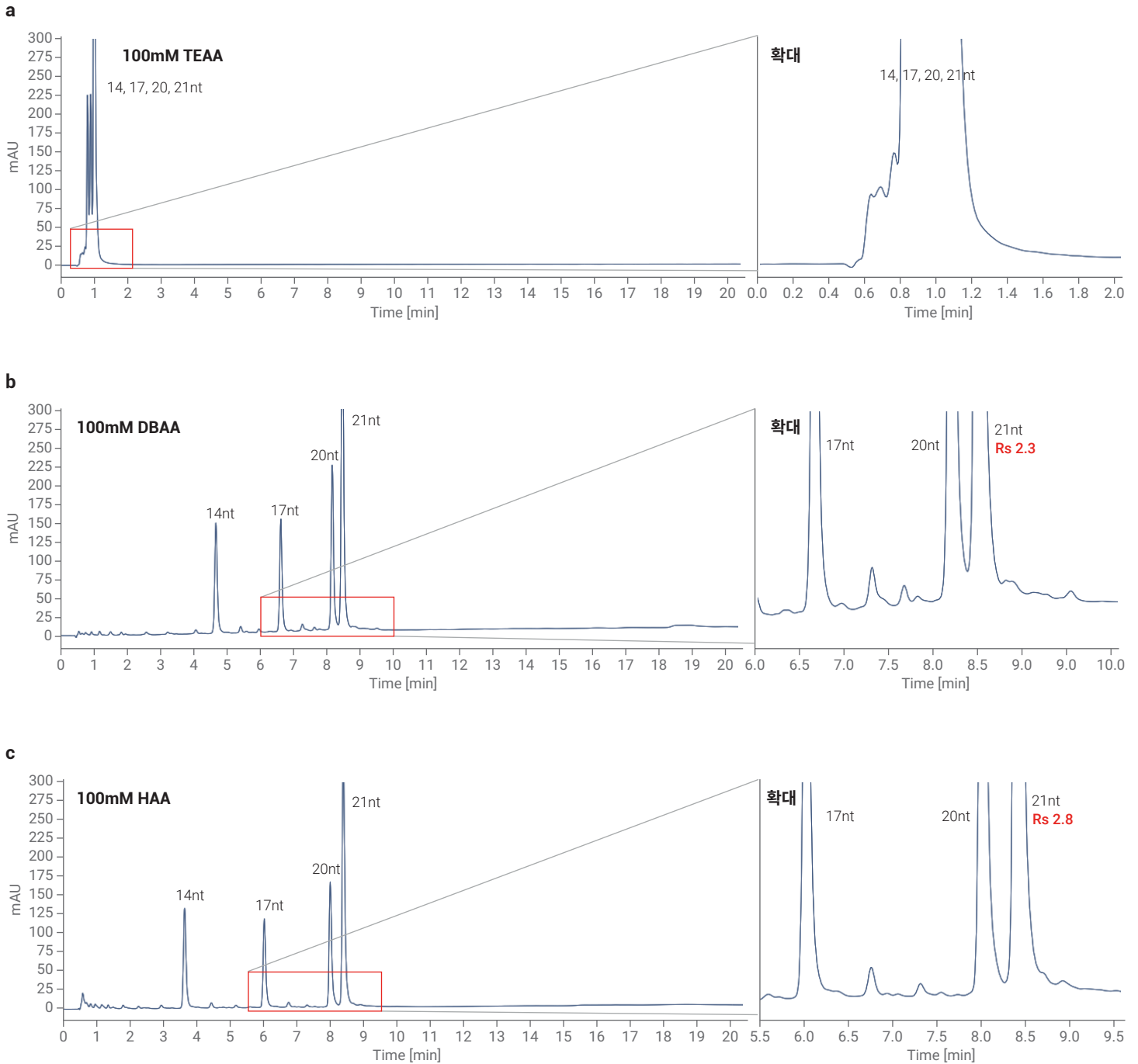


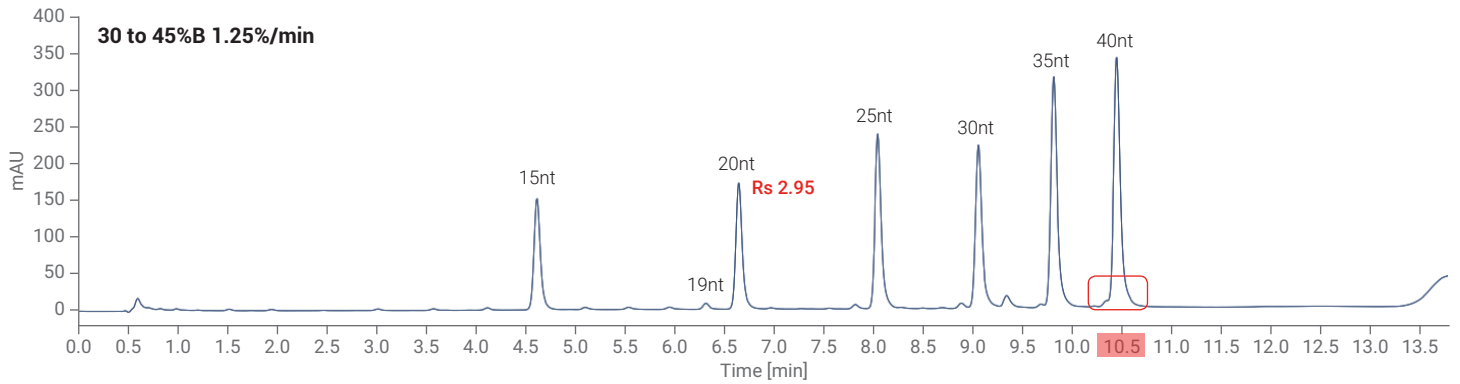
그림 2. Ion pair 시약별 올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품의 크로마토그램(a: 100mM TEAA 10 to 14.5%B in 19min, b: 100mM DBAA 26 to 46%B in 19min, c: 100mM HAA 30 to 45%B in 19min).

그레디언트 조건의 기울기별 크로마토그램

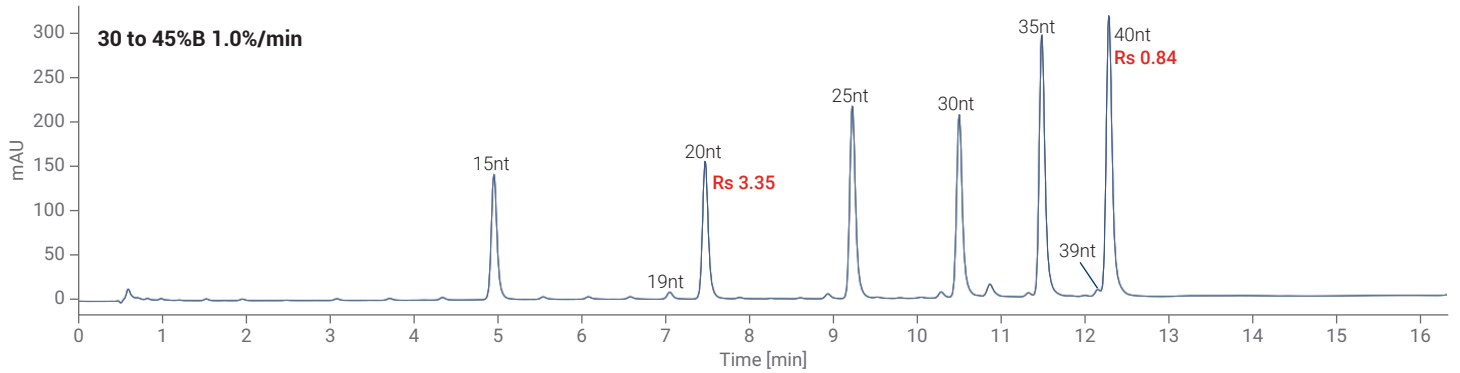
AdvanceBio Oligonucleotides 컬럼과 100mM HAA 이동상 조건에서 이동상 B의 그레디언트 기울기를 1.25%/min, 1.0%/min, 0.75%/min, 0.5%/min, 0.25%/min으로 다르게 하여 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품과 올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품을 분석하였습니다.

DNA ladder 시험 결과, 39nt와 40nt의 분리도를 비교했을 때, 1.25%/min에서는 분리되지 않았고, 1.0%/min은 0.84, 0.75%/min은 1.15, 0.5%/min은 1.48, 0.25%/min은 2.10으로, 기울기가 낮아짐에 따라 피크폭이 넓어지는 현상에 비해 분리도가 크게 좋아지는 것이 확인되었습니다. 하지만, 피크 높이는 1.25%/min에 비해 0.25%/min 조건에서 약 40% 수준으로 감도가 저하되고, 분석시간이 10.5분에서 37분으로 3.5배 길어진다는 단점이 있습니다. 따라서, 분석 대상과 유연물질의 크기 차이와 분리 효율성을 고려하여 기울기를 설정하는 것이 바람직합니다.

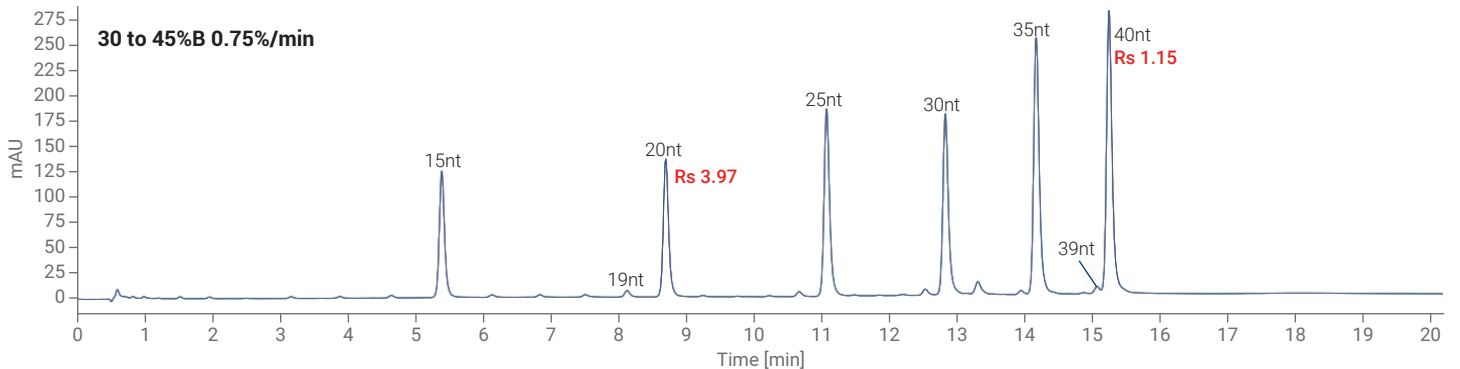
a



b



c



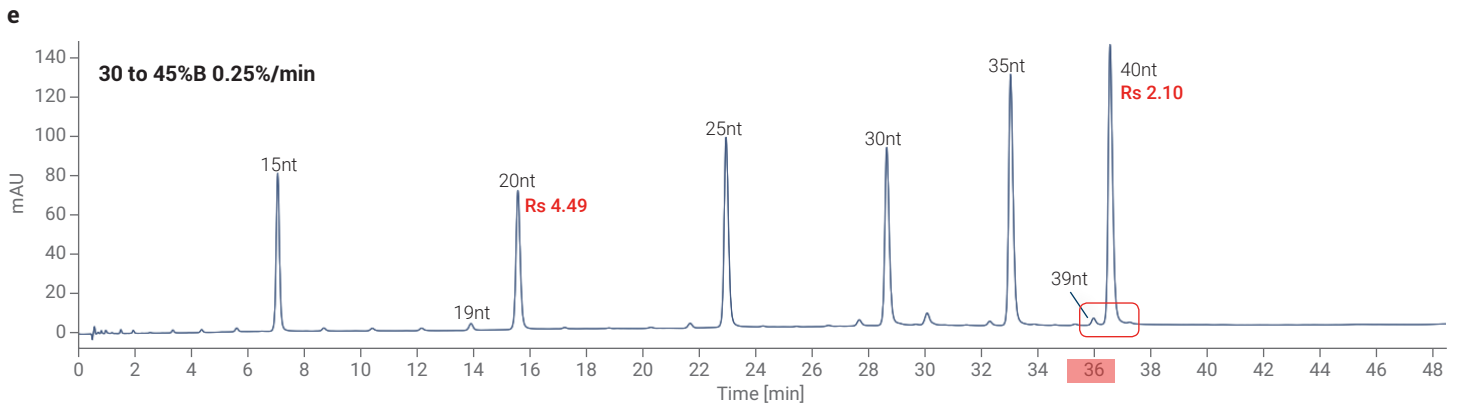
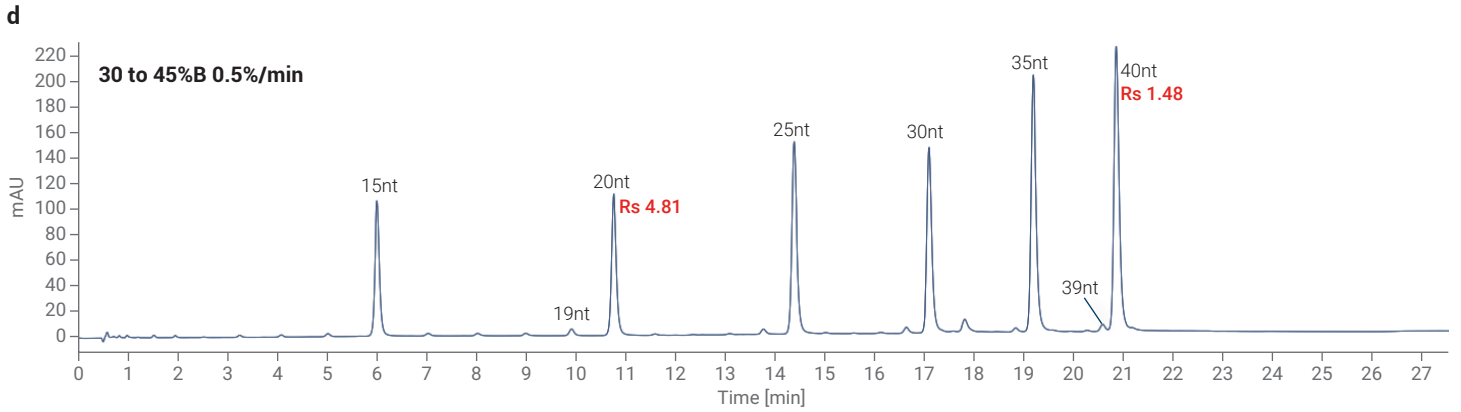
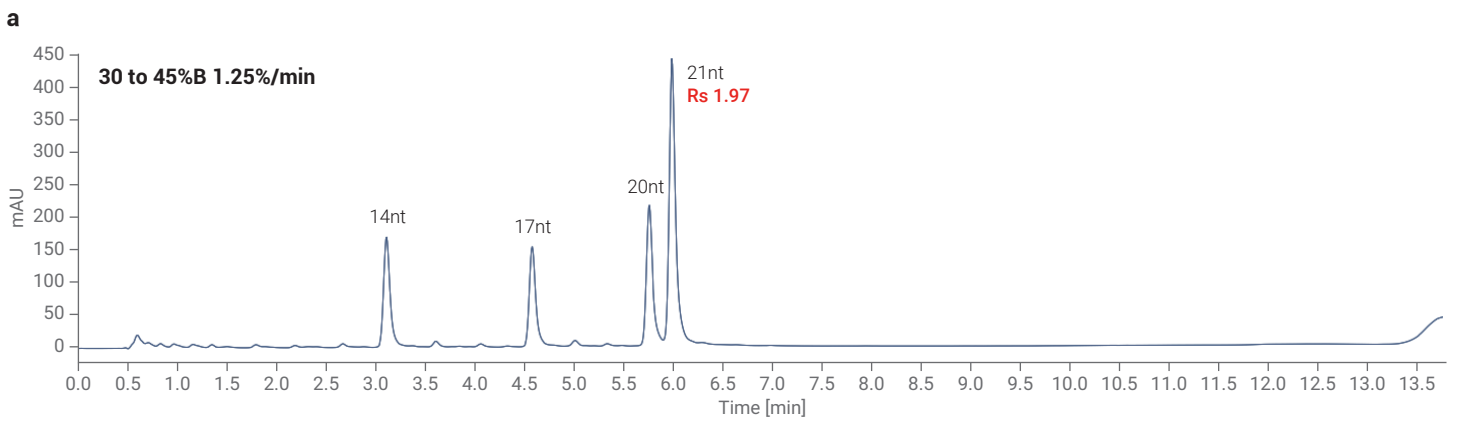


그림 3. 그레디언트 기울기별 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품 크로마토그램(a: 30 to 45%B 1.25%/min, b: 30 to 45%B 1.0%/min, c: 30 to 45%B 0.75%/min, d: 30 to 45%B 0.5%/min, e: 30 to 45%B 0.25%/min).

올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품도 동일한 조건으로 분석하였을 때, 20nt와 21nt간의 분리도는 1.25%/min에서 기울기가 감소함에 따라 1.97, 2.28, 2.75, 3.37, 4.26으로 좋아지는 것이 확인되었습니다.



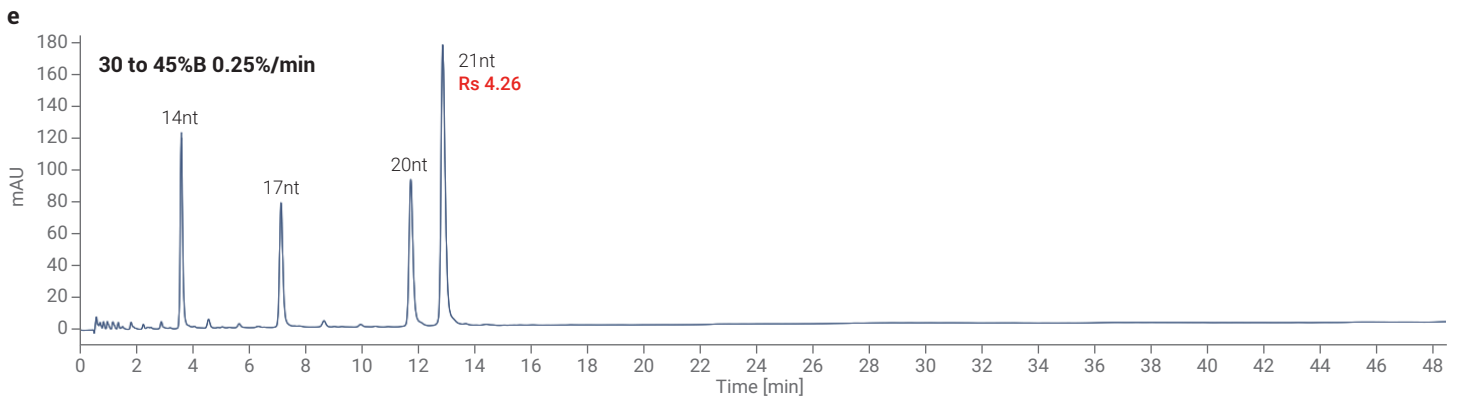
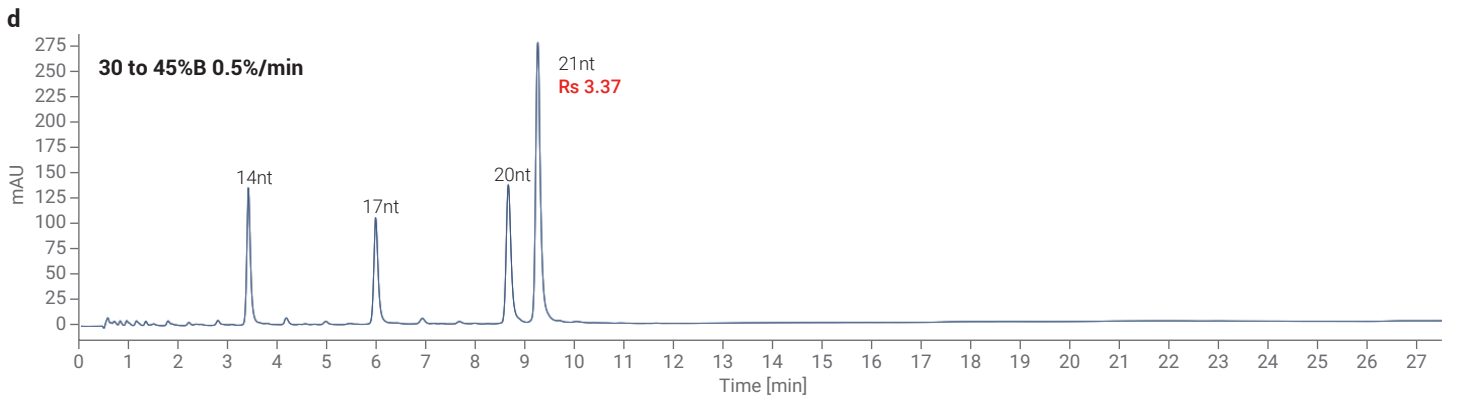
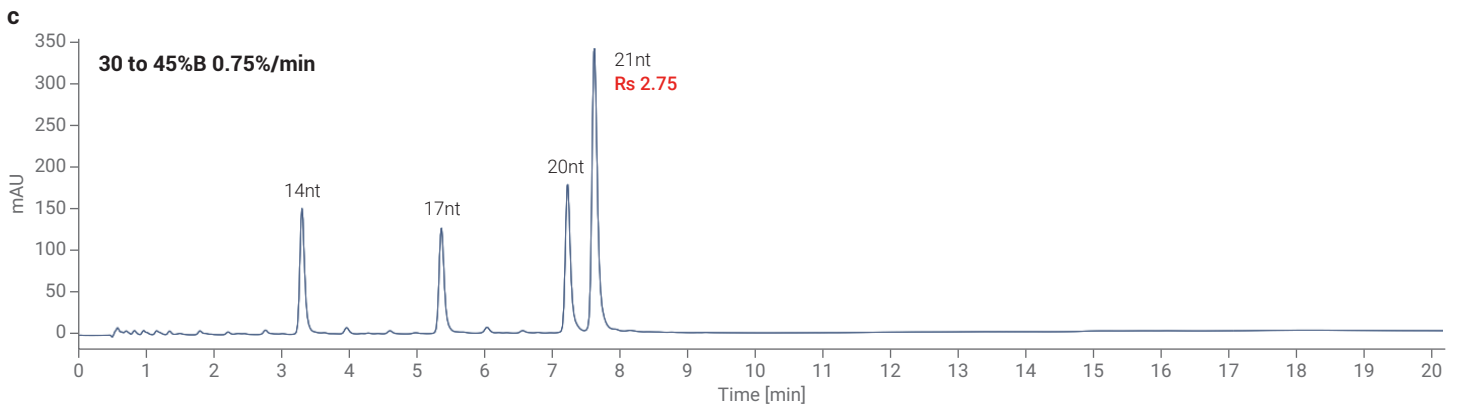
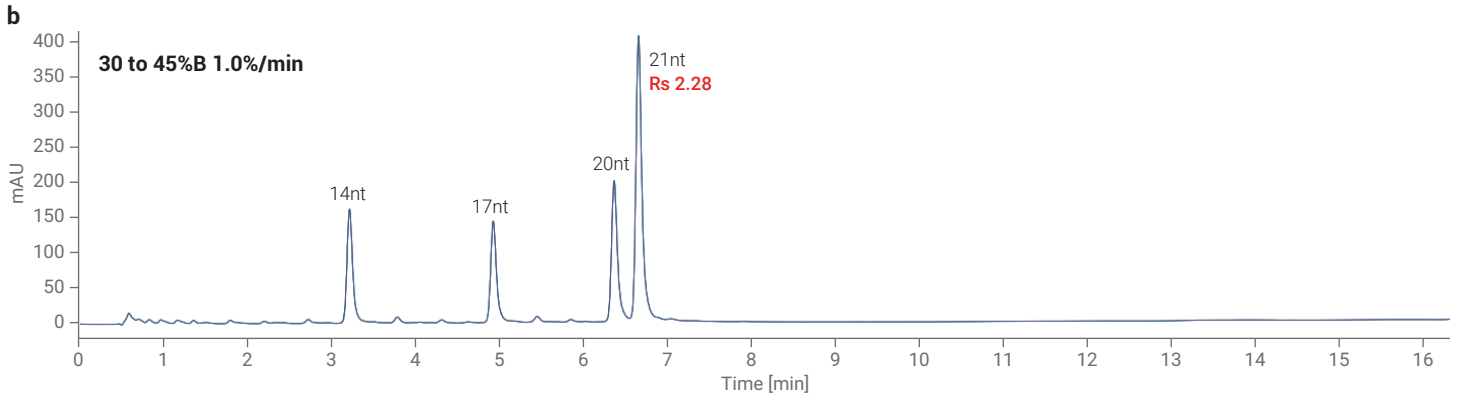


그림 4. 그레디언트 기울기별 올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품의 크로마토그램(a: 30 to 45%B 1.25%/min, b: 30 to 45%B 1.0%/min, c: 30 to 45%B 0.75%/min, d: 30 to 45%B 0.5%/min, e: 30 to 45%B 0.25%/min).

컬럼 온도별 크로마토그램

DNA와 RNA는 G, C의 조성비에 따라 각기 Denaturation 되는 온도에 차이를 보입니다. 컬럼 온도는 분석 중 Denaturation 되는 여부와 올리고뉴클레오타이드의 3차 구조에 영향을 미치기 때문에, 분석하고자 하는 목적에 따라 온도를 달리 설정해야 합니다. 또한, 사용되는 이동상은 통상 pH 7 이상의 염기성을 띠고 있으므로, 높은 pH에서 높은 온도 조건 하의 컬럼 안정성도 확인되어야 합니다.

아래는 AdvanceBio Oligonucleotides 컬럼(2.1 x 150mm, 2.7 μ m)을 가지고, 100mM HAA 조건에서 30 to 45%B in 20min 기울기로 분석한 결과입니다. 온도에 따라 DNA와 RNA의 유지시간이 달라지는 양상에 차이를 보였습니다. 특히, RNA는 온도가 증가함에 따라 유지시간은 짧아졌으나 분리도에는 큰 변화가 없는 반면, DNA는 40°C에서 유지시간이 가장 길었으며, 온도가 증가함에 따라 분리도는 개선되었습니다. dNMP는 NMP에 비해 비극성이 강하여 상대적으로 mass transfer의 영향을 많이 받으며, mass transfer는 온도에 크게 의존적이므로 높은 온도에서 DNA의 분리도가 높은 것으로 판단됩니다.

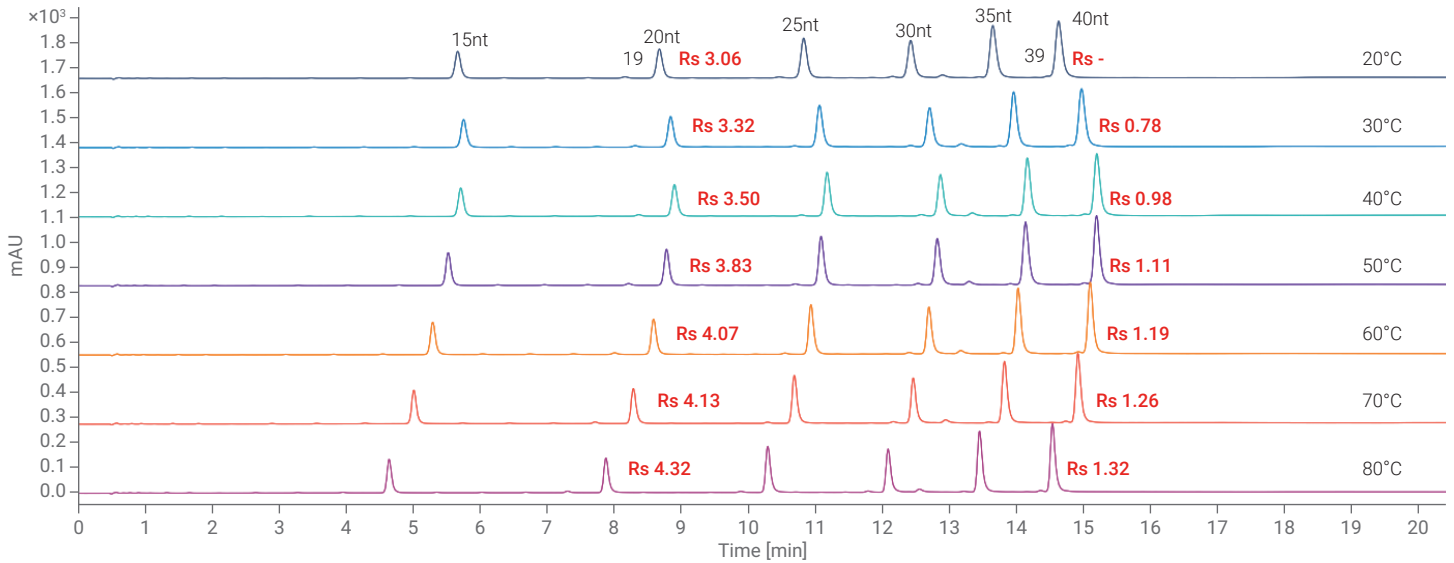


그림 5. AdvanceBio Oligonucleotides 컬럼 온도별 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품 크로마토그램 겹쳐보기.

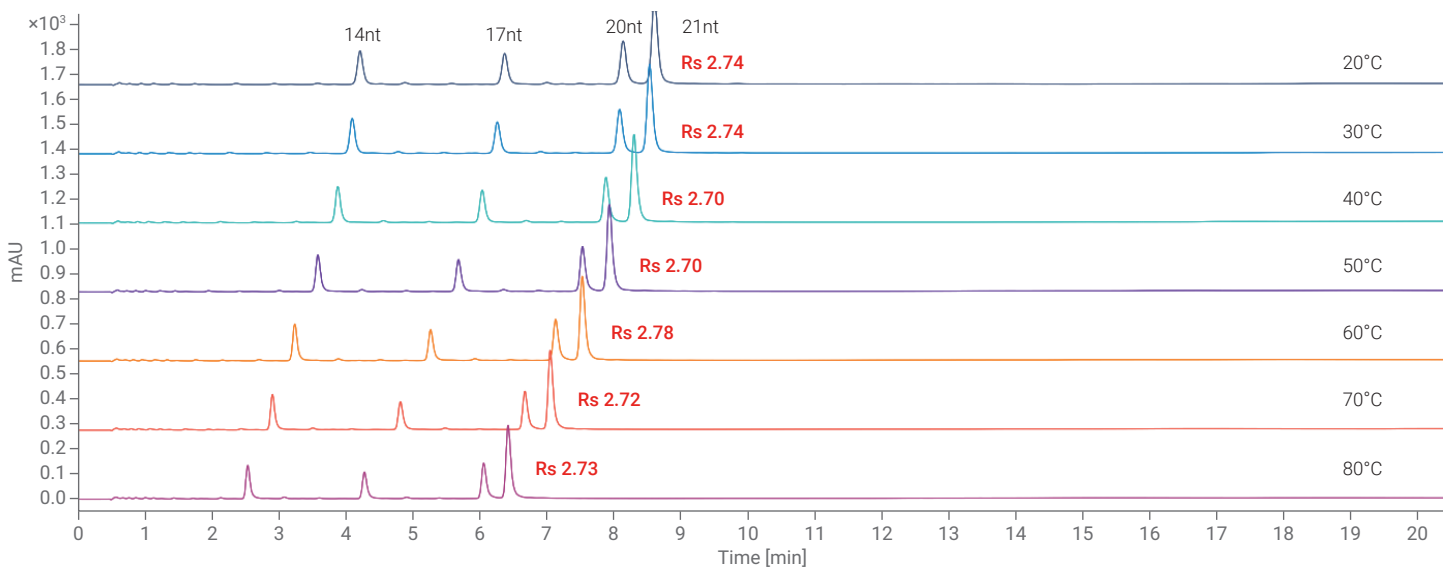


그림 6. AdvanceBio Oligonucleotides 컬럼 온도별 올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품 크로마토그램 겹쳐보기.

아래 표 5와 같이, 온도를 다르게 설정했을 때, 동일하게 20nt의 길이라 하더라도 RNA와 DNA에 유지시간의 차이를 보일 수 있으며, 이를 활용하여, RNA-DNA duplex를 분석할 경우 sense와 antisense의 single strand를 구분하여 분석할 수 있습니다.

표 5. AdvanceBio Oligonucleotides 컬럼 온도별 DNA 20nt와 RNA 20nt의 머무름 시간비교.

온도(°C)	DNA 20nt 머무름 시간(분)	RNA 20nt 머무름 시간(분)	차이(분)
20	8.660	8.133	0.527
30	8.827	8.081	0.746
40	8.884	7.877	1.007
50	8.767	7.527	1.240
60	8.574	7.125	1.449
70	8.273	6.668	1.605
80	7.864	6.053	1.811

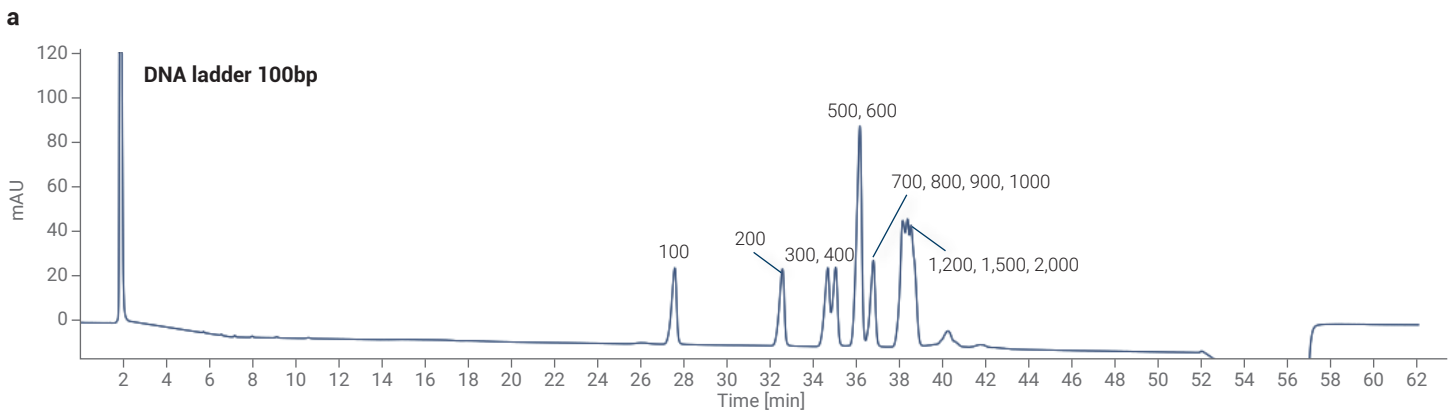
이온교환크로마토그래피

Bio SAX 컬럼과 PL-SAX 컬럼의 비교

올리고뉴클레오타이드 분석에서는 주로 Tris-HCl 버퍼와 sodium chloride의 용액을 이용한 염농도 그레디언트를 활용합니다. 애질런트에서는 다공성의 PL-SAX 컬럼과 non-porous의 특징을 가지고 있는 Bio SAX 컬럼이 활용되고 있습니다. Non-porous 성격의 컬럼은 Mass transfer의 영향은 적은 데 반해, 용량 인자가 상대적으로 작은 특징이 있어, 시료의 농도와 활용 목적에 따라 선택해서 사용해야 합니다.

아래는 DNA ladder를 Bio SAX NP5 PEEK, 4.6 x 250mm(part no. 5190-2467) 컬럼과 PL-SAX 4000A, 4.6 x 250mm, 10µm(part no. PL1551-5103)를 이용하여 분석한 결과입니다. 사용된 이동상은 20mM Tris-HCl, pH 8과 20mM Tris-HCl + 1.5M NaCl, pH 8 이고, Bio SAX 조건에서는 0-0.5min 20% B, 0.5-5min 20-45% B, 5-50min 45-70% B의 기울기로, PL-SAX 조건에서는 0-1min 50% B, 1-30min 50-70% B의 기울기로 분석하였습니다.

Bio SAX 컬럼에서는 10,000bp까지 올리고뉴클레오타이드 크기에 따라 분리된 것을 확인하였고, 특히, BsuRI enzyme digested 된 샘플(그림 7. c)에서도 각 조각들이 잘 확인되었습니다. PL-SAX 컬럼에서도 Bio SAX 컬럼에 비해 분리도는 낮지만, 시료의 정제 목적으로 활용하기 충분한 수준의 크로마토그램이 확인되었습니다.



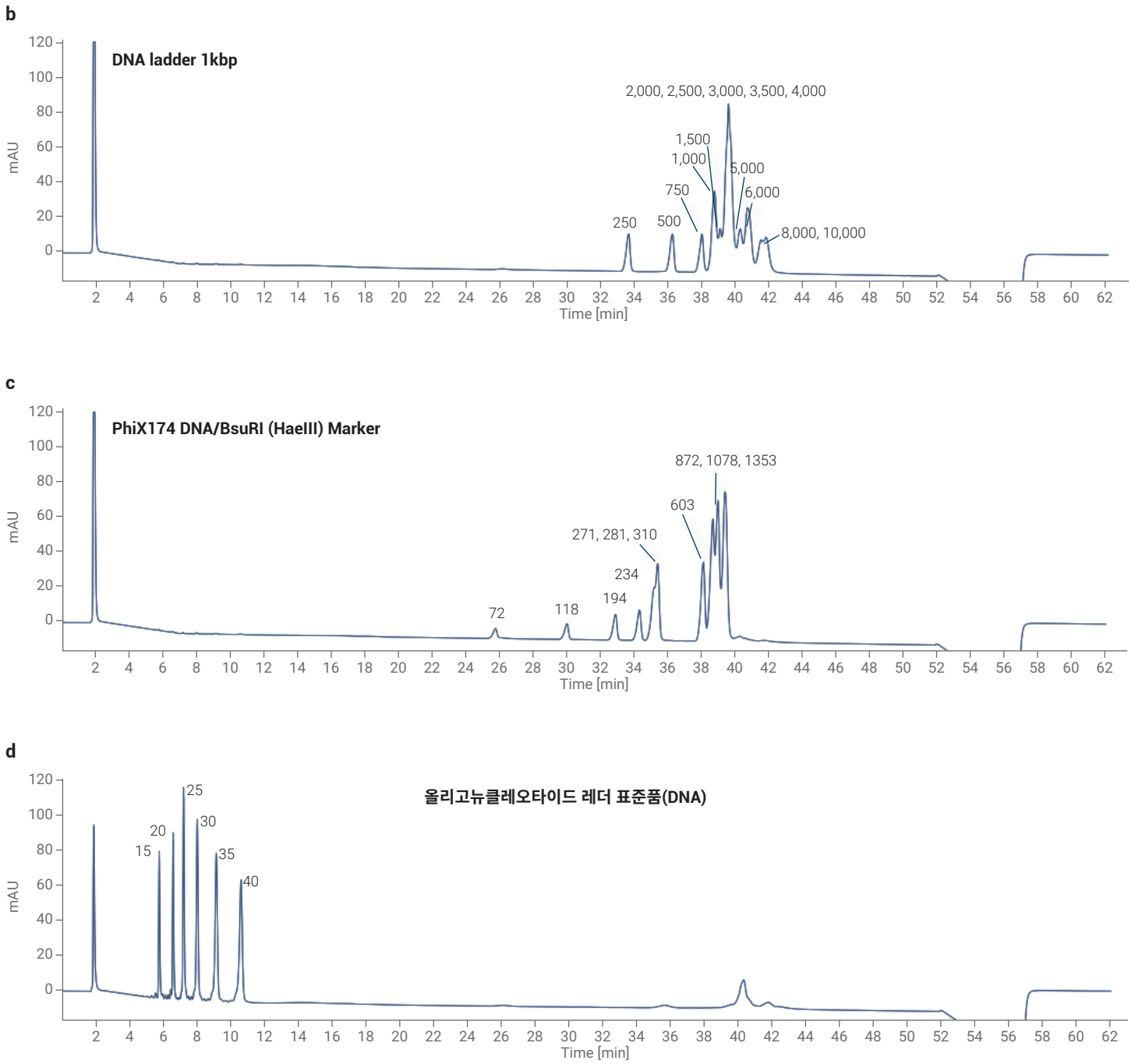


그림 7. Bio SAX NP5, PEEK 컬럼에서의 DNA ladder 크로마토그램(a: DNA ladder 100bp, b: DNA ladder 1kbp, c: PhiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, d: 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품).

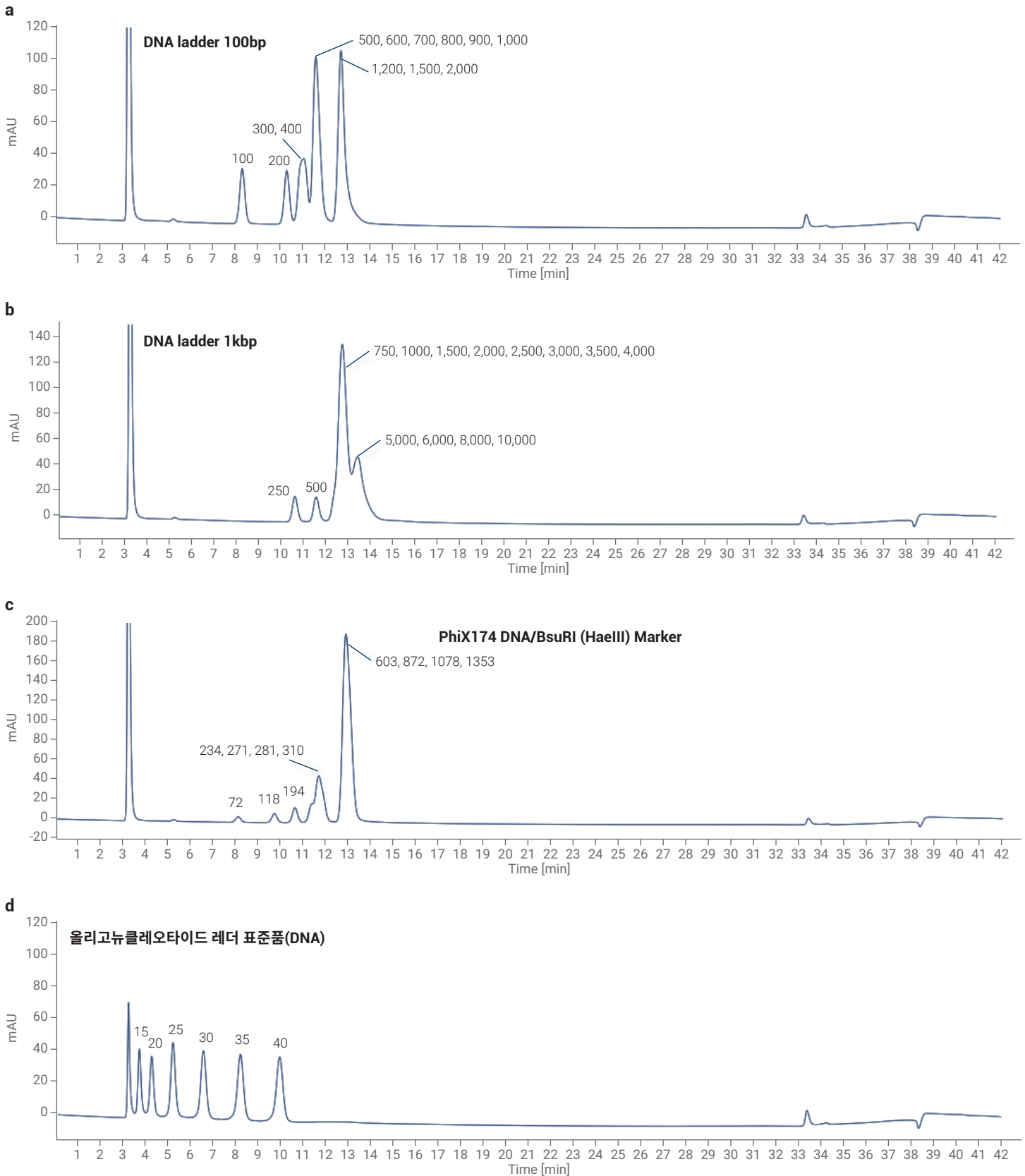


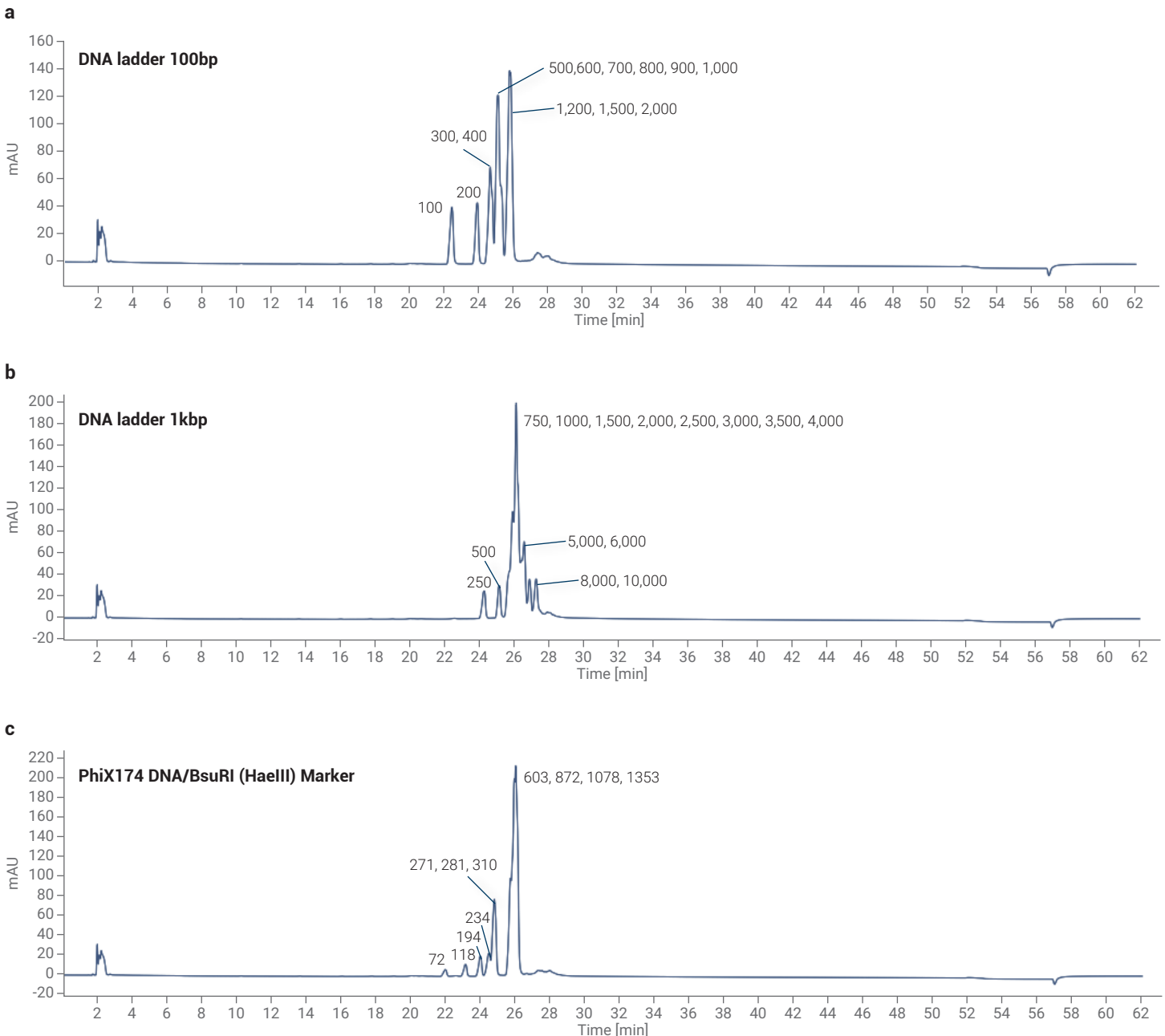
그림 8. PL-SAX 컬럼에서의 DNA ladder 크로마토그램(a: DNA ladder 100bp, b: DNA ladder 1kbp, c: PhiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, d: 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품).

Sodium perchlorate를 사용한 염농도 그레디언트

염농도에 대한 그레디언트 조건을 사용함에 있어, 올리고뉴클레오타이드 분석에는 Sodium chloride(NaCl)와 sodium perchlorate(NaClO_4)가 주로 이용됩니다. 동일 농도의 NaClO_4 는 NaCl 대비 2배 이상의 elution strength를 가지고 있으며, NaCl 대비 소수성이 커서, 형광물질과 같은 소수성 물질과 결합한 형태의 올리고뉴클레오타이드 분석에 유리합니다. 반면, NaCl을 이용한 이온교환크로마토그래피 분석에서는 10~30%의 아세토니트릴을 첨가하여 분석할 수 있습니다. 그리고, NaCl은 스테인리스강에 대해 강한 부식성을, NaClO_4 는 산화력을 가지고 있어, 음이온교환크로마토그래피 분석을 위해서는 Bio HPLC가 요구됩니다.

아래는 Bio SAX NP5 컬럼을 가지고 20mM Tris-HCl, pH 8과 20mM Tris-HCl + 1.5 M NaClO_4 를 이동상으로 하여 0-0.5min 5% B, 0.5-5min 5-15% B, 5-50min 15-40% B의 기울기로 DNA ladder를 분석한 결과입니다.

그림 6의 NaCl 결과와 비교하여, NaCl에 비해 낮은 이동상 B 비율에서 올리고뉴클레오타이드가 용리되는 것을 확인할 수 있었습니다.



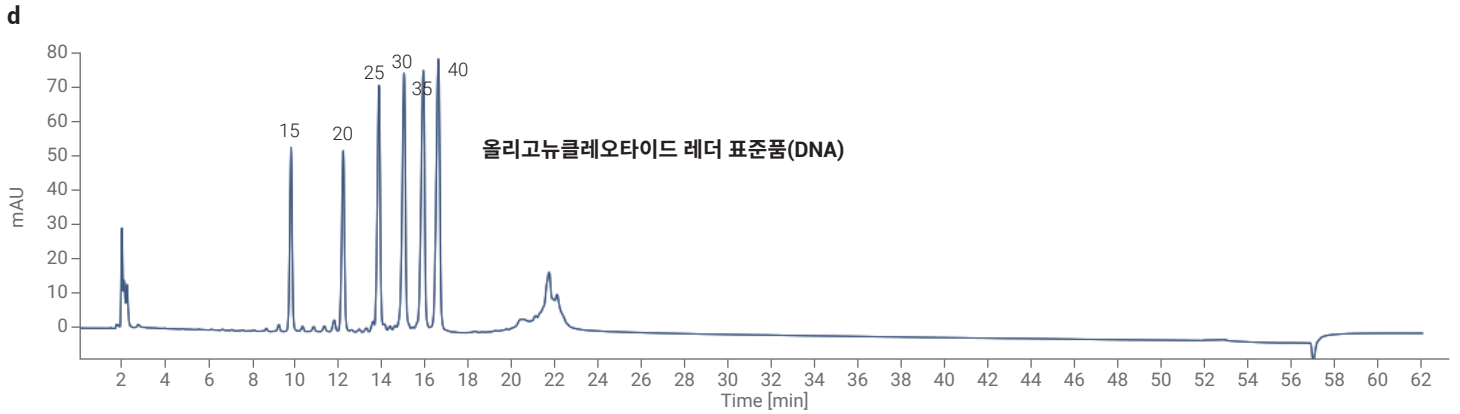
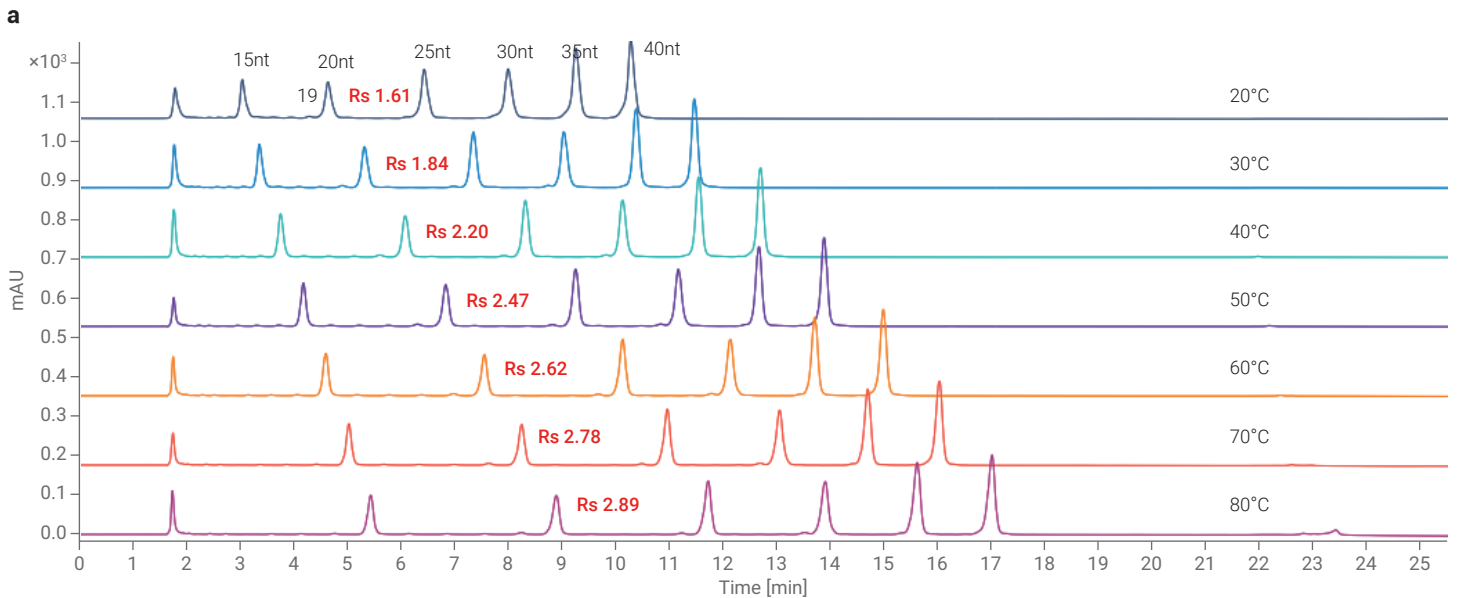


그림 9. Bio SAX 컬럼에서 Sodium perchlorate의 염농도 그래디언트를 통해 확인한 DNA ladder 크로마토그램(a: DNA ladder 100bp, b: DNA ladder 1kbp, c: PhiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, d: 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품).

Bio SAX 컬럼의 컬럼 온도별 크로마토그램

Ion pairing 역상크로마토그래피와 유사하게, 이온교환크로마토그래피에서도 온도에 따른 질량 이동 저항 및 점도, 이온결합 강도의 차이에 따라 용력에 차이를 나타냅니다. 또한, Duplex 시료는 denaturing 온도에 따라, 컬럼 온도 조건에서 single stranded 또는 double stranded 형태로 관측됩니다.

아래는 Bio SAX NP5 컬럼의 20mM Tris-HCl, 20mM Tris-HCl + 1.5 M NaCl의 30–55% B in 20 min 조건에서 DNA ladder 표준품과 RNA 분리능 표준품을 온도별로 분석한 결과입니다. 온도가 상승할수록 유지시간이 길어지고, 분리도가 개선되는 것을 확인하였습니다.



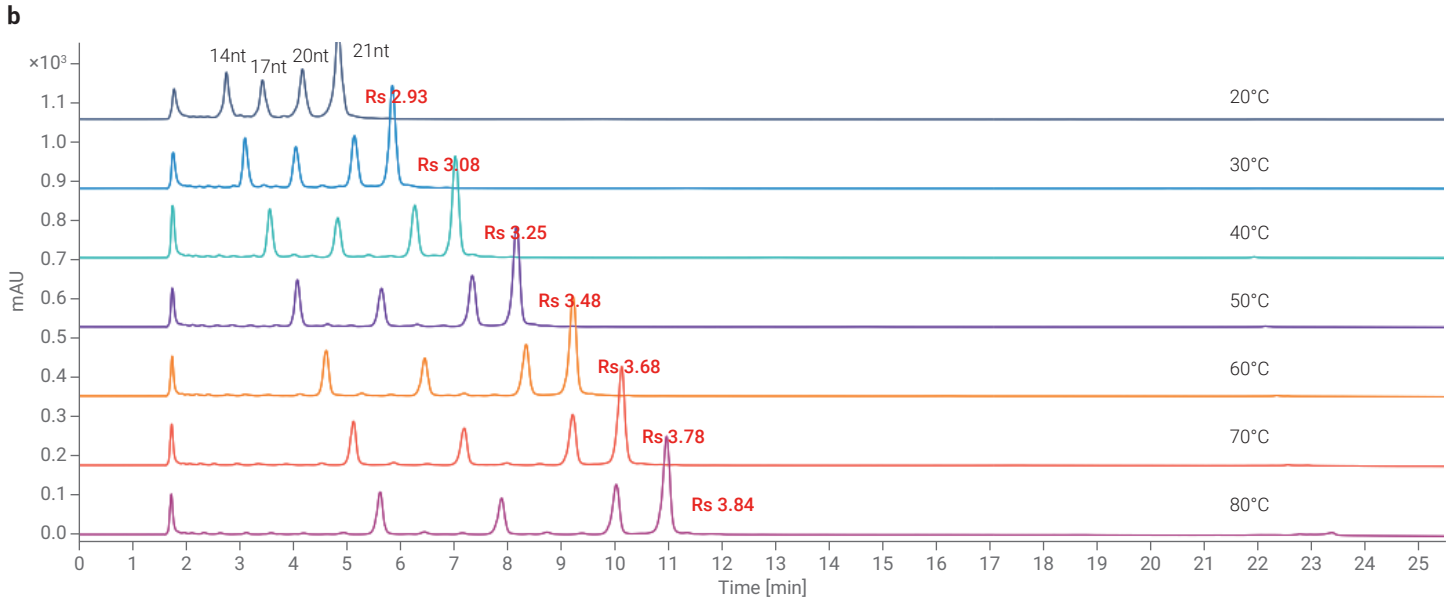
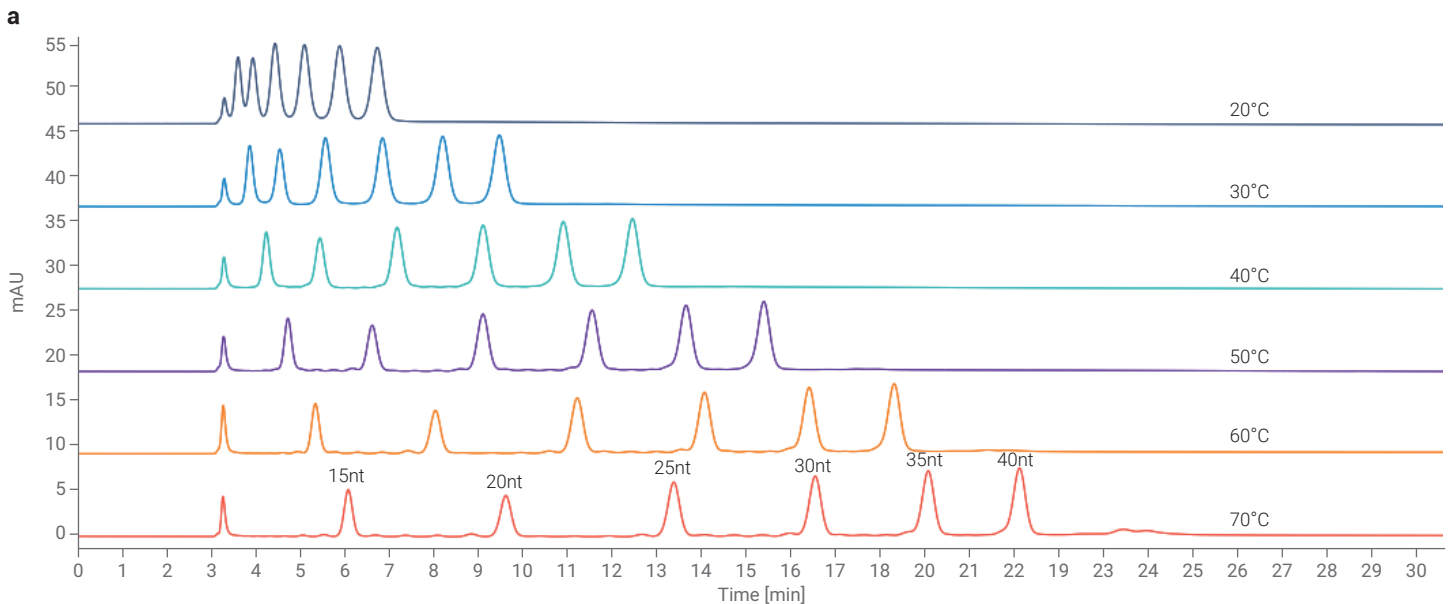


그림 10. Bio SAX 컬럼에서 온도를 다르게 하여 확인한 올리고뉴클레오타이드의 크로마토그램(a: 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품, b: 올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품).

PL-SAX 컬럼의 컬럼 온도별 크로마토그램

Bio SAX 컬럼은 올리고뉴클레오타이드의 순도를 확인하기 위한 목적으로 주로 사용된다면, PL-SAX 컬럼은 정제의 목적으로 활용될 수 있습니다. 이온교환크로마토그래피로 분리, 정제된 분획물은 Isopropanol로 간단히 정제한 뒤 다양한 목적으로 활용될 수 있습니다. PL-SAX 컬럼은 Preparative 크기, 또는 bulk resin으로 이용할 수 있어, 대용량 샘플을 분획하는데 적합합니다.

다음은, PL-SAX 4000A 컬럼의 20mM Tris-HCl, 20mM Tris-HCl + 1.5 M NaCl의 40~65% B in 30min 조건에서 온도별 분석 결과입니다. Bio SAX 컬럼 조건에서와 동일하게 온도가 상승할수록 유지시간이 길어졌습니다. 그림 11, c의 결과와 같이, 수천 bp 크기의 올리고뉴클레오타이드도 분석이 가능함이 확인함으로써, mRNA와 같은 큰 크기의 올리고뉴클레오타이드를 분리, 정제하는 데 충분히 활용될 수 있습니다.



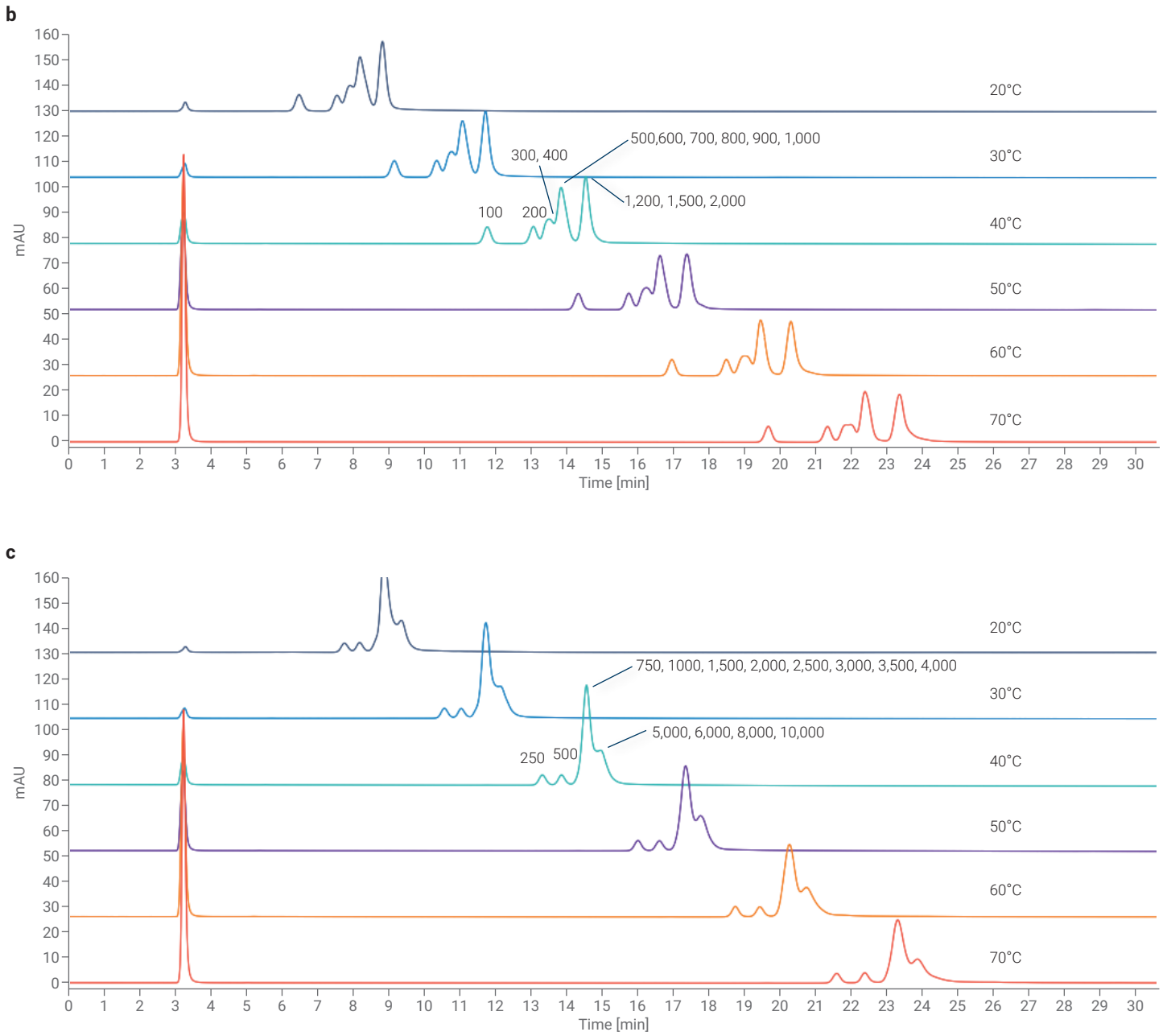
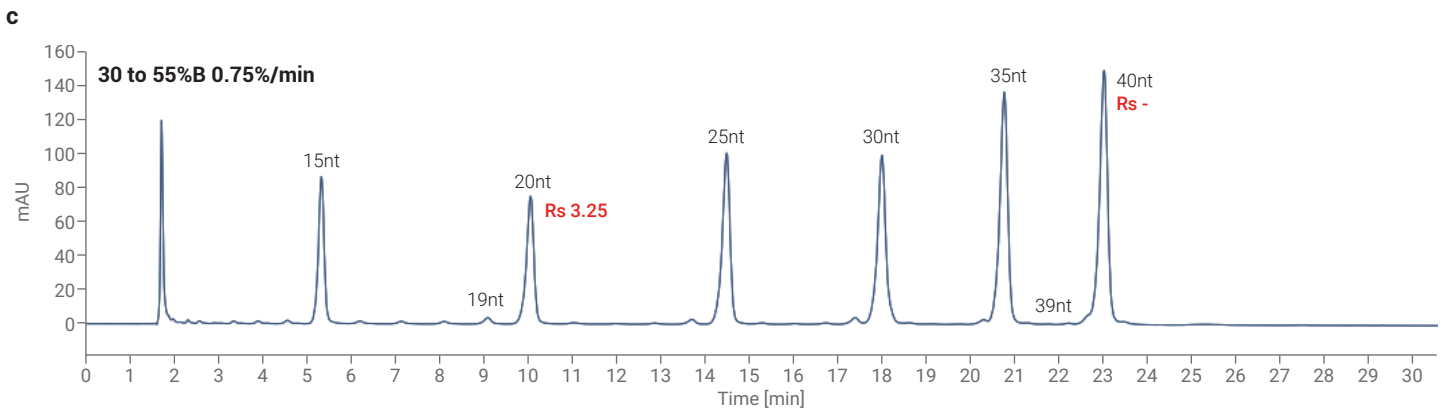
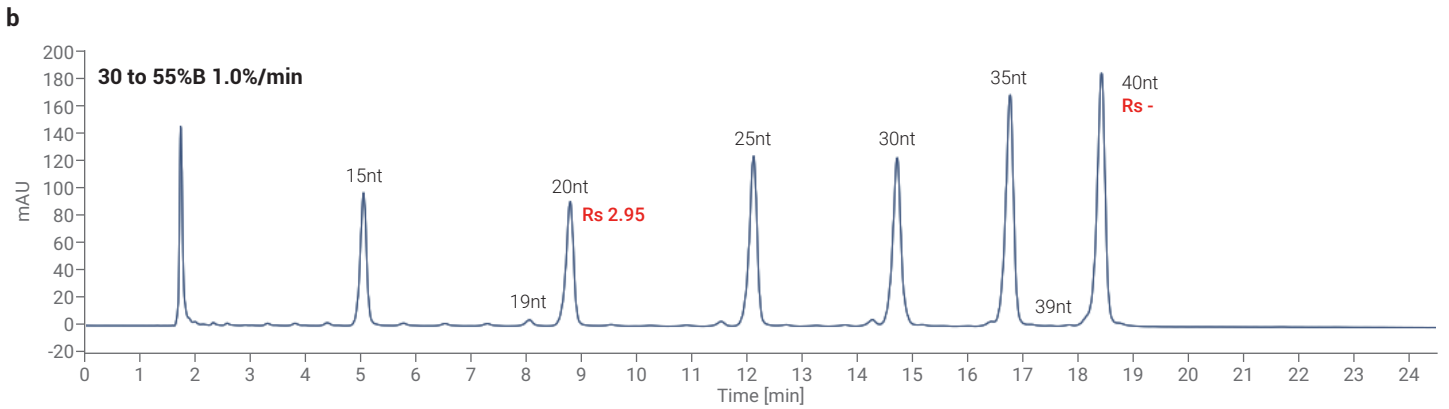
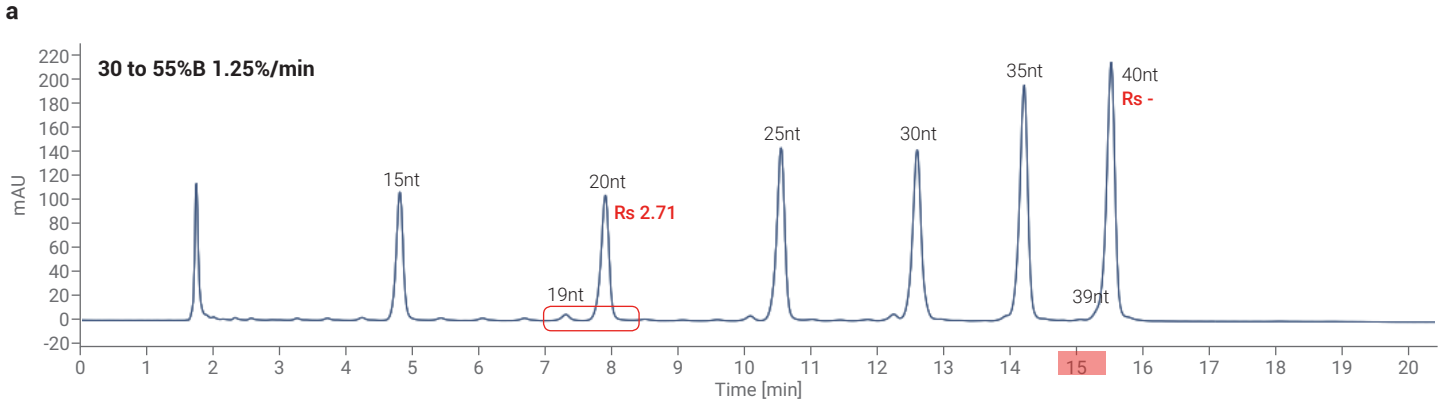


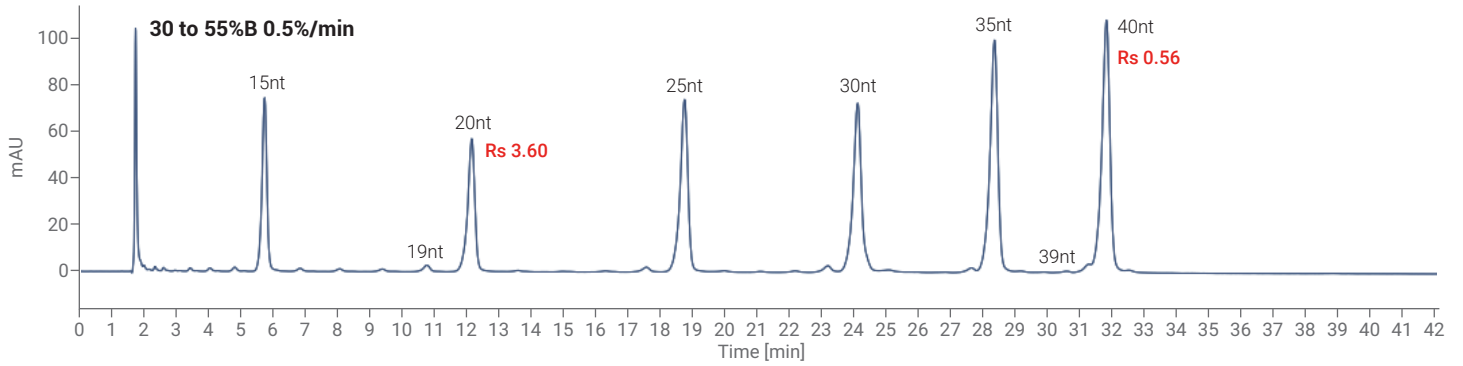
그림 11. PL-SAX 컬럼에서 온도를 다르게 하여 확인한 올리고뉴클레오타이드 크로마토그램((a: 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품, b: DNA ladder 100bp, c: DNA ladder 1kbp).

그레디언트 기울기별 크로마토그램

이온교환크로마토그래피에서도 염농도 그레디언트의 기울기를 변화시킬 때, 피크의 분리도를 개선할 수 있습니다. 다음은 Bio SAX NP5 컬럼을 20mM Tris-HCl, 20mM Tris-HCl + 1.5M NaCl을 이동상으로 하여, 30~55% B 조건의 기울기를 달리 하여 분석한 결과입니다. 40nt의 유지시간이 1.25%/min일 때 15.5분인데 반해, 0.25%/min일 때 56분으로 크게 증가했으나, 19nt와 20nt의 분리도는 2.71에서 4.09로 증가하였습니다.



d



e

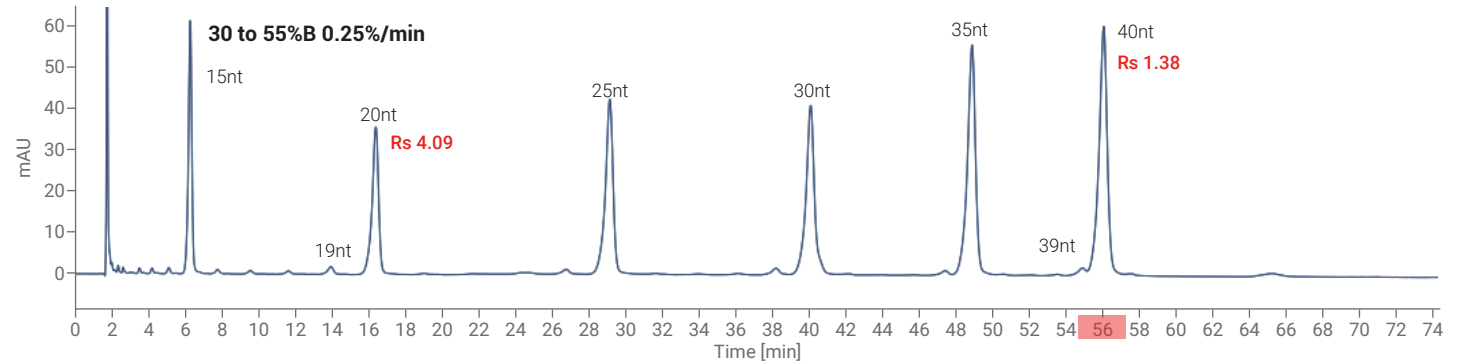
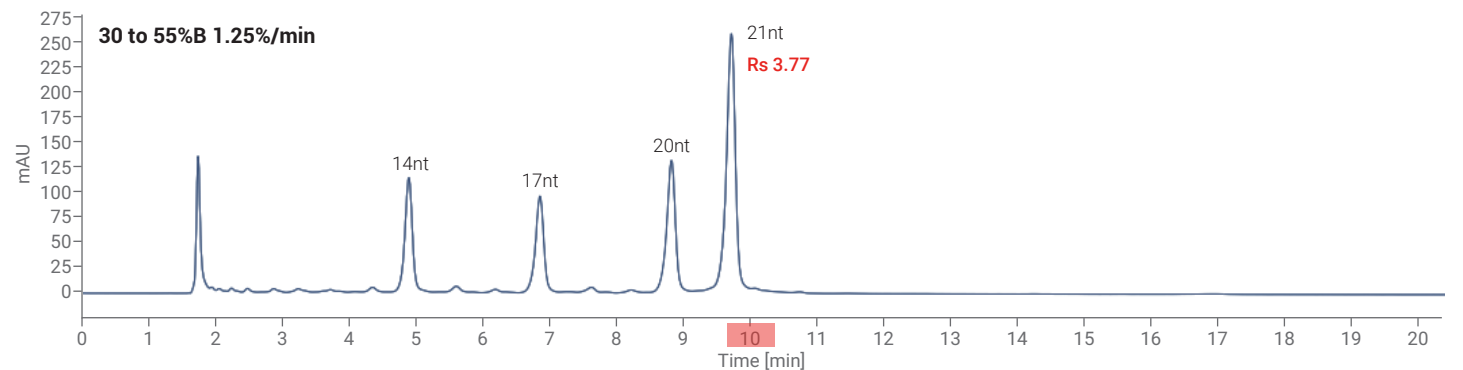


그림 12. 그레디언트 기울기별 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품 크로마토그램(a: 30 to 55%B 1.25%/min, b: 30 to 55%B 1.0%/min, c: 30 to 55%B 0.75%/min, d: 30 to 55%B 0.5%/min, e: 30 to 55%B 0.25%/min).

동일한 조건으로 올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품을 분석한 결과, 21nt의 분리도가 1.25%/min에서 3.77인데 반해, 0.25%/min에서 5.42로 증가하였습니다. 반면, 21nt의 분석시간은 약 10분에서 24분으로 증가하였습니다.

a



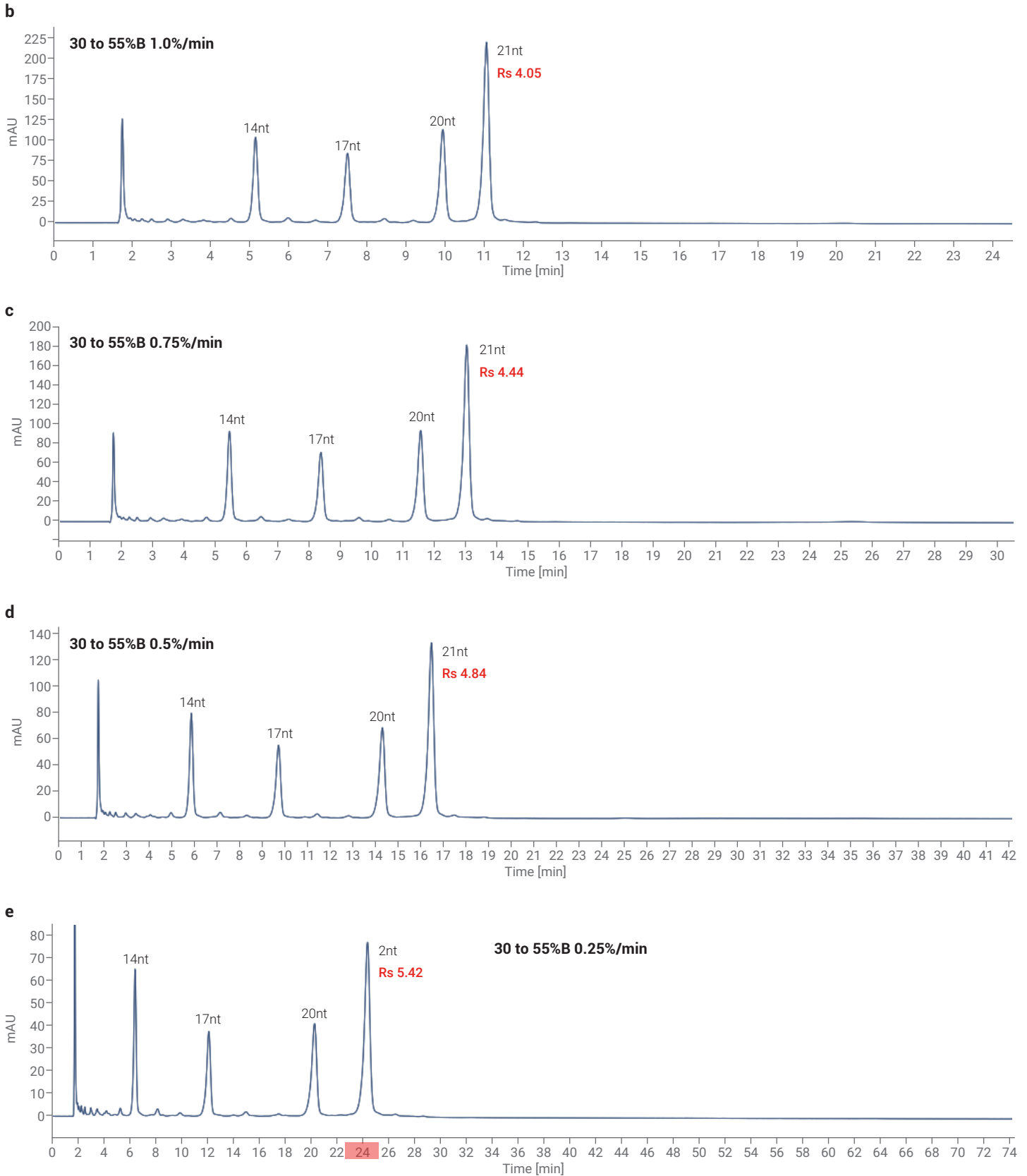
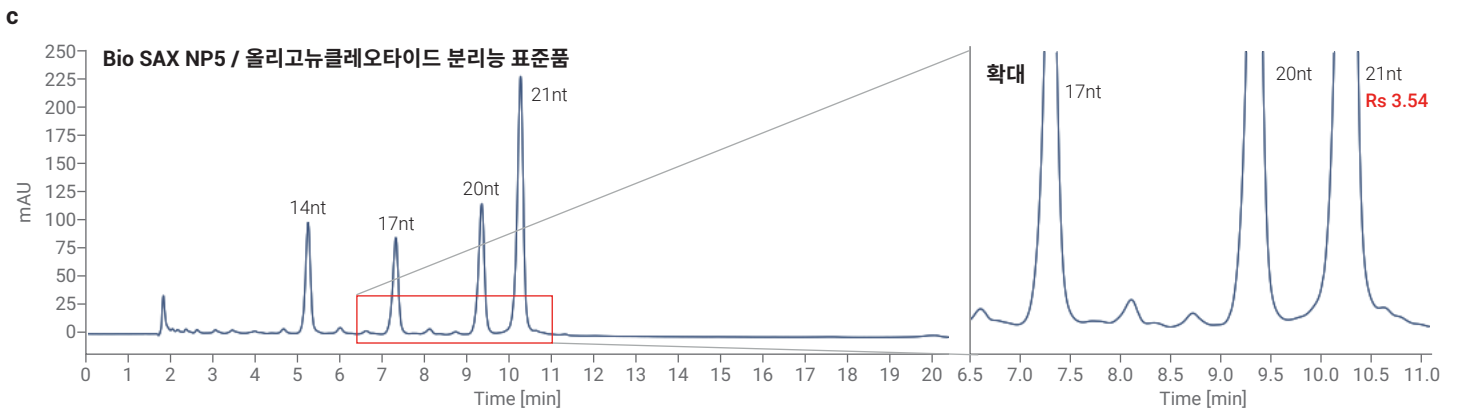
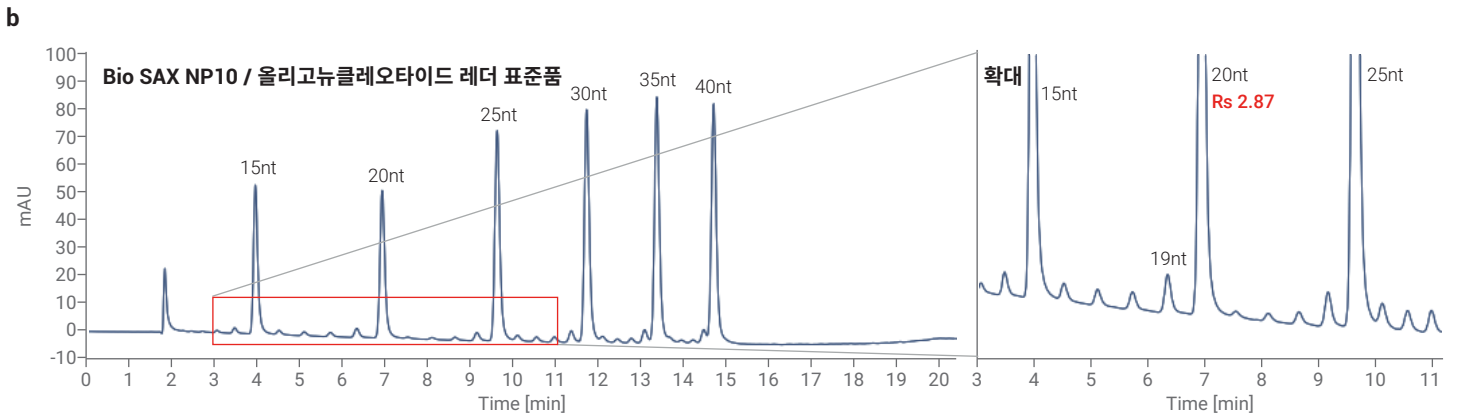
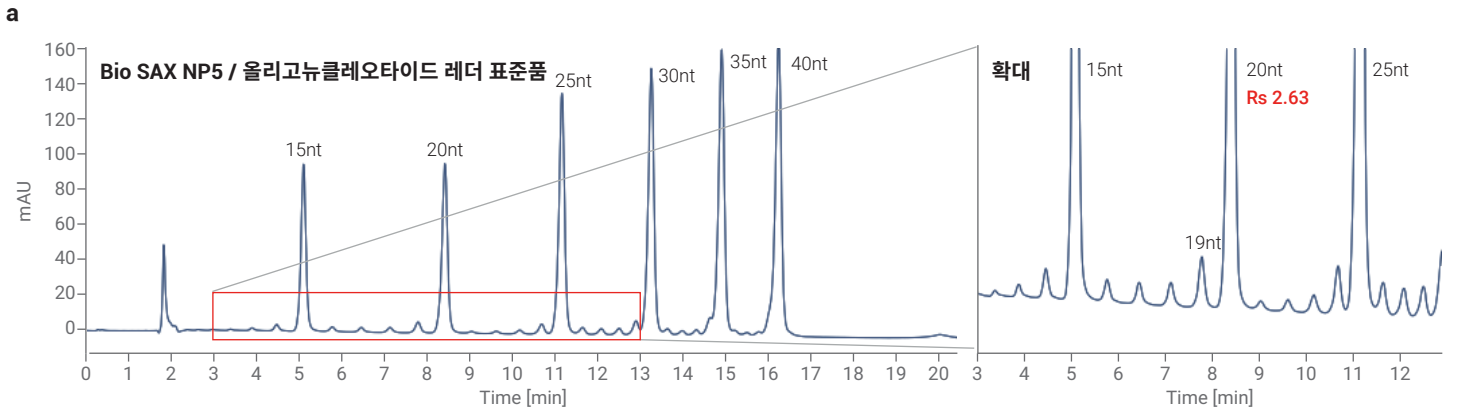


그림 13. 그래디언트 기술기별 올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품의 크로마토그램(a: 30 to 55%B 1.25%/min, b: 30 to 55%B 1.0%/min, c: 30 to 55%B 0.75%/min, d: 30 to 55%B 0.5%/min, e: 30 to 55%B 0.25%/min).

Bio SAX 입자크기별 크로마토그램

Bio SAX 컬럼은 1.7 μ m, 3 μ m, 5 μ m, 10 μ m를 이용할 수 있으며, 이 중 4.6 x 250mm 규격의 PEEK 재질의 컬럼은 NP5, NP10이 활용 가능합니다. 아래는 Bio SAX PEEK NP5와 NP10 간의 비교 시험 결과이고, 20mM Tris-HCl, 20mM Tris-HCl + 1.5M NaCl의 30~55% B in 20min 조건에서 시험하였습니다.

입자 크기가 작을수록 표면적과 상호작용의 증가로 유지시간과 용량인자가 증가하지만, 크기가 큰 올리고뉴클레오타이드의 분리도는 입자가 클수록 좋은 결과를 나타냅니다. 시험 결과, 유지시간은 Bio SAX NP5가 NP10에 비해 길었고, 피크 분리도는 NP10이 높았습니다.



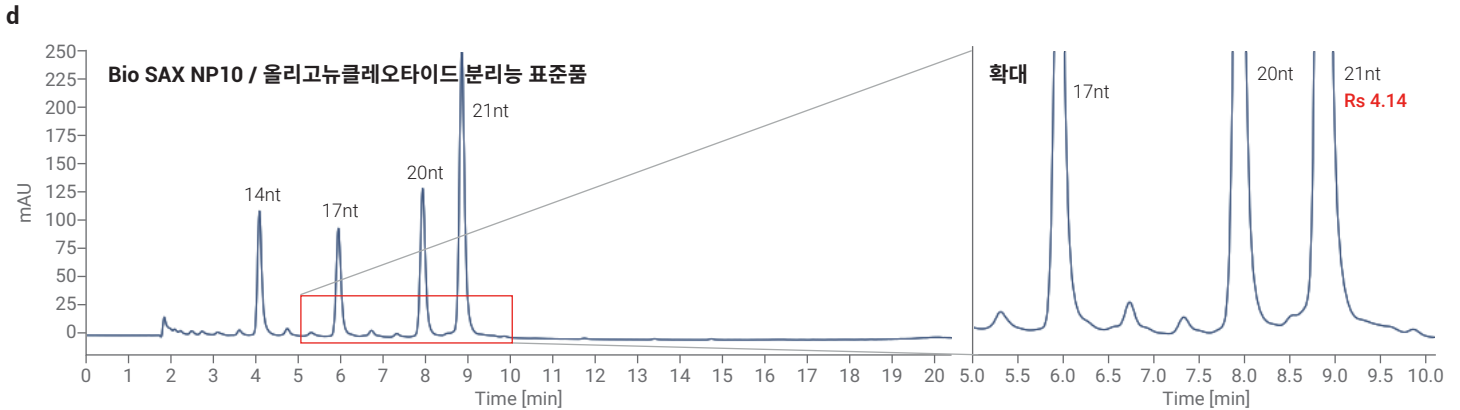


그림 14. Bio SAX NP5와 Bio SAX NP10의 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품, 올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품의 크로마토그램(a: Bio SAX NP5로 분석한 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품, b: Bio SAX NP10으로 분석한 올리고뉴클레오타이드 레더 표준품, c: Bio SAX NP5로 분석한 올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품, d: Bio SAX NP10으로 분석한 올리고뉴클레오타이드 분리능 표준품).

결론 및 고찰

Agilent 1260 Infinity II Prime LC를 이용하여 올리고뉴클레오타이드를 Ion pairing 역상크로마토그래피 각 시험 조건별 결과 차이를 확인하였습니다. 100mM HAA와 Agilent AdvanceBio Oligonucleotides 컬럼을 통해 15~40nt의 DNA ladder를 분석하여 39nt와 40nt간의 분리도가 최대 2.10임을 확인하였고, 동일한 조건에서 14~21nt의 RNA를 분석하여 20nt와 21nt간의 분리도가 최대 4.26임을 확인하였습니다. 또한 온도 및 Ion pairing 시약의 종류에 따른 분리도, 선택이 확인되었습니다.

그리고, Agilent 1290 Infinity II Bio UHPLC를 통해 올리고뉴클레오타이드의 이온교환크로마토그래피 분석 조건에서 부식성과 산화에 대한 손상 없이, 분석 결과를 확인할 수 있었습니다. 특히, Agilent Bio SAX 컬럼과 PL-SAX 컬럼을 통해 10,000bp의 DNA ladder까지도 분석이 가능했으며, Bio SAX컬럼을 통해 15~40nt의 DNA ladder를 분석하여 19nt와 20nt간의 분리도가 최대 4.09, 동일한 조건에서 14~21nt의 RNA를 분석하여 20nt와 21nt간의 분리도가 최대 5.42임을 확인하였습니다.

본 응용자료를 통해, 다양한 크기, 다양한 조성을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 정성, 정량, 정제에 대한 분석법 개발에 대응할 수 있을 것으로 기대합니다.

참고 문헌

1. Gerd V.; Sonja S. Evaluation of different ion-pairing reagents for LC/UV and LC/MS analysis of oligonucleotides. Agilent Technologies application note, publication number 5994-2957EN, 2021.
2. Phu D. Et al. Fast and high-resolution reversed-phase separation of synthetic oligonucleotides. Agilent Technologies application note, publication number 5991-6006EN, 2017.
3. J. Massie and L. Lloyd. Use temperature to enhance oligonucleotide masstransfer and improve resolution in ion-pair RP HPLC. Agilent Technologies application note, publication number 5990-7765EN, 2011.
4. J. Massie and L. Lloyd. High resolution separations of oligonucleotides using PL-SAX strong anion-exchange HPLC columns. Agilent Technologies application note, publication number 5990-8297EN, 2021.
5. Jose V. Bonilla. Et al. Handbook of analysis of oligonucleotides and related products. Taylor & Francis Group, 2011.
6. Alexander J. Investigation of pore size effects at separation of oligonucleotides using ion-pair RP HPLC. Faculty of health, science and technology. 2019.
7. Lingzhi G. Et al. Comparing ion-pairing reagents and sample dissolution solvents for ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis of oligonucleotides. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2014, 28, 339-350.
8. Evanna L. Et al. The investigation of DNA and RNA structural differences using ultra high performance liquid chromatography. Anthropology. 2016, 21.

www.agilent.com/chem

DE20544589

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2021
2022년 4월 1일, 한국에서 발행
5994-4631KOKR

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

