

寡核苷酸在 PLRP-S 柱和固定相上的 动态结合容量

作者

Andrew Coffey 博士
安捷伦科技有限公司



摘要

PLRP-S 是一种聚合物聚苯乙烯/二乙烯基苯 (PS/DVB) 反相材料，非常适合用于寡核苷酸的分离和纯化，有多种孔径和粒径可供选择。本技术概述旨在为您提供相关指导，帮助您根据所使用寡核苷酸的大小，选择合适的孔径。

前言

动态结合容量 (DBC) 是包含相应分子的溶液通过液相色谱柱时, 用于测定色谱柱饱和点的一种方法。为了评估不同孔径 PLRP-S 固定相的 DBC, 制备了已知浓度的一系列寡核苷酸 (25、50、75 和 100 碱基)。将这些溶液泵入不同的色谱柱中, 直到超过饱和点。

此方法能有效地指示固定相结合分子的能力, 有助于确定最适合纯化的固定相^[1]。

实验部分

试剂与化学品

所有试剂均为 HPLC 级或更高等级。

寡核苷酸通过 Integrated DNA Technologies 公司定制合成和购买。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 四元液相色谱系统包括:

- Agilent 1260 Infinity II 四元泵 (G1311B)
- Agilent 1260 Infinity II 高性能自动进样器 (G1367E), 配备样品冷却装置
- Agilent 1260 Infinity II 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G4212B)

样品前处理

用流动相 A 溶解寡核苷酸样品, 使最终浓度为 1.0 mg/mL, 并作为洗脱液 C 放置在仪器上。

流动相配制

- 配制 1 mol/L 醋酸三乙胺 (TEAA) 储备液: 将 60.0 g 冰醋酸溶解在 900 mL Milli-Q 水中, 向搅拌的溶液中缓慢加入 101.2 g 三乙胺。定容到 1 L

- 流动相 A 由 100 mL 1 mol/L TEAA 储备溶液和 900 mL 水制备
- 流动相 B 由 100 mL 1 mol/L TEAA 储备溶液和 900 mL 乙腈制备

表 1 列出了结合容量的 HPLC 条件, 表 2 列出了寡核苷酸净化的梯度曲线。

序列

- 寡核苷酸净化梯度 (60 分钟) × 2
- 寡核苷酸结合 (100% C, 直至流穿)
- 寡核苷酸净化梯度 (60 分钟) × 4

方法条件

表 1. 结合容量的 HPLC 条件

| | |
|-------|--|
| 色谱柱 | Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 5 μm, 100, 300, 1000 和 4000 Å |
| 流动相 | 洗脱液 A: 0.1 mol/L TEAA 洗脱液 B: 含 0.1 mol/L TEAA 的 90% ACN 溶液 洗脱液 C: 寡核苷酸溶液 |
| 流速 | 0.21 mL/min |
| 柱温 | 25 °C |
| 检测器 | UV, 262 nm |
| 进样量 | NA |
| 总运行时间 | NA |

表 2. 寡核苷酸净化梯度曲线

| 时间 | %A | %B |
|-------|-------|-------|
| 0.00 | 90.0 | 10.0 |
| 4.00 | 90.0 | 10.0 |
| 34.00 | 75.0 | 25.0 |
| 42.00 | 0.0 | 100.0 |
| 48.00 | 0.0 | 100.0 |
| 52.00 | 100.0 | 0.0 |
| 60.00 | 100.0 | 0.0 |

结果与讨论

PLRP-S 固定相是全多孔聚苯乙烯/二乙烯基苯颗粒，其具有疏水性，适用于反相分析。提供多种孔径（100、300、1000 和 4000 Å），其中市场上常见的小孔径可能会阻碍超大分子的可及性。即使小孔径颗粒具有更高的内表面积，但如果分子太大而无法进入孔中，容量也会受到影响。

为了进行更全面的研究，定制合成了四种不同的寡核苷酸（表 3）。这一大小范围代表了不同的寡核苷酸类型，从较小的 microRNA 到较大的向导 RNA。选择脱氧核糖核苷酸确保动态结合研究具有更高的稳定性。

一开始，使用直通接头代替色谱柱来确定延迟体积。用 100% 洗脱液 A 冲洗仪器，然后切换为 100% 洗脱液 C。将在 262 nm 处检测到寡核苷酸溶液之前所用的时间记录为系统的死体积，然后从每次色谱柱运行中扣除该体积（图 1A 至 1D）。检测在 25% 满量程偏转下进行。

表 3. 本实验中使用的寡核苷酸

| | |
|---------|--|
| 25 mer | CATATAAGTTGCGTTACTTCGGCCT |
| 50 mer | CCTAACCGCACCCCTTAGCACGAAGA CAGATTCGTTCTTACCCATACTCCA |
| 75 mer | CCGTTGGCAGGGGATCGCATGTCC CACGTGAAACATTGCTAAACCCCTCA GGTCTCTGAGCGACAAAAGCTTTAA |
| 100 mer | AGGGAAATTCGCGCCCATAACTTGGT CCGAATACGGGTTCTTGCATCGTTC GACTGAGTTTGTTTATATAAAAACG GGCGCAATGTCTGCTTTGATCAAC |

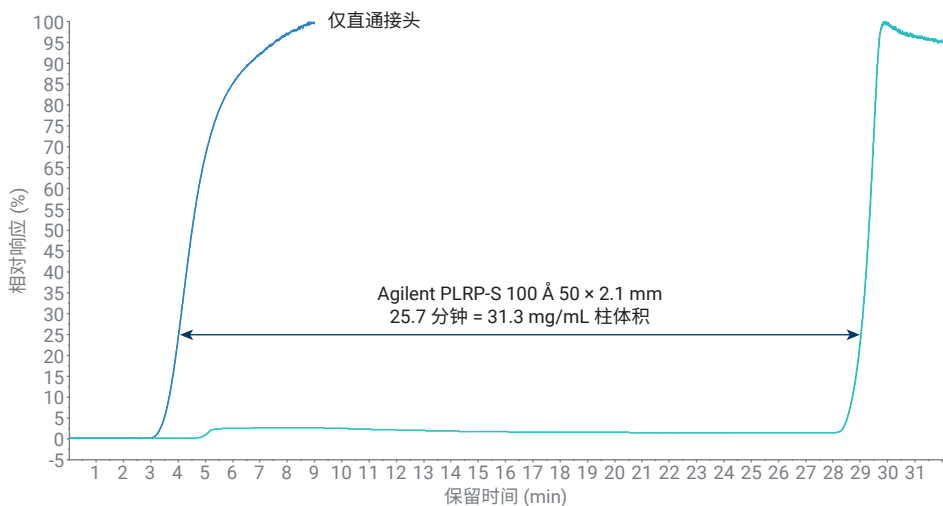


图 1A. 50 mer 寡核苷酸在 Agilent PLRP-S 100 Å 色谱柱中流穿

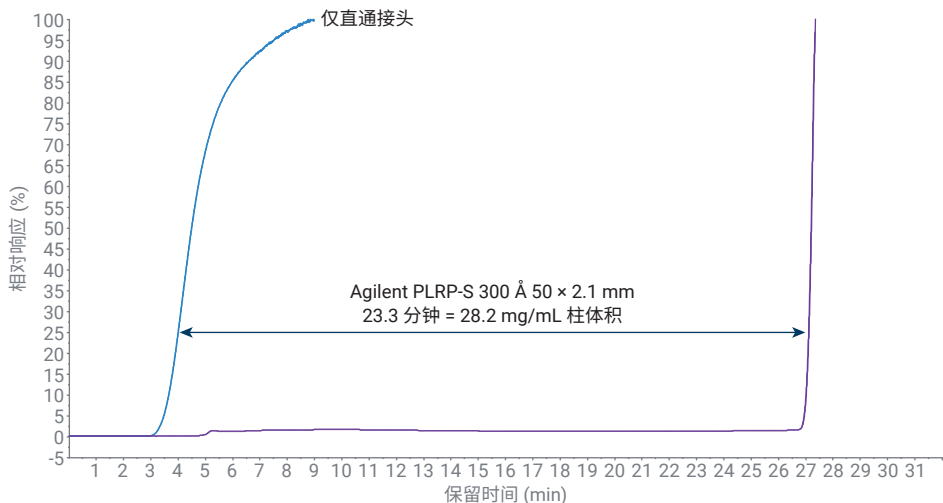


图 1B. 50 mer 寡核苷酸在 Agilent PLRP-S 300 Å 色谱柱中流穿

在进行 DBC 之前，对每根色谱柱进行持续 60 分钟的梯度净化。当检测到寡核苷酸溶液已使色谱柱饱和时，测定动态结合。然后重复四次梯度净化，对每根色谱柱进行彻底清洗，去除所有残留的结合寡核苷酸。务必要认识到梯度净化的重要性，并确保梯度变化不要过快，否则会使寡核苷酸继续吸附在色谱柱上。梯度曲线如图 2 所示。

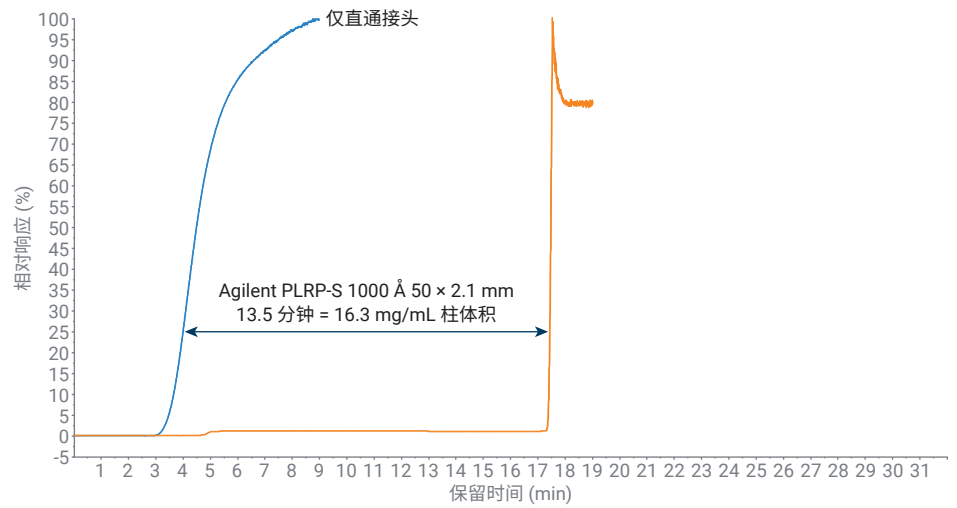


图 1C. 50 mer 寡核苷酸在 Agilent PLRP-S 1000 Å 色谱柱中流穿

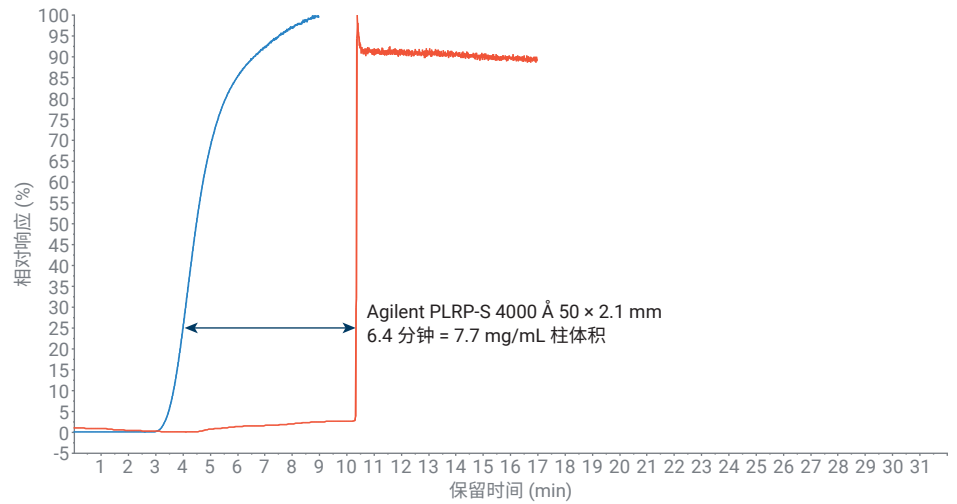


图 1D. 50 mer 寡核苷酸在 Agilent PLRP-S 4000 Å 色谱柱中流穿

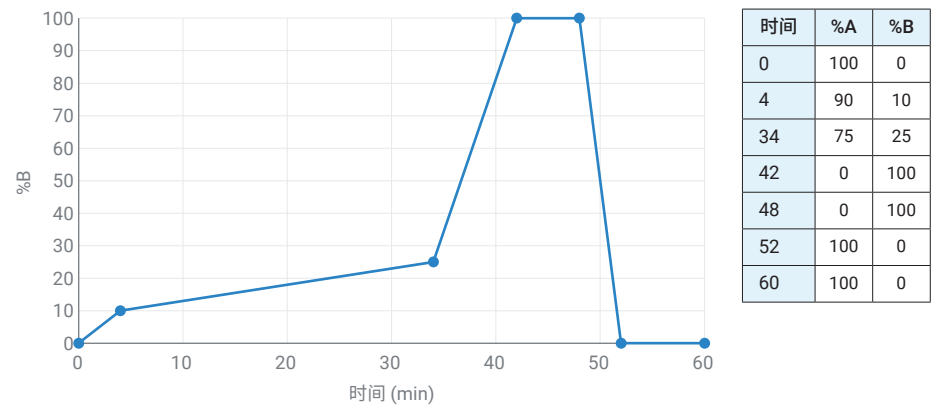


图 2. 色谱柱净化的梯度曲线

固定相颗粒的内表面积随着孔径的增大而减小。预计孔径更小的 PLRP-S 100 Å 的 DBC 将最高。在实践中，对于最小的寡核苷酸 (25 mer) 也是如此 (图 3)。对于更大的寡核苷酸 (50 和 75 mer)，PLRP-S 100 Å 的载样量降低，因为其孔径过小。

进一步观察 PLRP-S 100 和 300 Å 柱上 50 mer 寡核苷酸的 DBC 流穿曲线，可以在曲线中看到明显的变化，这也表明了进入孔隙受限对传质的影响 (图 4)。这种效应也可以在分析分离中观察到 (图 5)，其中 300 Å 孔径色谱柱的峰宽较窄，表明传质更好。

虽然最大孔径 4000 Å 的表面积最小，因而 DBC 受限，但大孔径可实现快速传质，获得更窄的峰，从而实现出色的分离度。

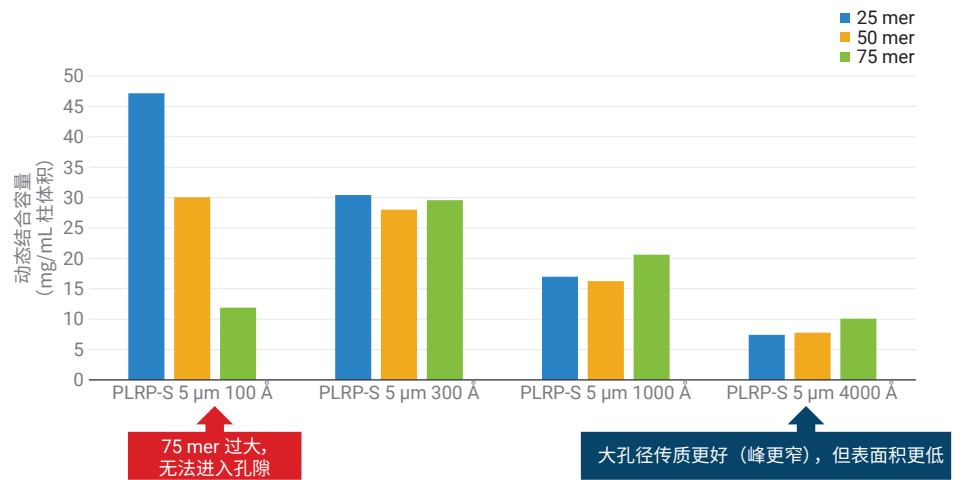


图 3. 不同大小寡核苷酸的结合容量对比

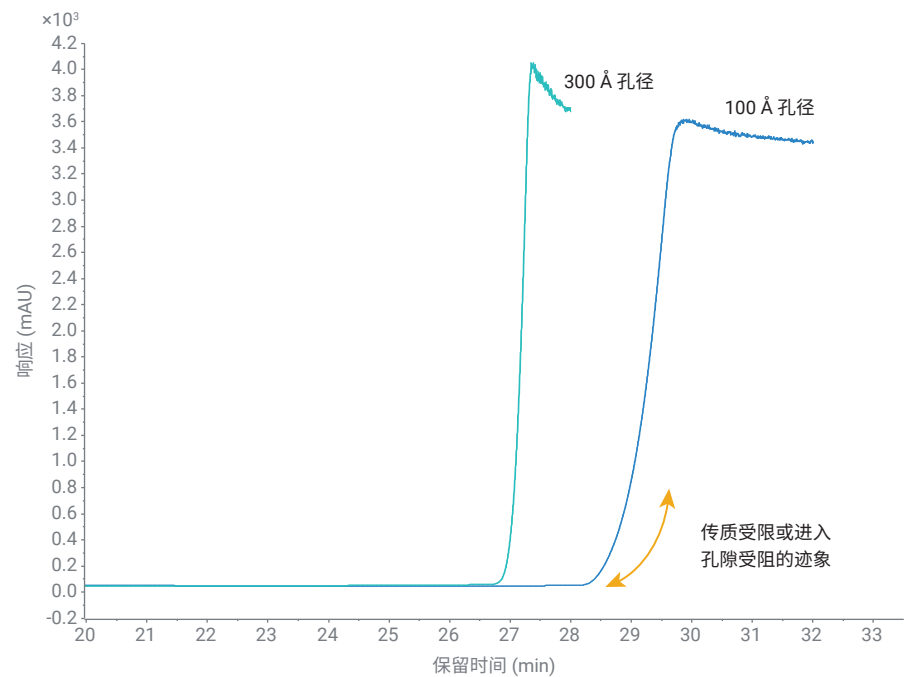


图 4. 300 Å 和 100 Å 下 50 mer 寡核苷酸结合容量曲线的放大图

图 6 显示了四种不同的寡核苷酸粗产品的分析分离，并放大了特定区域，以便清楚地区分其中存在的多种杂质。

DBC 为评估固定相的寡核苷酸纯化能力提供了一种有用的指示。它可以帮助确定哪种材料对特定寡核苷酸的纯化效果最好，并为所需的色谱柱规格提供指导。由于纯化结果将取决于存在的杂质以及目标纯度，因此无法预测单次运行可纯化的最佳寡核苷酸量。即便如此，使用这些信息作为指导，有助于预估能够纯化的寡核苷酸

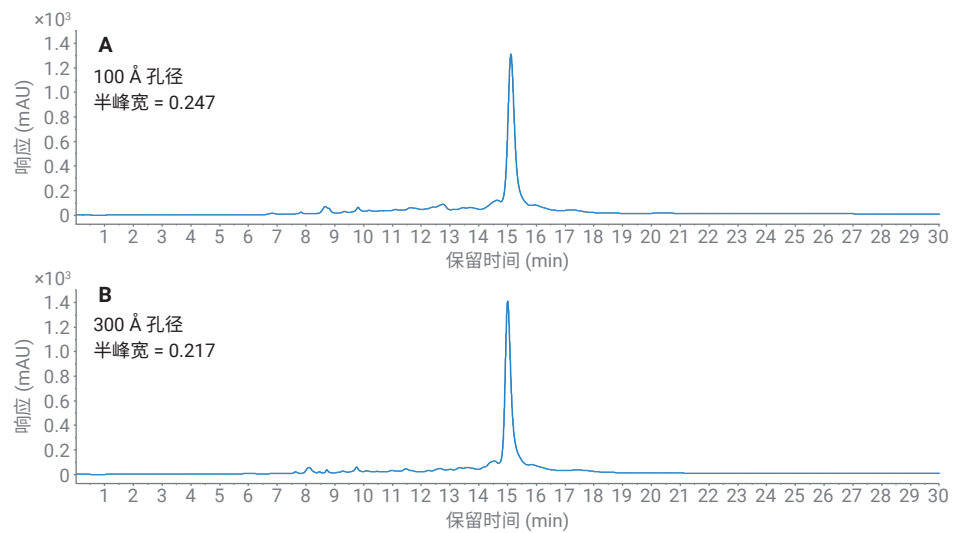


图 5. 在 Agilent PLRP-S 100 Å 和 300 Å 色谱柱上对 50 mer 寡核苷酸粗产品进行分析分离

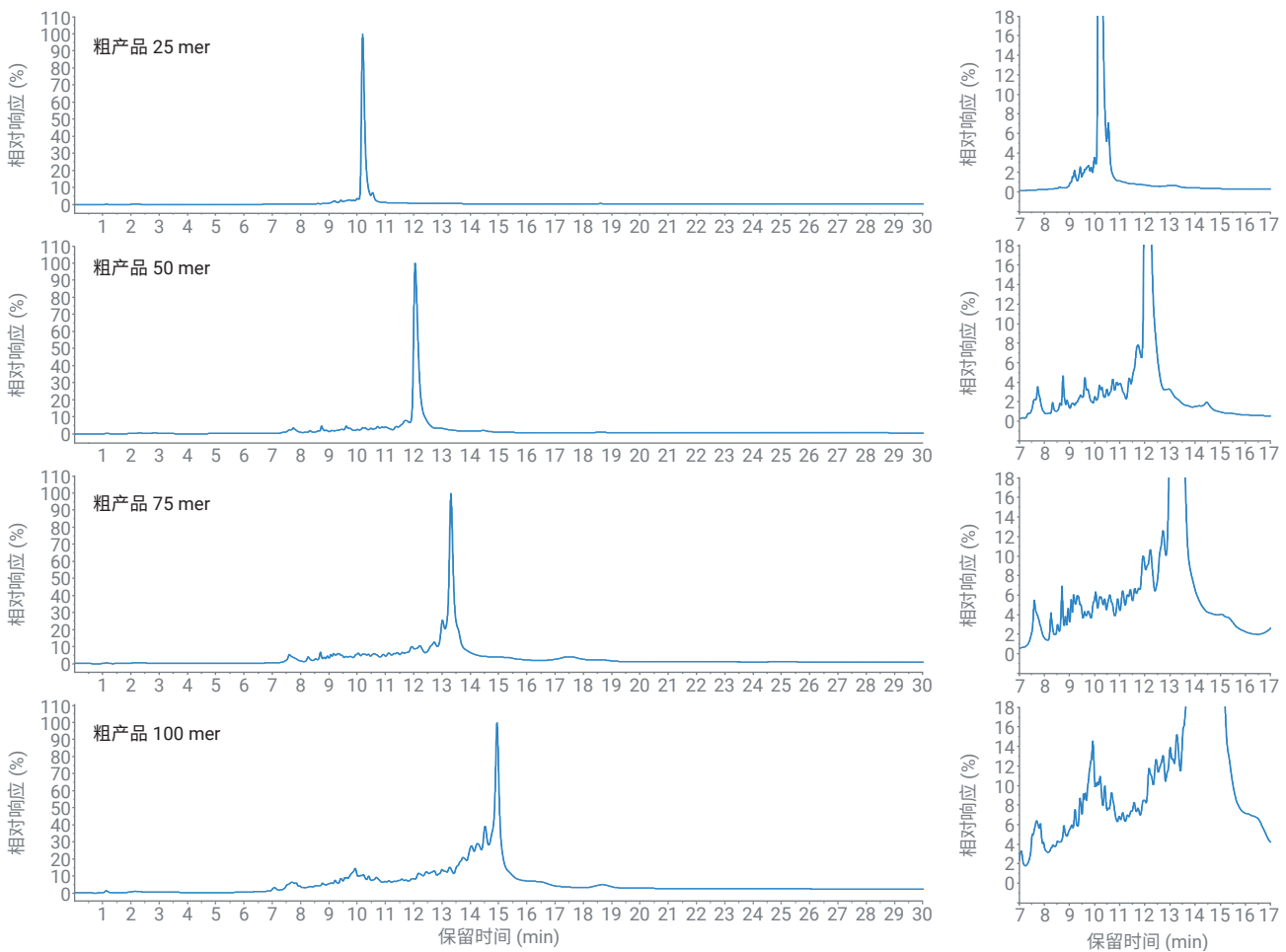


图 6. 使用 Agilent PLRP-S 4000 Å 色谱柱对 25、50、75 和 100 mer 粗产品进行分析分离的色谱图 (左) 以及放大图 (右)

酸量以作为初始进样量，然后由此进行优化和验证。例如，使用 5% DBC 作为载样值，可以比较不同色谱柱内径和柱床深度可实现的预期规模（表 4）。

最终，有必要针对每一次纯化对这些数据进行更广泛的测试和验证，以确保达到所需的纯度。最好使用装填有用于纯化的相同级别固定相的分析柱。

结论

PLRP-S 聚合物材料是寡核苷酸离子对反相纯化的理想选择。它们在物理和化学性质方面都很稳定，非常适合所要求的条件。根据寡核苷酸的长度选择正确的孔径对于优化结合容量和寡核苷酸的整体纯化非常重要。

参考文献

1. Lloyd, L. L. et al. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1009, 223-230

表 4. 按色谱柱内径估算的载样容量

| 内径 (mm) | 体积 (mL) | 每 50 mm 柱床深度的载样量 (mg) (基于 5% 容量) | | | | | | | | | | | |
|---------|---------|----------------------------------|--------|--------|--------------|--------|--------|---------------|--------|--------|---------------|--------|--------|
| | | PLRP-S 100 Å | | | PLRP-S 300 Å | | | PLRP-S 1000 Å | | | PLRP-S 4000 Å | | |
| | | 25 mer | 50 mer | 75 mer | 25 mer | 50 mer | 75 mer | 25 mer | 50 mer | 75 mer | 25 mer | 50 mer | 75 mer |
| 2.1 | 0.17 | 0.4 | 0.3 | 0.1 | 0.3 | 0.2 | 0.3 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| 4.6 | 0.83 | 2.0 | 1.3 | 0.5 | 1.3 | 1.2 | 1.2 | 0.7 | 0.7 | 0.9 | 0.3 | 0.3 | 0.4 |
| 7.5 | 2.2 | 5.2 | 3.3 | 1.3 | 3.4 | 3.1 | 3.3 | 1.9 | 1.8 | 2.3 | 0.8 | 0.9 | 1.1 |
| 25 | 24.5 | 58 | 37 | 15 | 37 | 34 | 36 | 21 | 20 | 25 | 9 | 10 | 12 |
| 50 | 98 | 232 | 148 | 58 | 149 | 137 | 145 | 83 | 80 | 101 | 36 | 38 | 50 |
| 100 | 393 | 927 | 591 | 234 | 597 | 550 | 581 | 334 | 318 | 404 | 145 | 153 | 198 |

查找当地的安捷伦客户中心：

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

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE92315149

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, 2022
2022 年 1 月 28 日, 中国出版
5994-4526ZHCN