HIGH QUALITY & EXPERT

慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 161 期 东曹色谱柱在寡核苷酸分析中的应用

2023 年 4 月

第 161 期　东曹色谱柱在寡核苷酸分析中的应用

寡核苷酸是合成的短链 DNA 或 RNA 分子，可用于治疗，通过与目标基因或蛋白序列结合来阻碍基因表达或蛋白发挥作用。快速增长的寡核苷酸疗法市场包括靶向性非常强的反义 DNA 和小干扰 RNA (siRNA)，在治疗癌症、遗传病和其他疾病方面有着广泛的应用前景。

液相色谱技术具有分离效率高、选择性好、检测灵敏度高、应用范围广等特点，已成为核酸药物生产与质控分析必不可少的重要手段。本期内容将介绍 TSKgel 色谱柱在寡核苷酸分析中的应用。

治疗性寡核苷酸分离色谱模式如下图：

Chromatography Mode	Principle	Advantage	Disadvantage	Typical Chromatographic Conditions
Reversed-phase chromatography (RPC)	Hydrophobic interaction	· High resolution · Separation of structure isomers, chiral forms · Various grade with different selectivity	· Broader peak separation due to many isoforms and chrial forms · Sample loading is not relatively high	· Ammonium acetate, triethylammonium acetate as ion-pair (IP) reagents · Gradient elution with organic solvent
Hydrophobic interaction chromatography (HIC)	Hydrophobic interaction	· Much less use of organic solvent · Separation of DMT-on and DMT-off form · Partial separation of N-1 and P=O form · Substitution to RPC	· Use of high concentration of salt and requires desalting after separation	· Reverse gradient by ammonium sulfate · Elution with organic solvent for more hydrophobic sample
Ion-exchange chromatography (IEC)*	Electrostatic interaction	· Higher sample loading · Separation due to phosphate number; (N-1, N, N+1)	· Desalting or dilution is required prior to separation	· Gradient elution with salt at neutral to alkalinepH buffer · Organic solvent may be added to elution buffer
Hydrophilic Interaction chromatography (HILIC)	Hydrophilic interaction	· Separation of structure isomers, chiral forms · Better sensitivity in MS detection without IP reagent · 2-D HPLC analysis with RPC	· Lower resolution compared with RPC	· Reverse gradient elution of organic solvent like acetonitrile
Size-exclusion chromatography (SEC)**	Molecular size	· Separation due to base number (MW) · Separation with buffer close to physiological conditions	· Lower sample loading · Lower resolution compared with RPC, IEC and HIC	· Isocratic elution at neutral pH buffer · Organic solvent may be added to elution buffer

* By IEC, non-porous resin (NPR) can improve resolution.like TSKgel DNA-NPR (2.5 mm) or TSKgel DNA-STAT(5 mm).

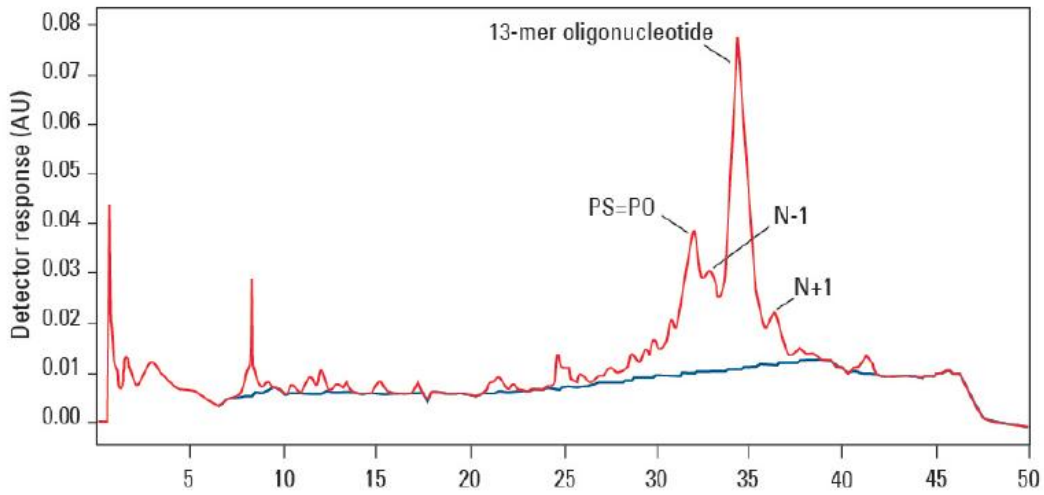
** By SEC, silica-based TSKgel SW column can separate oligonucleotide by molecular size due to number of nucleic base and phophate group.

一、离子交换色谱柱

TSKgel DNA-NPR 阴离子交换色谱柱性能参数。

基质	聚甲基丙烯酸酯
粒径	2.5μm
孔径	无孔
官能团	独有
抗衡离子	ClO_4^-
pH 耐受范围	2.0-12.0
蛋白容量	5g BSA/L
离子交换容量	0.1eq/L
pKa	11.2

下图是 TSKgel DNA-NPR 阴离子交换色谱柱对 13 个碱基的硫代磷酸寡核苷酸粗样分析的色谱图。



色谱条件：

色谱柱：TSKgel DNA-NPR（4.6×75mm）

流动相：A：20mmol/L NaOH（pH 12）+10mmol/L NaBr+1%二乙胺

B：20mmol/L NaOH（pH 12）+1mol/L NaBr+1%二乙胺

梯度：3.5min（20%B），12min（20%B），45min（55%B）

流速：1.0ml/min

检测：UV260nm

温度：60℃

样品：粗合成寡核苷酸（13mer，脱保护）

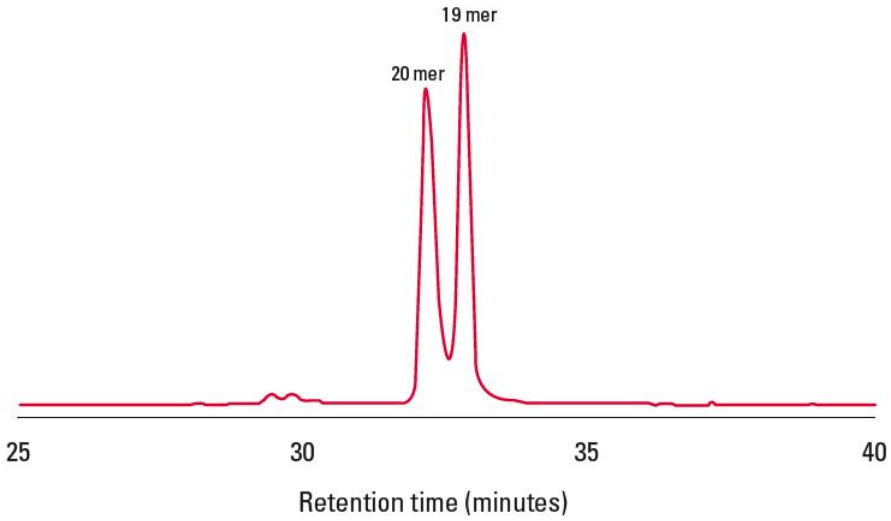
二、尺寸排阻色谱柱

硅胶基质填料表面键合二醇基，粒径 2μm，适用于小分子蛋白、多肽、寡核苷酸等生物分子的快速、高分辨率分析。可兼容 UHPLC 系统与常规 HPLC 系统。

基质	硅胶
官能团	二醇基
粒径	2μm
孔径	12.5nm
分子量排阻限	500 kDa
分离范围	5-100 kDa

在寡核苷酸的分析中，尺寸排阻分离模式是基于碱基数量、磷酸基不同导致的分子量差别进行分离，通常用于简单的质量控制或纯度研究。

下图是采用两根串联的 SEC 色谱柱 TSKgel UP-SW2000 来区分长度相差一个碱基的寡核苷酸混合物 (20-mer 和 N-1 19-mer)。



色谱条件：

色谱柱：TSKgel UP-SW2000（2μm，4.6×300mm×2）

流动相：50 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 6.7）

300 mmol/L NaCl，0.03% NaN_3

流速：0.2 ml/min

检测：UV260nm

样品：19-mer and 20-mer

*如需更详细的资料，请联系我们！

北京慧德易科技有限责任公司
咨询电话：010-59812370/1/2/3
公司官网：www.prep-hplc.com
邮　　箱：sales@prep-hplc.com
微信公众号：北京慧德易