

应用纪要

离子对反相(IP-RP)液相色谱法分析寡聚核苷酸的最佳实践：色谱柱及其填料

Martin Gilar, Nicholas J. Zampa

Waters Corporation



需要帮助？如需详细了解沃特世如何为您抗击新型冠状病毒肺炎(COVID-19)提供助力，请联系 [新型冠状病毒肺炎\(COVID-19\)疫情创新响应团队](#)

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

沃特世介绍了一些关键的色谱柱和填料最佳实践，以便利用离子对反相(IP-RP)液相色谱法成功进行寡聚核苷酸分析。无论用于诊断还是治疗，都需要借助稳定耐用的分析方法确保寡聚核苷酸具有高质量。例如，为应对全球COVID-19大流行疫情，研究人员已开发出基于聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)的诊断试剂盒，用于检测新型冠状病毒感染患者的SARS-CoV-2遗传密码。通过PCR进行准确的病毒检测需要使用高质量的寡聚核苷酸引物和探针。此外，科学家正在研究将寡聚核苷酸用作COVID-19的防治药物（包括mRNA疫苗）。

优势

- Waters BEH C₁₈颗粒使寡聚核苷酸可在高pH、高温以及兼容LC或LC-MS的缓冲液条件下分离
- 各批次已使用MassPREP寡聚核苷酸标准品进行QC测试，以确保一致性
- 提供多种粒径和色谱柱尺寸，制备型或分析型应用均适用
- 方法开发采用三步法，不到5分钟即可完成IP-RP寡聚核苷酸分离

简介

在本应用简报中，沃特世简要列出了利用离子对反相(IP-RP)液相色谱法表征寡聚核苷酸的最佳实践，包括分离温度、pH值优化、孔径选择、流动相选择、快速方法开发注意事项、纯化指导原则和常用的缓冲液配方。在寡聚核苷酸分析过程中应用这些最佳实践有助于确保方法稳定耐用，从而为治疗或诊断应用提供始终如一的高质量寡聚核苷酸。

本文以COVID-19大流行疫情为例，说明寡聚核苷酸在诊断应用中发挥的重要作用。及时诊断SARS-CoV-2病毒感染仍然是成功管控新型冠状病毒大流行疫情的关键。因此，许多公司都开发了体外诊断试剂，用于检测是否存在SARS-CoV-2遗传物质。在美国，获得紧急使用授权(EUA)的体外诊断试剂中，大多数采用的是PCR检测方法（例如qPCR、RT-PCR），可检测SARS-CoV-2病毒的遗传密码¹。病毒遗传密码的分子检测专用诊断试剂盒在PCR放大和检测过程中使用寡聚核苷酸作为引物和探针。因此，要成功进行诊断测试，分析评估寡聚核苷酸引物和探针的质量并确保其具有适当的纯度尤为重要。

结果与讨论

沃特世审查IP-RP法分离寡聚核苷酸的方法和产品开发资源后创建了一个简短的最佳实践列表，主要讨论以下6项重要实践。

- 1) 在升高的pH值和温度下进行寡聚核苷酸分离，获得优质结果。
 - i. 升高温度(60 °C)可防止寡聚核苷酸二级结构影响保留性能。对于富含CG或富含G且具有高度二级结构的寡聚核苷酸，可能需要将柱温升至80 °C或90 °C。
 - ii. 寡聚核苷酸分离通常使用高pH值缓冲液($\text{pH} \geq 7$)，例如TEAA。
 - iii. 研究发现，TEA-HFIP是一种非常稳定的流动相，用于不同大小单链寡聚核苷酸的LC-MS分析时，具有出色的灵敏度和分离度²。
 - iv. IP-RP法分离寡聚核苷酸使用的高pH值条件导致常用的硅胶基质固定相不适用。
 - v. Waters BEH吸附剂具有高pH值稳定性和温度耐受性，非常适用于寡聚核苷酸分离。

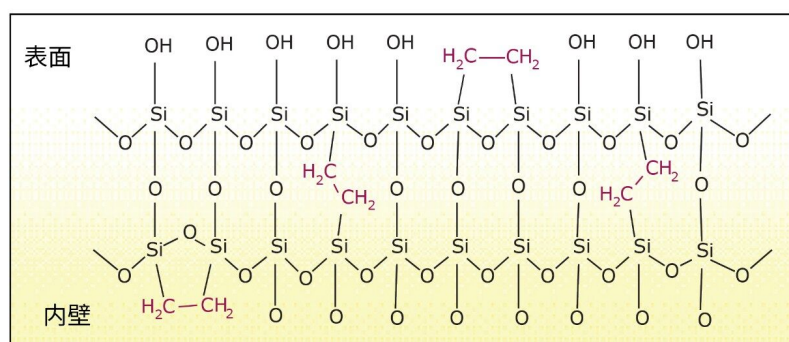


图1.BEH吸附剂结构示意图。水解稳定性通过桥接乙基实现。进行寡聚核苷酸分析时，用C₁₈官能团将吸附剂表面烷基化。

有关详细信息，请参阅沃特世的《寡聚核苷酸分析专用HPLC和UPLC色谱柱》(HPLC and UPLC Columns for the Analysis of Oligonucleotides)，[720002376EN <](#)

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002376en.pdf>>。

- 2) 选择适用于寡聚核苷酸分离的相应孔径。选择正确的孔径有助于实现分析物的适当扩散，使寡聚核苷酸与配体产生最佳的相互作用。改善配体相互作用可改善峰形。

i. 130Å孔径非常适用于单链寡聚核苷酸(2-100 mer)。

ii. 300 Å孔径可有效分离单链寡聚核苷酸以及更长的双链DNA片段。

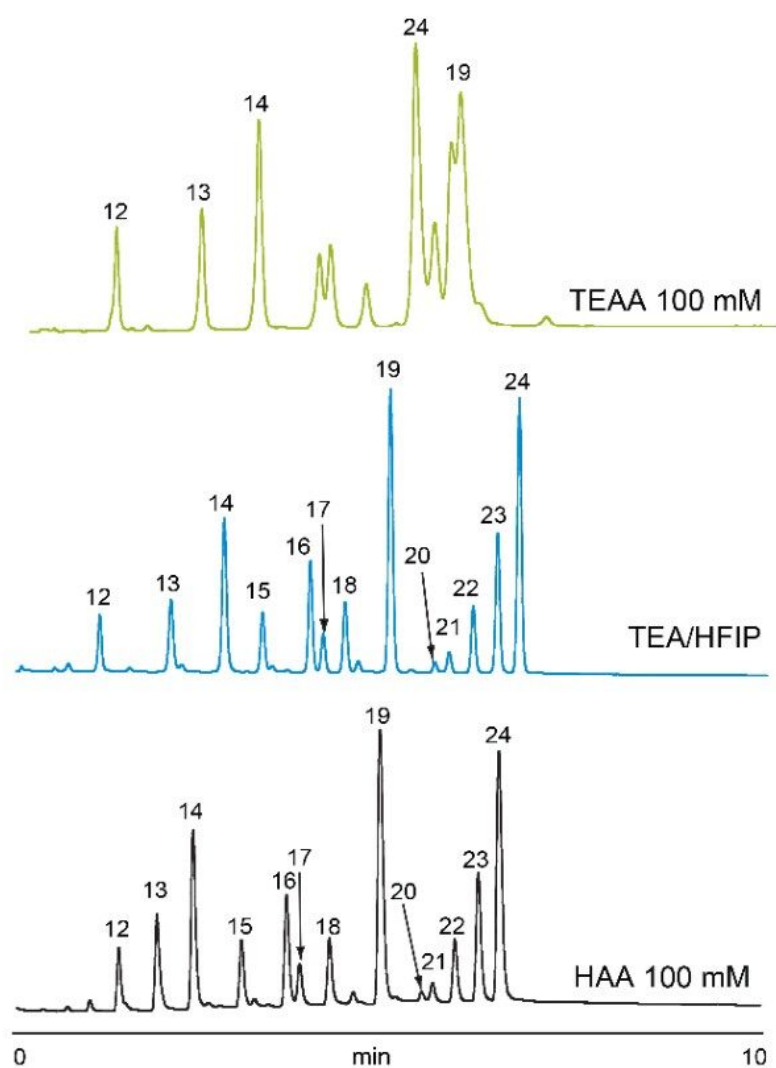
3) 选择合适的流动相。如需了解缓冲液配方请参阅第6节。

i. 三乙胺/六氟异丙醇(TEA/HFIP)可兼容MS方法，具有出色的分离能力。较高的TEA/HFIP缓冲液浓度可提高分离性能。较低的浓度可提高MS灵敏度。

ii. 乙酸己基铵(HAA)也可提供优异的分离度和MS兼容性。但HAA的MS兼容性弱于TEA/HFIP。与TEA/HFIP相比，使用HAA可以更好地分离标记的寡聚核苷酸和更长的寡聚核苷酸(>35-mer)。如果仅执行LC分析，这一优势就显得尤为重要。

iii. 要实现良好分离，TEA/HFIP和HAA/HFIP流动相必须新制。这些半挥发性流动相的分离能力可能会逐渐减弱，导致质谱图被碱金属离子加合物污染。为了在日常工作中获得稳定的结果，流动相应每天配制或限量配制。流动相的使用上限为一周。

iv. TEA和HFIP均应在通风橱中配制，使用沃特世APC溶剂瓶盖防止气体溢出，在条件允许的情况下，尽可能使用系统上方的通气管。



LC系统: 配备ACQUITY UPLC PDA的ACQUITY UPLC
 样品: 5'-CCC CTT GGT TAA CCA AGG TTC CAA-3'
 色谱柱: ACQUITY UPLC OST C₁₈, 2.1 × 50 mm, 1.7 μm
 柱温: 60 °C
 流速: 0.2 mL/min
 检测条件: 260 nm, 20点/秒

流动相:
 上图: A: 100 mM TEAA, pH 7.0
 B: A+20%乙腈
 梯度: B在10 min内从45%增加到55%
 中图: A: 15 mM TAE, 400 mM HFIP, pH 7.9
 B: A+50%甲醇
 梯度: B在10 min内从30%增加到47%
 下图: A: 100 mM HAA, pH 7.0
 B: A+50%乙腈
 梯度: B在10 min内从56%增加到78%

图2.异源寡聚核苷酸的分离条件。离子对流动相的类型会影响分离的选择性。对于“弱”离子对体系（例如TEAA），疏水作用和离子对相互作用均参与分析物分离过程。对于“强”离子对体系（TEA/HFIP、HAA），寡聚核苷酸分离主要由其电荷/长度驱动。

有关详细信息，请参阅以下沃特世应用纪要

- 使用UPLC/MS法在五分钟内分离寡聚核苷酸：方法开发(UPLC/MS Separation of Oligonucleotides in Less than Five Minutes: Method Development)，[720002387EN <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002387en.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002387en.pdf)。
- 使用ACQUITY QDa检测器评估寡聚核苷酸分析中的替代离子对试剂(Evaluation of Alternative Ion-pairing Reagents in the Analysis of Oligonucleotides with the ACQUITY QDa Detector)，[720005830EN <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005830en.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005830en.pdf)。
- 乙酸己基铵用作对寡聚核苷酸IP-RP LC分析的离子对试剂(Hexylammonium Acetate as an Ion-Pairing Agent for IP-RP LC Analysis of Oligonucleotides)，[720003361EN <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003361en.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003361en.pdf)。

4) 方法开发采用快速的三步法，不到5分钟即可完成IP-RP寡聚核苷酸分离。

i. 确定合适的初始梯度强度或从探索梯度开始。例如，使用15 mM TEA/400 mM HFIP离子对体系时，探索梯度可能如下：

- 从20%甲醇开始，在0.2 mL/min的流速下按1%/min的梯度升高甲醇比例（0.2 mL/min有助于提高大分子分析的柱效）。

ii. 调整梯度斜率以实现所需分离（更平缓的梯度可以提高分离度，但会增加分析时间）。根据需要调整甲醇的起始百分比，减少分析时间。根据需要延长甲醇梯度时间，直到目标寡聚核苷酸和杂质流出。然后注入高浓度有机溶剂冲洗液，洗脱具有高保留特性的组分（通常为寡聚核苷酸组分），尽量减少残留。目标寡聚核苷酸应随梯度洗脱液流出，而不是高浓度有机溶剂冲洗液。

iii. 如果需要提升速度，可在增加流速的同时按比例减少梯度时间，从而加快分离速度（梯度色谱柱体积恒定）。分离选择性不应改变，同时可观察到分离度损失非常小。如果需要提高灵敏度或优化分离度，请降低流速。

- 0.4 mL/min能够实现速度与性能的良好平衡。对于高通量分离，建议流速为0.8 mL/min（分离时间1-3 min，色谱柱内径2.1 mm）。

- 有关使用XBridge OST色谱柱进行方法开发的详细注意事项（例如起始梯度斜率、缓冲液配方和色谱柱注意事项），请参阅沃特世手册715001476。

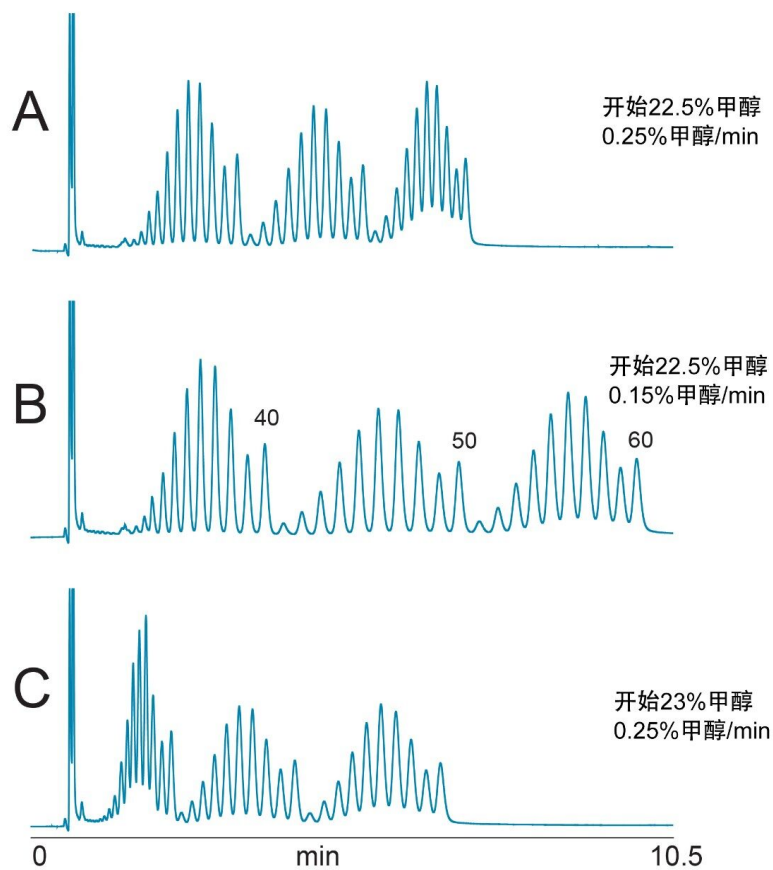


图3.使用2.1 x 50 mm, 1.7 μ m ACQUITY UPLC OST C_{18} 色谱柱分离30~60 nt的寡聚脱氧胸苷。

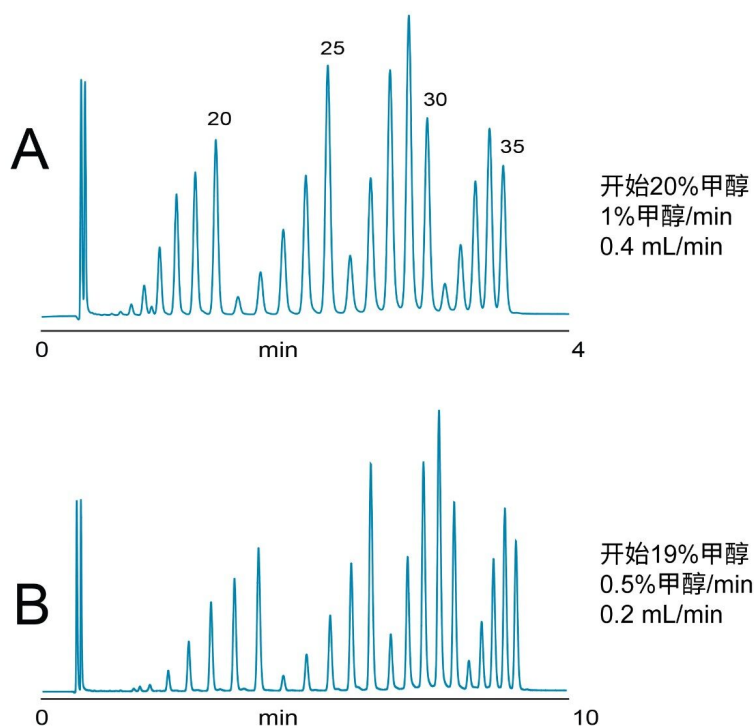


图4.15~35 nt的寡聚脱氧胸苷分离结果。

有关详细信息，请参阅以下沃特世应用纪要

- 使用UPLC/MS法在五分钟内分离寡聚核苷酸：方法开发(UPLC/MS Separation of Oligonucleotides in Less than Five Minutes: Method Development)，[720002387EN <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002387en.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002387en.pdf)。
- UPLC法分离寡聚核苷酸：方法开发(UPLC Separation of Oligonucleotides: Method Development)，[720002383EN <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002383en.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002383en.pdf)。
- XBridge OST C₁₈方法指南(XBridge OST C18 Method Guidelines)，[715001476 <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001476.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001476.pdf)。

5) 使用XBridge BEH C₁₈寡聚核苷酸分析专用柱纯化寡核苷酸的指导原则。

- XBridge BEH C₁₈, 130 Å寡聚核苷酸分析专用柱是去三苯甲基寡核苷酸纯化的首选解决方案，因为可以使用指定大小的色谱柱满足实验室规模的分离要求。
- XBridge BEH C₁₈寡聚核苷酸分析专用柱的尺寸和操作流速选择主要取决于合成反应混合物的规模。

- 例如，当寡聚核苷酸载样量小于或等于0.2 μmol 时，优先选择填充有XBridge BEH C_{18} , 130 Å, 2.5 μm 寡聚核苷酸分析填料的4.6 $\times$ 50 mm色谱柱。
- 建议根据寡聚核苷酸上样量选择合适的色谱柱大小，从而大幅提高组分分离度和目标产物从非预期失败序列中回收的回收率。请参阅表1了解载样量指导原则。

单链RNA的纯化

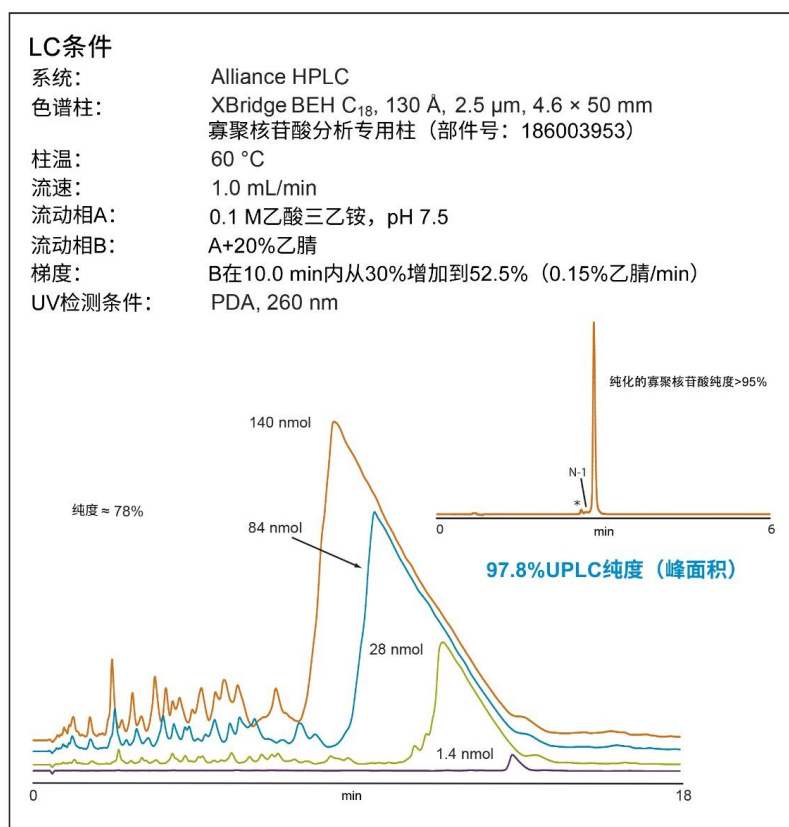


图5.合成21-mer寡聚核苷酸的HPLC纯化。样品浓度2.8 $\text{nmol}/\mu\text{L}$ ，柱上载样量范围1.4~140 nmol 。

色谱柱 (mm)	大约载样量 (μmol)*	流速 (mL/min)
2.1 x 50	0.04	0.2
4.6 x 50	0.20	1.0
10.0 x 50	1.00	4.5
19.0 x 50	4.00	16.0
30.0 x 50	9.00	40.0
50.0 x 50	25.00	110.0

* 表中所列为近似值，具体因寡聚核苷酸的长度、碱基组成和所用的“中心切割”馏分收集方法而异。

表1. 去三苯甲基寡核苷酸纯化时所用的XBridge OST C_{18} 色谱柱选择指南。

6) 如何制备专用的IP-RP缓冲液（1升）

- i. 所有工作均在通风橱中进行。
- ii. 使用溶剂相容的0.45 μm 滤膜过滤所有流动相，储存在清洁、无颗粒的储液瓶中。
 - 以下是流动相A的配方。流动相B通常由有机溶剂（例如乙腈、甲醇）与流动相A以合适的百分比（例如20-50%）混合而成。较高浓度的缓冲液(15 mM TEA/400 mM HFIP)可用于分离富含G的寡聚核苷酸。对于常规的去三苯甲基寡核苷酸LC-MS应用，较低强度的缓冲液(8.6 mM TEA/100 mM HFIP)通常已足够。

步骤	0.1 M TEAA	8.6 mM TEA/ 100 mM HFIP	15 mM TEA/ 400 mM HFIP	25 mM HAA
1	将5.6 mL冰醋酸加入950 mL水中并充分混合	将16.8 g (10.4 mL) HFIP加入988.4 g水中并充分混合	将67.17 g (41.56 mL) HFIP加入956.36 g水中并充分混合	将995 g水加入1 L的烧瓶中
2	缓慢添加13.86 mL TEA	缓慢添加1.2 mL TEA	缓慢添加1.52 g (2.08 mL) TEA	添加 1.43 mL 99% 乙酸
3	小心添加乙酸，将pH值调节至 7 ± 0.5	pH = 8.3 ± 0.1	pH = 7.9 ± 0.1	添加3.283 mL己胺 (pH值7.0-7.5，视准确度而定) (添加约40 μL 己胺将pH调节至8.5)
4	用水将最终体积调节至1 L			用水将最终体积调节至1 L

结论

为支持研究寡聚核苷酸的客户，沃特世提供了上述重要的最佳实践，确保使用IP-RP液相色谱法分离寡聚核苷酸时始终获得高性能。稳定耐用的方法是为诊断或治疗应用提供高质量寡聚核苷酸的关键。例如，在利用PCR技术进行准确的诊断检测（包括COVID-19检测）时，必须使用高质量寡聚核苷酸引物和探针。

参考资料

1. In Vitro Diagnostic EUAs - Test Kit Manufacturers and Commercial Laboratories Table
[Internet].Washington (DC).FDA.[引用日期：2020年6月1日]。参考网站：
<https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorizations#covid19ivd> <<https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorizations#covid19ivd>>
2. Gilar M, Fountain KJ, Budman Y, Holyoke JL, Davoudi H, Gebler JC.Characterization of Therapeutic Oligonucleotides Using Liquid Chromatography with On-line Mass Spectrometry Detection.*Oligonucleotides*.2003 13(4):229-243.

特色产品

Alliance HPLC系统 <<https://www.waters.com/534293>>

ACQUITY UPLC系统 <<https://www.waters.com/514207>>

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

720006948ZH，2020年7月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.