



リン酸緩衝液を用いたオリゴヌクレオチドの分離 とターゲットピークのオンライン脱塩及び分取



<要旨>

一般的にはイオンペアを用いた分離を行うオリゴヌクレオチドを、サイズ排除クロマトグラフィーでリン酸緩衝液を用いて分離しました。さらに目的ピークをバルブの動作によりハートカットすることで、揮発性移動相の系に移送し分取を行いました。これらを全てオンラインで行い、良好な回収率を得ることができました。

Key Words : 核酸、オリゴヌクレオチド、脱塩、分取

1. はじめに

近年、診断・治療などの目的で核酸が注目され、盛んに研究が行われています。核酸の分析や分取・精製には液体クロマトグラフィーを用いた手法が有効ですが、核酸は金属吸着などの問題が起こりやすく、通常は移動相にイオンペア試薬や不揮発性の塩が用いられます。しかし、イオンペア試薬はシステムに残留しやすく、他の分析を行う際には、事前にメンテナンスを必要とする場合があります。また、溶媒除去や、質量分析計での検出が必要な場合には不揮発性の塩は適しません。

本アプリケーションノートでは、リン酸緩衝液によるサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、オリゴヌクレオチドを分離し、さらに目的ピークをハートカット動作によりイオンペア試薬を用いない揮発性移動相の系に移送し分取を行えるシステムをご紹介します。

2. 実験条件

・ サンプル

Agilent DNA Ladder Standard, P/N 5190-9029

・ 装置

Agilent 1260 Infinity II LC System

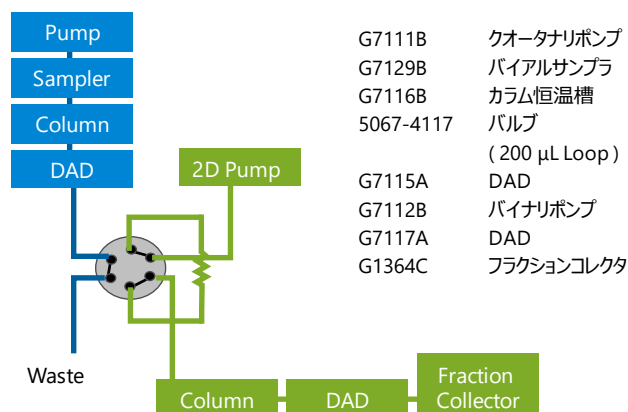


図1 システム構成

1D	
移動相	150 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)
カラム	Advanced Bio SEC 130 Å, 4.6 × 300 mm, 2.7 µm, P/N PL1580-5350
流速	0.2 mL/min
注入量	5 µL
検出波長	260 nm
2D	
移動相	A: 20 mM 酢酸アンモニウム B: メタノール
グラジエント	B conc. 5% (0-1min) → 90% (1.1 min)
カラム	Advanced Bio Oligonucleotide, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm, P/N 659750-702
流速	0.2 mL/min
検出波長	260 nm



Agilent Technologies

3. 結果

1次元目のSEC分析の結果を図2に示します。良好な分離が得られました。この20 merのピークをバルブによりハートカットし2次元目の脱塩カラムに導入しました。1次元目のリン酸移動相は2次元目カラムに保持せずに溶出されるため、不揮発性塩を除去する事が出来ます。この脱塩後のピークをフラクションコレクタで分取しました(図3)。

分取したサンプルを1次元目の条件で再分析した結果を図4に示します。20 merが分取出来ており、回収率は約90%と良好であることを確認しました。

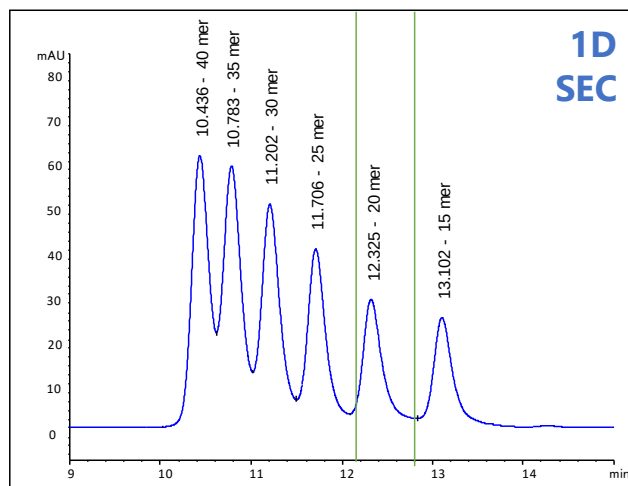


図2 オリゴヌクレオチド標準品クロマトグラム

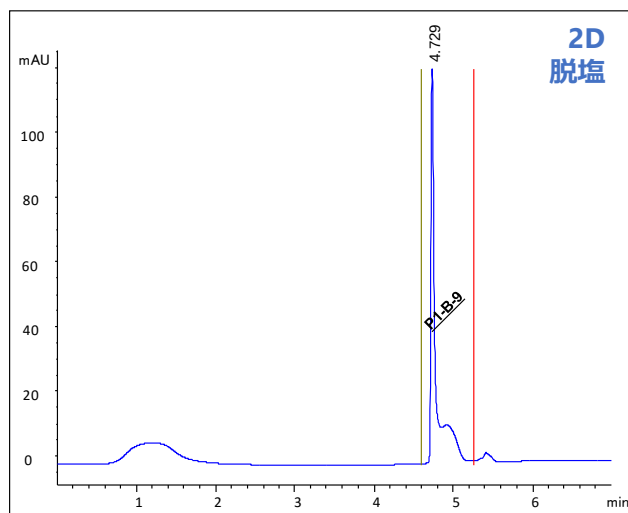


図3 ハートカット画分脱塩クロマトグラム

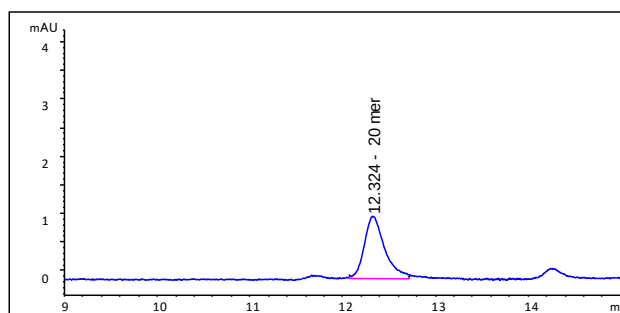


図4 分取したフラクションの再分析SECクロマトグラム

4. まとめ

Agilent 1260 Infinity II LC 脱塩・分取システムおよび Agilent Advanced カラムを用いて、オリゴヌクレオチドを分離し、ハートカットしたフラクションの脱塩・分取精製操作を行いました。イオンペア試薬を用いない揮発性移動相条件下で脱塩を行い、良好な回収率で分取出来ることが確認できました。揮発性移動相を用いているため、最終精製物の確認作業には質量分析計の利用も可能となります。

【LC-201709ND-001】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp