

# Agilent Bio SAX カラムによる オリゴヌクレオチドの動的結合容量 および高分解能分析

## 著者

Jordy Hsiao, Matt Turner  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

この技術概要では、非多孔性アニオン交換 (AEX) ケミストリをもとにした長さ 25 ~ 100 塩基のオリゴヌクレオチドの分離について紹介します。Agilent Bio SAX カラムが高分解能 LC-UV 分離にいかに対応しているかを実証します。

## はじめに

Agilent Bio IEX カラムには、カラム効率を高めながら非特異的結合を排除する親水性ポリマー層でグラフトされた非多孔性ポリスチレンジビニルベンゼン (PS-DVB) 粒子が含まれています。Bio SAX カラムは非多孔質粒子を使用しているため、近接して溶出するオリゴヌクレオチド生成物や不純物に対して優れた分解能を実現可能で、LC-UV 分析に特に適しています。

アニオン交換クロマトグラフィーは、オリゴヌクレオチドなどの生体分子の精製と分析の特性解析の両方に使用できる汎用性の高い手法です。<sup>1</sup>核酸骨格に負に帯電したリン酸基が、粒子上の正に帯電した官能基に引き付けられます。一般に、オリゴヌクレオチドの長さの増加に伴い、結合強度は強くなります。そのため、結合したオリゴヌクレオチドは、グラジエントの塩濃度が増加するにつれて長さの順序で溶出されます。以前の研究で、SAX を使用したオリゴヌクレオチド分離に対する移動相組成とカラム温度の影響が調べられています。<sup>2</sup>本研究では、動的結合容量 (DBC) と、SAX クロマトグラフィーを使用したオリゴヌクレオチドの分析的分離を検討します。

## 実験方法

### 試薬

- 試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。
- Agilent RNA 分解能標準 (部品番号 5190-9028) と Integrated DNA Technologies の粗製 DNA オリゴヌクレオチドを使用しました。

### 装置構成

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムの構成:

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンプラー (G7137A)、Agilent InfinityLab サンプルサーモスタット (オプション 101) 付き
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、バイオコンパチブル熱交換器付き
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7115A)、バイオイナートフローセル (オプション 28) 付き

### サンプル前処理

オリゴヌクレオチドサンプルを移動相 A に溶解し、NanoDrop 分光光度計を使用して最終濃度を測定しました。サンプルは、溶出液 C として機器に設置しました。

### HPLC メソッド

移動相の調製の概要を表 1 に、結合容量の HPLC 条件の概要を表 2 に、オリゴクリーンアップのグラジエントプロファイルの概要を表 3 に示します。本分析の HPLC 条件を表 4 および 5 に示します。

表 1. SAX クロマトグラフィー用の移動相の調製

	100x 原液バッファ	移動相 A	移動相 B
10 mM トリス、pH 8.0	1 M トリス、pH 8.0、HCl で調整	10 mL 原液バッファを 990 mL の水と混合	原液バッファ 10 mL を 116.88 g の NaCl (2 M) と混合し、水を加えて 1 L にしました。

表 2. 結合容量の HPLC 条件

パラメータ	設定値
カラム	<ul style="list-style-type: none"> <li>Agilent Bio SAX カラム、NP1.7、4.6 × 50 mm (p/n 5190-2461)</li> <li>Agilent Bio SAX カラム、NP5、4.6 × 50 mm (p/n 5190-2468)</li> <li>Agilent Bio SAX カラム、NP10、4.6 × 50 mm (p/n 5190-2476)</li> </ul>
移動相	溶出液 A: 水中 10 mM トリス、pH 8.0 溶出液 B: 溶媒 A 中 2 M NaCl 溶出液 C: オリゴヌクレオチド溶液
流量	0.5 mL/分
カラム温度	25 °C
検出 (DAD)	270/4 nm (リファレンス 360/20 nm) ピーク幅 > 0.025 分 (10 Hz)
注入量	NA
合計分析時間	NA

表 3. オリゴクリーンアップのグラジエントプロファイル

時間 (分)	%A	%B
0	100	0
2	0	100
10	0	100
10.1	100	0
20	100	0

表 4. RNA 標準、25 mer および 50 mer オリゴ、カラムコンパートメント温度 80 °C の分析に用いたグラジエントプロファイル

時間 (分)	%A	%B
0	100	0
1	100	0
2	80	20
4	80	20
14	60	40
15	100	0
20	100	0

表 5. 75 mer および 100 mer オリゴ、カラムコンパートメント温度 80 °C の分析に用いたグラジエントプロファイル

時間 (分)	%A	%B
0	100	0
1	100	0
2	70	30
4	70	30
14	50	50
15	100	0
20	100	0

## シーケンス

1. オリゴクリーンアップのグラジエント (20分)
2. オリゴ結合 (流出まで 100% C)
3. オリゴクリーンアップのグラジエント (20分) × 2

## 結果と考察

異なる粒子サイズ (1.7、5、10  $\mu\text{m}$ ) を充填した Bio SAX カラムの結合容量について調べました。4 つの異なるサイズのオリゴヌクレオチドを使用して、長さに基づいて広範なオリゴヌクレオチドクラスの結合容量を表しました (表 6)。

最初にカラムの代わりにユニオンを使用して、装置のデッドボリュームを決定しました。機器を 100% の溶出液 A でコンディショニングし、その後 100% の溶出液 C に切り替えました。オリゴヌクレオチド溶液が 270 nm で検出されるまでに要した時間を、システムのデッドボリュームとして記録し、各カラムの分析値から差し引きました (図 1A ~ 1C)。測定は 25% のフルスケール屈折量で行いました。

DBC を実施する前に、各カラムで 20 分間のクリーンアップグラジエントを実施しました。オリゴヌクレオチド溶液がカラムを飽和させたのを検出した時点で、動的結合を測定しました。次いで、クリーンアップグラジエントを 2 回繰り返して各カラムを洗浄し、残っている結合オリゴヌクレオチドを除去しました。

Bio SAX カラムは非多孔質粒子を使用しているため、充填カラムの粒子サイズが大きくなれば、総固定相表面積が減少します。したがって、1.7  $\mu\text{m}$  の Bio SAX 粒子は、5 および 10  $\mu\text{m}$  の

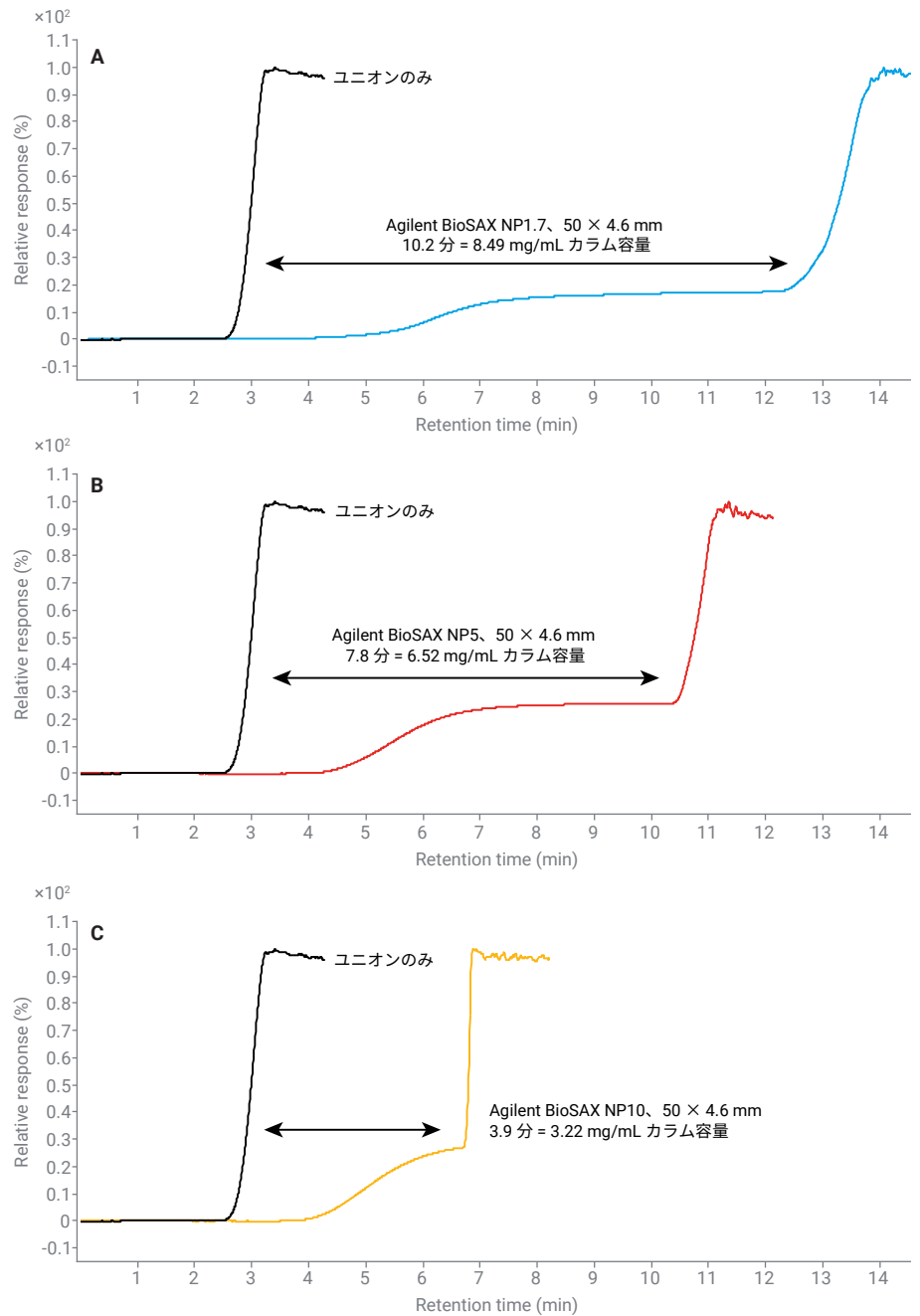


図 1. さまざまなサイズの Agilent Bio SAX カラムを使用した 50 mer オリゴヌクレオチドの流出: (A) 1.7  $\mu\text{m}$ 、(B) 5  $\mu\text{m}$ 、(C) 10  $\mu\text{m}$ 。

表 6. 本検討に用いたオリゴヌクレオチド

25 mer	CATATAAGTTGCGTTACTTCGGCCT
50 mer	CCTAACCGCACCTTAGCACGAAGA CAGATTCGTTCTTACCCATACTCCA
75 mer	CCGTTGGCAGGGGATCGCATGTCC CACGTGAAACATTGCTAAACCTCA GGTCTCTGAGCGACAAAAGCTTTAA
100 mer	AGGGAAATTCGCGCCATAACTTGGT CCGAATACGGGTTCTGCATCGTTC GACTGAGTTGTTTTATATAAAACGGGCGCAATGTCTGCTTTGATCAAC

Bio SAX 粒子と比較して DBC が高いと予想されます。予想どおり、1.7  $\mu\text{m}$  粒子の結合容量が最も高く、10  $\mu\text{m}$  粒子の結合容量が最も低い結果となりました (図 2)。興味深いことに、各粒子サイズの結合容量は、テストを行ったオリゴヌクレオチドの長さとは無関係でした (図 2)。

オリゴヌクレオチドの分析的分離を図 3 に示します。領域の拡大図を同時に示していますが、未精製サンプル内に存在する不純物の多くを分離するカラムの能力を示しています。

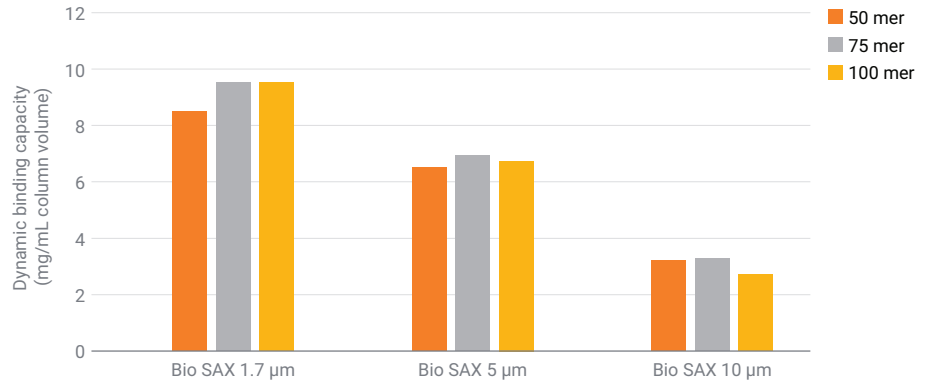


図 2. 異なるサイズのオリゴヌクレオチドの結合容量の比較。

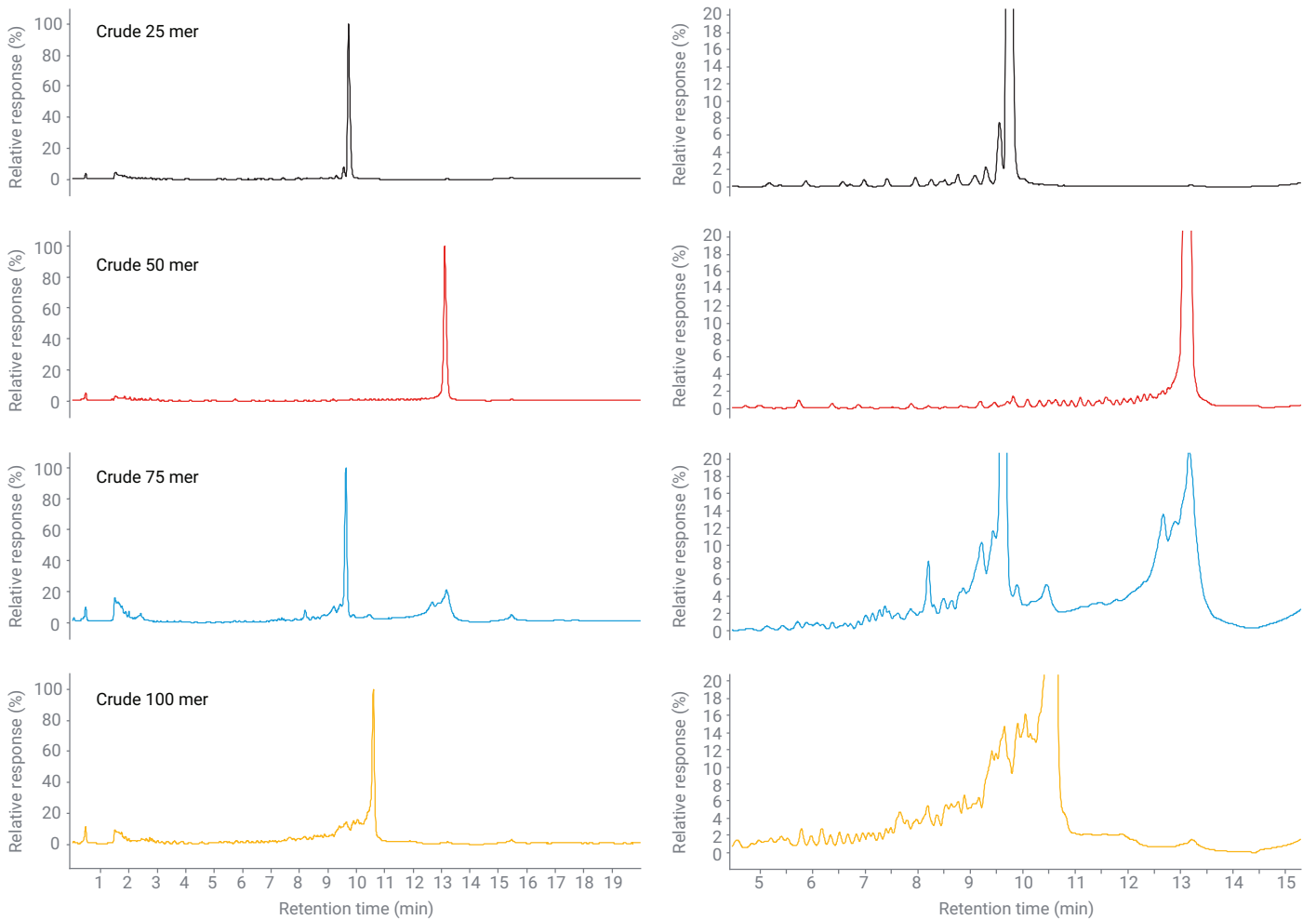


図 3. Agilent Bio SAX 5  $\mu\text{m}$  カラムを使用した粗製 25、50、75、100 mer の分析的分離 (左) と領域の拡大図 (右)。

さらに、20 mer および 21 mer オリゴヌクレオチドを含む RNA 標準を使用した Bio SAX カラムによる n - 1 オリゴヌクレオチドのベースライン分離を示しています (図 4)。

## 結論

Agilent Bio SAX 非多孔質材料は、特にイオンペア逆相 (IP-RP) クロマトグラフィーで使用されるような揮発性バッファーを避ける必要がある場合に、オリゴヌクレオチド分離に最適です。これは、最終オリゴヌクレオチド生成物の LC-UV 分析および不純物プロファイリングを実行する場合に魅力的です。ユーザーにとっては最終的に、クロマトグラフィーによる分離と方法論がユーザーの純度基準を満たしていることを確認するために、個々のターゲット生体分子ごとに、より広範なテストとバリデーションを実施することが重要です。

## 参考文献

1. Cook, K.; Thayer, J. Advantages of Ion-Exchange Chromatography for Oligonucleotide Analysis. *Bioanalysis* **2011**, 3(10), 1109-1120.
2. Hsiao, J.; Apffel, A.; Turner, M. Optimizing Separation of Oligonucleotides with Anion-Exchange Chromatography. Agilent Technologies application note, publication number 5994-4753EN, **2022**.

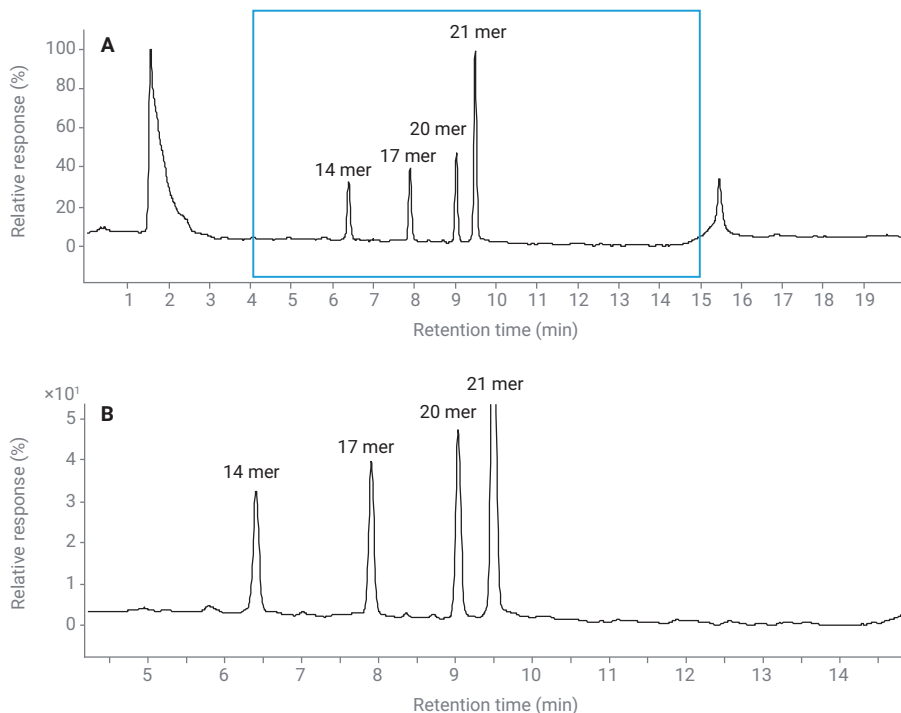


図 4. Agilent Bio SAX 5  $\mu$ m カラムを使用した RNA 標準の分析的分離 (A) と領域の拡大図 (B)。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンタ

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE50136108

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, July 22, 2022

5994-5109JAJP