

オリゴヌクレオチドにおける PLRP-S カラムの動的結合容量

著者

Dr. Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.



概要

PLRP-S は、ポリマーポリスチレン/ジビニルベンゼン (PS/DVB) 逆相充填剤で、オリゴヌクレオチドの分離と精製に最適であり、さまざまなポアサイズと粒子サイズで使用できます。この技術概要の目的は、処理するオリゴヌクレオチドのサイズに応じて、適切なポアサイズを選択するためのガイダンスを提供することです。

はじめに

動的結合容量 (DBC) は、適切な分子が含まれている溶液が通過する際に LC カラムの飽和点を測定する 1 つの方法です。ポアサイズが異なる PLRP-S 固定相の DBC を評価するために、25、50、75、および 100 ベースのオリゴヌクレオチドを、既知濃度で前処理しました。これらの溶液を、飽和点を越えるまで異なるカラムを通して送り出しました。

DBC は、固定相が分子を結合する能力を示すのに有用であり、精製の目的に最適な固定相を判別するのに便利です。¹

実験方法

試薬および調製

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。

オリゴヌクレオチドは、Integrated DNA Technologies でカスタム仕様で合成されたものを購入しました。

装置構成

Agilent 1260 Infinity II クォータナリ LC システムを次のコンポーネントで構成しました。

- Agilent 1260 Infinity II クォータナリポンプ (G1311B)
- Agilent 1260 Infinity II 高性能オートサンプラ (G1367E)、サンプル冷却器を搭載
- Agilent 1260 Infinity II サーモスタット付カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G4212B)

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 中に最終濃度 1.0 mg/mL で溶解し、溶離液 C として機器上に置きました。

移動相の前処理

- 1 M 酢酸トリエチルアンモニウム (TEAA) の原液は、Milli-Q 水 900 mL 中に 60.0 g の氷酢酸を溶解した液を攪拌しながら 101.2 g のトリエチルアミンを徐々に加えた後、全容を 1 L にすることで調製しました。101.2 g のトリエチルアミンを攪拌した溶液に徐々に加えました。容量は最大 1 L でした。

- 移動相 A は、100 mL の 1 M TEAA 原液と 900 mL の水により調製しました。
- 移動相 B は、100 mL の 1 M TEAA 原液と 900 mL のアセトニトリルにより調製しました。

結合能力の HPLC 条件を表 1 に、オリゴクリーナップのグラジエントプロファイルを表 2 に示します。

シーケンス

- オリゴクリーナップのグラジエント (60分) × 2
- オリゴ結合 (流出まで 100 % C)
- オリゴクリーナップのグラジエント (60分) × 4

メソッド条件

表 1. 結合能力の HPLC 条件

カラム	Agilent PLRP-S、2.1 × 50 mm、5 μm、100、300、1,000、および 4,000 Å
移動相	溶離液 A : 0.1 M TEAA 溶離液 B : 90 % ACN 中の 0.1 M TEAA 溶離液 C : オリゴヌクレオチド溶液
流量	0.21 mL/min
カラム温度	25 °C
検出器	UV、262 nm
注入量	NA
合計分析時間	NA

表 2. オリゴクリーナップのグラジエントプロファイル

時間	%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

結果と考察

PLRP-S 固定相は全多孔質ポリスチレン/ジビニルベンゼン粒子であり、元来疎水性であるため逆相に適しています。ポアサイズ (100、300、1,000、および 4,000 Å) の範囲で使用できますが、市場で一般的に使用されている小さいポアサイズにおいては非常に大きい分子のアクセスが妨げられる場合があります。ポアサイズの小さい粒子は内部表面積が大きい場合でも、分子が大きすぎてポアに適合できない場合、能力は低下します。

より詳細に調査するために、4 種類の異なるオリゴヌクレオチドをカスタム仕様で合成しました (表 3)。このサイズの範囲は、小さい microRNA から大きい gRNA まで多数のオリゴヌクレオチドクラスでは代表的なものです。結合能力の研究で高い安定性を確保できるように、デオキシリボヌクレオチドを選択しました。

最初に、カラムの代わりにバレルコネクタを使用して、デレイボリュウムを測定しました。機器を 100 % 溶離液 A で洗浄してから、100 % 溶離液 C に切り替えました。オリゴヌクレオチド溶液が 262 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ウムとして記録してから、各カラムの分析値から差し引きしました (図 1A ~ 1D)。計測は、フルスケールの 25 % の部分で行いました。

表 3. この研究で使用するオリゴヌクレオチド

25 mer	CATATAAGTTGCGTTACTTCGGCCT
50 mer	CCTAACCGCACCCCTTAGCACGAAGA CAGATTCGTTCTTACCCATACTCCA
75 mer	CCGTTGGCAGGGGGATCGCATGTCC CACGTGAAACATTGCTAAACCCTCA GGTCTCTGAGCGACAAAAGCTTTAA
100 mer	AGGGAAATTCGCGCCATAACTTGGT CCGAATACGGTTCTTGATCGTTC GACTGAGTTTGTTTTATATAAAACG GGCGCAATGTCTGCTTTGATCAAC

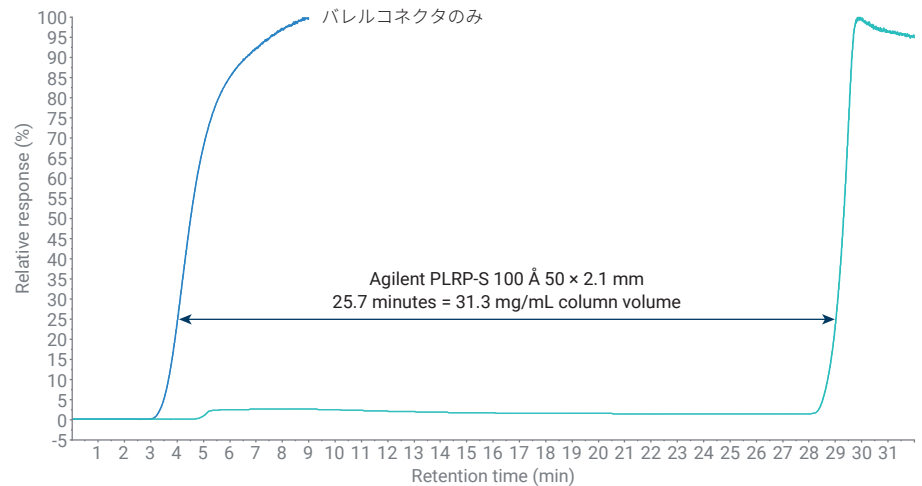


図 1A. Agilent PLRP-S 100 Å カラムによる 50 mer オリゴヌクレオチドの流出

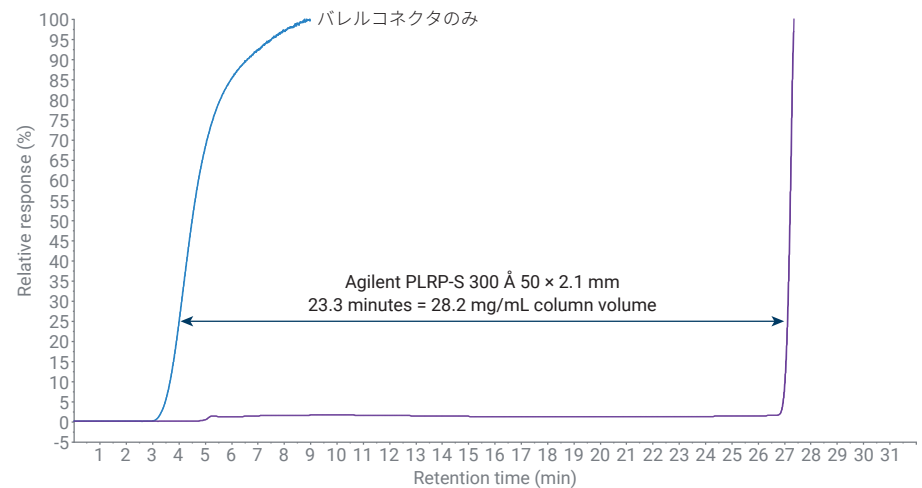


図 1B. Agilent PLRP-S 300 Å カラムによる 50 mer オリゴヌクレオチドの流出

DBC を実行する前に、各カラムをグラジエント 60 分でクリーンアップしました。オリゴヌクレオチド溶液のカラムが飽和したことを検出した際に、結合能力を測定しました。次に、各カラムでクリーンアップグラジエントを 4 回繰り返して十分に洗浄し、残りの結合オリゴヌクレオチドを除去しました。ここで重要なのは、クリーンアップグラジエントの重要性を認識し、グラジエントを急勾配にしすぎないことにより、オリゴヌクレオチドをカラム上に吸着させたままにすることです。図 2 にグラジエントプロファイルを示します。

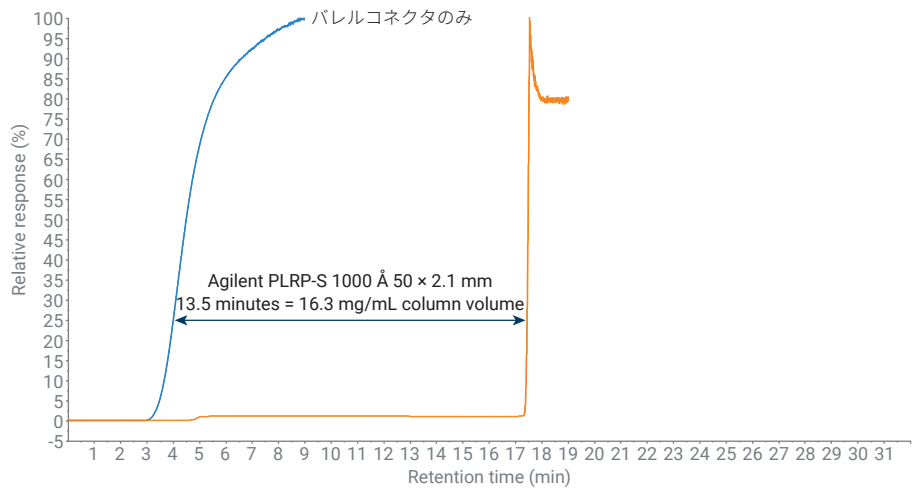


図 1C. Agilent PLRP-S 1000 Å カラムによる 50 mer オリゴヌクレオチドの流出

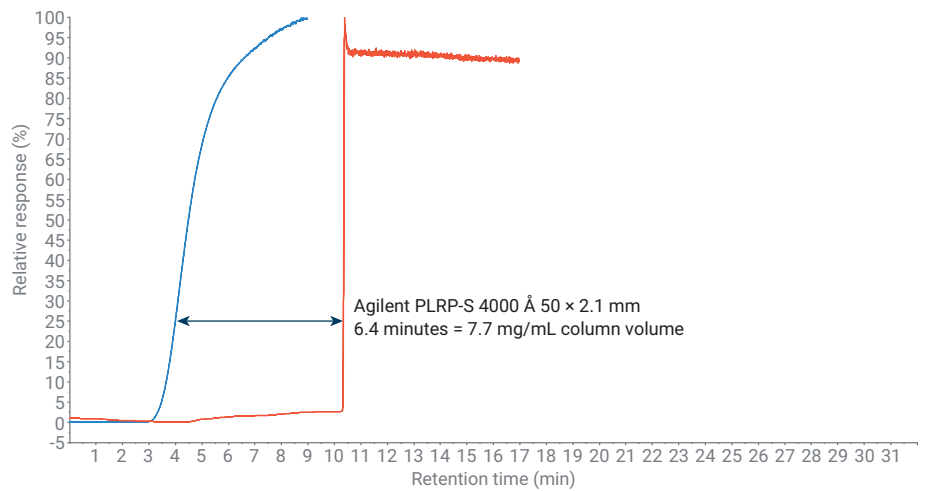


図 1D. Agilent PLRP-S 4000 Å カラムによる 50 mer オリゴヌクレオチドの流出

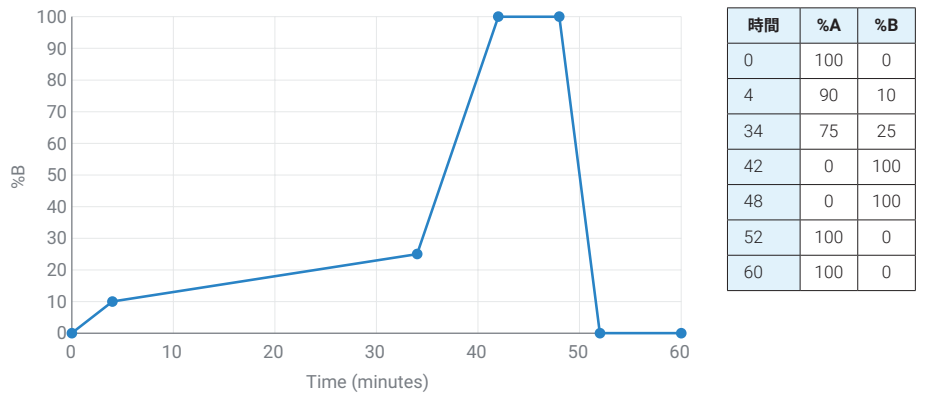


図 2. カラムクリーンアップのグラジエントプロファイル

固定相粒子の内部表面積は、ポアサイズが増大するにつれて減少しています。ポアサイズの小さい PLRP-S 100 Å の DBC が最高になることが予想されます。実際に、最小のオリゴヌクレオチド 25 mer に対して最高になっています (図 3)。大きいオリゴヌクレオチド (50 および 75 mer) については、一部のポアが小さくなりすぎたため、PLRP-S 100 Å の保持容量が減少しています。

PLRP-S 100 および 300 Å カラムの 50 mer オリゴヌクレオチドの DBC 流出曲線を詳細に観察してみると、プロファイルに顕著な変化が見られますが、これはポアへのアクセスが制限されていることが質量移動に影響を与えていることも示しています (図 4)。この種の影響は分析での分離でも見られる場合があります (図 5)、300 Å ポアサイズカラムのピーク幅が狭くなっていることは、質量移動が適切であることを示しています。

最大のポアサイズ 4,000 Å では表面積が最小になるため、DBC が制限されますが、ポアが大きいと質量移動が迅速になり、シャープなピークが得られるため、優れた分解能が実現します。

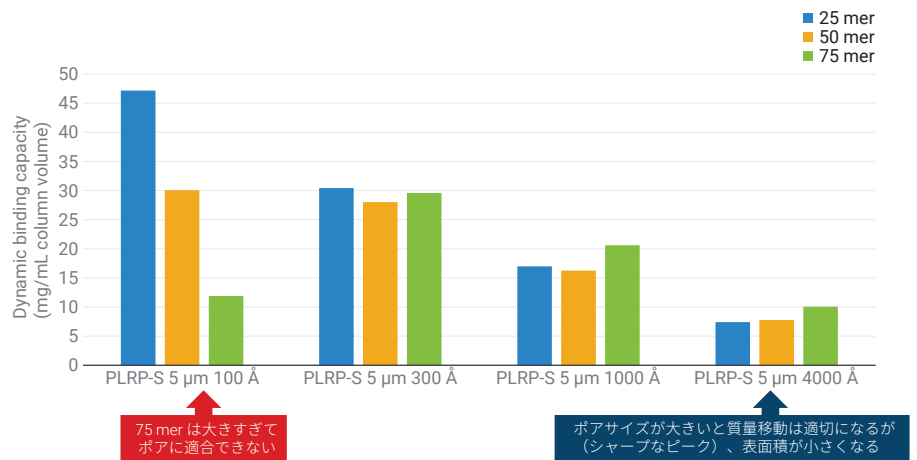


図 3. サイズの異なるオリゴヌクレオチドの結合能力の比較

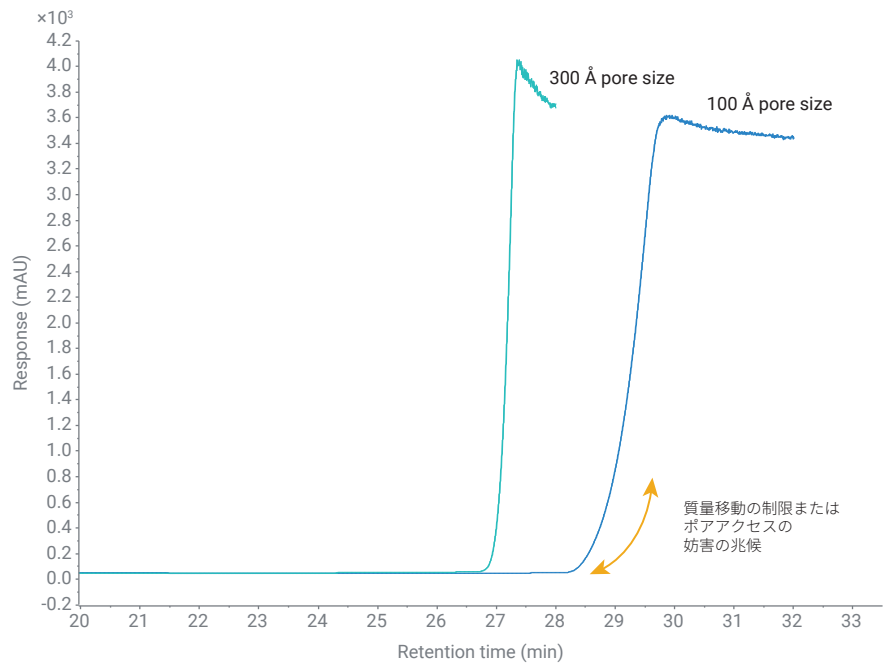


図 4. 300 および 100 Å の 50 mer オリゴヌクレオチド結合能力曲線を拡大した図

図 6 に、4 種類の異なる未処理のオリゴヌクレオチドの分析での分離、および存在する不純物の多くを明確に分離している領域の拡大図を示します。

DBC は、オリゴヌクレオチドの精製における固定相の挙動を示す有用な指標です。また、特定のオリゴヌクレオチドの精製において最適な結果を示す物質を判別する際にも役に立ち、必要なカラムサイズの指標になります。1 回の分析で精製できるオリゴヌクレオチドの最適量を予測することはできませんが、これは存在する不純物およびターゲットの純度によって結果が異なるためです。ただし、最適化とバリデーションを実施する初回注入量として

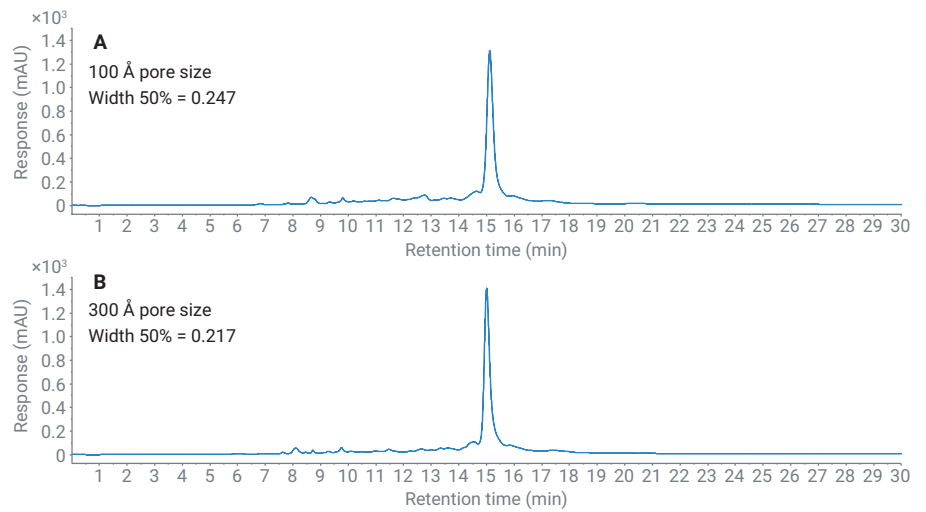


図 5. Agilent PLRP-S 100 および 300 Å カラムでの未処理の 50 mer オリゴヌクレオチドの分析での分離

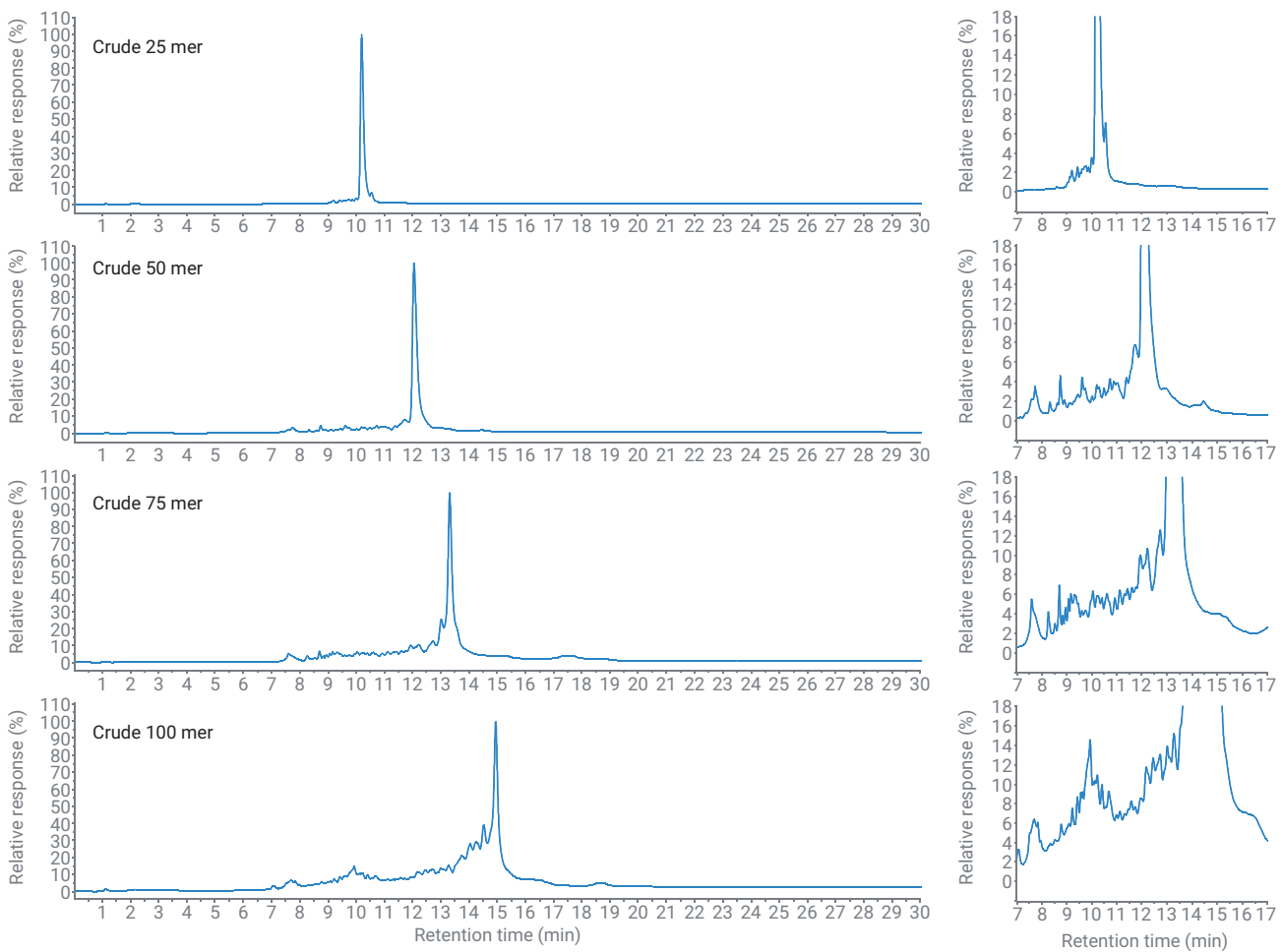


図 6. Agilent PLRP-S 4000 Å カラムを使用した未処理の 25、50、75、および 100 mer の分析での分離 (左) および領域の拡大図 (右)

精製可能なオリゴヌクレオチドの量を推定するために、これらの結果をガイドラインとして使用することは有用です。例えば、保持値としてDBC 5%を使用することにより、異なるカラム径とカラム長さに対して予想されるスケールを比較できます (表 4)。

最終的には、個別の精製ごとにこれらの値を幅広く試験およびバリデーションして、必要な純度を得ることが必要になります。これを最適に実行するには、精製において同じグレードの固定相が充填された分析カラムを使用します。

結論

PLRP-S ポリマー物質は、イオンペアの逆相オリゴヌクレオチド精製に最適です。これらの物質は物理的にも化学的にも堅牢であるため、求められる条件に適しています。結合能力およびオリゴヌクレオチドの精製全体を最適化するためには、オリゴヌクレオチドの長さに合った適切なポアサイズを選択することが重要です。

参考文献

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

表 4. カラム内径別の推定保持容量

内径 (mm)	容量 (mL)	カラム長さ 50 mm あたりの保持量 (mg) (能力 5% がベース)											
		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

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

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いません。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。

DE92315149

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, January 28, 2022

5994-4526JAJP