

Gilson GX-271 寡核苷酸纯化色谱系统： 使用自动 HPLC 简化分析级寡核苷酸的制备工作



APPLICATION NOTE

MC GSA746CN

优势

定制化的寡核苷酸需要在合成后进行额外纯化步骤将全长产品从诸如序列碎片，碱基保护基团和其他杂质中分离出来。高效纯化不同长度和规模的寡核苷酸序列，对生产提出了挑战。

收益

GX-271 寡核苷酸纯化色谱系统，具有自动化制备和分析 HPLC 能力；可在单次运行中完成试剂级寡核苷酸的分离、分析和脱盐。无需停机就可以添加分析排样对收集馏分进行分析。内置的错误处理条件可帮助在各个阶段防止样品损失，并确保完全无人值守。

LAINE STEWART, LUKE ROENNEBURG, AND KAREN KLEMAN | GILSON, INC., MIDDLETON, WI

翻译编辑 | GILSON CNSST

摘要

在分子生物学应用的寡核苷酸必须具有高纯度，但大量高效地纯化这些寡核苷酸样品是一个挑战。Gilson GX-271 寡核苷酸纯化色谱系统为分离、分析和脱盐寡核苷酸提供了一个灵活的连续解决方案。

引言

寡核苷酸是 qPCR、高通量测序(NGS)和微阵列分析等诸多分子生物学技术的重要组成，也能应用于治疗中。¹ 这些定制的化合物在应用于治疗之前，需要在大规模合成后进行额外的纯化步骤。全长序列需要和序列碎片分离，除去盐和碱基保护基团。高效纯化不同长度和规模的寡核苷酸序列，对生产提出了挑战。

为了克服这些挑战，Gilson 研发了具有自动制备和分析 HPLC 能力的液样平台，可一次性完成分离、分析、脱盐并连续制备试剂级寡核苷酸。

“...一次性完成试剂级寡核苷酸分离、分析和脱盐的单一液样处理平台。”



图 1
Gilson GX-271 寡核苷酸纯化平台

材料和方法

所有使用的溶剂均为色谱级 (HPLC grade)。Gilson TRILUTION® LC 软件控制整个纯化过程的仪器运行。

寡核苷酸粗合成物进样至离子交换型制备色谱柱。收集馏分中的少量样品通过再进样进行识别确认。经过确认的馏分通过排阻脱盐柱进行脱盐。

样品和试剂:

寡核苷酸粗合成物为实验室合成。

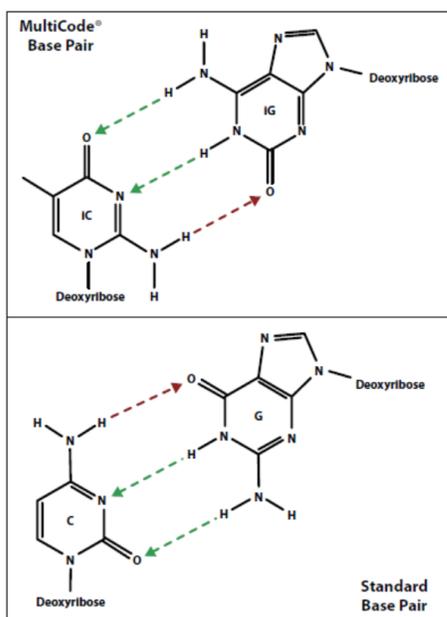


图 2

Luminex MultiCode® 技术

仪器

制备	
液样工作站	配备两组 GX 直接进样阀的 GX-271 液样处理平台
流动相	322 HPLC 输液泵-H2 泵头
检测器	159 UV/VIS 检测器 0.5mm 检测池
切换阀	VALVEMATE® II 切换阀

分析	
液样工作站	配备两组 GX 直接进样阀的 GX-271 液样处理平台
流动相	322 HPLC 输液泵-H2 泵头
检测器	159 UV/VIS 检测器 10mm 检测池
切换阀	VALVEMATE® II 切换阀

脱盐	
液样工作站	配备两组 GX 直接进样阀的 GX-271 液样处理平台
流动相	322 HPLC 输液泵-H2 泵头
检测器	VERITY® 1810 电导和 pH 检测器 159 UV/VIS 检测器 0.5mm 检测池
切换阀	VALVEMATE® II 切换阀

液相色谱方法

脱盐	
色谱柱	Tosoh SuperQ Column, 10 x 200 mm
流动相	A = 20% ACN, NaPO ₄ , pH8.5 B = A + 1M NaBr
梯度	0–9.95 min: 100% A 9.95–19.9 min: 100% A to 100% B 19.9–20 min: 10% A/90% B 20–119.90 min: 10% A/90% B to 35% A/65% B 119.9–120 min: 35% A/65% B 120–130 min: 35% A/65%B to 100% B 130–140 min: 100% B 140–141 min: 100% B to 100% A 141–155 min: 100% A
流速	5 mL/min
进样体积	多个; 运行时设置
馏分收集	根据峰高条件收集; 多个; 运行时设置

分析	
色谱柱	Dionex DNAPac PA-200
流动相	A = 20% ACN, NaPO ₄ , pH11 B = A + 1M NaBr
梯度	0–2.90 min: 15% A/85% B 2.9–13 min: 15% A/85% B to 50% A/50% B 13–13.1 min: 50% A/50% B 13.1–14 min: 50% A/50% B to 100% B 14–16 min: 100% B 16–16.95 min: 100% B to 15% A/85% B 16.95–25 min: 15% A/85% B
流速	1 mL/min
进样体积	多个; 运行时设置

结果和讨论

GX-271 寡核苷酸纯化色谱系统搭载了分析和进样阀，通过切换阀选择对应步骤所需的色谱柱，可以控制不同的进样体积。为了更好地展示这套系统的能力，我们将对一个样品的纯化展开介绍。寡核苷酸粗合成物（8-40 mers）首先进样至反相制备或者离子交换 HPLC 柱，通过条件馏分收集命令收集到所需的馏分。在这一步，满足方法所设条件 Abs260 斜率的馏分被自动收集。如图 3 所示。

...TRILUTION® LC 软件帮助无缝切换分析和制备方法，无需人工介入。

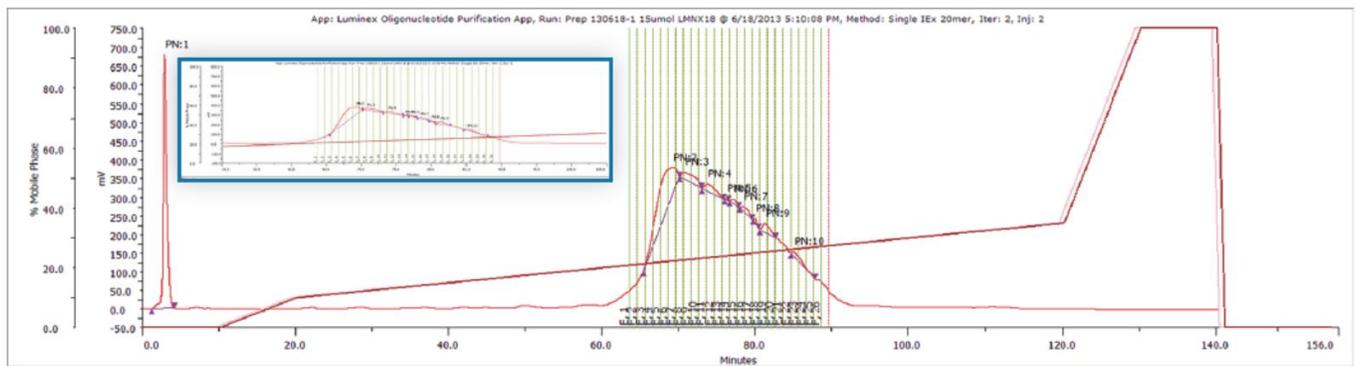


图 3
中试级纯化 20 mer 的寡核苷酸

仪器接着将试管中的馏分取出少量样品并直接进样至反相或离子交换分析柱进行寡核苷酸尺寸和纯度的确认（图 4）。在最终纯化步骤，系统自动将通过尺寸和纯度验证的馏分进样至尺寸排阻脱盐柱，达成 > 90% 的寡核苷酸纯度。除盐的效率通过在线 UV 和电导检测器进行确认。

模块化和 TRILUTION LC 软件的灵活性可以完成无缝的制备和分析方法切换，无需人工介入。在运行时可自动插入分析样品列表添加样品，仪器无停机时间。此外，内置的错误处理条件可帮助在各个阶段防止样品损失，并确保完全无人值守。在出现错误时，系统可以完全停止或者执行样品回收方法。

GX-271 寡核苷酸纯化色谱系统的灵活性使得在单一平台完成连续的进样、收集、再进样、馏分集中和脱盐工作，大量制备经过纯化的用于可应用于分子生物学的寡核苷酸终产品。

GX-271 寡核苷酸纯化色谱系统使用 VERITY® 1810 电导和 pH 检测器监测缓冲盐浓度。这套先进的仪器可以在一个大动态范围内快速响应地对生物类纯化的缓冲盐浓度进行监测，同时具备 pH 监测能力。图 5 展示了通过 VERITY 1810 电导和 pH 检测器收集的磷酸盐缓冲溶液的梯度数据。

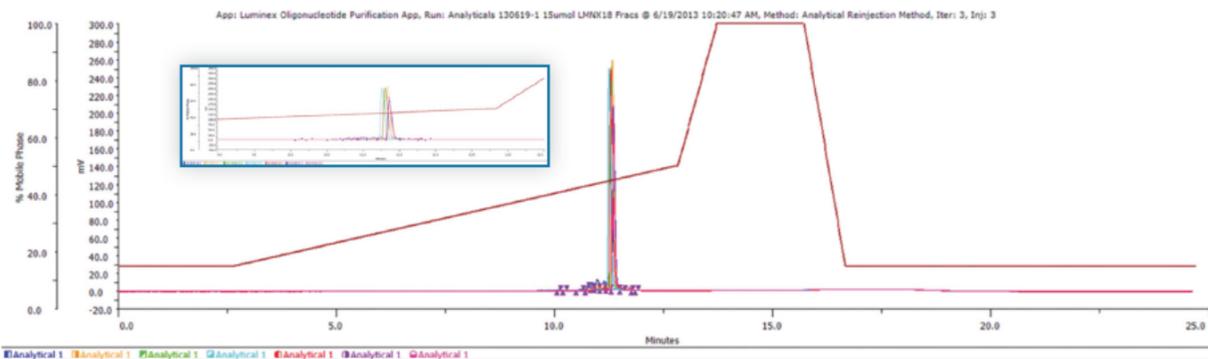


图 4
分析验证 20 mer 的寡核苷酸

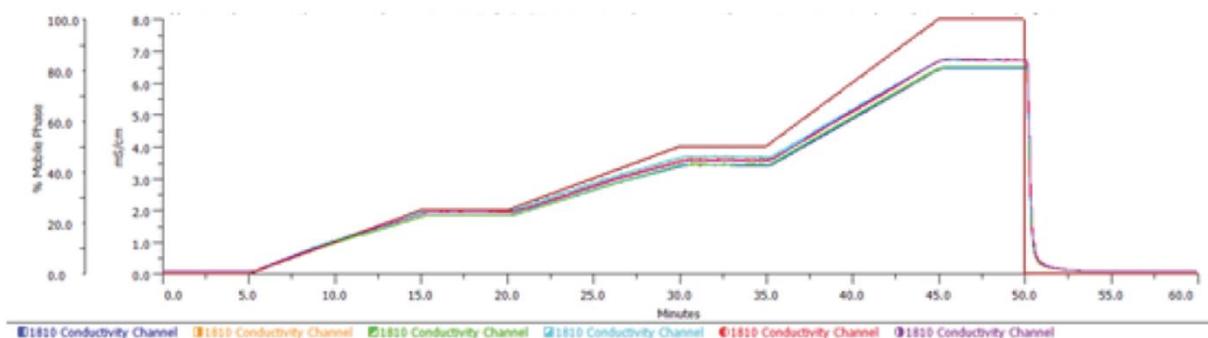


图 5
通过 VERITY 1810 电导和 pH 检测器收集的磷酸盐缓冲溶液的梯度数据

参考

1. Bonilla, Jose V., and G. Susan Srivasta, eds. Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products. CRC Press, 2011.

致谢

寡核苷酸纯化工作由 Luminex; Madison, WI 完成。VERITY 1810 电导和 pH 监测工作由 Gilson, Inc.; Middleton, WI 公司完成。

结论

以不同滴进样体积（最大至 1.5 L）在不同的色谱柱上纯化不同的寡核苷酸（8-40 mers）的挑战被 Gilson 仪器的模块化和 TRILUTION® LC 软件的灵活性完成。

GX-271 寡核苷酸纯化色谱系统和 TRILUTION LC 软件可以允许在硬件和色谱柱之间轻松切换，

以此在一套系统上完成制备 HPLC、分析性 HPLC 和大规模脱盐工作。

在运行时在线馏分分析可以无需仪器停机进行样品添加。

内置的错误处理条件可帮助在各个阶段防止样品损失，并确保完全无人值守。

在同一自动平台完成连续的进样、收集、再进样、馏分集中和脱盐工作，提升了制备用于分子生物学的寡核苷酸终产品的生产效率。

注册商标

所有产品和公司名称均为各自持有人的商标™或注册商标®。本文使用的商标不表示对与任何商标持有人的关联或背书。

注意：

本应用是根据出版时可用的信息制作和编辑的。本应用如有修订，恕不另行通知。