

イオン交換カラムによるオリゴヌクレオチド分析時のポイント

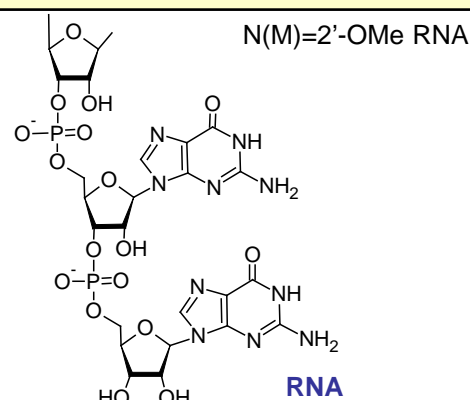
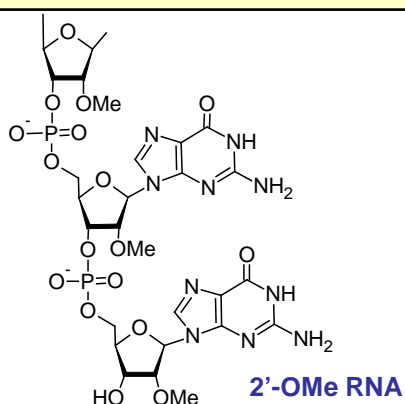
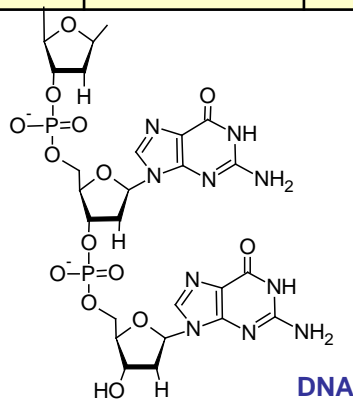
P180316A

化学合成で製造可能なオリゴヌクレオチドを薬効本体とする核酸医薬品の可能性が再認識され、研究開発が活発化しています。その中で、核酸医薬品合成後の類縁体の分析や分離精製が重要な課題となっています。

本データシートではノンポーラスタイプのイオン交換カラムBioPro IEX QFを用いたオリゴヌクレオチドの分析時のポイントを紹介します。

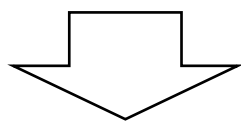
サンプル

1	一本鎖DNA	5'-TCATCACA CTGAATACCAAT-3' (DNA 20 mer)
2		5'-GTCATCACA CTGAATACCAAT-3' (DNA 21 mer)
3	一本鎖RNA	5'-U(M)C(M)A(M)U(M)C(M)A(M)C(M)A(M)C(M)U(M)G(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)A(M)U(M)-3' (2'-OMe RNA 20 mer)
4		5'-G(M)U(M)C(M)A(M)U(M)C(M)A(M)C(M)A(M)C(M)U(M)G(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)C(M)A(M)A(M)U(M)-3' (2'-OMe RNA 21 mer)
5		5'-UCAUCACACUGAAUACCAAU-3' (RNA 20 mer)
6		5'-GUCAUCACACUGAAUACCAAU-3' (RNA 21 mer)

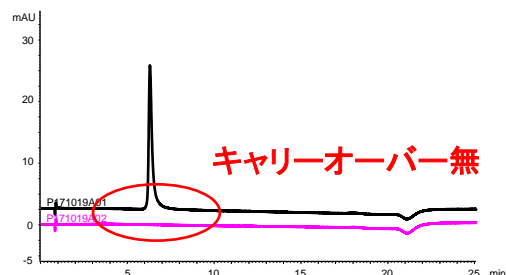
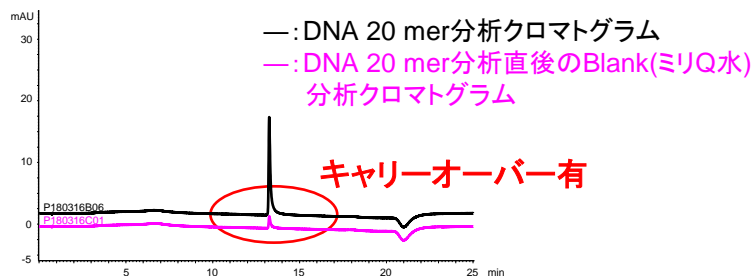


キャリアオーバーの改善

A) 20 mM Tris-HCl (pH8.1)
B) 20 mM Tris-HCl (pH8.1) containing 1.0 M NaCl
5-70%B (0-15 min), 74%B (15-18 min), 5%B (18-33 min)
グラジエント初期: 50 mM NaCl



A) 20 mM Tris-HCl (pH8.1)
B) 20 mM Tris-HCl (pH8.1) containing 1.0 M NaCl
40-70%B (0-15 min), 74%B (15-18 min), 40%B (18-33 min)
グラジエント初期: 400 mM NaCl

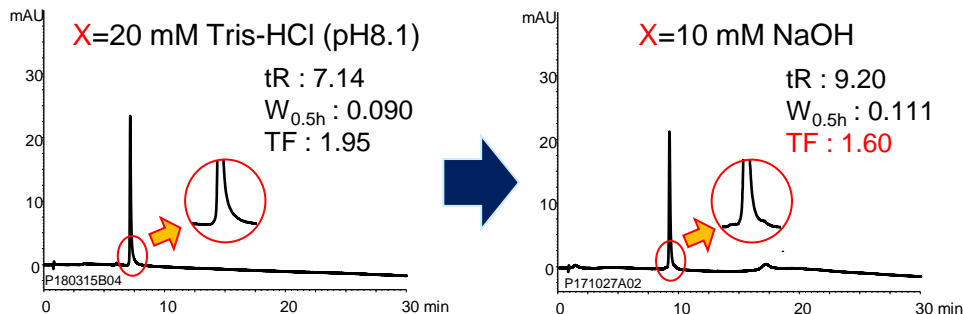


Column : BioPro IEX QF
5 μm, 100 X 4.6 mm I.D.
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 25°C
Detection : UV at 260 nm
Injection : 2 μL (10 nmol/mL)

グラジエント初期のNaCl濃度が低い場合はキャリアオーバーが認められますが、グラジエント初期のNaCl濃度を高く (300-400 mM NaClなど) することで、キャリアオーバーのない再現性の良いクロマトグラムが得られます。

テイリングの改善

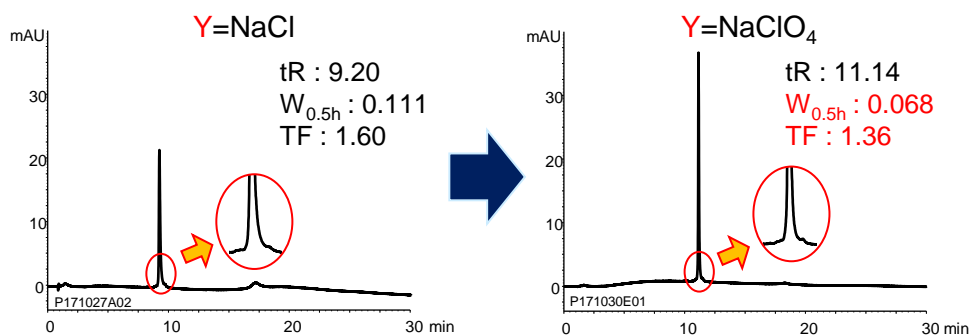
① 緩衝液の種類の影響



Column : BioPro IEX QF
 5 μm, 100 X 4.6 mmI.D.
 Flow rate : 1.0 mL/min
 Temperature : 25°C
 Detection : UV at 260 nm
 Injection : 2 μL (10 nmol/mL)
 Sample : RNA 20 mer

Eluent : A) X
 B) X containing 2.0 M NaCl
 15-100%B (0-30 min)

② 塩の種類の影響



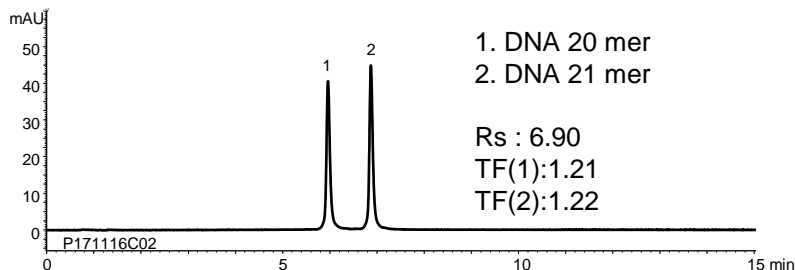
Eluent : A) 10 mM NaOH
 B) 10 mM NaOH containing 2.0 M Y
 15-100%B (0-30 min) for NaCl
 5-50%B (0-30 min) for NaClO₄

イオン交換において、NaClO₄を用いる場合は溶出力がNaClの2-3倍大きくなるため、移動相条件のグラジエント比率を調整しています。

緩衝液は、20 mM Tris-HCl (pH8.1)より10 mM NaOHにて、オリゴヌクレオチドのピーク形状が良好です。また、カウンターイオンとして使用する塩は、NaCl よりNaClO₄を用いる方がピークテイリングが抑えられています。
 →オリゴヌクレオチド分析で良好なピーク形状を得るためには、緩衝液の種類、塩の種類を最適化することが有効です。

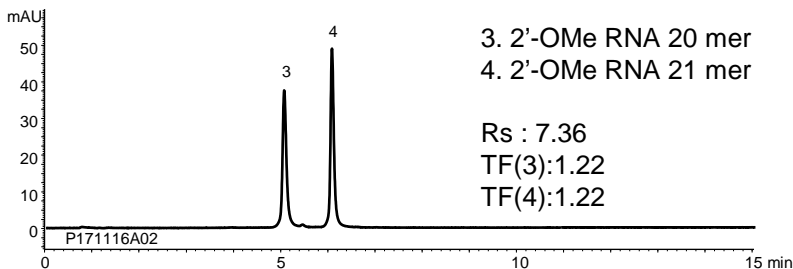
最適化条件での分析

一本鎖 DNA



Column : BioPro IEX QF
 5 μm, 100 X 4.6 mmI.D.
 Eluent : A) 10 mM NaOH
 B) 10 mM NaOH containing 1.0 M NaClO₄
 25-55%B (0-15 min), 100%B (15-20 min)
 Flow rate : 1.0 mL/min
 Temperature : 25°C
 Detection : UV at 260 nm
 Injection : 4 μL (各5 nmol/mL)

一本鎖 2'-OMe RNA



オリゴヌクレオチドの分析について、ノンポーラスタイプのイオン交換カラムであるBioPro IEX QF を用いて、移動相の緩衝液の種類、塩の種類、グラジエント条件を最適化することにより、キャリアオーバー、テイリングなく溶出する分析条件を見出すことができました。

一本鎖 RNA

