



使用疏水相互作用层析填料纯化 DMT-on 寡核苷酸的简单有效方法

简介

合成寡核苷酸疗法在致命性疾病治疗方面具有显著疗效，因此在治疗方面的实际应用也在持续增长。在生物制药工业中，随着寡核苷酸药物产品管线的显著增加，对此类高价值药物纯化技术的需求也在增加。

二甲氧三苯甲基 (DMT) 是一种强疏水性的 5' 保护基团，可用于寡核苷酸的合成，以暂时掩盖 5'-羟基官能团的化学特性。在许多精细寡核苷酸的制备过程中，DMT 可在合成后保留在寡核苷酸上，以便随后的过程中给与分子稳定性。

本文中，我们将介绍一种全新、有效且高回收率的纯化 DMT-on 寡核苷酸的方法。只需单一纯化步骤，不仅能够实现 DMT-on 寡核苷酸的纯化，还能够有效去除寡核苷酸中的 DMT-基团。DMT-on 基团具有极强的疏水性，因此，可以使用疏水相互作用色谱 (HIC) 进行纯化。

材料和方法

寡核苷酸: 5'-GAA TTC ATC GGT TCA GAG AC-3'，一种单链 DNA 寡核苷酸，长度 20-mer，分子量为 6.141 kDa。~55% 的纯度 (AEX-HPLC) (由 Trilink 提供)。

盐: 本研究中，使用了从 MilliporeSigma 购买的 3 种不同的盐：氯化钠 (NaCl)、硫酸钠 (Na₂SO₄) 和硫酸铵 ((NH₄)₂SO₄)。

HIC 填料: 本研究中，共筛选了四种 TOYOPEARL HIC 填料：PPG-600M、Phenyl-650M、Butyl-650M 及 Hexyl-650C。

操作方法: 相关操作条件，请参阅色谱图。

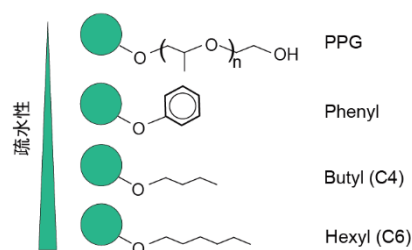
结果和讨论

填料选择

疏水相互作用层析法是生物大分子纯化的有力工具。该技术主要利用位于分子表面的可及疏水区域与弱疏水性固定相的相互作用。使用水溶性高盐流动相，将具有疏水性表面的蛋白质及其他分子吸附到 HIC 填料的疏水性配体 (官能团) 上。盐条件有助于产生溶致效应，促进蛋白质与疏水性配体结合。然后，通过降低盐浓度将分子洗脱。大多数治疗性目标物都会在低盐或无盐缓冲溶液中洗脱出来。HIC 分离时采用的是温和洗脱条件，因此通常会保留目标分子的生物学活性。

为了确定能够为寡核苷酸的纯化提供最佳纯度、回收率和产率的配体，我们选择了四种 TOYOPEARL HIC 填料进行测试：PPG-600M、Phenyl-650M、Butyl-650M 及 Hexyl-650C。这些固定相按疏水性从小到大大进行排列，如图 1 所示。这些 HIC 填料的骨架均属于聚甲基丙烯酸聚合物基质，区别在于配体具有不同的疏水性和选择性。

图 1. TOYOPEARL HIC 填料的疏水性

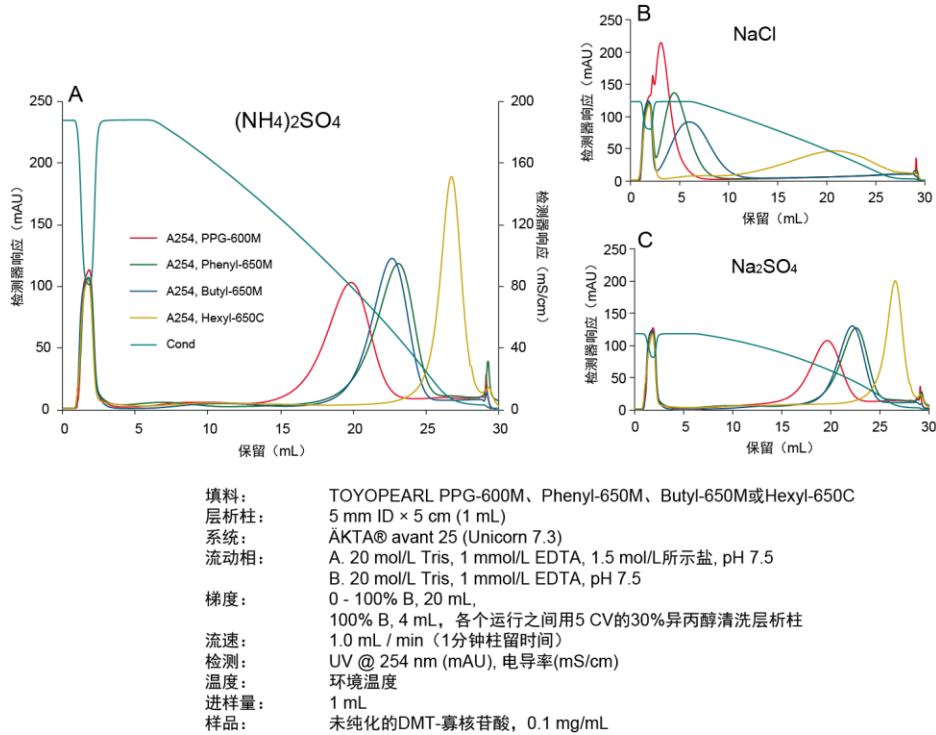


不同盐条件对寡核苷酸纯化的影响

开始筛选评估 HIC 填料之前，使用不同的盐来确定寡核苷酸的耐盐极限。为此，我们在样品中添加了不同浓度的盐进行测试，以验证发生沉淀时的盐浓度：0.5 mol/L、1.0 mol/L 及 1.5 mol/L。实验结果 (数据未列出) 表明，在 1.5 mol/L 盐浓度下，寡核苷酸与所有 HIC 填料都能够牢固结合，样品没有沉淀。因此，我们选择了 1.5 mol/L 的盐浓度用于后续研究。

本研究中，我们筛选了 3 种不同的盐：氯化钠 (NaCl)、硫酸钠 (Na₂SO₄) 和硫酸铵 ((NH₄)₂SO₄)。图 2，图 A 和图 C 显示，(NH₄)₂SO₄ 和 Na₂SO₄ 具有非常相似的寡核苷酸峰 (分离选择性相似)。实际上，所有 HIC 树脂均具有相似的洗脱曲线，且所有选定的树脂均能够有效区分 DMT-off (流穿峰) 与 DMT-on 寡核苷酸。另外，数据还显示，与 TOYOPEARL PPG-600M 填料相比，TOYOPEARL Phenyl-650M 和 Butyl 650M 与寡核苷酸的结合更加牢固。TOYOPEARL Hexyl-650C 具有的结合力最强，寡核苷酸峰洗脱时的保留时间也最长。同时，也可以发现 NaCl (图 2，图 B) 没有为寡核苷酸与填料之间提供强结合力，导致在盐梯度初期时早早就被洗脱。

图 2. 不同盐条件对 HIC 填料纯化寡核苷酸的影响



我们知道钠和铵的硫酸盐在促进配体-寡核苷酸相互作用方面最有效，而且对样品结构几乎没有破坏作用。硫酸铵在梯度条件下使用时具有更线性的电导率响应（比较图 2，图 A 与图 C），因此后续研究中我们选择使用硫酸铵。

HIC 填料对寡核苷酸纯化的影响

初步筛选填料后，选择 TOYOPEARL PPG-600M、Phenyl-650M 和 Butyl-650M，使用 DMT-off 和 DMT-on 寡核苷酸样品进行纯化。选择这些填料是因为它们在相似的梯度条件下能够产生相似的峰洗脱曲线（图 3）。与 TOYOPEARL Phenyl-650M 和 Butyl-650M 相比，TOYOPEARL PPG-600M 洗脱 DMT-on 寡核苷酸的保留时间更短。放大图显示，DMT-off 寡核苷酸与三种填料均未结合，而 DMT-on 寡核苷酸与三种填料均结合，当在盐浓度降低时被洗脱。TOYOPEARL PPG-600M 结合 DMT-on 寡核苷酸的牢固程度不如其他两种填料强。TOYOPEARL Phenyl-650M 和 Butyl-650M 能够在 DMT-off 和 DMT-on 寡核苷酸峰之间实现高分辨率和基线分离。

图 3. 不同 TOYOPEARL HIC 填料纯化寡核苷酸对比谱图

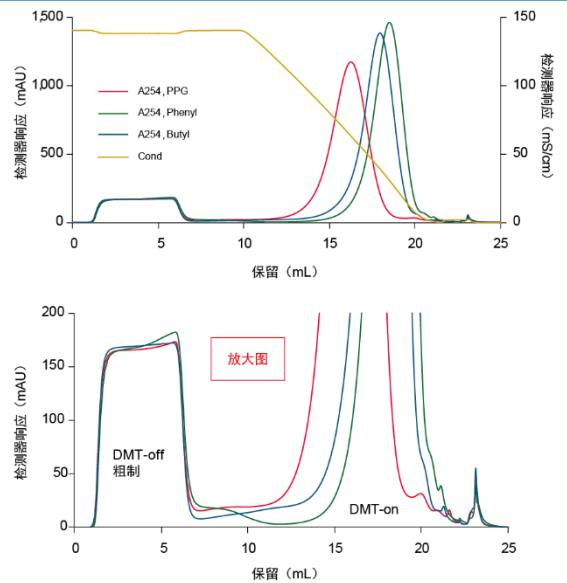


表 1 显示, 经反相 HPLC (RP-HPLC) 测定, TOYOPEARL PPG-600M、Phenyl-650M 和 Butyl-650M 在 DMT-on 寡核苷酸的纯度 (99%) 和回收率 (89%) 方面具有相似的纯化效果。

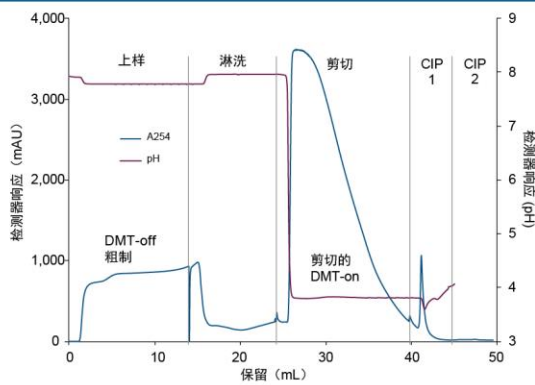
表 1. TOYOPEARL HIC 填料纯化寡核苷酸的纯度和回收率总结

组分	收集体积 (mL)	平均电导率 (mS/cm)	纯度 (% DMT-on)	回收率 (% DMT-on)
初始样品			77.9	
PPG 洗脱	4.9	68.0	98.7	89.1
Butyl 洗脱	4.5	45.9	99.0	89.0
Phenyl 洗脱	4.2	36.8	99.0	88.9

一步清除 DMT-on 保护基

为了从寡核苷酸中清除 DMT-基团, 我们选择了 TOYOPEARL Phenyl-650M 作为筛选后的 TOYOPEARL HIC 填料代表作进一步研究。图 4 表明, 直接在柱上成功地从寡核苷酸中清除了 (剪切) DMT-基团。DMT 在 pH 约为 4 的条件下被酸化裂解。随后, 成功洗脱 DMT-off 寡核苷酸, 当对柱子进行在线清洗时 DMT 基团也将会被洗脱。

图 4. 在线剪切 DMT-基团

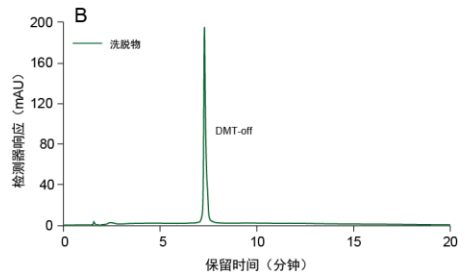
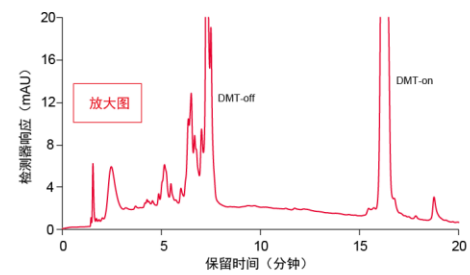
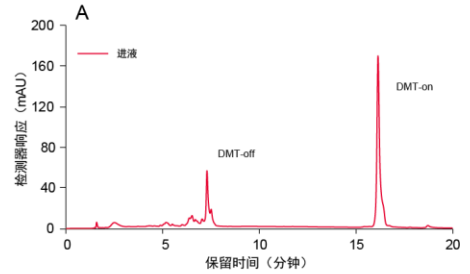


填料: TOYOPEARL Phenyl-650M
 色谱柱: 6.6 mm ID × 3.0 cm (1 mL)
 流速: 0.25 mL/min (4分钟保留时间)
 检测: UV @ 254 nm (mAU), pH
 温度: 环境温度

步骤	体积 (mL)	缓冲溶液
平衡	10	10 mmol/L NaOH, 1.0 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄
上样	14	DMT-寡核苷酸, 0.5 mg/mL (7 mg)
淋洗	10	10 mmol/L NaOH, 1.0 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄
剪切	15	50 mmol/L 乙酸, 1.0 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄
CIP 1	5	水
CIP 2	5	30% (v/v) 2-丙醇

图 5 显示使用 TSKgel OligoDNA-RP 色谱柱针对粗制寡核苷酸样品 (图 A) 和在线剪切的 DMT-基团寡核苷酸片段 (出自图 4 收集组分 (图 B)) 的分析情况。数据证实, DMT-基团已从寡核苷酸中被有效去除, 在线 DMT 剪切可获得 99% 以上纯度的 DMT-off 寡核苷酸, 回收率高达 99%。

图 5. 在线剪切的 DMT-基团寡核苷酸的分析



色谱柱: TSKgel OligoDNA-RP, 4.6 mm ID × 15 cm
 流动相: A. 100 mmol/L TEAA, pH 7.0
 B. 乙腈
 梯度: 5 - 35% B, 20 min
 温度: 45 °C
 流速: 1.25 mL/min
 检测: UV @ 254 nm (mAU)
 进样量: 10 µL

结论

TOYOPEARL PPG-600M、Phenyl-650M 和 Butyl-650M 疏水相互作用层析填料能够有效分离粗制品中的 DMT-on 和 DMT-off 寡核苷酸。在低 pH 值条件下, 使用在柱剪切能够有效去除 DMT-基团并洗脱出 DMT-off 寡核苷酸。采用在线剪切法可获得高纯度和高回收率。