



## SEC-MALS（尺寸排阻色谱与多角光散射联用）测定寡核苷酸分子量

在过去几年中，寡核苷酸在治疗领域已取得显著进展，寡核苷酸也越来越被公认为多种疾病的潜在治疗药物。本文将着重介绍超高效尺寸排阻色谱（SEC）法在区分 N 及 N-1 寡核苷酸方面展现出的卓越性能。

### 简介

寡核苷酸疗法已在很多疾病适应症的临床治疗方面取得了快速进展。近几年，已有多种寡核苷酸药物，如短干扰 RNA（siRNA）和反义寡核苷酸（ASO）药物获得了 FDA 上市批准，更有多种 microRNA（miRNA）和适体作为治疗平台正在开发。CRISPR-Cas 系统的应用前景十分良好，但也需要特定 RNA 部分（引导 RNA）来募集和引导 Cas 核酸酶的活性。

治疗性寡核苷酸是由固相化学合成工艺生产。尽管在寡核苷酸合成及最彻底的后合成清理工艺已经取得了不错的进展，但在链分布方面的异质性仍将存在，这种分布的监控是工艺及质量控制一个基础指标。对该指标的评估，通常是采用毛细管电泳或阴离子交换色谱法。这里，我们展示了尺寸排阻色谱法在分辨长度相差一个碱基的不同寡核苷酸样品的能力。实验采用了 TSKgel® UP-SW2000 色谱柱与 UHPLC 及 UHPLC-MALS 系统。

### 寡核苷酸的 SEC 分析

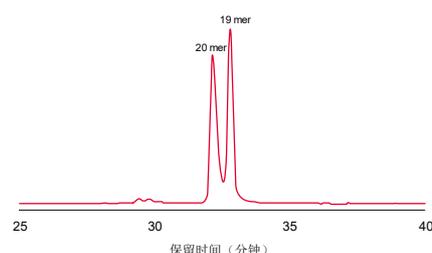
TSKgel UP-SW2000 是我们新开发的 2 μm、12.5 nm 孔径的硅基 SEC 色谱柱，设计用于分离小蛋白、肽和寡核苷酸。该柱适用于 UHPLC 系统，也可用于 HPLC 系统，非常适合从传统 HPLC 尺寸排阻色谱法到 UHPLC 系统的方法转移。这里，采用两根 30 cm 柱长的 TSKgel UP-SW2000 色谱柱串联，来分析两种相差一个碱基的寡核苷酸混合物。

### 分析条件：

色谱柱： TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 4.6 mm ID × 30 cm × 2)  
 流动相： 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH 6.7  
 300 mmol/L NaCl, 0.03 % NaN<sub>3</sub>  
 流速： 0.2 mL/min  
 检测： UV @ 260 nm  
 样品： 19-mer (5'-AATTCATCGGTTTCAGAGAC-3') &  
 20-mer (5'-GAATTCATCGGTTTCAGAGAC-3')

图 1 显示 TSKgel UP-SW2000 色谱柱可用于分离 20-mer 及其 N-1 19-mer。

图 1. N 及 N-1 寡核苷酸的分离



### 寡核苷酸的 SEC-MALS 分析

使用 Tosoh Bioscience 多角度光散射检测仪 LenS<sub>3</sub>™ 通过 SEC-MALS 法分析未纯化及纯化后的寡核苷酸样品。

### 材料与方法：

色谱柱： TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 4.6 mm ID × 30 cm)  
 设备： Thermo Fisher Ultimate® 3000 UHPLC 系统 (配备 LenS<sub>3</sub> 多角度光散射检测器)  
 流动相： 含 0.5 mol/L NaCl+0.1 mol/L EDTA+0.1 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0.03 % NaN<sub>3</sub> 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.5)  
 流速： 0.3 mL/min  
 检测： UV @ 260 nm  
 进样量： 10 μL  
 样品： MW = 6141 Da 的 20 碱基定制寡核苷酸 (纯化样品 0.3 mg/mL; 未纯化样品 1 mg/mL)

图 2 显示了未纯化和纯化后寡核苷酸样品的色谱对照图。图 3 显示了未纯化的 20-mer 的分子量分布情况。分子量示迹线清楚地表明存在较高和较低分子量的杂质。

图 2. 未纯化及纯化 20-mer 的 UV 色谱对照图

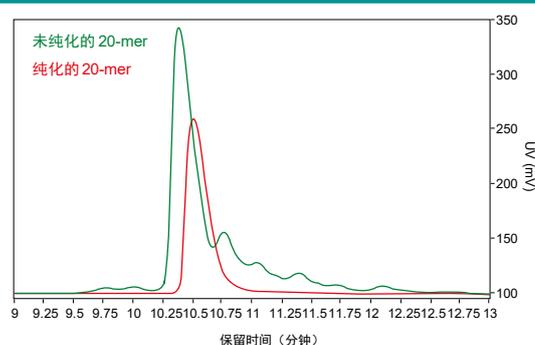
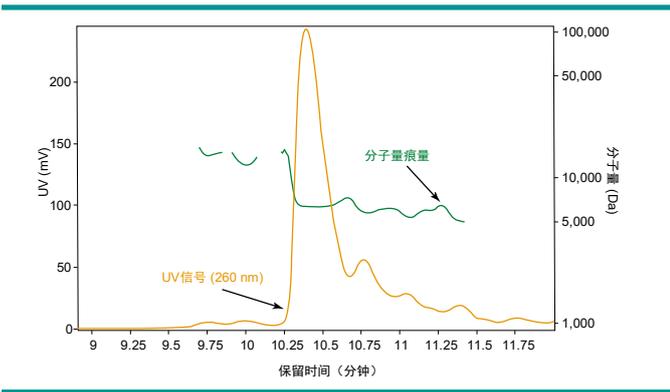


图 3. 未纯化的 20-mer 的分子量分布 (绿色)



利用图 4 中的峰分析 (详情见表 1), 可对产物和杂质进行分子量分析。纯化样品的 MALS 分析结果 (图 5) 证明了 20-mer 寡核苷酸具有极高的纯度。从表 2 可以看出纯化后的 20-mer 的保留时间和计算分子量具有良好的可重复性 (三次进样)。

图 4. 未纯化的 20-mer 的峰分析

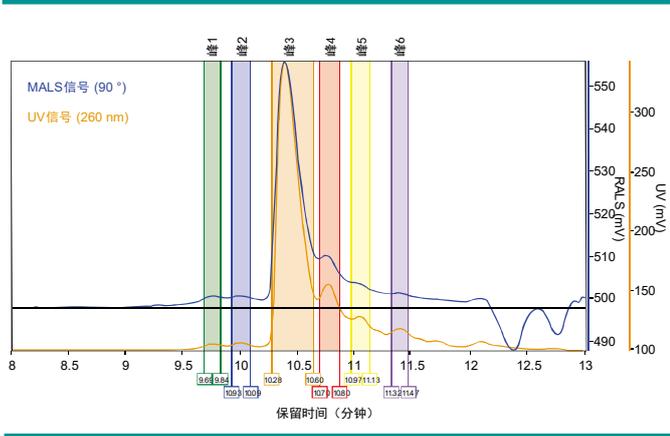


表 1. 保留时间及各峰分子量 (一式三份进样)

峰	保留时间(min)	% RSD	MW (Da)	% RSD
1	9.774	0.1%	13,599	2.1%
2	10.012	0.0%	11,550	1.9%
3	10.398	0.1%	6,398	0.7%
4	10.776	0.1%	5,751	1.5%
5	11.053	0.1%	5,177	2.3%
6	11.422	0.2%	4,446	5.5%

图 5. 纯化的 20-mer 的分子量分布 (绿色)

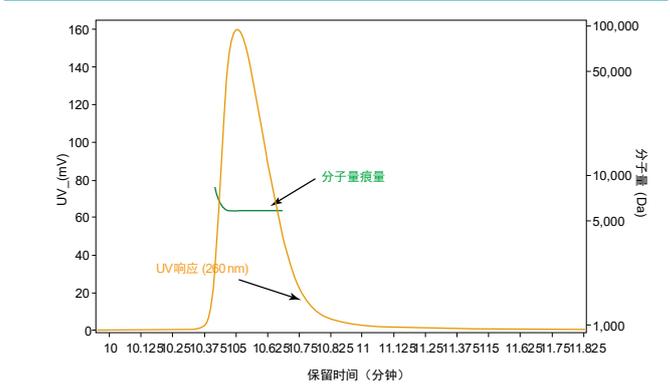


表 2. 纯化后 20-mer 的保留时间及分子量 (一式三份进样)

进样	保留时间 (分钟)	MW (Da)
1	10.431	6,066
2	10.431	6,023
3	10.445	6,038
平均	10.440	6,042
%RSD	0.1%	0.3%

### 结论

TSKgel UP-SW2000 是一款尺寸排阻色谱柱, 设计用于对分子量为 1~150 kDa 的生物分子进行的 UHPLC 分析。其分离范围非常适合分析小蛋白质或多肽及其聚集体。

本应用笔记表明, 该色谱柱也可在 UHPLC 系统上用来分析寡核苷酸。配合使用多角度光散射检测还能获取更多有关寡核苷酸和样品杂质的分子量信息。

TSKgel 和 Tosoh Bioscience 是 Tosoh Corporation 的注册商标。

LenS 是 Tosoh Bioscience LLC 的商标。

UltiMate 是 Dionex Corporation 的注册商标。