



使用AEX填料高效纯化短链寡核苷酸

客户面临的挑战

- ▶ 需要提高寡核苷酸的纯度和回收率。
- ▶ 传统的寡核苷酸纯化方法受限于阴离子交换填料较低的吸附载量。

东曹的解决方案

TSKgel® SuperQ-4PW (20)填料

- ▶ 优化的孔径设计、超高纯度、高回收率。

我们做了什么？

- ▶ 对比了新型TSKgel SuperQ-4PW (20)与既有产品TSKgel SuperQ-5PW (20)对短链寡核苷酸的纯化效果。

结果如何？

- ▶ TSKgel SuperQ-4PW (20)填料在短链寡核苷酸的吸附载量、纯度及回收率方面均表现优异。

TSKgel SuperQ-4PW (20)对于 ≤ 50 -mer的寡核苷酸，可实现高达30%的载量提升与更优的回收率，无需改变现有纯化工艺即可实现更高的产率。

客户获益

提高寡核苷酸的纯度与回收率，进而优化工艺效率。

TOSOH BIOSCIENCE

**SEPARATION
& PURIFICATION**

CONNECTING MINDS.
TOUCHING LIVES.





使用TSKgel® SuperQ-4PW (20)填料高效纯化短链寡核苷酸

合成寡核苷酸的纯化需要兼具高分辨率、高载量和稳定性能的层析填料。TSKgel SuperQ-4PW (20)是一款新开发的阴离子交换填料，是专为高效纯化 ≤ 50 -mer的短链寡核苷酸而优化的产品。其50 nm的孔径为短链寡核苷酸提供了更大的比表面积，从而实现了对这类分子的更高载量。而对于更长链的治疗性核酸的纯化，TSKgel SuperQ-5PW (20)仍是行业的黄金标准——该填料与TSKgel SuperQ-4PW (20)具有相同的配基和粒径大小，但具备100 nm的更大孔径。

实验条件

材料：

本应用笔记中的实验使用了下述填料：

属性	TSKgel SuperQ-5PW (20)	TSKgel SuperQ-4PW (20)
基材	聚甲基丙烯酸酯	
配体	季胺基（强阴离子交换填料）	
平均粒径	20 μm	
平均孔径	100 nm	50 nm

方法：动态吸附载量（DBC）测定

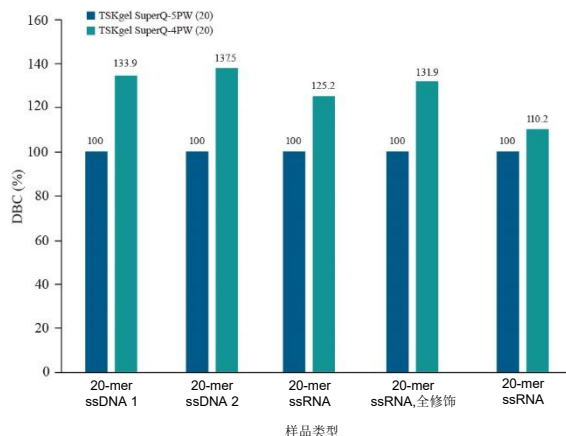
测定了核苷酸长度在20~41-mer范围内的不同序列寡核苷酸的DBC。

首先，通过测定260 nm波长下的紫外吸收值来确定样品的最大吸收值。随后，将样品进样至层析柱，直至柱穿透液中检测到的吸收值达到此前测定的最大吸收值的10%。记录达到10%阈值时所需的进样体积。将进样体积乘以样品浓度，即可确定进样质量。最后以进样质量除以柱体积计算得出DBC值。

结果和讨论：动态吸附载量

在两种受试填料上，对不同寡核苷酸序列的动态吸附载量进行了评估，并以 TSKgel SuperQ-5PW (20)填料的动态吸附载量测定值为基准进行了归一化处理（图1）。

图1 两种AEX填料对不同寡核苷酸的归一化DBC对比



对于20-mer寡核苷酸，TSKgel SuperQ-4PW (20)的动态吸附载量比 TSKgel SuperQ-5PW (20)高25% - 37%；而对于41-mer寡核苷酸，前者的动态吸附载量则比后者高约10%。尽管该填料针对20-mer进行了优化，但在40~50-mer范围内的寡核苷酸上也能观察到吸附载量的提升。

方法：20-mer寡核苷酸的纯化工艺

在使用TSKgel SuperQ-4PW (20)和TSKgel SuperQ-5PW (20)填料的纯化工艺中，采用了一种20-mer单链DNA寡核苷酸来测定纯度和回收率。

工艺条件：

层析柱：0.3 cm ID \times 5.0 cm，柱体积：0.35 mL
 流动相：A: 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5
 B: A + 0.6 mol/L 溴化钠
 流速：85 cm/h
 梯度：0-100% B, 37 CV
 温度：25 $^{\circ}\text{C}$
 样品：20-mer的ssDNA寡核苷酸（未修饰）
 样品浓度：1.0 g/L
 进样量：约80% DBC
 进样：TSKgel SuperQ-5PW (20)填料为25 mg/mL
 TSKgel SuperQ-4PW (20)填料为34 mg/mL

方法：41-mer寡核苷酸的纯化工艺

在使用TSKgel SuperQ-4PW (20)和TSKgel SuperQ-5PW (20)填料的纯化工艺中，采用2'-O-甲基化修饰的41-mer RNA寡核苷酸来测定纯度和回收率。

工艺条件：

层析柱： SkillPak 5 (0.8 cm ID × 10 cm, 柱体积： 5 mL)

流动相： A: 20 mmol/L磷酸钠, pH 7.8

B: A + 1.4 mol/L溴化钠

流速： 120 cm/h

梯度： 0-100% B, 30 CV

温度： 60°C

样品： 2'-O-甲基化修饰的41-mer RNA寡核苷酸

样品浓度： 1.2 g/L

进样量： 约80% DBC

进样： TSKgel SuperQ-5PW (20)填料为32.5 g/L

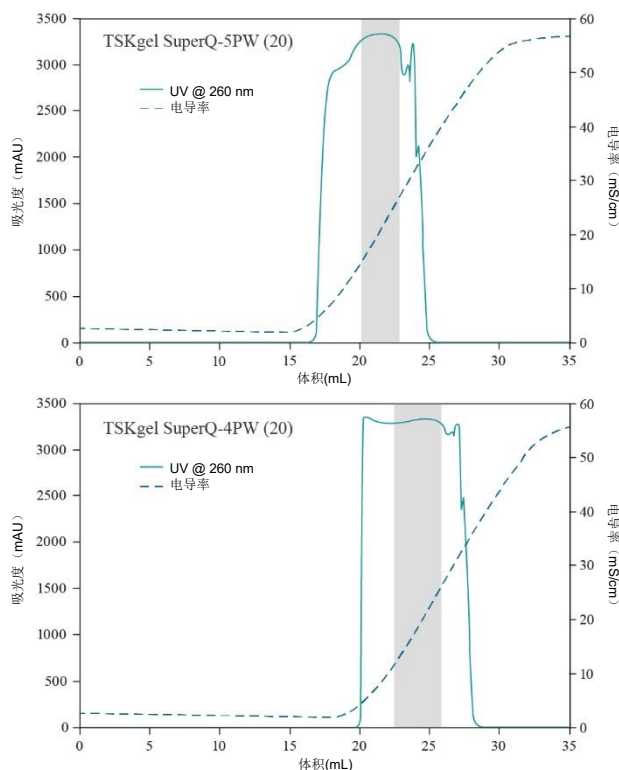
TSKgel SuperQ-4PW (20)填料为35.1 g/L

结果和讨论

TSKgel SuperQ-5PW (20)与TSKgel SuperQ-4PW (20)对20-mer寡核苷酸的纯化效果对比

为了对比TSKgel SuperQ-5PW (20)与TSKgel SuperQ-4PW (20)的纯化纯度和回收率，进行了两次纯化实验。将纯度67%的20-mer ssDNA寡核苷酸粗品，以动态吸附载量80%的上样量进样至两根层析柱。

图2 两款填料纯化20-mer寡核苷酸的谱图



使用TSKgel DNA-NPR色谱柱测定所有组分的纯度。收集纯度高于85%的组分（灰色标注区域）。

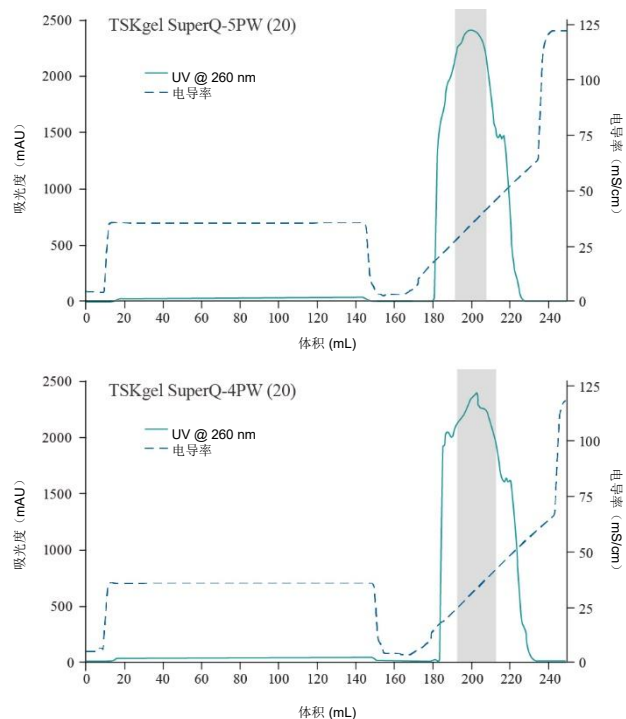
属性	TSKgel SuperQ-5PW (20)	TSKgel SuperQ-4PW (20)
上样量	25 mg/mL填料 (80% DBC)	34 mg/mL填料 (80% DBC)
收集组分 (AEX-HPLC)	94%	94%
FLP回收率	67%	76%

对于20-mer ssDNA寡核苷酸，TSKgel SuperQ-4PW (20)在纯度相同的情况下，回收率比TSKgel SuperQ-5PW (20)高出9%。结合进样量的增加与回收率的提升，最终在保持纯度相同的情况下，产物总量增加了54.2%。

TSKgel SuperQ-5PW (20)与TSKgel SuperQ-4PW (20)对41-mer寡核苷酸的纯化效果对比

采用两种受试填料对纯度为52.5%的2'-O-甲基修饰的41-mer RNA寡核苷酸粗品进行了纯化。进样量为之前测定的总DBC的80%，且两款填料均采用线性梯度洗脱方式。

图3 两款填料纯化41-mer寡核苷酸的谱图



所有纯度 > 85% 的组分均被收集（洗脱峰中灰色标注部分）。

属性	TSKgel SuperQ-5PW (20)	TSKgel SuperQ-4PW (20)
上样量	162.8 mg (32.5 mg/mL)	175.3 mg (35.1 mg/mL)
收集组分 (AEX-HPLC)	88.9%	91.3%
FLP回收率	78.6%	98.2%

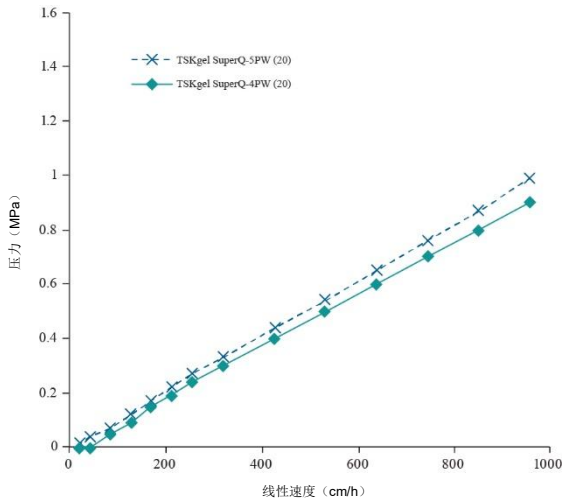
在梯度洗脱实验中，TSKgel SuperQ-4PW (20)的纯度比TSKgel SuperQ-5PW (20)高出约2%，回收率高出约20%。

同时由于上样量的增加和回收率的提升，在收集组分纯度相近的情况下，使用TSKgel SuperQ-4PW (20)的产物回收量增加了35%。

压力-流速稳定性

虽然两款填料的孔径大小不同，但基质与粒径完全相同。因此具有极为相近的压力-流速特性。

图4 压力-流速曲线



结论

TSKgel SuperQ-4PW (20)填料用于纯化长度不超过50个核苷酸的寡核苷酸 (DNA或RNA)，展现出了可靠且高效的优势。其平均吸附载量比TSKgel SuperQ-5PW (20)填料高32%，即使在高负载条件下仍能保证高效处理。该填料可在不影响压力-流速性能的前提下，实现稳定的高回收率和高纯度。凭借其可靠性，并可兼容现有纯化工艺的优势，TSKgel SuperQ-4PW (20)是寡核苷酸纯化的可信之选。

产品信息

货号	产品描述
0045564	SkillPak 1 SuperQ-4PW (20), 5 × 1 mL col.
0045566	SkillPak 50 SuperQ-4PW (20), 50 mL col.
0045567	SkillPak 200 SuperQ-4PW (20), 200 mL col.
0045244	SkillPak 5 TSKgel SuperQ-5PW (20), 5 mL col.
0023588	TSKgel SuperQ-4PW (20), 25 mL
0030000	TSKgel SuperQ-4PW (20), 250 mL
0030001	TSKgel SuperQ-4PW (20), 1 L
0030002	TSKgel SuperQ-4PW (20), 5 L
0030003	TSKgel SuperQ-4PW (20), 25 L
0030004	TSKgel SuperQ-4PW (20), 50 L
0018249	TSKgel DNA-NPR, 2.5 μm, 4.6 mm ID × 7.5 cm

Tosoh Bioscience和TSKgel是Tosoh Corporation的注册商标。
SkillPak是Tosoh Bioscience LLC的商标。