

## XBridge™ Premier GTx BEH™ SEC 450 Å 2.5 μm 色谱柱对核酸体积排阻分离的适用性

---

Lavelay Kizekai, Nabeel Jawdat, Vlad Chumakov, Martin Gilar, Matthew A. Lauber

Waters Corporation, Nitto BioPharma

仅供研究使用，不适用于诊断。

---

### 摘要

体积排阻色谱经常被用于分子完整性分析。本文报告了使用450 Å孔径、2.5 μm粒径的XBridge Premier GTx BEH SEC色谱柱对单链和双链核酸的分析过程。在多种流动相下实现了出色的分离，并获得了尖锐且对称的核酸峰。利用这种色谱柱技术，可以高效分析ssRNA和dsDNA，其分离能力分别可达到6000和3000核苷酸/碱基对的长度。这些结果提供了一些系统适应性测试示例，证实了XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 μm色谱柱对于核酸药物（包括中小型治疗性mRNA）分析的适用性。

---

### 简介

体积排阻色谱(SEC)被广泛用于蛋白质分析。最近，SEC已被用于分析抗体寡核苷酸偶联物和单向导RNA (sgRNA)<sup>1,2,3</sup>。虽然这些研究中使用的填料孔径(110~300 Å)足以分析100~200个核苷酸(nt)的核酸，但分离较长（长度超过1000 nt）的核酸，例如信使RNA (mRNA)，需要使用孔径更大的填料。本文介绍了使用XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 μm色谱柱分离较长核酸的实用性。该色谱柱中的BEH-二醇基颗粒不仅适用于分析腺相关AAV衣壳，还适用于在各种流动相条件下分析RNA和dsDNA<sup>4</sup>。色谱柱硬件结构采用大孔径BEH颗粒，搭载高性能表面

技术，可确保长链核酸SEC分离的快速启动和可靠的分离度。其孔径大小经过优化，对于中小型核酸物质具有出色的分离度。利用这种色谱柱技术，可以高效分析ssRNA和dsDNA，其分离能力分别可达到6000和3000核苷酸/碱基对的长度。

---

## 实验

制备2× PBS：将四包磷酸盐缓冲盐混合物（Sigma，P/N：P-3583）溶于2 L 18.2 MΩ水中，制得pH为7.4，含20 mM磷酸盐、276 mM NaCl、5.4 mM KCl的溶液。使用1000 mL Nalgene™ Rapid-Flow™ 无菌一次性PES过滤器（孔径0.1 μm，P/N：567-0010）过滤溶液。

50 bp DNA ladder（NEB P/N：N3236L）、100 bp plus DNA ladder（Thermo Scientific Gene ruler，P/N：SM1143）：将冷冻样品在环境条件下解冻15分钟，使用移液器上下吸取和释放液体10次混匀，然后使用带PE盖的300 μL聚丙烯螺纹口样品瓶（P/N：186004169 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186004169-polyethylene-septumless-screw-cap-for-12-x-32-mm-vials-100-pk.html>>）分装成50 μL的等分试样批次。拧紧瓶盖，防止液体在-20 °C冰箱储存期间蒸发。

单链RNA (ssRNA) ladder：使用高范围RNA ladder（Thermo Ribo Ruler P/N：SM1821）和NEB ssRNA ladder (N0362S)。这些样品瓶在-80 °C下储存，室温下解冻后，用80 μL 1.25 mM EDTA稀释20 μL RNA ladder，然后用移液器上下吸取和释放液体混匀后，转移到进样样品瓶中。

100 mM乙酸铵，pH 6.2：制备200 mM乙酸铵储备液，并用1 M氢氧化钠将pH调整至6.2（初始pH为6.099）。用18.2 MΩ水按1:1的比例稀释200 mM乙酸铵(pH 6.2)溶液，制得100 mM乙酸铵溶液(pH 6.2)。

含75 mM高氯酸钠和20%乙腈的1× PBS：该流动相的制备方式为：将900 mL Milli-Q水与200 mL 10× PBS、21 g高氯酸钠一水合物和400 mL乙腈混合，然后用18.2 MΩ水将混合物定容至2 L，并在室温下储存。

## 液相色谱条件

液相色谱系统：

配备四元溶剂管理器（带100 μL混合器）的ACQUITY™ UPLC™ H-Class Bio系统、FTN-SM（带15 μL MP35N针，P/N：700005421）、带主动预加热器（18.5"，P/N：205001755）的CH-30A

	加热器，以及连接到TUV的柱后管路：0.005"内径 × 22.5" LG MP35N焊接管[P/N：700008914] [相当于配备高pH试剂盒的ACQUITY Premier QSM FTN仪器]
检测：	ACQUITY TUV检测器（钛合金流通池，5 mm，1500 nL）
波长：	260 nm
检测：	ACQUITY RI检测器
数据采集：	Empower™ Pro 3 Feature Release 3
样品瓶：	最大回收样品瓶和瓶盖（沃特世 P/N：186000327C），以及300 μL聚丙烯螺纹口样品瓶（沃特世 P/N：186004112）
色谱柱：	XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 μm色谱柱，7.8 × 300 mm（沃特世 P/N：186010586）；XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱（钢制硬件），450 Å, 3.5 μm, 7.8 mm × 300 mm（沃特世P/N：176003599）
柱温：	30~50 °C
样品温度：	6 °C
样品管理器清洗液：	18.2 MΩ水
密封清洗液：	10% HPLC级甲醇/90% 18.2 MΩ水(v/v)
进样体积：	20 μL (DNA ladder)，10 μL(RNA ladder)

流速:	0.288 mL/min或0.25 mL/min
流动相A:	2X PBS: 磷酸盐缓冲液 (20 mM磷酸盐、276 mM NaCl、5.4 mM KCl, pH 7.4) (或) 含75 mM高氯酸钠和20%乙腈的1× PBS
流动相B:	100 mM乙酸铵, pH 6.2
流动相C:	N/A
流动相D:	1× PBS Sigma P/N: P3813 (10 mM磷酸盐, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)
样品:	NEB 50 bp DNA Ladder (N3236L); Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (SM1143); Thermo Scientific RiboRuler高范围 RNA Ladder (SM1821)
梯度:	等度
注射器吸取速度:	30 $\mu$ L/min
进样针位置:	1.0 mm
数据通道:	系统压力和TUV
TUV采样速率:	5 Hz (推荐)
滤波器时间常数:	无
数据模式:	吸光度
进样开始时自动复零:	是

---

## 结果与讨论

短链核酸通常会采用离子对反相液相色谱(IP-RP-LC)进行定性和定量表征<sup>5</sup>。然而，这种分析方法在分析较长的核酸(>1000 nt)时可能会表现出分离度方面的局限性。此外，基于离子对的流动相可能使双链DNA发生部分变性，导致峰匹配和数据解析不明确。另外，IP-RP-LC方法无法识别由核酸形成的任何类型的聚集体。而另一方面，SEC通常在自然状态下进行，可以检测由较长RNA形成的任何聚集体，并且还能保持DNA的互补链在一起，从而实现体积排阻分离。

图1展示了使用XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 µm色谱柱在多种流动相下获得的dsDNA ladder分离结果。色谱峰轮廓与琼脂糖凝胶电泳系统上观察到的预期体积排阻分离非常匹配，其中早期洗脱的DNA物质与凝胶中迁移速度最慢的条带相匹配。同样，SEC的后洗脱峰与凝胶中迁移速度最快的条带也相符。中间大小的条带在这些对应配对中显示出正确的洗脱顺序。和预期一致，100 bp ladder中较长的核酸(>1500 bp)比50 bp ladder中最长的核酸（1350 bp物质）更早洗脱。每种物质的峰面积与电泳观察到的条带特征匹配良好。PBS和乙酸铵流动相产生了相似的分选，核酸ladder的所有组分都显示出尖锐且对称的峰。

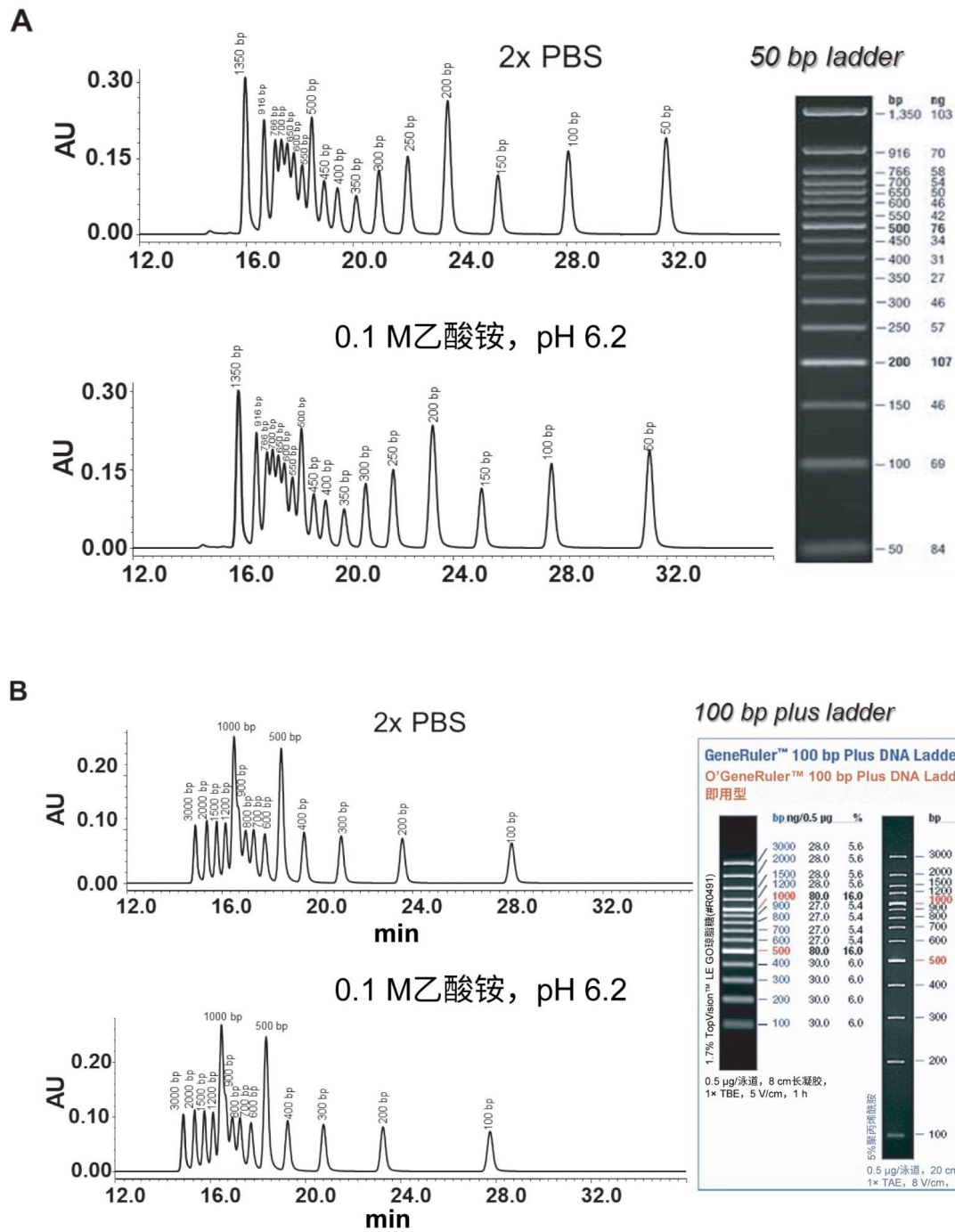


图1.使用XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 µm色谱柱对DNA ladder进行SEC分离。50 bp DNA ladder(A)或100 bp plus DNA ladder (20 µL) (B)组分，使用7.8 × 300 mm色谱柱，在2× PBS (上图

---

）或0.1 M乙酸铵（*pH* 6.2，下图）流动相下（50 °C，流速 0.288 mL/min）进行分离。注意SEC峰轮廓与琼脂糖凝胶（右侧）电泳条带之间的对应关系。260 nm处的UV吸光度水平也与50 bp（1350、500和200 bp）和100 bp（1000和500 bp）ladder中各组分的含量吻合。凝胶电泳结果显示在每个标准品随附的证书信息中。

本研究还考察了这些SEC色谱柱在单链RNA分离中的实用性。研究中比较了使用钢制硬件的3.5 μm 450 Å SEC色谱柱和XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 μm色谱柱。图2A展示了200~6000 nt的单链RNA ladder的色谱峰轮廓。研究中观察到八(8)个RNA峰轮廓（6000、4000、3000、2000、1500、1000、500和200 nt）。然而，对4000和3000 nt ladder的分离是一项挑战。有趣的是，在6000 nt RNA峰之前的20.5（或19.8）分钟处观察到一个较小的峰，在30（或28.6）分钟处观察到另一个峰。尽管这些峰的确切来源尚不清楚，但20.5分钟处的峰可能是高分子量聚集体物质，因为它比样品中预期的最长核酸更早洗脱。这些信息只能在SEC分析中观察到。本研究使用了特别配制的流动相，由PBS缓冲液，加上20%的乙腈助溶剂以及高氯酸盐添加剂制成。

鉴于3000和4000 nt物质的分离挑战，我们选用了XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 μm色谱柱。使用该色谱柱获得的分离结果如图2B所示。结果表明，使用粒径更小、柱效更高的色谱柱在分离3000/4000 nt关键分析对上的效果立竿见影。使用3.5 μm色谱柱获得的峰谷比率为1.3，而使用GTx BEH SEC 2.5 μm色谱柱时达到了1.6。此外，新的分离方法似乎还部分解决了500 nt物质中的某种异质性问题。将3.5 μm填料转换为2.5 μm填料，预计分离度可提高约20%。使用MaxPeak高性能表面并减少核酸分析物与色谱柱硬件之间的次级相互作用也可能改善分离效果。

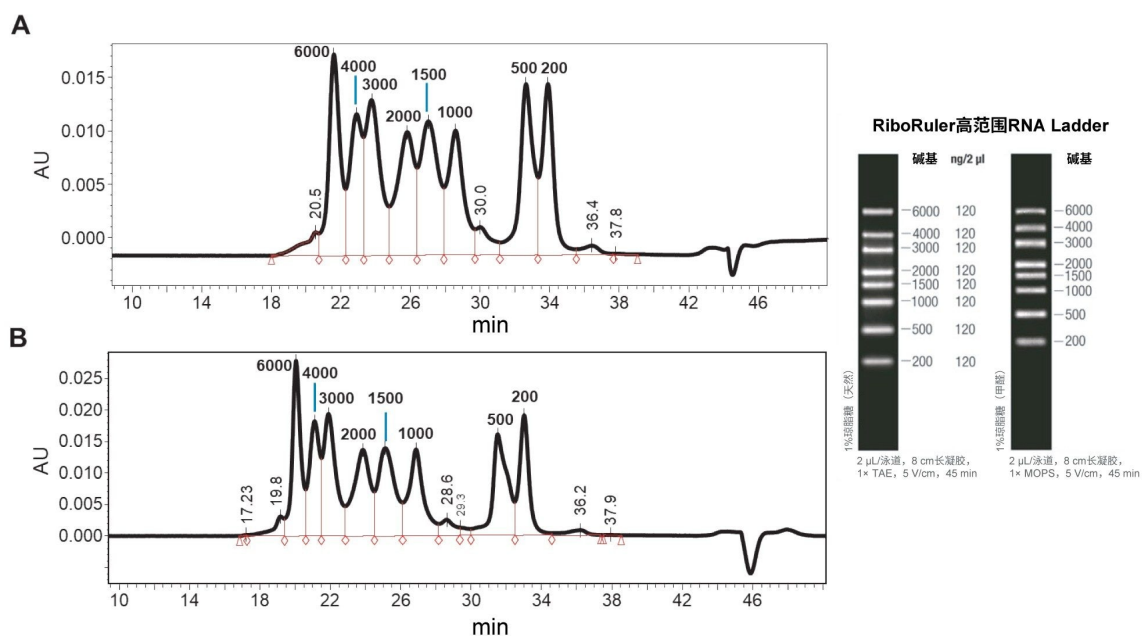


图2.使用XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 μm色谱柱对高范围ladder的单链RNA组分进行SEC分离。A. 使用含高氯酸盐和乙腈的1× PBS缓冲液, 在7.8 × 300 mm钢制硬件, 3.5 μm 450 Å颗粒色谱柱上分离ssRNA ladder。B. 使用XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 μm 7.8 × 300 mm色谱柱实现的分离结果。根据预期的RNA分子大小分布对色谱峰进行注释。凝胶电泳结果显示在标准品随附的证书信息中。

## 结论

中小型DNA和RNA可以使用XBridge Premier GTx BEH SEC 450 Å 2.5 μm色谱柱在一种或多种流动相组成下进行分离。对于<3000 bp的双链DNA和<6000 nt的RNA, 其分离度最为理想。SEC为药物完整性和纯度测定提供了一种极具吸引力的方法, 并且是为数不多的几种可用于聚集体分析的技术之一。虽然它不是分离度最高的分离技术, 但它通常简单易行。GTx BEH SEC 450 Å 2.5 μm色谱柱凭借其高效的2.5 μm填料, 搭配低吸附性硬件, 以及可达到传统7.8 × 300 mm配置的色谱柱尺寸优化, 为全新RNA和DNA检测带来了稳定的分离度和必要的系统适应性。



---

## 参考资料

1. Jones, J., *et al.*, Native Size-Exclusion Chromatography-Mass Spectrometry: Suitability for Antibody-Drug Conjugate Drug-to-Antibody Ratio Quantitation Across a Range of Chemotypes and Drug-Loading Levels. *MAbs*, 2020.12(1): p. 1682895.
2. Henry Shion, C.E.D., Ed Ha, Ying Qing Yu, Weibin Chen, 使用BioAccord系统分析抗体siRNA偶联物, 沃特世应用纪要, [720007212ZH](#), 2021年.
3. Crittenden, C.M., M.B. Lanzillotti, and B. Chen, Top-Down Mass Spectrometry of Synthetic Single Guide Ribonucleic Acids Enabled by Facile Sample Clean-Up. *Analytical Chemistry*, 2023.95(6): p. 3180-3186.
4. Lavelay Kizekai, B.A., Matthew A. Lauber, 使用XBridge™ Premier GTx BEH™ SEC 450 Å 2.5 μm色谱柱通过SEC-MALS改进AAV表征, 沃特世应用纪要, [720007969ZH](#), 2023年6月.
5. Gilar, M., *et al.*, Ion-Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Oligonucleotides: Retention Prediction. *Journal of Chromatography A*, 2002.958(1-2): p. 167-182.

---

## 特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY Arc Bio系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134966135>>

ACQUITY UPLC示差折光(RI)检测器 <<https://www.waters.com/134726507>>

ACQUITY UPLC和ACQUITY Premier可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

Empower色谱数据软件 <<https://www.waters.com/10190669>>

720008061ZH, 2023年10月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)