

# 毛细管凝胶电泳法对单链寡核苷酸的纯度分析

## Purity analysis of oligonucleotides by capillary gel electrophoresis

唐红梅, 王文涛, 陈泓序, 罗继, 郭立海

Hongmei Tang, Wentao Wang, Hongxu Chen, Ji Luo, Lihai Guo

SCIEX, 中国

SCIEX, China

**Keywords:** CGE, Oligonucleotides, Primer

### 1. 引言

寡核苷酸是一类由人工合成的若干个短链核苷酸的总称, 它可作为DNA合成的引物 (Primer)、基因探针 (Probe) 等, 在现代分子生物学研究中具有广泛的用途。此外, 随着生物技术的不断发展, 寡核苷酸也可作为一种新型的治疗药物, 通过作用于信使 RNA (mRNA) 来调控疾病基因转录翻译, 可以达到传统药物无法替代的效果, 尤其是对遗传疾病、肿瘤、代谢类疾病及罕见病等非常有优势, 被认为是继抗体药物及细胞免疫疗法之后的下一代新型药物。目前在研的寡核苷酸药物种类很多, 包括反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO)、小干扰核糖核酸 (small interfering RNA, siRNA)、微小核糖核酸 (microRNA, miRNA)、核酸适配体 (aptamer) 等。其中ASO是一种单链寡核苷酸, 是常用的基因调控工具之一, 已被开发为基因治疗药物。目前寡核苷酸药物几乎都是采用化学方法合成, 用高效液相色谱分离纯化, 该方法获得的寡核苷酸容易被杂质和截短的错误序列 (又叫失败序列) 所污染, 其中难以除去的杂质是大量 (n-1) 缺失序列 (与完整长度为 n 的寡核苷酸相比仅相差一个核苷酸), 从而导致产物纯化十分困难。因此, 迫切需要开发一种可实现单核苷酸差异分离的方法, 用于单链寡核苷酸以及引物的纯度分析。

本文以两条片段长度相差1 nt的寡核苷酸引物 (33 nt和34 nt) 为例, 基于SCIEX成熟稳定的单链DNA分析试剂盒 (ssDNA 100-R), 利用毛细管凝胶电泳方法对其进行了分离。该方法基于核酸片段大小进行分离, 分辨率高, 可实现单核苷酸差异的分离; 定量准确, 可用于单链寡核苷酸的纯度测定。

### 2. 试剂及方法

#### 2.1 试剂及样品

**试剂:** 本实验采用ssDNA 100-R试剂盒 (SCIEX, 477480), 其中包含DNA涂层毛细管 (SCIEX, 477477), 总长为65 cm, 内径100  $\mu\text{m}$ ; ssDNA 100-R Gel凝胶粉末 (SCIEX, 77621)、Tris-Borate Buffer (SCIEX, 338481)、7 M Urea (SCIEX, 338481)、pd(A) 40-60 Test Mix (SCIEX, 477626)、磁子 (Sigma-Aldrich)、0.45  $\mu\text{m}$  滤膜 (Sigma-Aldrich)、去离子水 (Millipore)。

**样品:** 两条合成的寡核苷酸引物混合物, 浓度分别为388  $\mu\text{M}$ , 片段长度分别为33 nt和34 nt。

#### 2.2 样品及前处理

**制备Tris-Borate-Urea Buffer溶液:** 先用甲醇清洗磁子, 并用去离子水将磁子冲洗干净; 将135 mL的去离子水添加到含有Tris-Borate干粉的试剂瓶中, 使用磁子在800 rpm下搅拌溶液20至30 min, 确保硼酸完全溶解。缓慢将干燥的7 M尿素添加到Tri-硼酸盐缓冲液中, 同时继续搅拌溶液; 在室温下搅拌溶液2 h, 直至尿素完全溶解且缓冲液澄清; 将Tris-Borate-Urea缓冲液储存在2-8  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 保质期为30天;

**制备ssDNA 100-R Gel Buffer溶液:** 向冻干的凝胶粉末中加入5.0 mL经0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后的Tris-Borate-Urea缓冲液; 用干净且干燥的磁子在800 rpm下搅拌溶液4-6 h, 直到凝胶完全溶解; 将凝胶缓冲液储存在2-8  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 保质期为30天。

**制备寡核苷酸样本溶液:** 将样品置于1.5 mL离心管中, 加入无酶水稀释至终浓度为77.6  $\mu\text{M}$ ; 准确移取20  $\mu\text{L}$  稀释后的样品溶液加入到PA 800 Plus 纳升样品管中, 用于后续检测;

## 2.3 仪器及方法设置

采用SCIEX PA 800 Plus药物分析系统，匹配紫外检测器，采集频率：4 Hz，检测波长为：254 nm；窗口狭缝：100 × 200 μm；DNA涂层毛细管，100 μm内径，20/ 30.2 cm (有效长度/总长度)；进样条件：-3 kV, 4 s；分离电压：-9.0 kV, 40 min；毛细管温度：30 °C；样品室温度：15 °C。毛细管活化方法、凝胶填充方法、分离方法、关机方法设置如下图；

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI:F1	BO:F1	forward	ddH2O Rinse
2	Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI:C1	BO:C1	forward	TBE Urea Buffer Rinse
3	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:D	BO:D1	forward	ssDNA Gel Fill
4	Separate - Voltage	3.0 KV	5.00 min	BI:B1	BO:B1	0.17 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis between Buffer Vials
5	Separate - Voltage	9.0 KV	10.00 min	BI:B1	BO:B1	0.17 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis between Buffer vials
6	End						
7							

图1. 毛细管活化方法时间程序表

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	forward, In / Out vial inc 5	ssDNA Gel Fill
2	Separate - Voltage	9.0 KV	10.00 min	BI:B1	BO:B1	0.17 Min ramp, reverse polarity, i	Pre-electrophoresis between Buffer vials
3	End						
4							

图2. 凝胶填充方法时间程序表

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 5	ddH2O dip
2	Inject - Voltage	5.0 KV	4.0 sec	SI:A1	BO:B1	Override, reverse polarity	Sample injection
3	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 5	ddH2O Dip
4	Separate - Voltage	9.0 KV	45.00 min	BI:E1	BO:E1	0.17 Min ramp, reverse polarity, b	Separation Between Buffer Vials
5	Autozero						
6	End						
7							

图3. 分离方法时间程序表

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI:C1	BO:C1	forward	TBE Urea Buffer Rinse
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	forward	ssDNA Gel Fill
3	Separate - Voltage	9.0 KV	10.00 min	BI:B1	BO:B1	5.00 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis between Buffer vials
4	Lamp - Off						Lamp Off
5							

图4. 关机方法时间程序表

缓冲液的入口盘及出口盘顺序摆放如下图5所示：

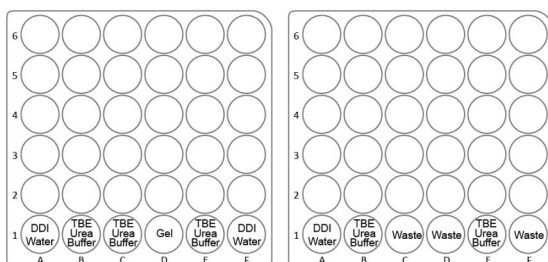


图5. 左侧的缓冲液入口托盘 (BI) 和右侧的缓冲液出口托盘 (BO)

每个试剂的体积如下：

- 去离子水：1.5 mL 去离子水。
- TBE 尿素缓冲剂：1.5 mL Tris-硼酸盐-尿素缓冲剂
- 凝胶：
  - 对于五次或更少的运行：200 μL ssDNA 100-R Gel。
  - 对于六次或更多次连续运行：1.5 mL ssDNA 100-R Gel。

注释：每隔五次运行，应使用凝胶填充法更换一次毛细管中的 ssDNA 100-R Gel。

- 废液：1 mL 去离子水

## 3. 结果与分析

### 3.1 毛细管凝胶电泳法分离结果

样品为两条等浓度的寡核苷酸引物，长度分别为 33 nt 和 34 nt；其毛细管凝胶电泳分离结果如下图；

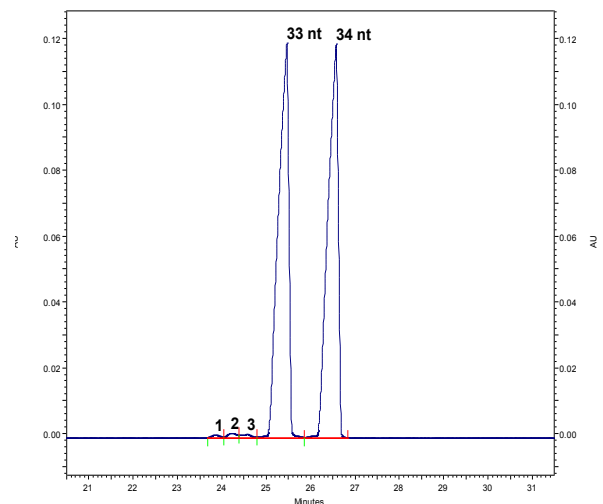


图6. 两条寡核苷酸引物的毛细管凝胶电泳分离谱图

表1. 两条寡核苷酸引物的毛细管凝胶电泳分离结果

PK#	峰名	迁移时间(min)	校正峰面积 %	分离度
1	杂质1	23.86	0.38	0.00
2	杂质2	24.21	0.59	0.89
3	杂质3	24.57	0.50	0.65
4	33 nt	25.46	50.76	1.50
5	34 nt	26.57	47.77	2.28

毛细管凝胶电泳法依据核酸片段大小进行分析，其中峰4和5分别对应33 nt和34 nt的两条等浓度的寡核苷酸引物，并且峰响应值一致；峰1-3是该样品中的杂质峰。如表1所示，毛细管凝胶电泳法可实现对单核苷酸差异的寡核苷酸引物实现基线分离，分离度为2.28。

### 3.2 重复性考察

为了进一步评估毛细管凝胶电泳方法的稳定性，对该样品进行3次重复进样，结果如表2。33 nt和34 nt两条引物迁移时间的RSD值分别为1.17 %和1.14 %；33 nt和34 nt两条引物校准峰面积%的RSD分别为1.14%和 0.26%，结果表明该方法重复性良好。

表2. 33 nt和34 nt寡核苷酸毛细管凝胶电泳分析的重复性

	33 nt寡核苷酸		34 nt寡核苷酸	
	迁移时间 (min)	校准峰面积%	迁移时间 (min)	校准峰面积%
Rep-1	29.41	51.02	30.66	48.02
Rep-2	29.82	51.01	31.08	47.78
Rep-3	30.10	51.01	31.36	47.98
RSD	1.17%	0.01%	1.14%	0.26%

## 4. 结论

毛细管凝胶电泳法是依据核酸片段大小的差异进行分离，广泛应用于核酸的纯度分析。本文采用SCIEX成熟稳定的ssDNA 100-R单链寡核苷酸分析试剂盒，可有效应用于引物及寡核苷酸药物的质量控制。毛细管凝胶电泳法主要表现出如下优点：

- 1) 分离度高，可实现单碱基差异的寡核苷酸分析：33 nt和34 nt的寡核苷酸可实现基线分离，分离度可达2.28。
- 2) 分析速度快，30 min内可以完成分离。
- 3) 操作简单，无需标记，可以直接使用UV检测器。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在英国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14994-ZH-A



#### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话：010-5808-1388  
传真：010-5808-1390  
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-2419-7200  
传真：021-2419-7333  
官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州分公司  
广州市天河区珠江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510-0200  
传真：020-3876-0835  
官方微信：SCIEX-China