[TECHNOLOGY BRIEF]

ACQUITY UPLC H-Class Bio システムによる効率的なsiRNA分析

目的

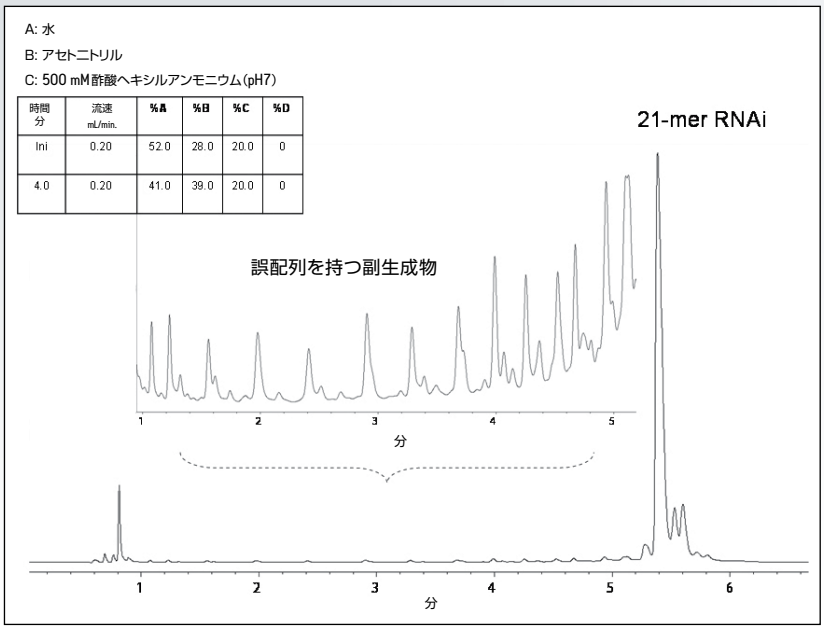
Auto•Blend™ Plus テクノロジー搭載の ACQUITY UPLC® H-Class Bioシステムを用いて、siRNAオリゴヌクレオチドと合成時に生成する誤配列をもつ様々な副生成物との分離を検討します。

背景

合成オリゴヌクレオチドは分子生物学、臨床診断、新規治療薬の開発等の分野で幅広く用いられています。RNAi (RNA interference、RNA 干渉) のメカニズムが発見されて以来、RNAiを利用した治療法が注目を集め、それとともに、21残基程度の長さを中心とする短いRNAオリゴヌクレオチドの分析法の開発も進んでいます。

RNAオリゴヌクレオチドは固相合成により段階的に生産されます。合成されたオリゴヌクレオチドは担体から外されますが、この際に、目的のオリゴヌクレオチドだけではなく、配列の一部を欠損したものや合成時に生成する不純物も混入します。薬品の安全性、薬効を確実にするためには、目的物以外の物質を定量し、その特性を解析することが求められます。

ACQUITY UPLC H-Class Bioシステムで、21残基のsiRNAを合成時の様々な副生成物から効率よく分離します。



時間 分	流速 mL/min.	%A	%B	%C	%D
Ini	0.20	52.0	28.0	20.0	0
4.0	0.20	41.0	39.0	20.0	0

副生成物産物中の21残基のsiRNAの分離。合成ヌクレオチドの品質管理の例。ACQUITY UPLC H-Class BioシステムのAuto•BlendPlus機能により、3液自動混合を行い、迅速かつ正確な分析法を確立。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

様々な不純物を含む合成オリゴヌクレオチドの分離には、UPLC®によるイオンペアを利用した逆相分析が有効です。siRNAの分離には、MS検出に適した試薬、非変性状態でsiRNAの2本鎖を保ったまま使用できる試薬など複数のイオンペア試薬が利用できます。また、修飾オリゴヌクレオチドでは、試料に適した特別な組成の移動相が必要になることもあります。試料に適した分析法を最適化するためには、様々な組成の移動相を試さなければなりません。ACQUITY UPLC H-Class Bioシステムは、水や100%有機溶媒、イオンペア試薬のストック溶液を、正確、精密、そして自在に自動混合することができ、まさにこのような目的のために開発された4液混合システムです。

ソリューション

合成オリゴヌクレオチドの分析では、2液グラジエントがよく用いられます。ここでは、ACQUITY UPLC H-Class Bio システムのAuto•Blend Plusテクノロジーを使用し、3液グラジエントで21残基の合成siRNAを分離した例をご紹介します。

溶媒Cを、イオンペア試薬として500 mM 酢酸ヘキシルアンモニウム（pH 7）、溶媒Aを100%水、溶媒Bを100%アセトニトリルとしました。希釈や混合溶媒の事前調製が不要であることから、分析準備が簡便になり、調製時のミスも軽減されます。28%から39%の有機溶媒グラジエントを行い、この間、イオンペア試薬は一定に20%送液しました。この分析ではUPLC Oligonucleotide Separation Technology (OST) C_{18}カラムを使用し、検出はUV検出器(TUV)にて行いました。

その結果、目的の21残基siRNAと不要な不純物とを良好に分離することができました。主ピークが目的物、その他は誤配列をもつ副生成物のピークです。これらの様々な副生成物をわずか6分で分離しています。主ピークの後に溶出しているピークは、目的のRNAより長い配列をもったオリゴヌクレオチドです。これらは、合成中に余分なヌクレオチドが結合したものや、保護基の脱離が不完全であったオリゴヌクレオチドです。

まとめ

21残基siRNAを合成時の多くの副生成物から6分で分離することが可能でした。ACQUITY UPLC H-Class BioシステムのAuto•Blend Plusテクノロジーにより溶媒調製を簡略化し、分析法開発をより柔軟に行っていただくことが可能です。

このきわめて効率的で、かつ費用対効果の高いシステムをご使用いただくことで、法規制の要求基準を満たし、より確かな、信頼性の高いオリゴヌクレオチド分析を実現します。

適用規格：JISQ9001:2008(ISO9001:2008)
登録番号：JMAQA-331 登録日：1999年05月31日
審査登録範囲：理科学機器（液体クロマトグラフ・質量分析装置・ データ管理システム等）の輸入・販売から保守業務までのトータルサポート及び保守プランの設計・開発

Waters、ACQUITY UPLC および UPLC は Waters Corporation の登録商標です。The Science of What's Possible、Auto•Blend Plus および ProteinPak は Waters Corporationの商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

このISO9001認証登録ロゴは、Waters Corporationのものです。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡

©2010 Waters Corporation. Produced in Japan.
2010年10月 720003645JA PDF