

Vývoj a optimalizace separace oligonukleotidů s využitím nového přístupu recyklační HPLC

Barbora Fišerová (1), Milan Minárik (2), Michal Náhunek (2), Roman Kysilka (2) a Marek Minárik (1,2)

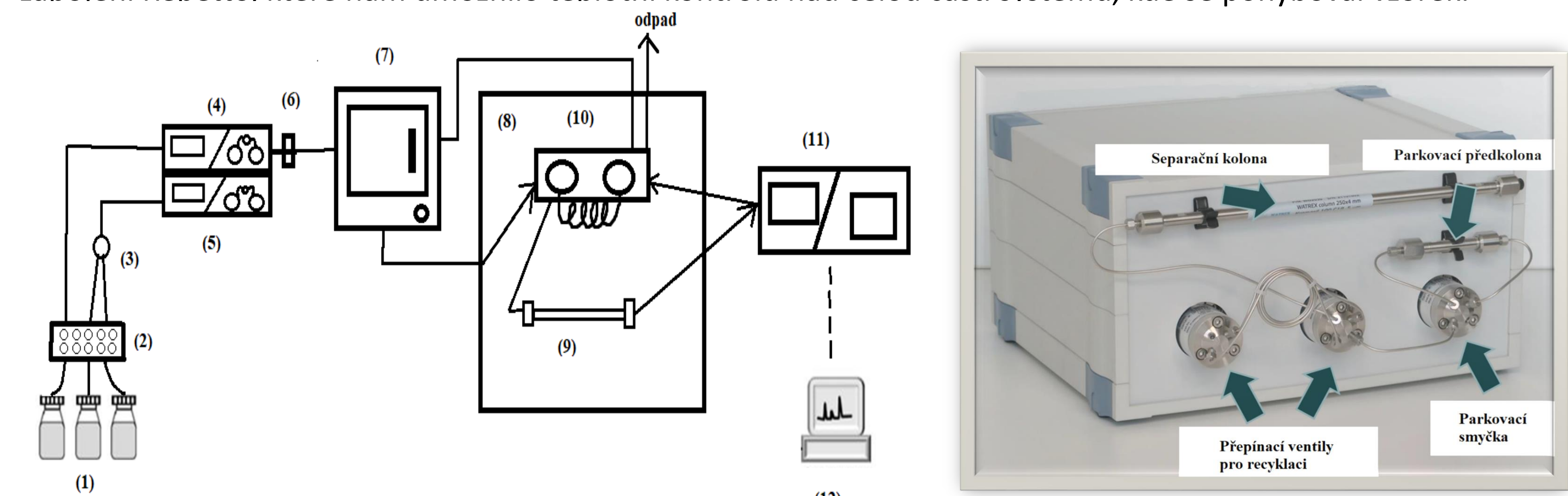
1) Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2) HPLC laboratoř, Watrex Praha, s.r.o., Praha 6

Úvod

Separace biologicky významných polymerů se v dnešní době těší stále větší pozornosti a umožňují zásadní průlomů v mnoha oborech, zejména v oblasti klinické biochemie. Oligonukleotidy nejčastěji najdeme ve formě krátkých sekvencí, primerů či sond, a jsou nenahraditelnými složkami pro řadu molekulárních metod (PCR, DNA sekvenování apod.). Příprava dokonale přesných a čistých oligonukleotidů bývá často zcela zásadní pro úspěšnost těchto metod, proto velmi záleží na účinnosti izolace cílové sekvence od neúplných produktů syntézy či dalších nechtěných příměsí. Současné postupy zahrnují mimo jiné i preparativní chromatografii, avšak nezářídka kdy mívají standardně používané postupy nedostatečné rozlišení. Koncept recyklační chromatografie, kdy jsou analyty po výstupu z kolony navraceny zpět pro opakovaný průchod kolonou, a tím je zlepšeno jejich rozlišení, je znám od 60 let. V poslední době byl však představen zcela nový koncept, tzv. systému Repetto, kdy jsou segmenty separované směsi sekvenčně vráceny zpět na kolonu bez nutnosti průchodu pumpou snižující účinnost separace a s možností detekce mezi cykly, kdy na detektor nepůsobí vysoký zpětný tlak (jako např. při alternativní metodě tzv. přehazování mezi dvěma kolonami). Hlavním cílem předložené práce byla optimalizace podmínek pro separaci směsi oligonukleotidů lišících se délkou sekvence či obsahem vysoko-tajících G a C bází a následně prokázání výrazného zlepšení rozlišení jejich separace pomocí výše zmíněného přístupu recyklační chromatografie.

HPLC systém pro optimalizaci metody a po zapojení Repetto

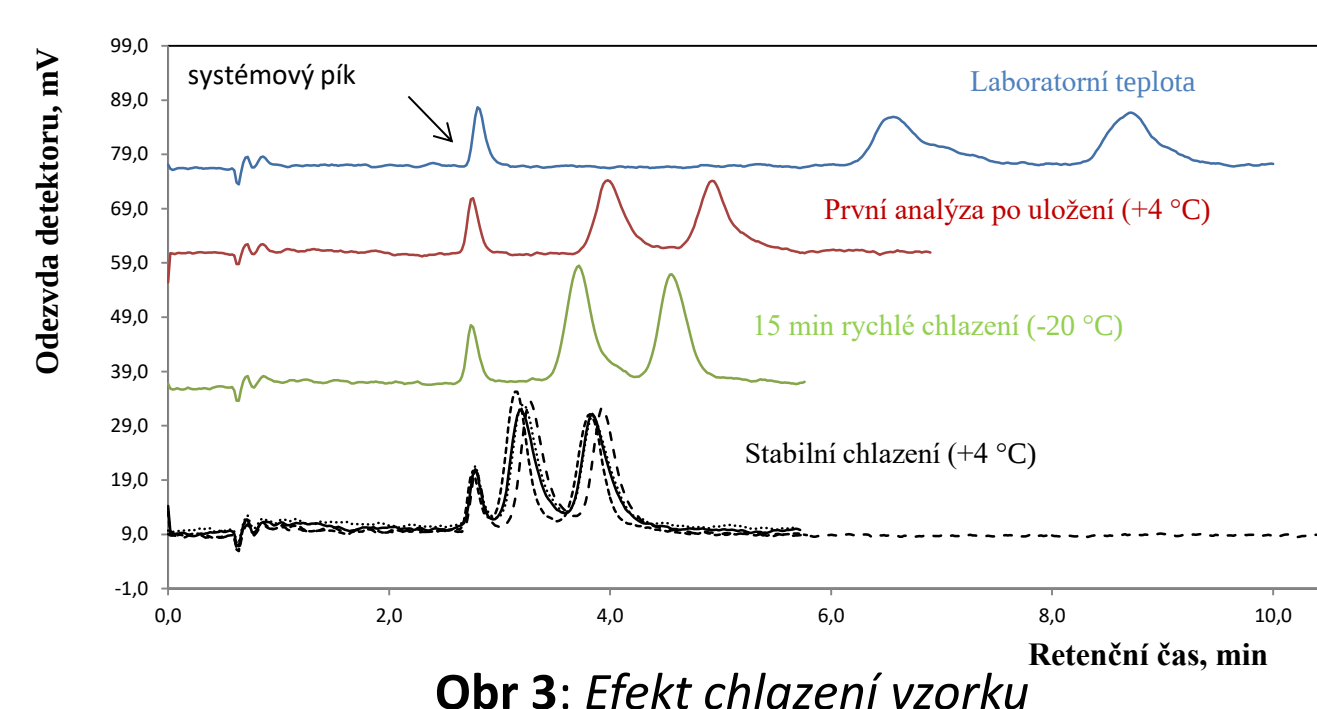
Z důvodu komerčního využití metod pro separaci a purifikaci oligonukleotidů a nedostupného „know-how“ se fáze optimalizace metody pro isokratický mód stala velkou výzvou. Pro využití modulu Repetto bylo zásadní zapojení robustního systému poskytujícího málo rozmyté píky o stálých retenčních časech. Na obrázku Obr 1 je schéma systému HPLC po zapojení modulu Repetto. Zásadní inovací bylo zapojení přepínacího ventilu pro třetí zásobník mobilní fáze v rámci vysokotlakého gradientu, umožňující oplach kolony čistým acetonitrilem, aby nedocházelo k jejímu zanášení, a také využití prostorné skříně termostatu plynového chromatografu pro zapojení Repetto, které nám umožnilo teplotní kontrolu nad celou částí systému, kde se pohyboval vzorek.



Obr 1: Schéma systému po zapojení recyklačního modulu Repetto. (1) Zásobníky mobilní fáze. (2) Degasser. (3) Přepínací ventil pro selekci zásobníků mobilní fáze. (4), (5) Čerpadla mobilní fáze. (6) Směšovač mobilní fáze. (7) Chlazený autosampler. (8) Plynový chromatograf. (9) Kolona. (10) Repetto. (11) UV Detektor. (12) Datastanice.

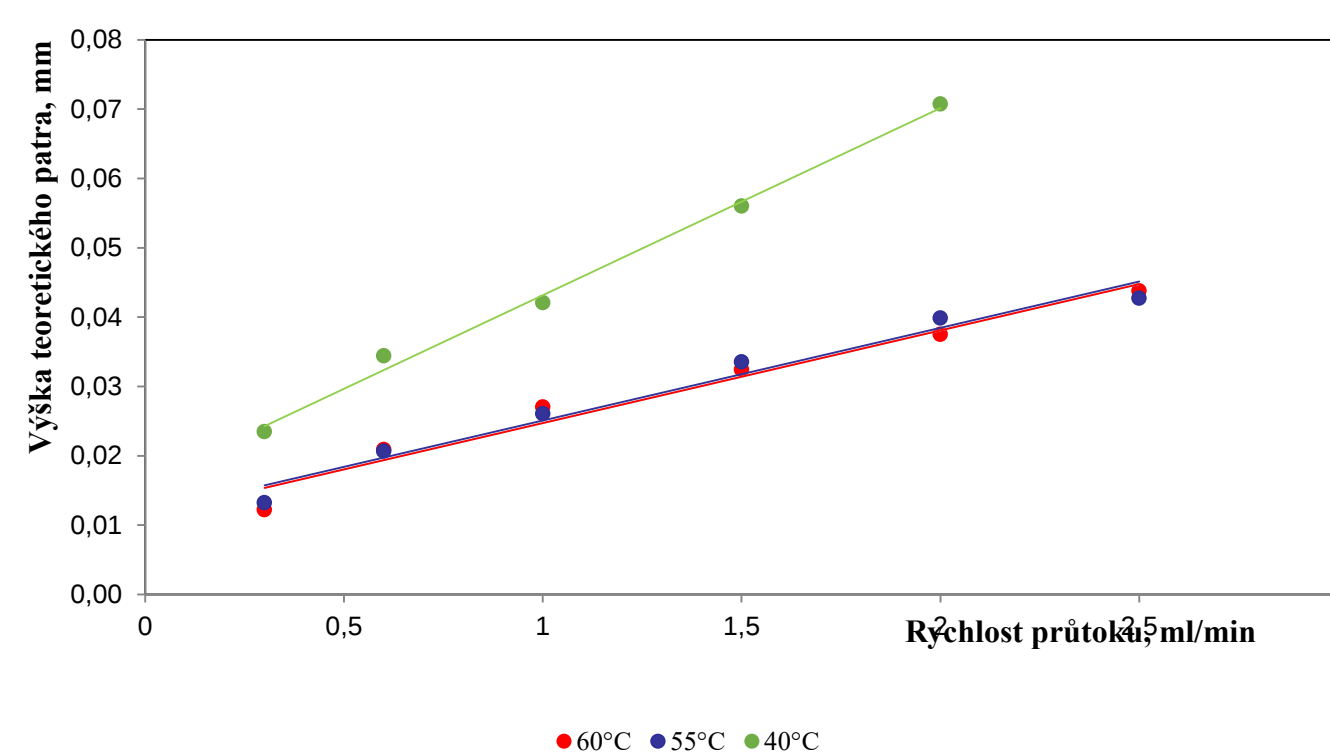
Optimalizace metody

Úvodní pokusy s dělením oligonukleotidů se od počátku potýkaly s variabilitou v elučních časech a rozmytím píků. Kromě standardních optimalizací podmínek jako jsou průtok, teplota separace a zastoupení organické složky v mobilní fázi bylo experimentálně zjištěno, že lze nežádoucí jevy píků zmírnit zchlazením vzorku před nástřikem na kolonu. Domníváme se, že by tento efekt mohl být způsoben adsorpcí oligonukleotidů na kovový povrch frit v koloně. Chromatogramy popisující tento experiment jsou znázorněny na Obr 3.



Obr 3: Efekt chlazení vzorku

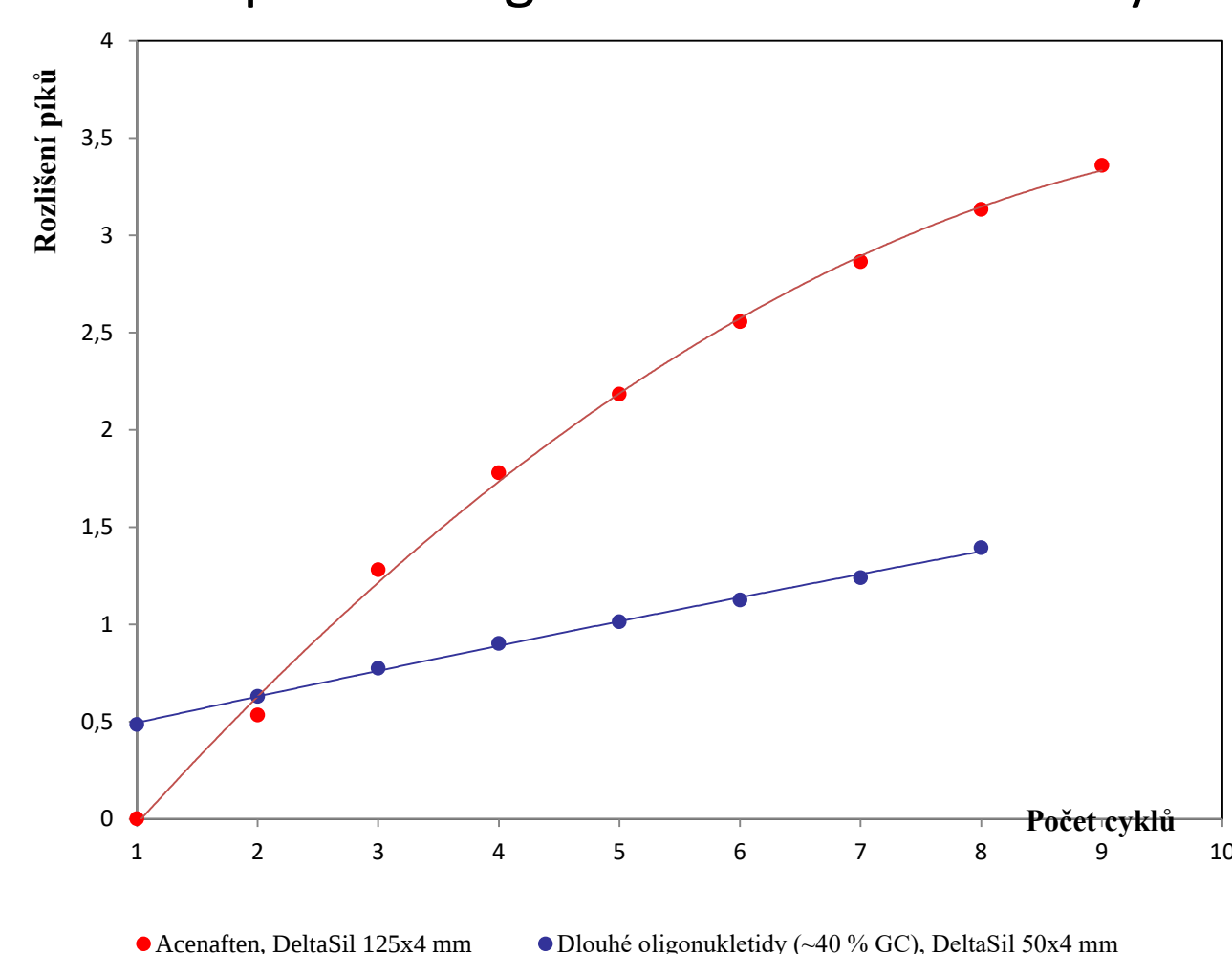
Dalším důležitým bodem optimalizace bylo sestrojení Van Deemterových křivek, které potvrdily, že příčinu rozmývání píků musíme hledat v mezimolekulové interakci neboli „mass-transfer“ a také že zvýšená teplota této interakci napomáhá. Z tohoto poznatku vycházela nutnost termostátovat celý systém HPLC včetně modulu Repetto. Lineární část Van Deemterovy křivky je znázorněna na Obr 4.



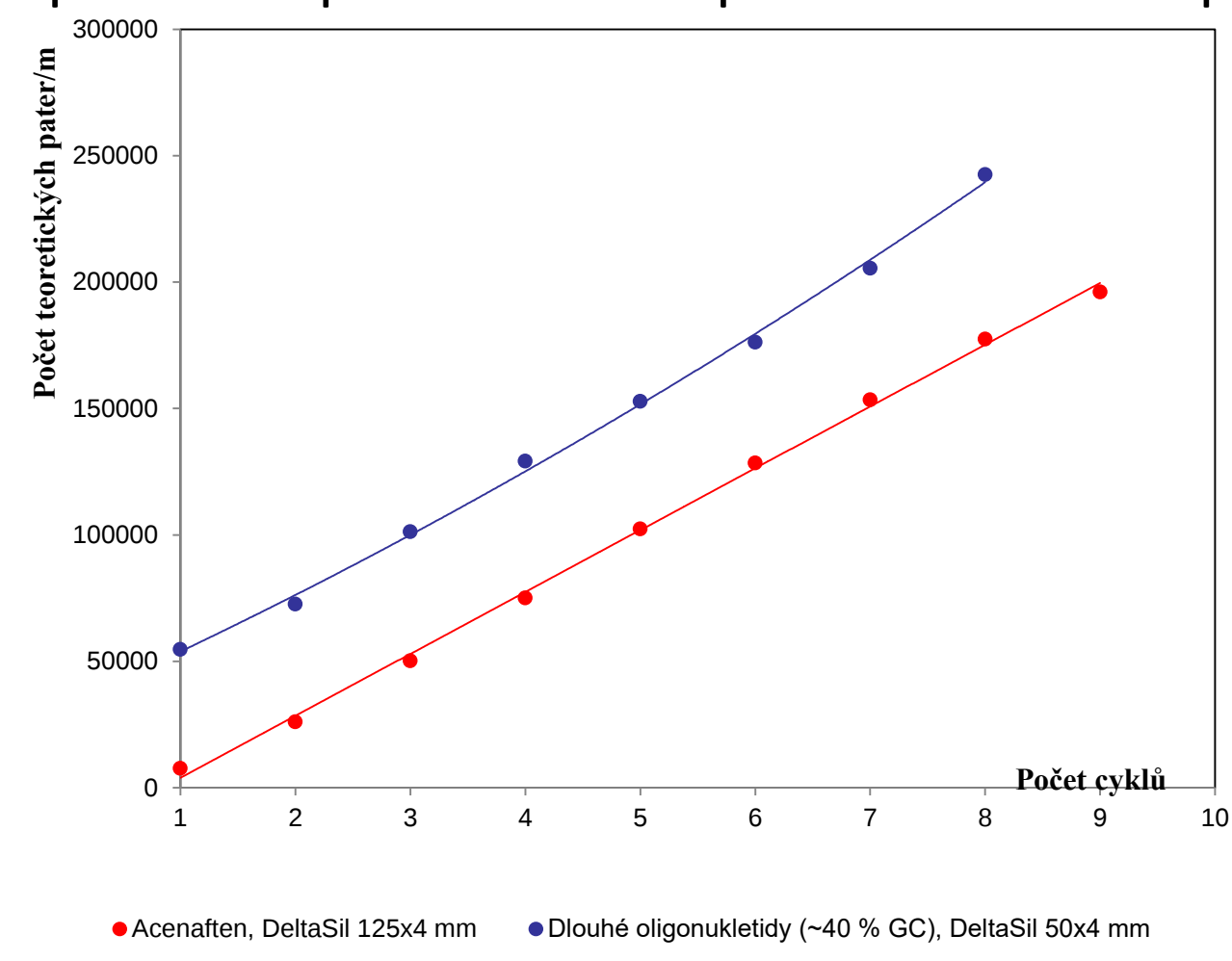
Obr 4: Van Deemterova křivka

Efekt recyklační chromatografie na rozlišení píků a účinnost separace

Hlavním účelem využití recyklační chromatografie je zlepšení rozlišení separace. To znamená možnost rozdělit analyty, které bez recyklace (i přes optimalizaci metody) zůstaly nerozdělené a také zvýšit účinnost separace. Na Obr 5 a 6 jsou znázorněny grafy závislosti parametrů separace (rozlišení a počtu pater kolony na metr) na počtu cyklů při recyklaci. Pro ověření funkčnosti recyklace byla změřena směs acenaftenu a antracenu, které mají velmi blízké eluční časy, ale separace probíhá pomocí reverzní HPLC bez iontové párového módu. Poté byly průběhy výše zmíněných závislostí porovnány s hodnotami z iontové párového systému separace oligonukleotidů. V obou systémech bylo patrné zlepšení rozlišení píků i účinnosti separaci.



Obr 5: Zlepšení rozlišení píků po recyklaci



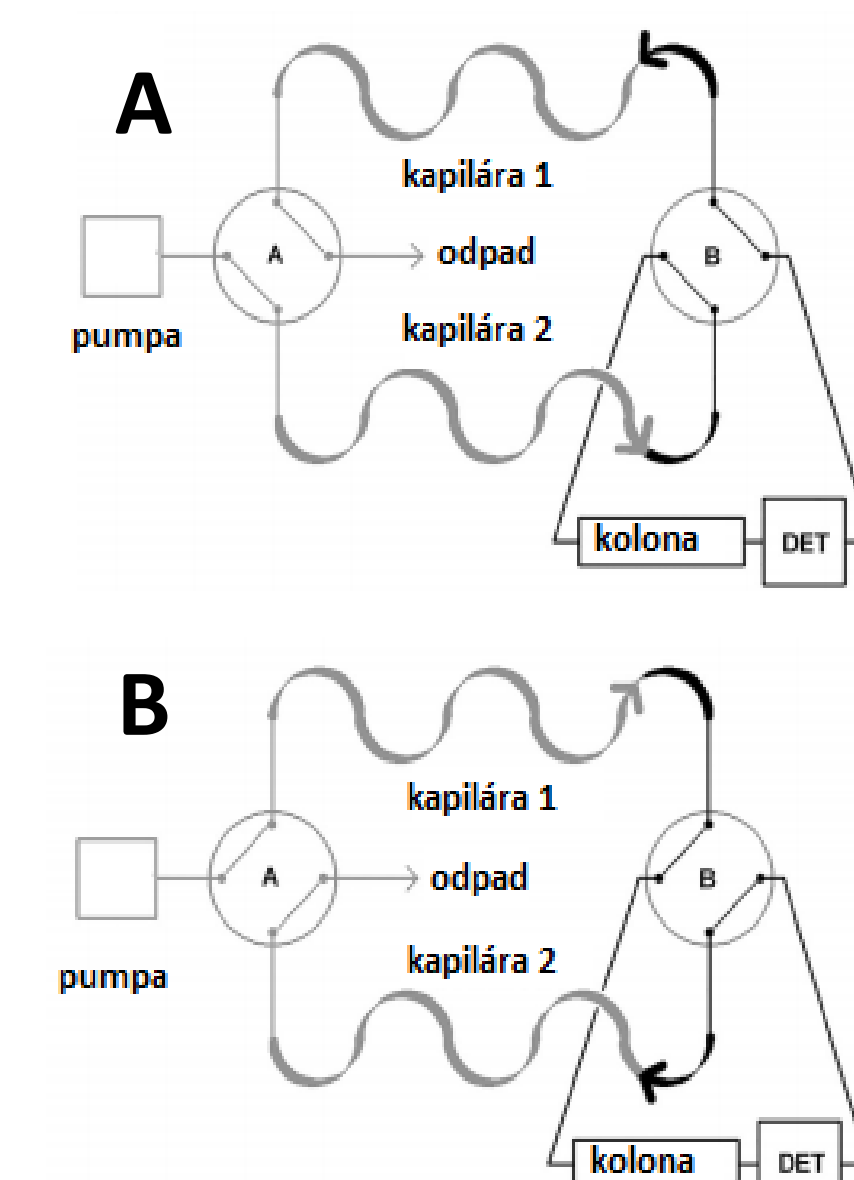
Obr 6: Zlepšení účinnosti separace po recyklaci

Recyklační chromatografie - Repetto

Recyklační modul Repetto byl v nedávné době vyvinut jako nový přístup recyklační chromatografie. Na rozdíl od všech ostatních přístupů je v tomto zapojení detektor umístěn v bezpečné části systému a není vystavován vysokému tlaku. Recyklace probíhá relativně rychlým přepínáním ventilů (1 přepnutí za 2 vteřiny), které tvoří uzavřenou smyčku.

Nejprve je vzorek vpuštěn na kolonu a poté putuje na detektor. Jakmile se spustí recyklace, je vzorek po velmi malých segmentech vrácen na začátek separační kolony.

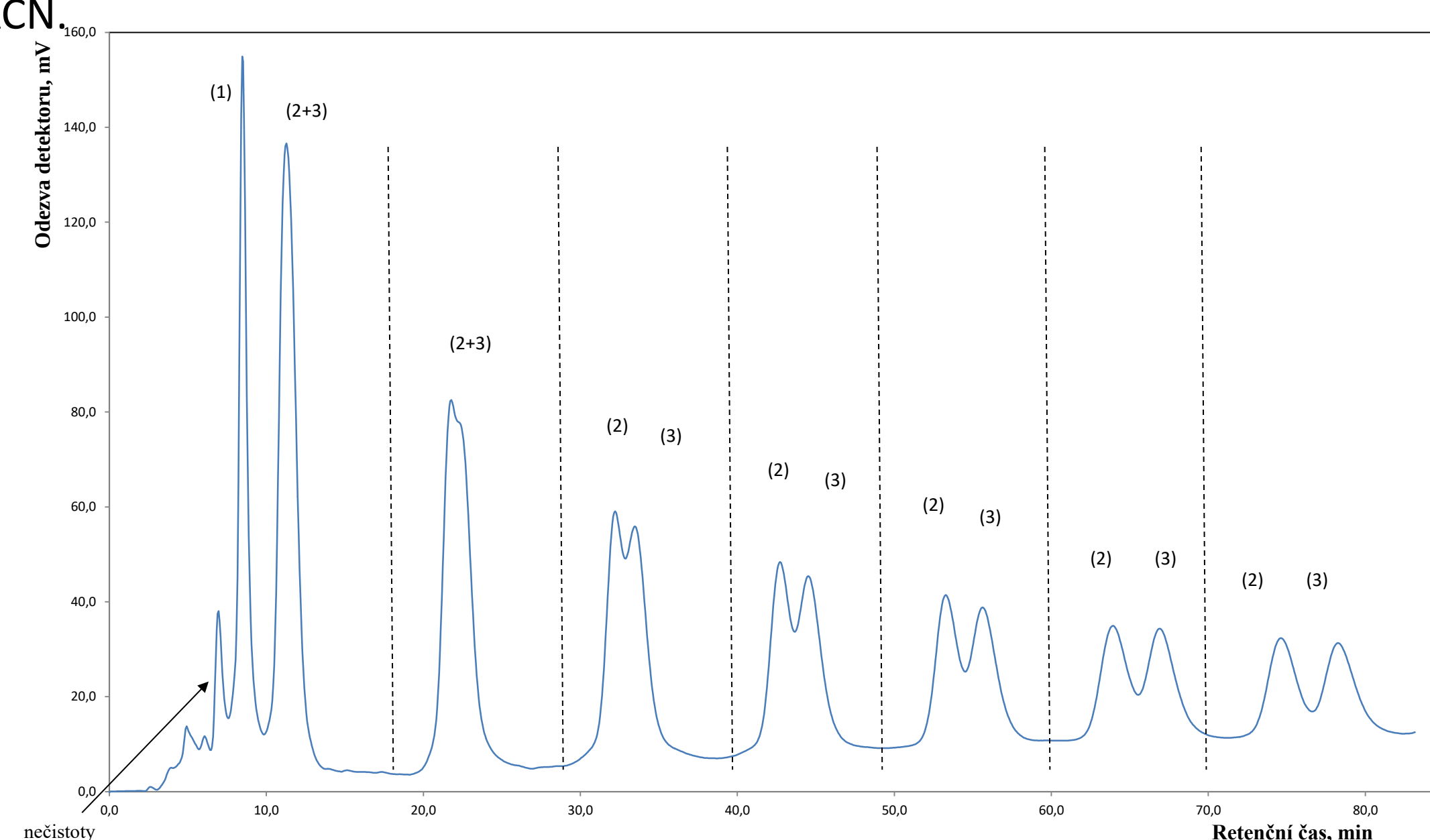
Na obrázku Obr 2 je schéma zapojení tohoto modulu v obou polohách přepínacích ventilů (A a B).



Obr 2: Schematické zapojení recyklačního modulu Repetto. (A) Pozice 1. (B) Pozice 2.

Recyklace směsi oligonukleotidů

Nejlepších výsledků recyklace směsi oligonukleotidů bylo dosaženo na koloně od společnosti Waters s označením Xterra C18 o rozměrech 50 x 4,6 mm s velikostí částic 2,5 μm. Na Obr 7 je znázorněn chromatogram recyklace směsi oligonukleotidů o délce 54, 55 a 56—mer se zastoupemím GC v řetězci asi 40%. Recyklace prokázala možnost snadno odstranit nečistoty eluující před píky analytů a tyto nečistoty již nejsou po recyklaci na chromatogramu přítomny. Po recyklaci došlo ke zlepšení separace píků (2) a (3). Navyšující se základní linie je důsledkem zanášení kolony aminovými zbytky z iontové párového činidla, protože nebylo možné dělat oplachy 100% ACN.



Obr 7: Chromatogram směsi dlouhých oligonukleotidů (~40 % GC) po recyklaci na koloně Waters Xterra C18. Experimentální podmínky: kolona Waters Xterra C18, 50x4,6 mm, 100 Å, 2,5 μm, mobilní fáze A (5% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH 7), B (15% ACN v 0,1 mol/dm³ TEAA, pH7), C (100% ACN), A:B (50:50, v/v, 10 % ACN), 0,4 ml/min, oplach C 3 min (1 ml/min), ekvilibrace kolony 5 min (2 ml/min), teplota separace 60 °C, nástřik vzorku 20 μl, UV detekce při 260 nm.

Závěr

Využití recyklačního přístupu umožnilo významné zlepšení separace oligonukleotidů. Efekt je obzvláště patrný pro analýzu dlouhých oligonukleotidů, kde separace standardními metodami v podstatě není možná – viz Obr. 6 první segment, kde píky 2 a 3 nejsou rozdělené. Tento výsledek je tak nejvýznamnějším dosaženým v tomto projektu. Na jeho základě lze předpokládat i brzké zavedení do průmyslové praxe.

Literatura

- [1] FOUNTAIN KJ, Gilar M, Gebler JC. Analysis of native and chemically modified oligonucleotides by tandem ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2003;17(7):646-53. doi: 10.1002/rcm.959. PMID: 12661016.
- [2] Oligonucleotide Purification. Merck [online]. [cit. 2020-12-19]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/best-purification.html>
- [3] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [4] MINARIK, Marek, Martin FRANC a Milan MINARIK. High performance liquid chromatography column efficiency enhancement by zero dead volume recycling and practical approach using park and recycle arrangement. Journal of Chromatography A [online]. 2018, 1554, 1-7 [cit. 2020-12-22]. ISSN 00219673.