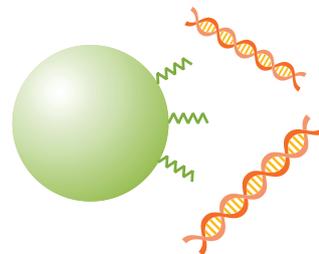


DNA 和 RNA 寡核苷酸的分离

寡核苷酸又重新引起关注，因为其应用越来越多，包括潜在的治疗作用。其合成流程与较成熟的肽合成流程相似，即采用活性固相合成树脂，通过不断添加特定核苷酸，来构建所需要的序列。

在 5' 羟基端用二甲氧基三苯甲烷 (DMT) 基团进行保护，断裂的目标核苷酸仍连着这些保护基团。由于 DMT 具有疏水性，在第一阶段进行该处理非常有用。为提高寡核苷酸的稳定性，特别是对酶降解的稳定性，可以对其进行化学改性，如用硫置换氧，形成硫代磷酸酯。使用化学合成生产生物分子时，每个添加循环的偶联效率都不是 100%。从固相合成支持相上裂解下来的样品含有缺失序列（丢失了一个或几个残基的寡核苷酸），以及某些由于双偶联或支链连接产生的更大的寡核苷酸。样品混合物非常复杂，需要高效的技术进行分析。



寡核苷酸的分离通常使用三种 UHPLC/HPLC 技术：

三苯甲基保护 — 此步骤为从脱保护失败序列中分离仍带有 DMT 基团的全长目标寡核苷酸，相对比较简单。此步骤得到的分析信息有限，并且被视为纯化方法。

脱三苯甲基保护寡核苷酸的离子交换分离 — 该方法利用寡核苷酸骨架上的负电荷进行分离。较短寡核苷酸的分离度良好，但分离度随链长增加而降低。使用水相洗脱液，但寡核苷酸高度带电荷，需要用高浓度盐从色谱柱上洗脱下来。

脱三苯甲基保护寡核苷酸的离子对反相色谱分离 — 该技术使用有机溶剂和挥发性离子配对试剂，并且适用于 LC/MS。该技术最好用高效颗粒填料来实施。需要能使寡核苷酸完全变性，并防止其与互补序列发生结合的条件。因此，该分离最好在高温下进行。

DNA 和 RNA 寡核苷酸色谱柱的选择

应用	技术	安捷伦色谱柱	备注
三苯甲基保护/ 脱三苯甲基保护 寡核苷酸	三苯甲基保护	PLRP-S 50 μm 填料	基于疏水性差异进行分离。特别适合从脱三苯甲基保护寡核苷酸中分离三苯甲基保护寡核苷酸，也可以用于反相离子对色谱分离脱保护的寡核苷酸。
脱保护的寡核苷酸	脱三苯甲基保护寡核苷酸的 离子对反相色谱分离	PLRP-S 3 μm 至 50 μm AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱	
脱保护的寡核苷酸	脱三苯甲基保护寡核苷酸的 离子交换分离	PL-SAX 1000 Å	在变性高 pH 条件下分离脱保护寡核苷酸。聚合型填料上的季胺官能团实现了高 pH 下的离子交换分离，改善了自补序列的色谱分离。