

## 肝臓組織からのオリゴヌクレオチドの高回収率での回収

---

Kim Van Tran, Mary Trudeau, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

---

### 要約

このアプリケーションブリーフでは、定量分析のための組織サンプルからのオリゴヌクレオチド医薬品の抽出に関するガイダンスを提供し、肝臓組織からのオリゴヌクレオチドの高回収率での回収について実証します。

---

### 実験方法

以下（図 1）に、ウォーターズ社内で使用している、溶媒による組織の均質化およびオリゴヌクレオチド抽出のワークフローおよびプロトコルの概要を示しています。ここでは、Waters OligoWorks SPE マイクロプレートキットを用いています。均質化した組織の mg 数と、RapiZyme プロテイナーゼ K 消化試薬、バッファー、溶媒を含む均質化用混合液の合計容量（mL）の比は 1:10 であることに注意してください。

---

**1 ビーズベースの均質化**

1:10 組織 (g) /RapiZyme 消化モジュール試薬  
 100 mg の組織  
 +30 µL のオリゴ標準試料混合液  
 +220 µL の 100 mM トリス塩酸 pH 7  
 +300 µL のアセトニトリルまたはメタノール  
 +100 µL の 0.5 M TCEP HCl  
 +100 µL の 6M GuHCl  
 +250 µL の RapiZyme™ プロテイナーゼ K  
 Precellys 組織ホモジナイザーでビーズ破碎 (90 秒、6400 rpm)

1. <https://www.berlin-corp.com/5-tissue-homogenizer>  
 2. [BioRender.com](https://www.bioRender.com).

**3 サンプルの清澄化**

マイクロ冷却遠心分離 30 分、≥ 9,400 RCF (10,000 RPM) <sup>2</sup>  
 消化均質化した組織の上清の処理

3. <https://www.eppendorf.com/us-en/eShop-Products/Centrifugation/Microcentrifuges>

**2 RapiZyme™ プロテイナーゼ K 消化**

55 °C で 2 時間、600 rpm

4. <https://www.eppendorf.com/us-en/eShop-Products/Temperature-Control-and-Mixing/Instruments/Eppendorf-ThermoMixerC-p-PFp19703>

**4 OligoWorks SPE (WAX) SPE マイクロプレート**

サンプルのロード: 50 mM 酢酸アンモニウム pH 5.5 バッファー (100 µL) で 1:1 希釈した均質化/消化した組織の上清 (100 µL)、200 µL  
**洗浄 1:** 200 µL の 50 mM 酢酸アンモニウム pH 5.5 バッファー  
**洗浄 2:** 200 µL の 30% メタノール  
**溶出:** 2 × 25 µL OligoWorks SPE 溶離液  
**希釈:** 溶出液の 1:1 水希釈液 (オプション)  
**LC-MS 分析:** DIPEA IP-RPLC への最大 30 µL の直接注入

図 1. 溶媒を用いた組織の均質化、および RapiZyme プロテイナーゼ K 消化モジュールと OligoWorks SPE マイクロプレート (2 mg/ウェル) を用いた消化による、オリゴヌクレオチド組織抽出のワークフローおよびプロトコル

注: 参照している装置はウォーターズのラボで使用しているものですが、代わりに同等の機能を備えた代替装置も使用できます。

## LC-MS 分析

### LC-MS 分析

UPLC	ACQUITY™ Premier BSM システム FTM
MPA	1% HFIP (ヘキサフルオロ-2-フロロエーテル)、0.1% DIPEA (N,N-ジイソプロピルエチルアミン) 水溶液
MPB	0.75% HFIP, 0.0375% DIPEA, 65% アセトニトリル (ACN)
カラム吸着剤	ACQUITY Premier Oligonucleotide C <sub>18</sub> カラム, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 × 50 mm
カラム温度	50 °C
サンプル温度	10 °C
注入量	5 ~ 15 µL
バース溶媒	90:10 H <sub>2</sub> O : MeOH (メタノール)
洗浄溶媒	25:25:25 水 : MeOH : ACN : IPA
MS	Xevo™ TQ-Absolute
キャピラリー (kV)	2.0
脱溶媒温度	500 °C
脱溶媒流量	1,000 L/時間
コーンガス流量	150 L/時間

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
0.00	0.6	95	5	6
3.25	0.6	77	23	6
3.75	0.6	10	90	6
4.1	0.6	10	90	6
4.25	0.6	95	5	6



## 結果および考察

**OligoWorks™ SPE マイクロプレートキット、および溶媒による組織均質化と消化を使用した、オリゴヌクレオチドの組織からの高い回収率**

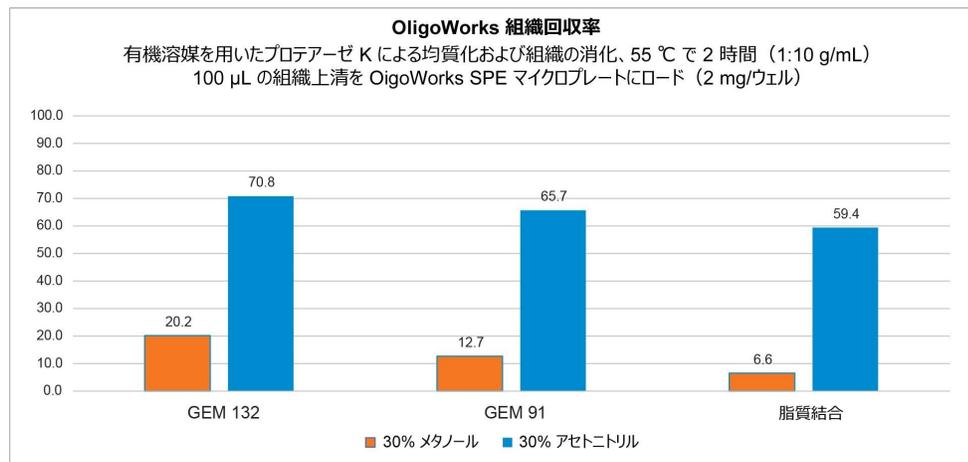


図 2. OligoWorks SPE マイクロプレートの性能の実証。0.05 g 組織/0.5 mL プロテイナーゼ K 消化モジュール試薬 (55 °C、600 rpm で 2 時間均質化および消化)、OligoWorks SPE マイクロプレートキット (OligoWorks RapiZyme プロテイナーゼ K 消化モジュールおよび OligoWorks SPE マイクロプレート (2 mg/ウェル) を含む) を使用して精製した 100 μL の組織上清により、70% 超のオリゴヌクレオチド回収率が得られました。

## オーダーインフォメーション

説明	製品番号
OligoWorks SPE マイクロプレートキット	186010614
ACQUITY Premier Oligonucleotide C <sub>18</sub> カラム、130Å、1.7 μm 2.1 × 50 mm	186009484
MaxPeak を採用した QuanRecovery™、700 μL プレート	186009184
96 ウェル用ポリプロピレン製キャップマット丸型ウェル	186009452

## ソリューション提供製品

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

Xevo TQ Absolute タンデム四重極質量分析計 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

720008270JA、2018 年 4 月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシーポリシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [法的通知およびプライバシー通知](#) [Cookies](#)  
[Cookie 環境設定](#)