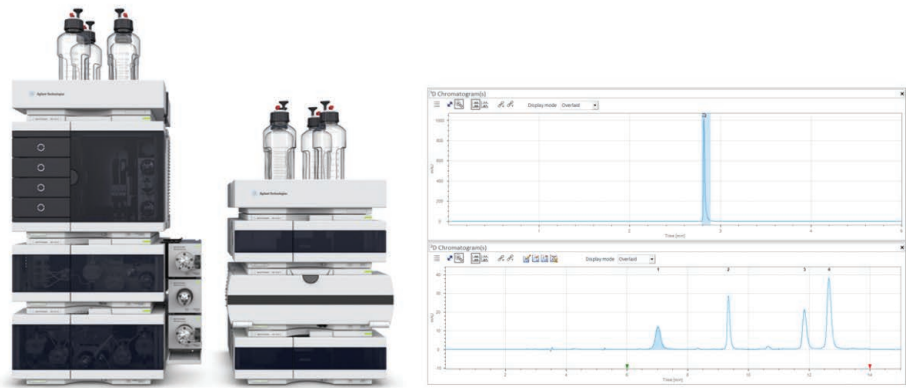


수동 정제 없이 생산 공정 중 올리고뉴클레오타이드의 직접 분석

Agilent InfinityLab 2D-LC 솔루션을 이용하여 온라인
탈염을 포함한 이온쌍 역상 LC 분석



저자

Sonja Krieger와
Clarissa Dickhut

Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

개요

포스포라미다이트 케미스트리를 이용해 합성된 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 이온쌍 역상 액체 크로마토그래피(IP-RPLC) 및 음이온 교환 크로마토그래피를 이용해 분석하고 정제됩니다. 음이온 교환 정제 분획물(fraction)의 높은 염 함량은 IP-RPLC 분석 중에 올리고뉴클레오타이드가 이온 쌍에 관여하는 능력을 저하시킵니다. 이로 인해 IP-RPLC 분석 이전에 시료 탈염이 필요하며 보통 원심 분리 필터를 이용해 수동으로 이루어집니다.

이 응용 자료는 높은 염 함량이 있는 용액에서 올리고뉴클레오타이드의 직접 2D-LC 분석을 보여줍니다. 즉, 첫 번째 차원(1D)에서 온라인 탈염을 수행하고 이어서 두 번째 차원(2D)에서 IP-RPLC 분석을 실행합니다. 이 설정에서, 2D-LC를 적용하면 워크플로 속도가 증가하고 수동 시료 전처리가 불필요합니다.

소개

분자 생물학 및 분자 진단에서, polymerase 연쇄 반응(PCR), 유전자 silencing 및 관련 기법 중에는 표준 및 변형 합성 올리고뉴클레오티드가 필요합니다¹.

게다가, 합성 뉴클레오티드는 암 및 바이러스성 질병과 같은 다양한 질병의 치료제로써 그 중요성이 점점 더 증가하고 있습니다². 올리고뉴클레오티드 기반 의약품에는 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNAs(short interfering RNA) 및 압타머 등이 있습니다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 siRNA는 모두 mRNA 번역을 차단하여 단백질 합성을 방해합니다. 압타머는 압타머-단백질 복합체를 형성하여 단백질의 생물학적 기능을 억제합니다³.

올리고뉴클레오티드는 일반적으로 포스포라미다이트 케미스트리를 이용해 합성됩니다^{2,4}. 달성 가능한 순도는 보통 70% 이상이며, 합성 후 존재하는 일반적인 불순물은 삭제되거나 연장된 서열을 가진 올리고뉴클레오티드뿐 아니라 불완전하게 보호 해제된 산물, 푸린 염기가 상실된 올리고뉴클레오티드 및 기타 분해산물 등이 있습니다². 합성된 보호 해제 올리고뉴클레오티드의 분석적 분리 및 정제는 일반적으로 이온쌍 역상 액체 크로마토그래피(IP-RPLC) 및 음이온 교환 크로마토그래피를 이용해 수행됩니다^{2,4}.

음이온 교환 정제 분획물(fraction)은 일반적으로 고농도의 염(예: 염화나트륨(NaCl) 또는 브롬화 나트륨(NaBr))을 포함하고 있습니다. IP-RPLC를 이용하여 이러한 분획물(fraction)을 분석할 경우, 높은 염 수준은 이온 쌍에 참여하는 올리고뉴클레오티드의 능력을 저하시켜서 머무름 시간, 피크 분할 및 breakthrough의 변화가 발생합니다⁵. 음이온 교환 정제 분획물(fractions)에 대해 성공적인 IP-RPLC 분석이 가능하도록 하려면 분석⁵ 전에 시료를 탈염해야 하며, 보통 수작업으로 이루어집니다.

이 응용 자료는 올리고뉴클레오티드 합성 후 얻어진 음이온 교환 정제 분획물(fraction)에 비교해 고염 함량 용액에서 올리고뉴클레오티드에 대한 직접 2D-LC 분석을 보여줍니다. 2D-LC 분석의 1D는 2D에서 IP-RPLC 분석 전에 온라인 탈염에 사용됩니다. 이 설정에서, 2D-LC를 적용하면 시간을 절약하고 수동 시료 전처리가 불필요합니다. 수동 시료 전처리 단계를 피하면 재현성을 개선하고 시료 전처리 중 시료 손실을 방지할 수 있습니다.

실험

기기

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC 시스템은 다음 모듈로 구성되었습니다.

- 두 개의 Agilent 1290 Infinity 고속 펌프(G7120A)
- 냉각기(옵션 #100) 장착 Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167B)
- 두 개의 Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostats(G7116B)
- Max-Light 카트리지가 셀 10mm(G4212-60008)를 포함한 두 개의 Agilent 1290 Infinity II Diode Array 검출기(G7117B)
- 2D-LC 밸브, active solvent modulation(G4243A)을 포함한 Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A)
- 40µL 루프가 장착된 multiple heart-cutting 밸브(G4242-64000)를 포함한 두 개의 Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A)

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition 버전 C.01.08 [210]와 2D-LC 소프트웨어 버전 A.01.04 SR1.

컬럼

- Agilent PLRP-S 100 Å, 2.1 × 50mm, 3µm(p/n PL1912-1300)
- Agilent AdvanceBio Oligonucleotide, 2.1 × 50mm, 2.7µm(p/n 659750-702)

화학 물질

모든 용매는 LC 등급을 사용했으며 메탄올은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구매했습니다. 신선한 초순수는 Millipak 0.22µm의 membrane point-of-use cartridge를 장착한 Ultrapure Lab Water System(Millipore, Merck(Darmstadt, Germany))에서 얻었습니다. Ammonium acetate 및 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanole(HFIP)는 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구매했습니다. Triethylamine(TEA) 및 암모니아 용액은 각각 Fluka(Steinheim, Germany) 및 VWR(Darmstadt, Germany)에서 입수했습니다.

시료 및 시료 전처리

올리고뉴클레오티드 분석 표준물질, RNA, DNA 시료는 물에 용해되었습니다. 생성되는 고농도 용액은 물이나 2M NaCl 용액으로 1:1 추가 희석되어 물과 1M NaCl 에에서 동일 농도의 올리고뉴클레오티드를 가진 용액이 얻어졌습니다. 1M NaCl 에서 올리고뉴클레오티드 용액은 많은 염을 포함하는 음이온 교환 정제 분획물(fractions)을 모으기 위해 전처리되었습니다.

다음 절차는 1M NaCl 용액에서 NMWCO 의 3 kDa(Millipore, Merck(Darmstadt, Germany))를 가진 Microcon YM-3 원심분리 필터를 이용한 수동 탈염에 사용되었습니다.

- 1M NaCl에서 올리고뉴클레오티드 용액(200µL)은 시료 저장 용기로 이전되었으며 올리고뉴클레오티드를 농축하고 염을 용출하기 위해 14,000g 로 30분 동안 원심분리했습니다.
- 세척을 위해, 200µL의 물을 시료 저장 용기에 넣고 14,000g로 30분 동안 원심분리했습니다.

- 결과로 생성되는 세척된 농축물은 시료 저장 용기를 바이알에 뒤집어 놓고 1,000g에서 3분 동안 원심분리하여 깨끗한 바이알로 이전했습니다.
- 농축물은 물을 이용해 약 200µL로 재용해되었습니다.

올리고뉴클레오티드 분석 표준물질(p/n 5190-9028):

14mer: rCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

17mer: rUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

20mer: rUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

21mer: rGrUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

RNA 시료(RNA/2'-OMethyl mix; Agilent NSAD에 의해 합성):

5'-GuGcCaAcCuGaUgCaGcU-3', 대문자: RNA, 소문자: OMethyl

DNA 시료(완전 티올화, Agilent NSAD에 의해 합성):

5'-ugcaCCCTGGATACCauuu-3', 대문자: DNA, 소문자: OMethyl

분석법

1차원 분석

파라미터	값	
컬럼	AdvanceBio Oligonucleotide, 2.1 × 50mm, 2.7µm	
용매	A) 물에서 400mM HFIP + 15mM TEA B) 용매 A/메탄올(50:50 v:v)	
Gradient	올리고뉴클레오티드 분석 표준물질: 0분 – 16%B 7분 – 30%B 13분 – 34%B 14분 – 100%B 정지 시간: 18분 포스트 타임: 3분	RNA 및 DNA 시료: 0분 – 16%B 10분 – 70%B 10.5분 – 100%B 정지 시간: 14.5분 포스트 타임: 3분
유량	0.4 mL/min	
온도	60°C	
검출	260/4nm, 참조 360/100nm, 20Hz	
주입	주입량: 5µL 시료 온도: 10°C 니들 세척: water:acetonitrile(90:10)에서 3초	

2D-LC 분석

1차원			
컬럼	PLRP-S, 2.1 × 50mm, 3μm		
용매	A) 물에서 50mM 아세트산암모늄, 암모니아를 이용해 pH 7로 조정 B) 메탄올		
Gradient	0분 - 2%B 2분 - 2%B 3분 - 70%B 5분 - 70%B 5.1분 - 2%B 이 기울기는 carryover를 최소화하기 위해 세 번 반복되었습니다. 정지 시간: 19분 포스트 타임: 오프 정지 시간과 포스트 타임은 2D 펌프에서 설정되어 모든 cuts의 2D 분석을 완료할 때까지 실행 시간을 연장할 수 있습니다.		
유량	0.4 mL/min		
온도	60°C		
검출	260/4nm, 참조 360/100nm, 20Hz 밸브 전환으로 발생하는 압력 펄스로부터 흐름 셀을 보호하기 위해 압력 배출 키트(G4236-60010)가 1D DAD와 2D-LC 밸브 사이에 설치되었습니다.		
주입	주입량: 5μL 시료 온도: 10°C 니들 세척: water:acetonitrile(90:10)에서 3초		
2차원			
컬럼	AdvanceBio Oligonucleotide, 2.1 × 50mm, 2.7μm		
용매	A) 물에서 400mM HFIP + 15mM TEA B) 용매 A/메탄올(50:50 v:v)		
온도	60°C		
검출	260/4nm, 참조 360/100nm, 20Hz		
2D-LC			
2D-LC 모드	Heart-cutting		
유량	0.4 mL/min		
샘플링 표	1D 크로마토그램을 참조 크로마토그램으로 이용하여 시간 기준 heart-cutting이 설정되었습니다. 올리고뉴클레오타이드 분석 표준물질: 2.79분 RNA 시료: 2.88분 DNA 시료: 3.04분		
ASM	ASM 모세관: 5500-1300(0.12 × 85mm) ASM 지원(ASM 인수: 5) 샘플 루프를 3.0회(1.54분) 플러시		
2D 변화도	<table border="0"> <tr> <td> 올리고뉴클레오타이드 분석 표준물질: 0.00분 - 10%B 1.54분 - 10%B 1.55분 - 16%B 8.55분 - 30%B 14.55분 - 34%B 15.55분 - 100%B 2D 변화도 정지 시간: 19.55분 2D 주기 시간: 22.55분 </td> <td> RNA 및 DNA 시료: 0.00분 - 10%B 1.54분 - 10%B 1.55분 - 16%B 11.55분 - 70%B 12.05분 - 100%B 2D 변화도 정지 시간: 16.05분 2D 주기 시간: 19.05분 </td> </tr> </table>	올리고뉴클레오타이드 분석 표준물질: 0.00분 - 10%B 1.54분 - 10%B 1.55분 - 16%B 8.55분 - 30%B 14.55분 - 34%B 15.55분 - 100%B 2D 변화도 정지 시간: 19.55분 2D 주기 시간: 22.55분	RNA 및 DNA 시료: 0.00분 - 10%B 1.54분 - 10%B 1.55분 - 16%B 11.55분 - 70%B 12.05분 - 100%B 2D 변화도 정지 시간: 16.05분 2D 주기 시간: 19.05분
올리고뉴클레오타이드 분석 표준물질: 0.00분 - 10%B 1.54분 - 10%B 1.55분 - 16%B 8.55분 - 30%B 14.55분 - 34%B 15.55분 - 100%B 2D 변화도 정지 시간: 19.55분 2D 주기 시간: 22.55분	RNA 및 DNA 시료: 0.00분 - 10%B 1.54분 - 10%B 1.55분 - 16%B 11.55분 - 70%B 12.05분 - 100%B 2D 변화도 정지 시간: 16.05분 2D 주기 시간: 19.05분		

결과 및 토의

그림 1은 물(그림 1A) 및 1M NaCl(그림 1B)에서 올리고뉴클레오타이드 분석 표준물질의 1차원 IP-RPLC 분석을 보여줍니다. 그림 1B는 주입된 올리고뉴클레오타이드 용액에서 높은 염 수준이 이온 쌍에 참여하는 올리고뉴클레오타이드의 능력을 저하시켜서, 큰 주입 피크로부터 보이는 바와 같이 피크의 splitting 및 breakthrough에 이르게 된다는 점을 명확하게 보여줍니다.

1M NaCl에서 원심분리 필터를 이용한 올리고뉴클레오타이드 분석 표준물질의 수동 탈염은 그림 2에 나오는 탈염된 올리고뉴클레오타이드 용액의 IP-RPLC 분석에서 보이는 바와 같이 피크의 splitting과 breakthrough를 방지합니다. 그러나 수동 탈염은 노동 집약적인 작업이며 원심분리 필터를 이용해야 약 75분이 걸립니다. 게다가, 수동 탈염 후 개별 올리고뉴클레오타이드의 세기 비율에 변화가 관찰되며, 이는 더 작은 올리고뉴클레오타이드의 부분적 손실을 일으킬 가능성이 높습니다.

1290 Infinity II 2D-LC 시스템과 active solvent modulation을 이용한 Heart-cutting 2D-LC를 통해 높은 염 함량을 가진 용액에서 올리고뉴클레오타이드의 직접 분석이 가능합니다. 2D-LC 분석의 1D는 온라인 탈염에 사용되고 2D에서 IP-RPLC 분석이 이어집니다

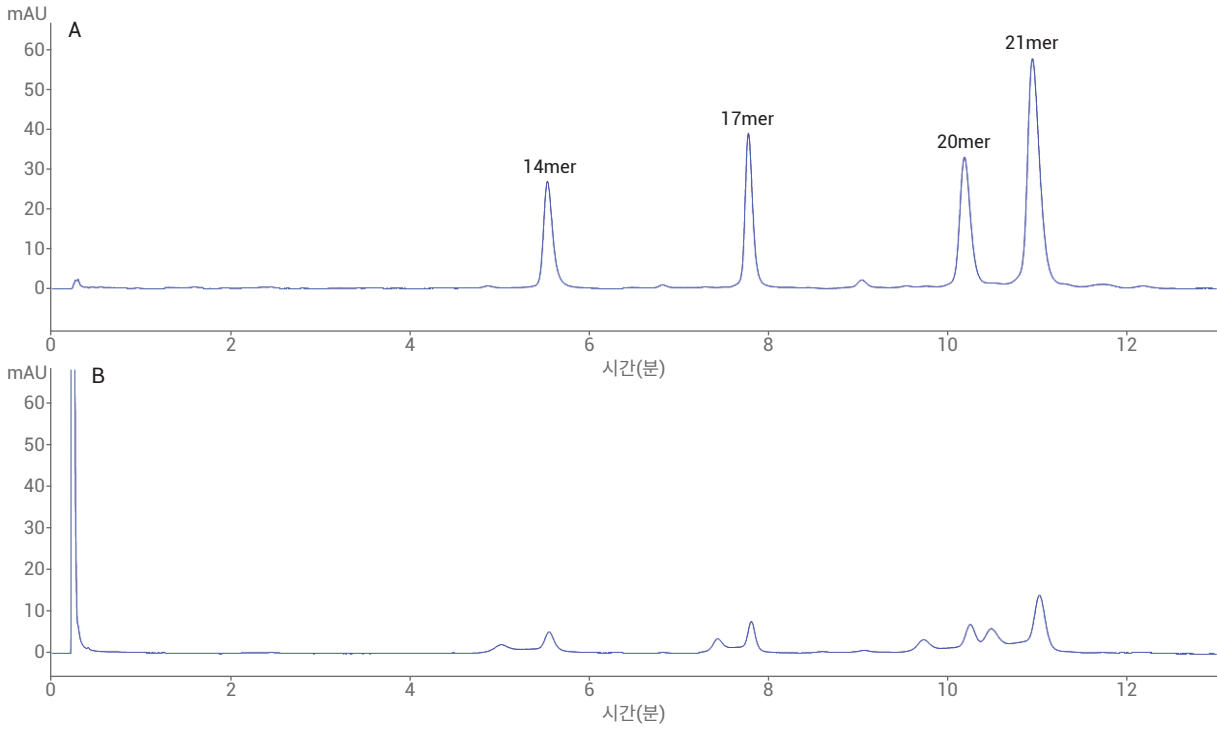


그림 1. 올리고뉴클레오티드 분석 표준물질의 1차원 IP-RPLC 분석; (A) 물에서 올리고뉴클레오티드 분석 표준물질; (B) 1M NaCl에서 올리고뉴클레오티드 분석 표준물질; blank run subtraction에서 얻어진 크로마토그램

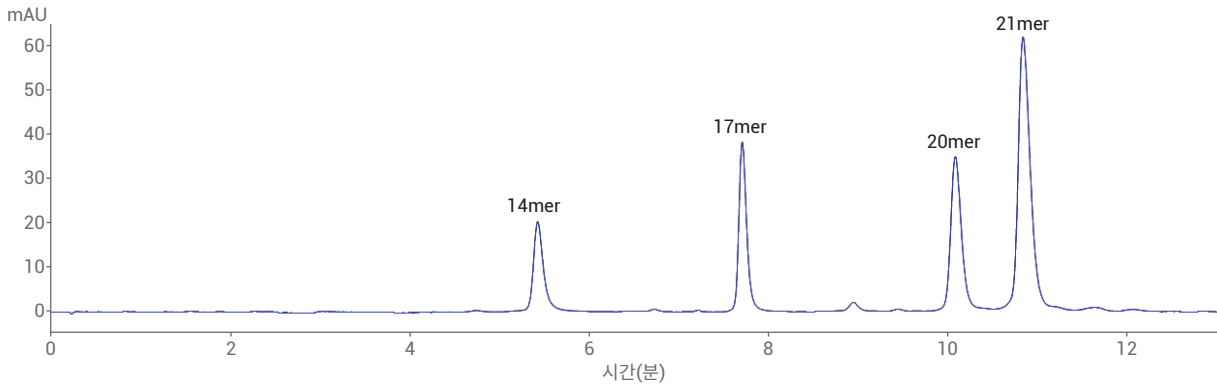


그림 2. 원심분리 필터를 이용한 수동 탈염 후 1M NaCl에서 올리고뉴클레오티드 분석 표준물질의 1차원 IP-RPLC 분석; blank run subtraction 후에 얻어진 크로마토그램

그림 3과 4는 각각 물과 1M NaCl에서 올리고뉴클레오타이드 분석 표준물질의 분석을 보여줍니다. ¹D에서, 올리고뉴클레오타이드는 염이 폐기물용출되는 동안 PLRP-S 컬럼에

효과적으로 보존됩니다. 그런 다음 올리고뉴클레오타이드가 ¹D로부터 단일 피크로 용출되고 ²D IP-RPLC 분석으로 이전됩니다. ²D에서 올리고뉴클레오타이드의 성공적인 IP-RPLC 분석이 이루어졌습니다.

2D-LC 분석은 그림 3과 4(6회 연속 실행의 머무름 시간과 면적 정밀도)에 덧붙인 것과 같이 ¹D 및 ²D 분리 모두에서 양호한 머무름 시간을 보여줍니다.

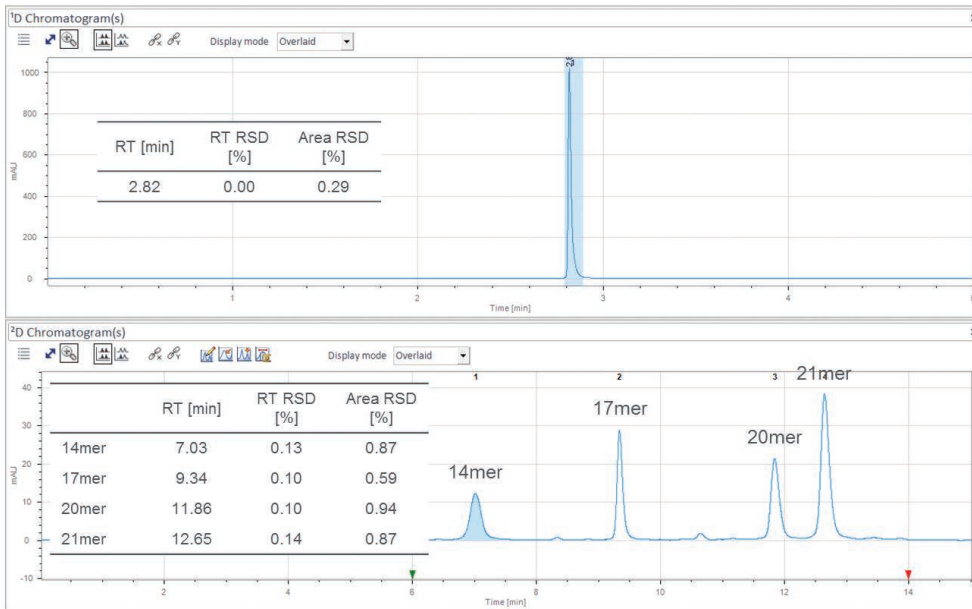


그림 3. 물에서 올리고뉴클레오타이드 분석 표준물질의 2D-LC 분석; A) ¹D 크로마토그램; B) ²D 크로마토그램; 6회 연속 실행 후 머무름 시간 및 면적 정밀도; blank run subtraction 후 얻어진 크로마토그램

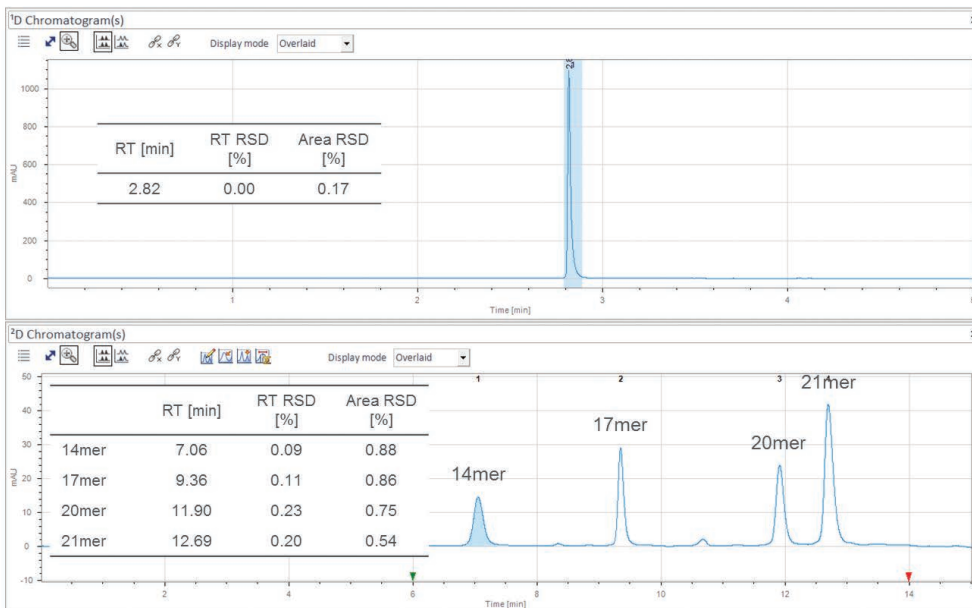


그림 4. 1M NaCl에서 올리고뉴클레오타이드 분석 표준물질의 2D-LC 분석; A) ¹D 크로마토그램; B) ²D 크로마토그램; 6회 연속 실행 후 머무름 시간 및 면적 정밀도; blank run subtraction 후 얻어진 크로마토그램

1차원 IP-RPLC 분석법에 비교해, 1D에서 온라인 탈염 및 2D에서 IP-RPLC로 이루어진 2D-LC 분석법은 약 4.5분이 더 길지만 시료 전처리가 필요하지 않습니다. 그러나 1차원 IP-RPLC 분석에 필요한 수동 탈염은 약 75분이 걸립니다. 시료 전처리와 시료의 분석에 필요한 시간을 고려할 때, 2D-LC 분석법은 주어진 프로토콜에 대해 필요 시간을 약 96분에서 26분으로 단축합니다. 이는

워크플로 속도가 세 배 증가하는 것과 같습니다. 게다가, 2D-LC 분석법은 시료 전처리 필요성을 줄여 수작업이 줄어듭니다.

그림 5와 6은 각각 RNA 시료와 DNA 시료의 1차원 IP-RPLC 분석을 보여줍니다. 1M NaCl에 RNA 시료를 주입할 때, 그림 5B의 관찰된 피크 분할 및 breakthrough 에서 보이는 바와 같이 높은 염 함량이

올리고뉴클레오티드가 이온 쌍에 참여하는 능력을 저하시킵니다. 1M NaCl에서 RNA 시료의 수동 탈염을 통해 IP-RPLC 분석에 성공할 수 있습니다(그림 5C). 1M NaCl에서 DNA 시료의 경우, 주입된 용액의 높은 염 수준의 효과가 더 적었고 여기서는 작은 breakthrough 피크만 관찰되었습니다(그림 6B).

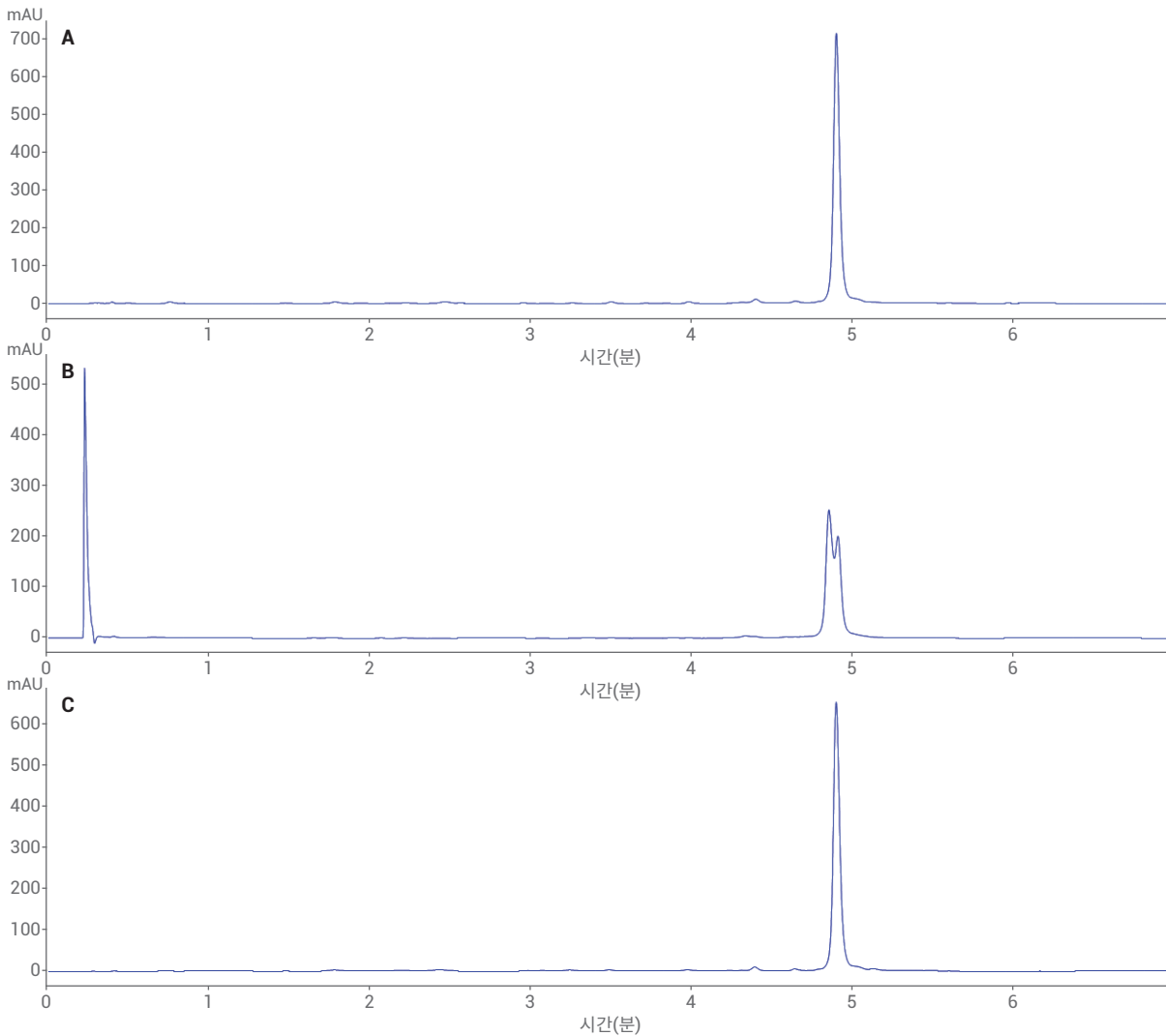


그림 5. RNA 시료의 1차원 IP-RPLC 분석; A) 물에서 RNA 시료; B) 1M NaCl에서 RNA 시료; C) 1M NaCl에서 원심분리 필터를 이용한 수동 탈염 후 RNA 시료; blank run subtraction 후 얻어진 크로마토그램

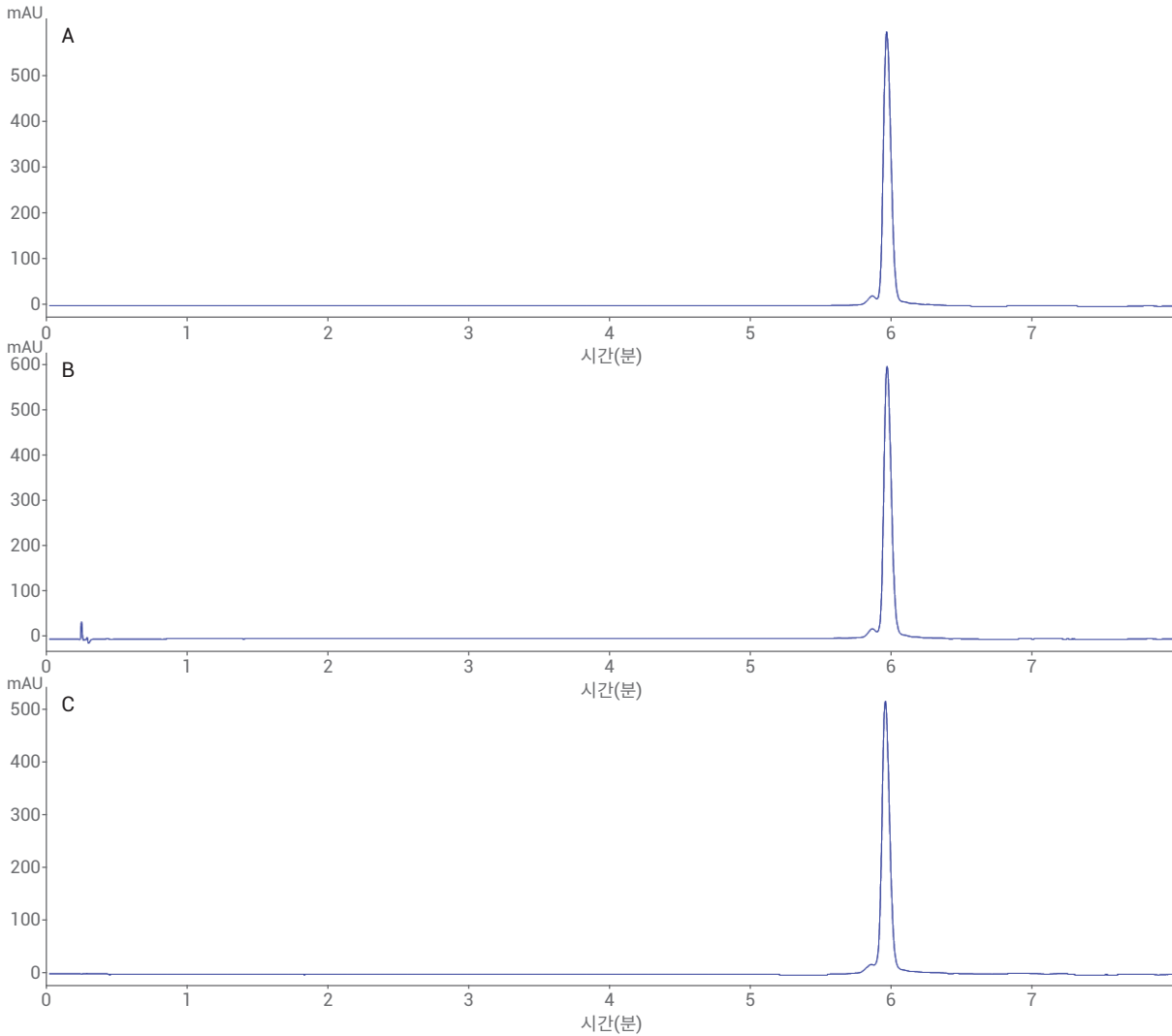


그림 6. DNA 시료의 1차원 IP-RPLC 분석; A) 물에서 DNA 시료; B) 1M NaCl에서 시료; C) 1M NaCl에서 원심분리 필터를 이용한 수동 탈염 후 DNA 시료; blank run subtraction 후 얻어진 크로마토그램

그림 7과 8은 각각 1M NaCl에서 RNA 시료와 DNA 시료의 직접 2D-LC 분석을 보여줍니다. RNA 및 DNA의 효과적인 머무름 및 탈염은 ¹D에 이어진 ²D에서 성공적인 IP-RPLC 분석에 의해 달성됩니다. ²D에서, 주 화합물로부터 여러 불순물의

분리가 관찰되었으며, 베이스라인에 가까운 확대를 보여주는 그림 7과 8의 ²D 크로마토그램에 덧붙인 그래프에서 확인할 수 있습니다. 기본 피크의 피크 면적과 1M NaCl에서 RNA 및 DNA 시료의 2D-LC 분석 후 획득한 검출된 불순물을 기초로 두 시료에

대해 약 96%의 순도를 계산할 수 있습니다. 이 값은 원심분리 필터를 이용한 수동 탈염 후 1차원 분석으로부터 동일한 방식으로 계산할 수 있는 순도와 일치합니다.

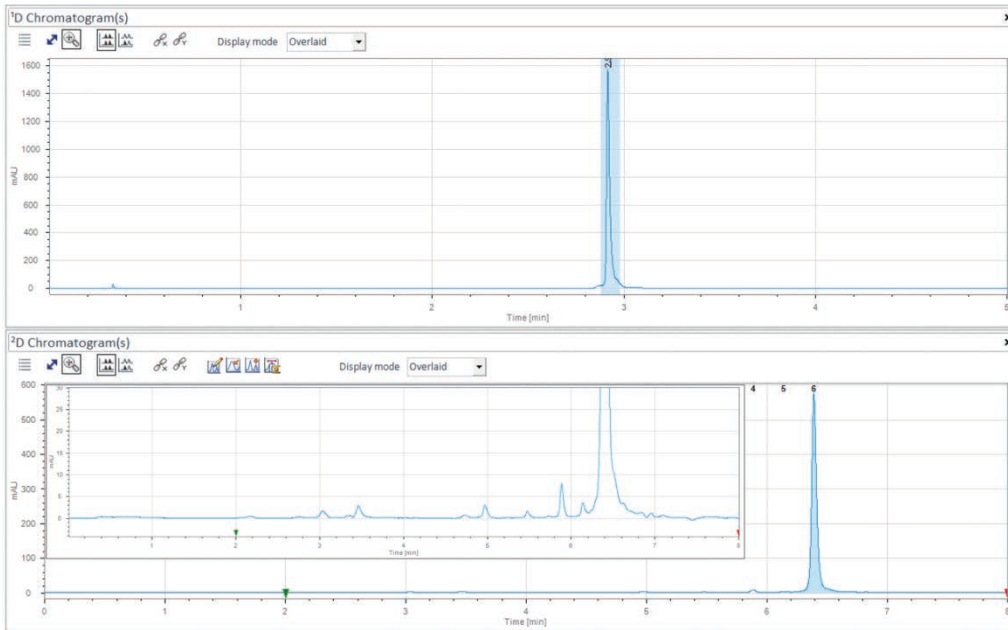


그림 7. 1M NaCl에서 RAN 시료의 2D-LC 분석; A) ^1D 크로마토그램; B) ^2D 크로마토그램, ^2D 크로마토그램 내의 삽화는 베이스라인 가까이 확대된 것을 보여줍니다; blank run subtraction 후 얻어진 크로마토그램

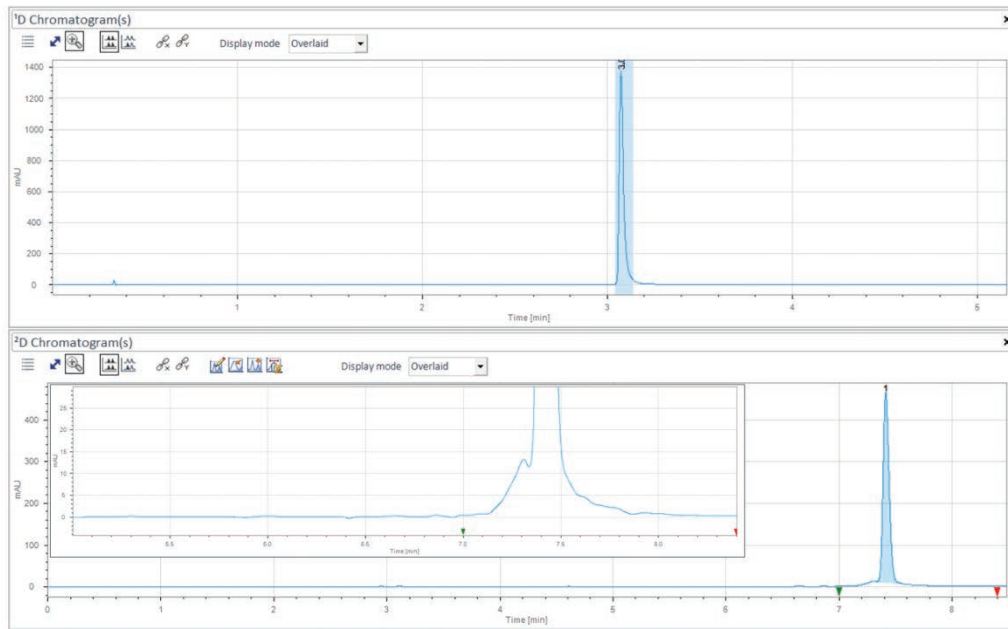


그림 8. 1M NaCl에서 DNA 시료의 2D-LC 분석; A) ^1D 크로마토그램; B) ^2D 크로마토그램, ^2D 크로마토그램 내의 삽화는 베이스라인 가까이 확대된 것을 보여줍니다; blank run subtraction 후 얻어진 크로마토그램

결론

1290 Infinity II 2D-LC 시스템과 active solvent modulation을 이용한 Heart-cutting 2D-LC를 이용하면 올리고뉴클레오티드 합성 후 얻어진 음이온 교환 정제 분획물(fraction)과 같이 높은 염 함량을 가진 용액에서 올리고뉴클레오티드의 직접 분석이 가능합니다. 1D에서 효과적인 온라인 탈염은 2D에서 IP-RPLC 분석에 의해 완료됩니다. 원심분리 필터를 이용한 수동 탈염 후 1차원 IP-RPLC 분석에 비교해 2D-LC 분석법을 이용하면 워크플로 속도를 세 배 이상 높일 수 있습니다. 추가로, 시료를 전처리할 필요가 없어 수작업이 줄어듭니다.

참고문헌

1. Mangano; *et al.* Composition dependent separation of oligonucleotides by capillary electrophoresis in acidic buffers with application to the quality control of synthetic oligonucleotides. *Journal of Chromatography A*, **1999**, *848*, 435–442.
2. Zimmermann; *et al.* Synthetic oligonucleotide separations by mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **2014**, *1354*, 43–55.
3. Mustonen; *et al.* Oligonucleotide-based pharmaceuticals: Non-clinical and clinical safety signals and non-clinical testing strategies, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2017**, *90*, 328–341.
4. Shanagar. Purification of a synthetic oligonucleotide by anion exchange chromatography: Method optimization and scale-up, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2005**, *64*, 216–225.
5. Cramer, F.; Herzberg. Purity Analysis and Impurities Determination by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, In: *Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products*; Bonilla and Srivatsa, eds.; CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, **2011**, 28–34.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 6월 1일, 한국에서 인쇄
5991-9490KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr