

Agilent LC/MSD XT および OpenLab CDS を用いた オリゴヌクレオチドの分子量確認



著者

Lee Bertram and Brian Rivera
Agilent Technologies, Inc.

概要

質量分析（MS）技術は、合成オリゴヌクレオチドの開発における品質管理の重要なツールです。このアプリケーションノートでは、Agilent OpenLab CDS 2.8、Agilent LC/MSD XT シングル四重極 LC/MS および MS スペクトルデータのデコンボリューション機能を使用した、合成オリゴヌクレオチドの分子量（MW）確認と簡単な特性解析ワークフローを示します。

はじめに

オリゴヌクレオチドは、標的の相補配列に基づいてヌクレオチドを組み込む段階的合成であるホスホルアミダイト法を用いて製造される短い核酸配列です。アプリケーションによっては、合成オリゴヌクレオチドは著しく修飾されます。これらの修飾は、核酸塩基、リボースまたはデオキシリボースに生じ、さらにはホスホロチオエートによる硫化を考慮するとリン酸骨格でも生じる可能性があります。そのため、リード開発などの中〜高スループットのアプリケーションでは特に、full-length product (FLP, 全長生成物) の分子量を確認する必要があります。

オリゴヌクレオチドの分子量測定は、特に不純物の特性解析と同定が必要な場合は、高分解能の精密質量測定を用いてよく行われます。ただし、シングル四重極質量分析計などのユニット質量検出器を使用すれば、意図した配列を確認するのに十分な精度で迅速に結果を得ることができます。

このアプリケーションノートでは、LC/MSを使用した分子確認ワークフローを実証する目的で、poly dT ラダーおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を含むオリゴヌクレオチド標準を分析しました。さらに、LC/MSD XT シングル四重極 LC/MS およびスペクトルデータのデコンボリューション機能を使用して基本的な特性解析を実行しました。

実験

試薬および標準試料

Agilent DNA ラダー標準 (部品番号 5190-9029)。完全にチオール化された合成オリゴヌクレオチドは、Integrated DNA Technologies (コーラルビル、アイオワ州、米国) から購入しました。

サンプル前処理法

オリゴヌクレオチドラダー標準を、使用前に 1 mL の脱イオン (DI) 水で溶解しました。最終濃度は 4 nmol/μL でした。

すべての合成オリゴヌクレオチドサンプルも、1 mL の DI 水で溶解しました。さらにサンプルを 50 μg/mL に希釈しました。

使用装置

Agilent エレクトロスプレーイオン化 (ESI) ソース (G1948B) を備えた LC/MSD XT (G6135C) を使用して、オリゴヌクレオチドサンプルを分析しました。この分析には、Agilent 1290 Infinity II BioLC または不動態化された Agilent 1290 Infinity II LC を使用できます。分析に適用した LC のパラメータを表 1 に、MS パラメータを表 2 に示します。

メソッド

液体クロマトグラフィー

表 1. Agilent 1290 Infinity II LC メソッド

Agilent 1290 Infinity II		
パラメータ	設定値	
カラム	Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラム、2.1 × 50 mm、2.7 μm (部品番号 659750-702)	
サンプリング温度	4 °C	
移動相 A	100 mM HFIP, 15 mM TEA 水溶液	
移動相 B	メタノール	
流量	0.5 mL/min	
注入量	2 μL	
カラム温度	65 °C	
グラジエントプログラム	時間 (min)	%B
	0.0	15
	10.0	30
	11	95

質量分析

表 2. Agilent LC/MSD XT メソッド

Agilent LC/MSD XT (G6135C)	
パラメータ	設定値
イオン源	AJS
極性	ネガティブ
乾燥ガス温度	275 °C
ガス流量	12 L/min
ネブライザ圧力	35 psi
キャピラリー電圧	4,500 V
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	12 L/min
ノズル電圧	2,000 V
スキャン範囲	1,000 ~ 3,000 m/z プロファイル
スキャン時間	1,500 ms
フラグメンタ電圧	175 V

ソフトウェア

MS スペクトルデータのデコンボリューション機能を備えた OpenLab CDS 2.8 を使用して LC/MS 機器を操作し、オリゴヌクレオチド分析を行いました。OpenLab CDS でスペクトルデータのデコンボリューションに使用されるアルゴリズムは、ユニット質量分析計から得られる多重荷電分子のスペクトルを単純化するために最適化されています。マスペクトルが高品質であれば、パラメータの調整は最小限で済みます。表 3 に、ターゲット化合物に対して設定したパラメータを示します。MW アルゴリズム、MW アルゴリズムスレッショールド、エンベロープスレッショールドなどの詳細設定を、15 ～ 40 mer のオリゴに対して最適化しました。

結果と考察

オリゴはエレクトロスプレーイオン化中に高電荷状態（多価イオン）になることが多く、LC/MS 分析や分子量確認のワークフローが複雑になるおそれがあります。例えば、21 mer（図 1）は、8 または 9 価が最も支配的な幅広い電荷分布を示す可能性があります。結果として得られるマスペクトルも非ガウス型になる場合があり、広い分布となって低い m/z 値での干渉と重なる可能性があります。さらに、移動相やオリゴヌクレオチド長、配列が荷電状態分布に影響を与える可能性があるため、日常的なテストに LC/MS メソッドを導入する前に分子の挙動を経験的に決定することが重要になります^{1,2}。

このような理由から、Agilent DNA ラダーなどの適切な標準を使用して取り込みメソッドを最適化する必要があります。テスト混合物にはさまざまな長さのオリゴヌクレオチド（15、20、25、30、35 mer）が含まれているため、この標準を使用してメソッドの性能を評価することで、LC/MS メソッドがさまざまな種類のオリゴに対応できることが保証されます。

ソフトウェア

表 3. DNA ラダー標準に対する Agilent OpenLab CDS スペクトルデータのデコンボリューション処理メソッド

パラメータ	設定値
スペクトル抽出タイプ	ピーク頂点スペクトル
バックグラウンドモード	ピークの開始と終了のスペクトル
使用 m/z 範囲	無効
低分子量	4,000
高分子量	13,000
最大電荷	40
セット中の最小ピーク	4
MW の一致度 (0.01 %)	5
絶対ノイズスレッショールド	1,000
相対アバンダンススレッショールド (%)	15
MW アルゴリズム	カーブフィット
MW アルゴリズムスレッショールド	40
エンベロープスレッショールド	10

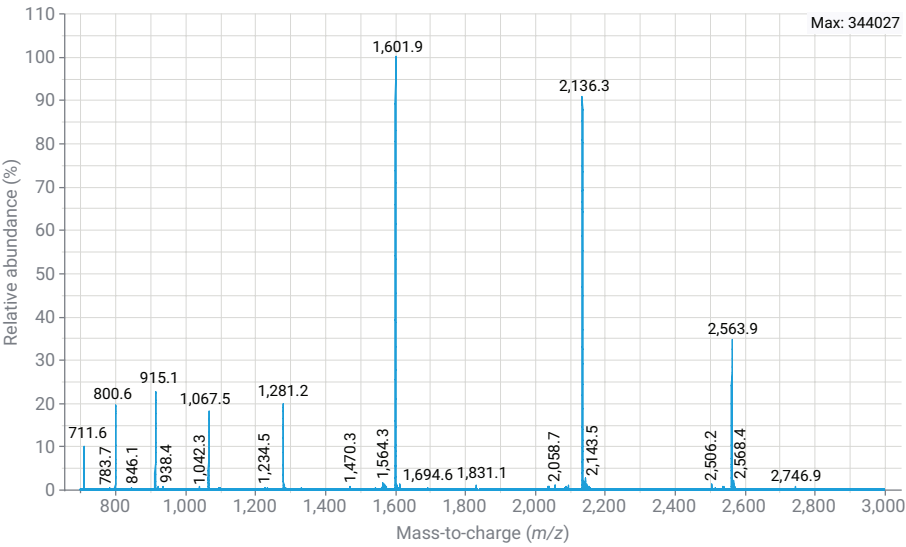


図 1. 21 mer DNA オリゴヌクレオチドのマスペクトル

これはソースおよび移動相に大きく依存しますが、一般に、オリゴヌクレオチドが長くなると、より広い分布を持つより高い電荷状態をとります。図 2 は、poly dT ラダーの例と、各オリゴヌクレオチドで観察された電荷状態分布の違いを示したものです。15 mer poly dT オリゴヌクレオチドは主に 1 つの主要な電荷状態 (m/z 1,499.3 で $z = 3$) を持ちますが、40 mer は 5 ~ 13、750 ~ 2,500 m/z の範囲にかなり多くの電荷状態を持ちます。LC/MSD XT は上限質量範囲が、より大きな分子種の検出に対応する 3,000 m/z となっており、幅広いオリゴヌクレオチドに最適です。

さらに、データ解析処理メソッドも、さまざまな長さで配列のオリゴの多様な電荷エンベロップに対応できるように最適化する必要があります。表 4 に示すデコンボリューションの結果は、異なる長さのオリゴヌクレオチドに対して、同じデータ解析パラメータがどのように用いられるかを示しています。セット内の最小ピークとエンベロップスレッショールド (%) はいずれも、それぞれ電荷状態と分布の分散に対応するように最適化しました。オリゴヌクレオチドのデコンボリュートされた質量は少なくとも ± 1 ダルトン以内でした。これは分子量が異なるオリゴヌクレオチドのユニット質量検出で予想される程度のものです。

DNA ラダー標準に使用される設定は、多くの種類のサンプルを分析する場合に適しているとはいえ、処理メソッドの最適化が必要な場合があります。これは、予期しない分離ピークやスペクトルの異常が観察された場合に、状況に応じた予備特性解析を実行するなど、日常的なテストから逸脱がある場合に有用です。

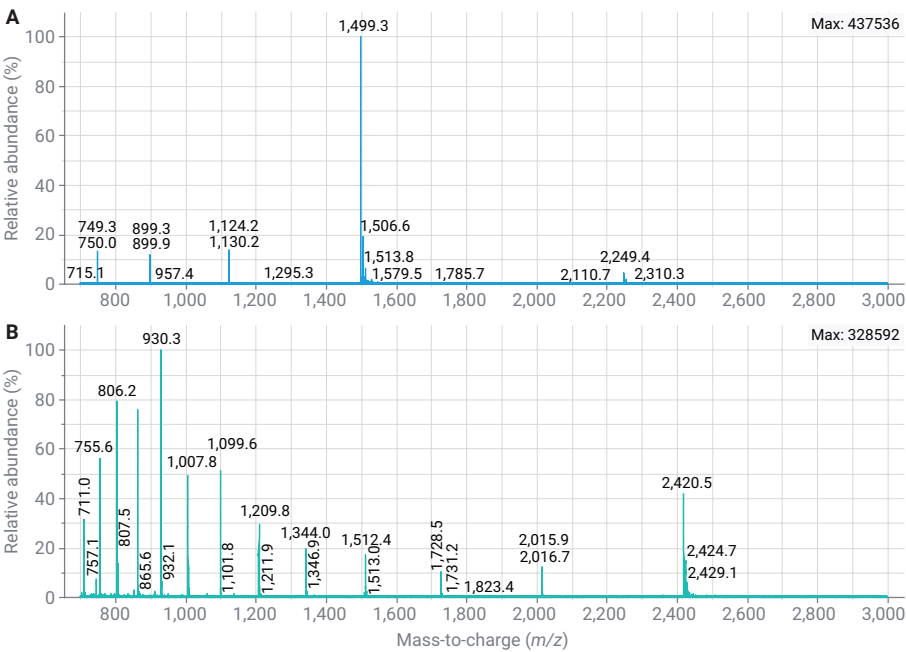


図 2. 15 mer DNA オリゴ (A) と 40 mer DNA オリゴ (B) のマススペクトルの比較。
一般により長いオリゴヌクレオチドはより高い電荷状態を持ち、より広い電荷状態分布を持ちます。
これは、イオン源と移動相/注入溶媒の両方に依存します。

表 4. DNA ラダーのデコンボリューション結果

サンプル名	スペクトル RT (min)	算出質量 (Da)	実験で得られた質量 (Da)	Δ 質量 (Da)	質量精度 (ppm)
15 mer	2.38	4,501.0	4,501.0	0.0	9
20 mer	3.594	6,022.0	6,022.0	0.1	11
25 mer	4.387	7,543.0	7,543.6	0.6	84
30 mer	4.924	9,063.9	9,064.5	0.5	59
35 mer	5.274	10,584.9	10,585.5	0.5	51
40 mer	5.554	12,105.9	12,106.8	0.9	76

18 mer および 20 mer ASO のデコンボリューションでは、ターゲット質量範囲を 6,000 ～ 8,000 MW に狭めて解析しました。他のパラメータはすべて表 3 と同様です。これにより、全長生成物だけでなく、ショートマーやロングマー不純物も適切に同定することが可能でした。デコンボリュートされた質量を表 5 に報告します。計算値と測定値の間のデルタ質量は、ユニット質量計測器の予想される性能の範囲内です。

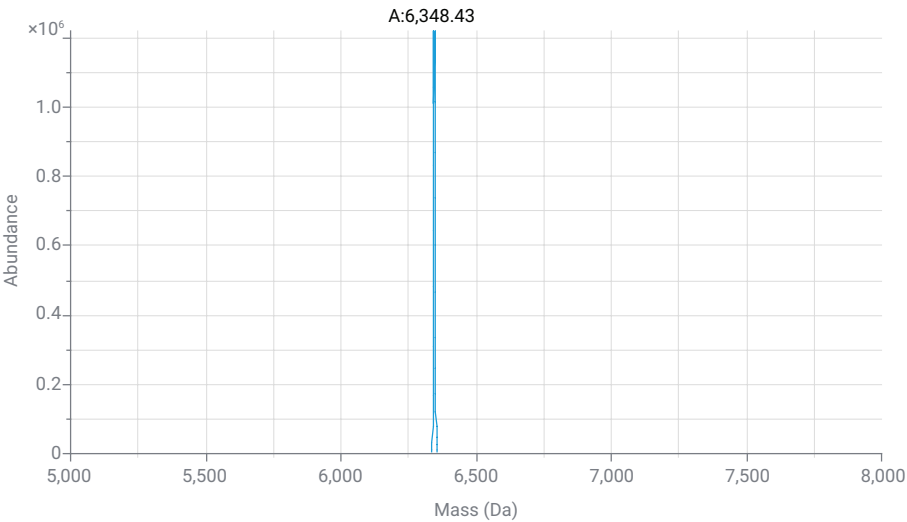


図 3. 最適化されたデコンボリューションパラメータを使用してデコンボリュートした、18 mer ASO のスペクトル

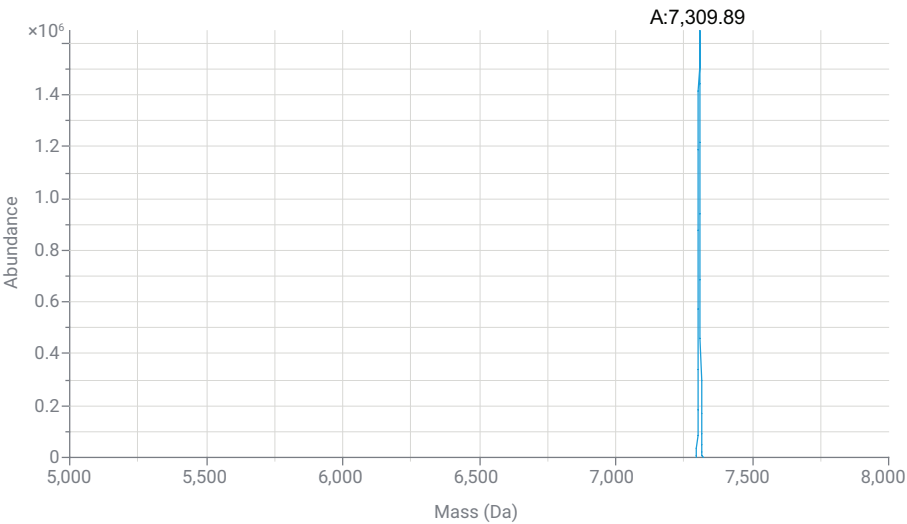


図 4. デコンボリュートした 20 mer ASO のスペクトル

表 5. 18 mer および 20 mer アンチセンスオリゴヌクレオチドのデコンボリューション結果

サンプル	シーケンス	スペクトル RT (min)	算出質量 (Da)	実験で得られた質量 (Da)	Δ 質量 (Da)	質量精度 (ppm)
18 mer	5'- U*/i2MOErC/*i2MOErA/* /i2MOErC/*U*U*U*/i2MOErC/*i2MOErA/* U*/i2MOErA/*i2MOErA/* U*/i2MOErG/*C* U*/i2MOErG/*G -3'	5.764	6348.2	6,348.4	0.2	36
20 mer	5'- U*/i2MOErC/*U* U*/i2MOErG/*T* T*/i2MOErA/*i2MOErC/* /i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErG/* /i2MOErA/*i2MOErA/*i2MOErA/* U*/i2MOErC/*i2MOErC/* /i2MOErC/*C -3'	7.280	7309.2	7,309.9	0.7	94
20 mer、n-1	NA	7.012	NA	6913.49	0.7	NA

データ解析処理メソッドが最適化されており、分離と信号強度が十分であれば、低レベルの不純物も検出可能です。図 5 は、トータルイオンクロマトグラム (TIC) において、FLP である 20 mer ASO と主成分に対しより低分子量と推定される不純物がベースライン分離していることを示しています。スペクトル抽出とデコンボリューションを実施したところ、結果 (6,913.49) からこれが確かに n-1 不純物であり、デコンボリュートされたスペクトルの絶対アビダンスからメインピークの 0.12 % であることが示されました。

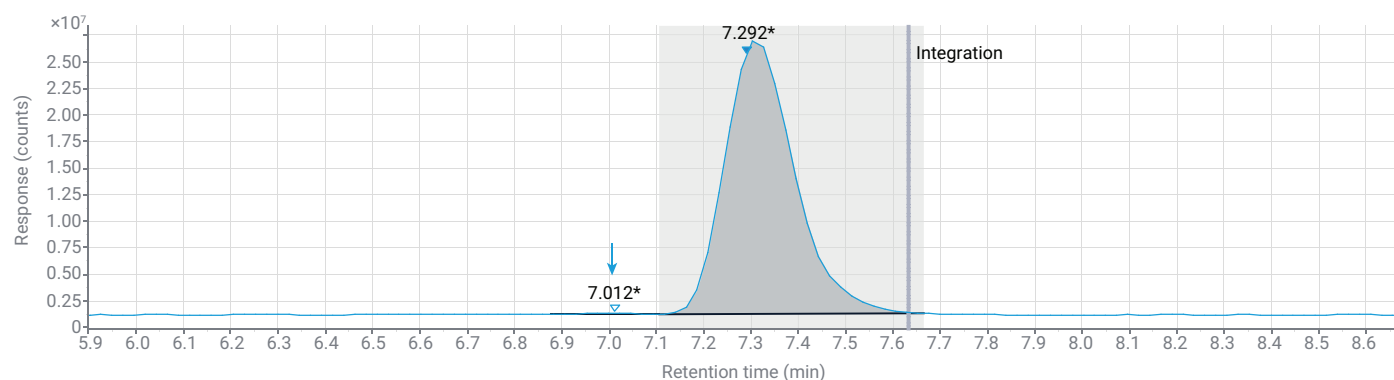


図 5. 20 mer オリゴのトータルイオンクロマトグラム (TIC)。主成分の前に溶出した不純物はマニュアル積分し、デコンボリューションのためにスペクトルを抽出しました。

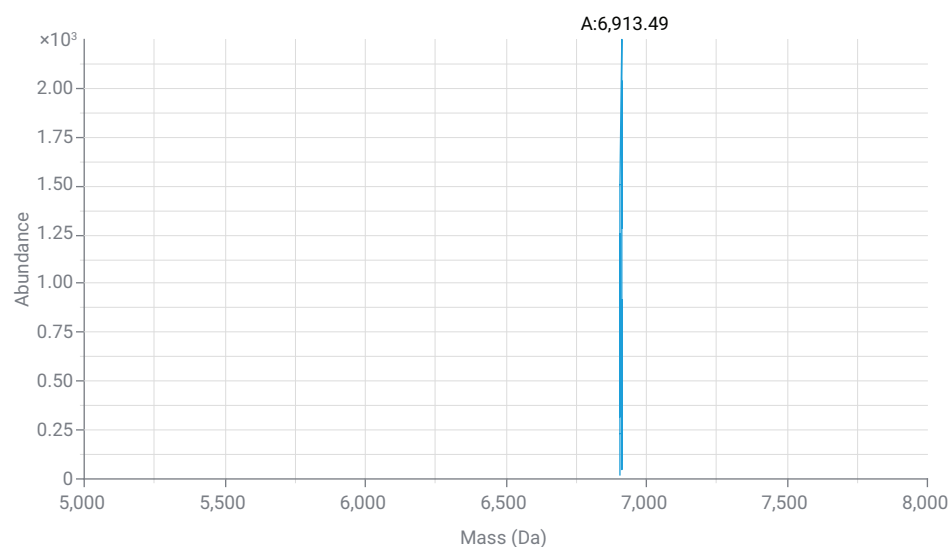


図 6. 主成分の前に溶出した不純物のデコンボリューションスペクトル。デコンボリュートした質量は 6,913.49 Da であり、これが n-1 であることを強く示しています。精密質量測定により、さらなる確認と特性解析を実施する必要があります。

結論

Agilent 1290 Infinity II LC/MSD XT と OpenLab CDS 2.8 を MS スペクトルデータのデコンボリューション機能と組み合わせて用いると、オリゴヌクレオチドの迅速な分子量確認と純度評価に役立つツールとなります。この分析ツールの組み合わせは、ユーザーフレンドリーなソフトウェアと堅牢なハードウェアを提供し、最速で答えが得られるオリゴヌクレオチド分析ワークフローを実現します。OpenLab CDS によるスペクトルデータのデコンボリューションは、DNA ラダーの分析によって実証されたように、さまざまな長さのオリゴヌクレオチドの日常的な分子量確認に使用できます。

参考文献

1. Chen, B.; Mason, S. F.; Bartlett, M. G. The Effect of Organic Modifiers on Electrospray Ionization Charge-State Distribution and Desorption Efficiency for Oligonucleotides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2013**, 24(2), 257–264. <https://doi.org/10.1007/s13361-012-0509-5>
2. Basiri, B.; Murph, M. M.; Bartlett, M. G. Assessing the Interplay Between the Physicochemical Parameters of Ion-pairing Reagents and the Analyte Sequence on the Electrospray Desorption Process for Oligonucleotides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2017**, 28(8), 1647–1656. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1671-6>

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE91792165

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, January 24, 2024

5994-7083JAJP