

Agilent LC/MSD XT 및 OpenLab CDS를 사용한 올리고뉴클레오타이드 분자 확인



저자

Lee Bertram, Brian Rivera
Agilent Technologies, Inc.

개요

질량 분석기(MS)는 합성 올리고뉴클레오타이드 개발 과정에서 품질 관리에 중요한 도구입니다. 이 응용 자료는 Agilent LC/MSD XT SQ LC/MS 및 Agilent OpenLab CDS 2.8의 MS 스펙트럼 디콘볼루션 기능을 사용하여 합성 올리고뉴클레오타이드의 분자량(MW)을 확인하고 간단한 특성 규명을 수행하는 워크플로를 소개합니다.

서론

올리고뉴클레오타이드는 표적화된 상보적 서열을 기초로 뉴클레오타이드를 통합하는 단계적 합성인 포스포라미다이트 화학을 사용해 만들어진 짧은 핵산 서열입니다. 합성 올리고뉴클레오타이드는 응용 분야에 따라 상당한 변형을 거칩니다. 이러한 변형은 핵염기, 리보스 또는 데옥시리보스, 심지어 포스포로티오에이트에 의한 황화 작용을 고려하는 경우에는 인산염 백본(backbone)에서도 발생할 수 있습니다. 따라서, 특히 리드 개발과 같이 처리량이 중간에서 높은 수준에 이르는 응용 분야에서는 전체 길이 제품의 분자량을 확인하는 것이 필요합니다.

특히 불순물의 특성 규명과 식별이 필요한 경우에 올리고뉴클레오타이드의 분자량 측정은 고분해능 accurate mass 방식으로 수행되는 경우가 많습니다. 그러나 SQ 질량 분석기와 같은 단위 질량 검출기를 사용하면 의도한 서열을 확인하는 데 충분한 정확도로 신속한 결과를 제공할 수 있습니다.

이 응용 자료에서는 폴리 dT 래더 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)를 포함한 올리고뉴클레오타이드 표준물질을 분석하여 LC/MS를 사용한 분자 확인 워크플로를 시연하였습니다. 또한 LC/MSD XT SQ LC/MS 및 스펙트럼 디콘볼루션을 사용하여 기본 특성 규명을 수행하는 기능도 소개됩니다.

실험

화학 및 표준물질

Agilent DNA 래더 표준물질(제품 번호 5190-9029). 완전히 티올화된 합성 올리고뉴클레오타이드는 Integrated DNA Technologies(Coralville, IA, USA)에서 구입했습니다.

시료 전처리

올리고뉴클레오타이드 래더 표준물질은 사용 전에 1mL의 탈이온수에 용해했습니다. 최종 농도는 4nmol/μL였습니다.

분석법

액체 크로마토그래피

표 1. Agilent 1290 Infinity II LC 분석법.

Agilent 1290 Infinity II		
파라미터	값	
컬럼	Agilent AdvanceBio 올리고뉴클레오타이드 컬럼, 2.1 × 50mm, 2.7μm (p/n 659750-702)	
샘플러 온도	4°C	
이동상 A	100mM HFIP 및 15mM TEA 수용액	
이동상 B	메탄올	
유속	0.5mL/분	
주입량	2μL	
컬럼 온도	65°C	
그라디언트 프로그램	시간(분)	%B
	0.0	15
	10.0	30
	11	95

질량 분석

표 2. Agilent LC/MSD XT 분석법.

Agilent LC/MSD XT(G6135C)	
파라미터	값
이온화원	AJS
극성	음이온화
건조 가스 온도	275°C
가스 유속	12L/분
Nebulizer 압력	35psi
캐필러리 전압 양이온	4,500V
Sheath 가스 온도	350°C
Sheath 가스 유속	12L/분
노즐 전압	2,000V
스캔 범위	1,000-3,000m/z 프로파일
스캔 시간	1,500ms
Fragmentor 전압	175V

모든 합성 올리고뉴클레오타이드 샘플도 1mL의 탈이온수에 용해시켰습니다. 그 후 샘플을 50μg/mL로 희석했습니다.

기기

애질런트 전자분무 이온화(ESI) 소스 (G1948B)를 갖춘 **LC/MSD XT(G6135C)**를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 샘플을 분석했습니다. **Agilent 1290 Infinity II BioLC** 또는 부동태화된 **Agilent 1290 Infinity II LC**가 이 분석에 사용될 수 있습니다. 분석에 적용된 LC 분석법 파라미터는 표 1에, MS 파라미터는 표 2에 정리되어 있습니다.

소프트웨어

MS 스펙트럼 디콘볼루션 기능을 갖춘 OpenLab CDS 2.8을 사용하여 LC/MS 기기를 작동하고 올리고뉴클레오타이드 분석을 수행했습니다. 스펙트럼 디콘볼루션을 위해 OpenLab CDS에 사용되는 알고리즘은 단위 질량 계측에서 얻은 다중 전하 분자의 스펙트럼을 단순화하는 데 최적화되어 있습니다. 질량 스펙트럼의 품질이 높은 경우, 파라미터에 대한 최소한의 조정만 필요합니다. 표 3에는 표적 분석물질에 대해 선택된 설정이 요약되어 있습니다. MW 알고리즘, MW 알고리즘 임계값, Envelope 임계값을 포함한 고급 설정은 15mer에서 40mer 사이의 올리고뉴클레오타이드에 대해 최적화되었습니다.

결과 및 토의

올리고뉴클레오타이드는 전기분무 이온화 중에 높은 전하 상태를 나타내는 경우가 많으며, 이로 인해 LC/MS 분석 및 분자량 확인 작업 흐름이 복잡해질 수 있습니다. 예를 들어, 21mer(그림 1)는 넓은 전하 분포를 보이는 가운데, 8 또는 9 전하 상태가 가장 지배적입니다. 또한 결과 질량 스펙트럼은 낮은 m/z 값 영역에서 간섭과 중첩될 수도 있는 넓은 분포의 비 가우시안(non-Gaussian)일 수 있습니다. 또한 이동상, 올리고뉴클레오타이드 길이 및 서열은 전하 상태 분포에 영향을 미칠 수 있으므로 일상적인 테스트에 LC/MS 방법을 적용하기 전에 분자의 행태를 경험적으로 파악하는 것이 중요합니다.^{1,2}

이러한 이유로 Agilent DNA 래더와 같은 적절한 표준물질을 사용해 획득 방법을 최적화해야 합니다. 테스트 혼합물에는 다양한 길이(15, 20, 25, 30, 35mer)의 올리고뉴클레오타이드가 포함되어 있으므로 이 표준물질을 사용하여 분석법 성능을 평가하면 해당 LC/MS 분석법이 다양한 유형의 올리고뉴클레오타이드를 수용할 수 있음을 보장할 수 있습니다.

소프트웨어

표 3. DNA 래더 표준물질을 위한 Agilent OpenLab CDS 스펙트럼 디콘볼루션 처리 방법.

파라미터	값
스펙트럼 추출 유형	피크 정점 스펙트럼
백그라운드 모드	피크 시작과 끝의 스펙트럼
m/z 범위 사용	비활성화됨
저분자량	4,000
고분자량	13,000
최대 전하	40
세트의 최소 피크	4
MW Agreement(0.01%)	5
노이즈 절대 임계값 (Absolute Noise Threshold)	1,000
상대적 존재비 임계값(%)	15
MW 알고리즘	곡선 피팅
MW 알고리즘 임계값	40
Envelope 임계값	10

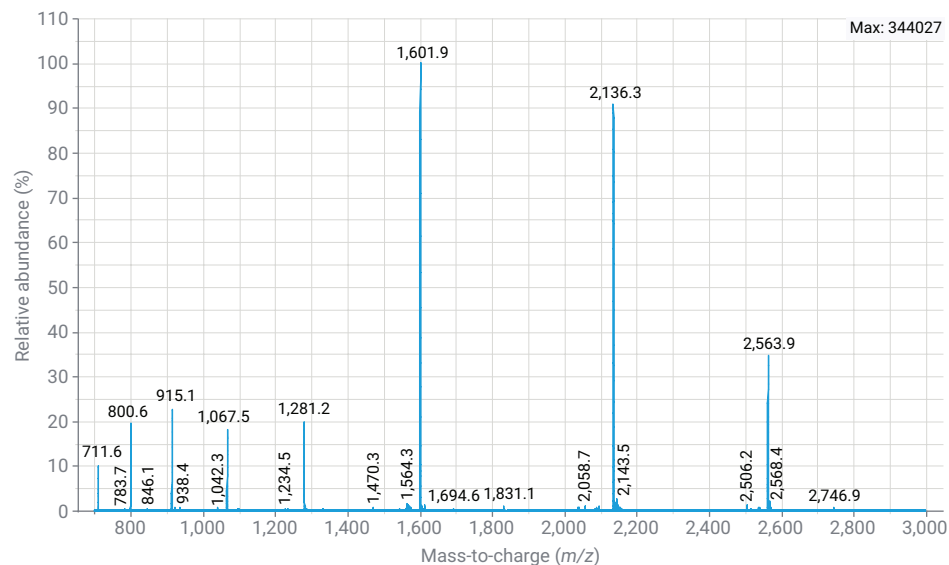


그림 1. 21mer DNA 올리고뉴클레오타이드의 질량 스펙트럼.

소스 및 이동상에 따라 크게 달라지지만, 일반적으로 길이가 긴 올리고뉴클레오타이드일수록 더 넓은 분포에서 더 높은 전하 상태를 취합니다. 그림 2는 폴리 dT 래더의 예와 각 올리고뉴클레오타이드에 대해 관찰된 전하 상태 분포의 차이를 보여줍니다. 15mer 폴리 dT 올리고뉴클레오타이드는 주로 하나의 지배적인 전하 상태(1,499.3m/z에서 $z = 3$)를 갖는 반면, 40mer는 5-13, 750-2,500m/z 범위의 훨씬 더 많은 전하 상태를 갖습니다. LC/MSD XT는 더 큰 분자 종의 검출을 위해 3,000m/z의 넓은 질량 범위를 지원하므로 광범위한 올리고뉴클레오타이드에 이상적입니다.

또한 데이터 분석 처리 방법은 다양한 길이와 서열의 올리고뉴클레오타이드에 대한 다양한 전하 Envelope를 수용할 수 있도록 최적화되어야 합니다. 표 4에 표시된 디콘볼루션 결과는 동일한 데이터 분석 파라미터가 어떻게 다른 길이의 올리고뉴클레오타이드에 사용될 수 있는지를 보여줍니다. 세트의 최소 피크 및 Envelope 임계값(%)은 각각 전하 상태 및 분포의 가변성을 수용하도록 최적화되었습니다. 올리고뉴클레오타이드에 대해 디콘볼루션된 질량은 최소 ± 1 Dalton 이내였으며, 이는 다양한 분자량을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 단위 질량 검출에서 예상되는 결과입니다.

DNA 래더 표준물질에 사용되는 설정은 다양한 유형의 샘플을 분석할 때 적합할 수 있지만, 처리 방법 최적화가 필요할 수 있습니다. 이는 예상치 못한 크로마토그래피 피크나 스펙트럼 이상이 관찰되는 경우 임시 예비 특성 규명을 수행하는 등 일반적인 테스트에서 벗어날 때 유용합니다.

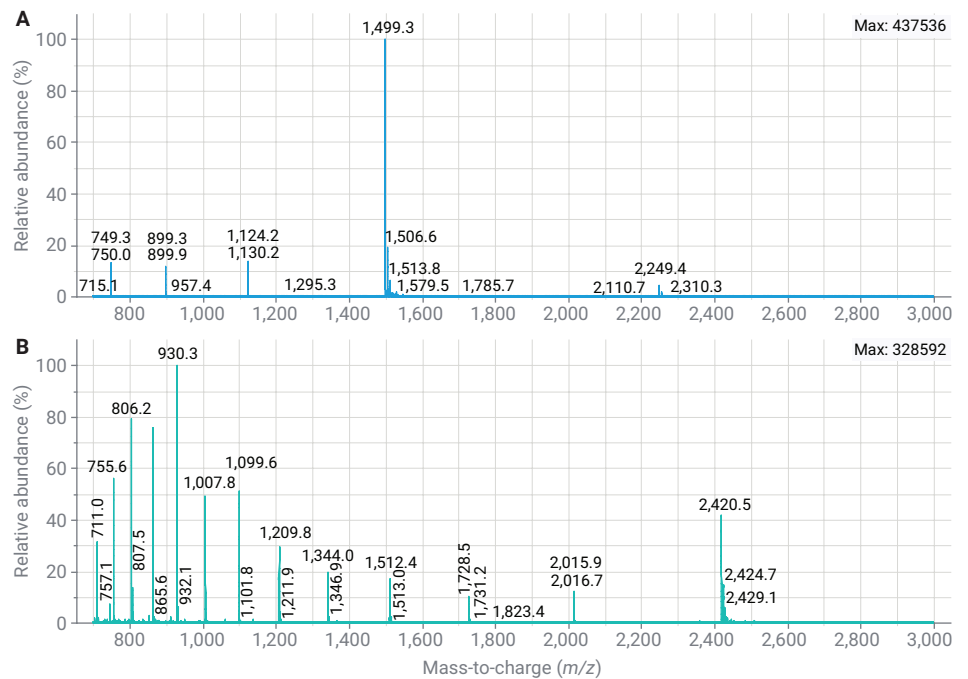


그림 2. 15mer DNA 올리고뉴클레오타이드(A)와 40mer DNA 올리고뉴클레오타이드(B)의 질량 스펙트럼 비교. 길이가 긴 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 더 넓은 전하 상태 분포와 함께 더 높은 전하 상태를 갖습니다. 이는 이온화 원 및 이동상/주입 용매에 따라 다릅니다.

표 4. DNA 래더 디콘볼루션 결과, 표준 설정.

샘플명	스펙트럼 RT(분)	계산된 질량	실험 질량(Da)	Δ 질량(Da)	질량 정확도(ppm)
15mer	2.38	4,501.0	4,501.0	0.0	9
20mer	3.594	6,022.0	6,022.0	0.1	11
25mer	4.387	7,543.0	7,543.6	0.6	84
30mer	4.924	9,063.9	9,064.5	0.5	59
35mer	5.274	10,584.9	10,585.5	0.5	51
40mer	5.554	12,105.9	12,106.8	0.9	76

18mer 및 20mer ASO의 디콘볼루션에서는 표적 질량 범위가 6,000-8,000MW로 좁혀졌습니다. 다른 모든 파라미터는 표 3과 동일합니다. 이를 통해 전체 길이의 제품은 물론, 더 짧거나 긴 길이의 불순물을 적절하게 식별할 수 있었습니다. 분리된 질량은 표 5에 보고되어 있습니다. 계산된 질량과 측정된 질량 간의 델타 질량은 단위 질량 계측의 성능 예상치 내에 있습니다.

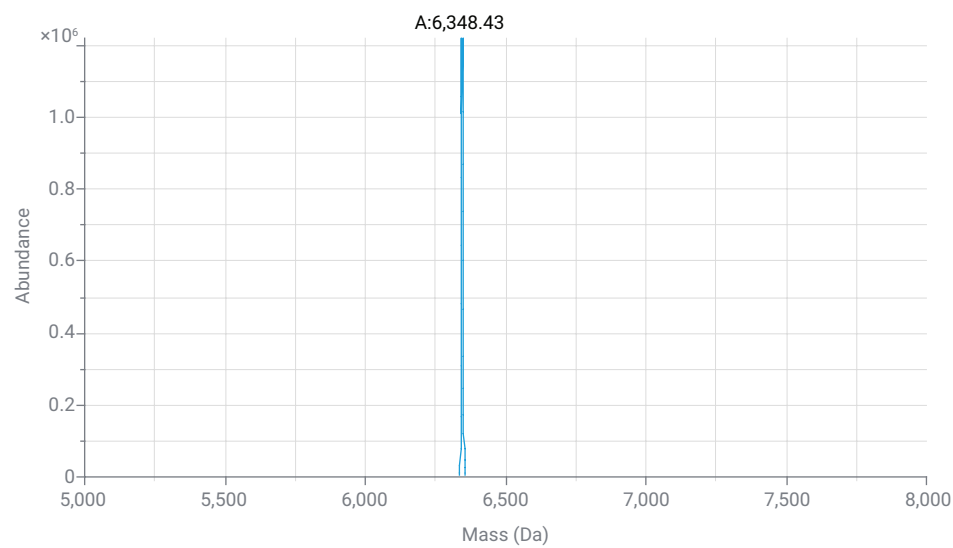


그림 3. 최적화된 디콘볼루션 파라미터를 사용한 18mer ASO의 디콘볼루션 스펙트럼.

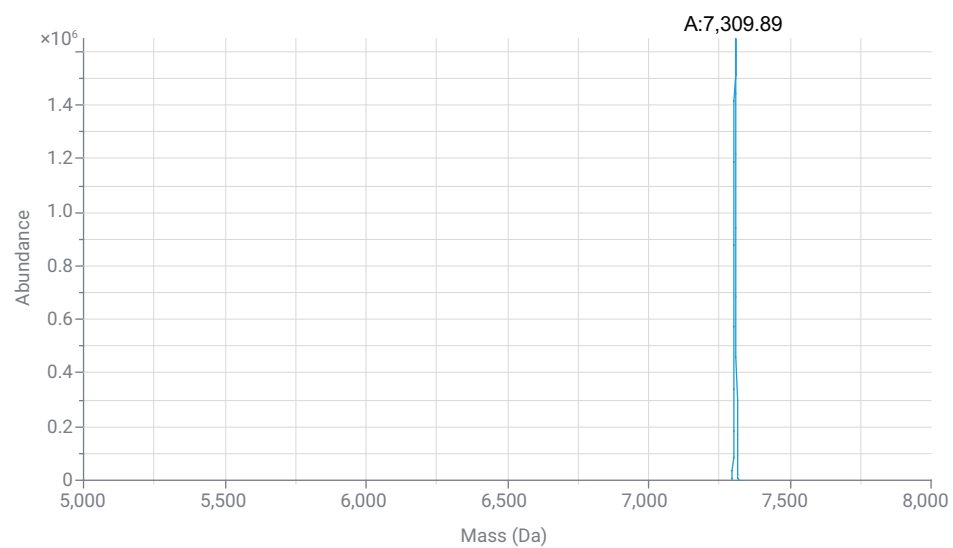


그림 4. 20mer ASO에 대해 디콘볼루션된 스펙트럼.

표 5. 18mer 및 20mer 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 대한 디콘볼루션 결과.

샘플	시퀀스	스펙트럼 RT(분)	계산된 질량	실험 질량(Da)	Δ 질량(Da)	질량 정확도(ppm)
18-mer	5'- U*/i2MOErC/*/i2MOErA/* /i2MOErC/*U* U*/i2MOErC/*/i2MOErA/* U*/i2MOErA/*/i2MOErA/* U*/i2MOErG/*C* U*/i2MOErG/*G -3'	5.764	6,348.2	6,348.4	0.2	36
20mer	5'- U*/i2MOErC/*U* U*/i2MOErG/*T* T*/i2MOErA/*/i2MOErC/* /i2MOErA/*/i2MOErT/*/i2MOErG/* /i2MOErA/*/i2MOErA/*/i2MOErA/* U*/i2MOErC/*/i2MOErC/* /i2MOErC/*C -3'	7.280	7,309.2	7,309.9	0.7	94
20mer, n-1	NA	7.012	NA	6,913.49	0.7	NA

데이터 분석 처리 방법이 최적화되어 분리 정도와 신호 강도가 충분한 경우, 낮은 농도의 불순물도 여전히 검출할 수 있습니다. 그림 5는 추정 저분자량 불순물의 베이스라인 분해능과 함께 18mer ASO의 총 이온 전류(TIC)를 보여줍니다. 스펙트럼 추출과 디콘볼루션을 수행한 결과 (6,913.49)는 이것이 실제로 n-1 불순물이며, 디콘볼루션된 스펙트럼의 절대 존재비에 따라 주요 피크의 0.12%임을 명확하게 나타냅니다.

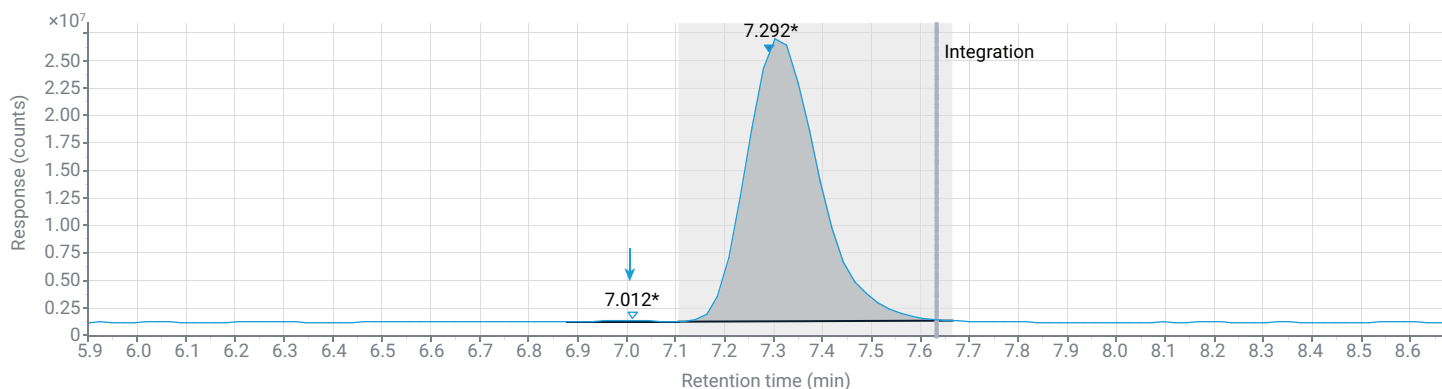


그림 5. 20mer 올리고뉴클레오타이드의 총 이온 전류(TIC). 초기 용리 불순물을 수동으로 통합하고 디콘볼루션을 위해 스펙트럼을 추출했습니다.

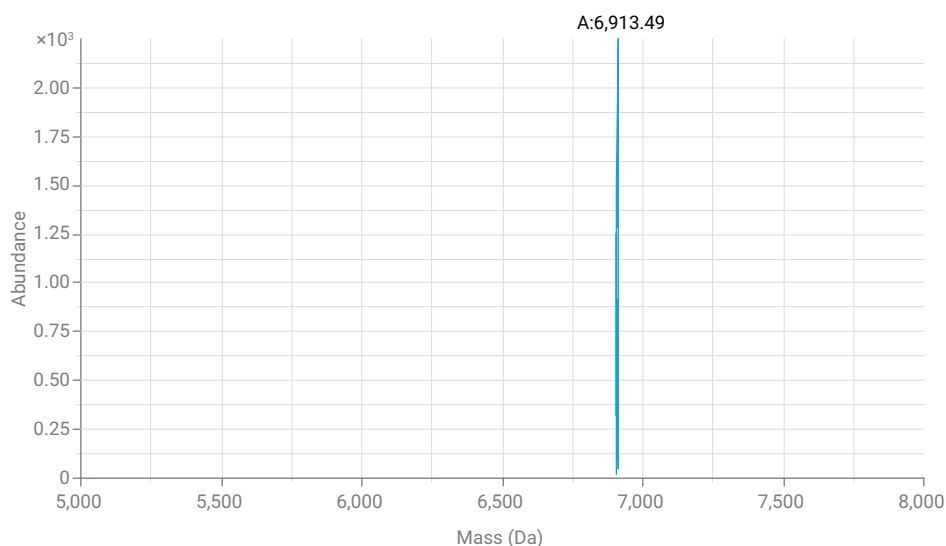


그림 6. 초기 용리 불순물에 대해 디콘볼루션된 스펙트럼. 6,913.49Da의 디콘볼루션된 질량은 이것이 n-1임을 의미합니다. Accurate mass 방식을 사용하여 추가 확인 및 특성 규명을 수행해야 합니다.

결론

Agilent 1290 Infinity II LC/MSD XT 및 OpenLab CDS 2.8과 MS 스펙트럼 디콘볼루션의 결합은 올리고뉴클레오타이드의 신속한 분자량 확인 및 순도 평가를 위한 유용한 도구입니다. 이러한 분석 도구의 조합은 사용자 친화적인 소프트웨어와 강력한 하드웨어를 제공하여 응답 속도가 우선시되는 올리고뉴클레오타이드 분석 작업 흐름을 가능하게 합니다. OpenLab CDS의 스펙트럼 디콘볼루션은 DNA 래더 분석을 통해 입증된 것처럼 다양한 길이의 올리고뉴클레오타이드 일반 분자량 확인에 사용할 수 있습니다.

참고 문헌

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>

www.agilent.com

DE91792165

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 2월 28일 한국에서 발행
5994-7083KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com