

Agilent RapidFire と四重極飛行時間型 質量分析の組み合わせによる イオンペアリングを用いない オリゴヌクレオチドのハイスループット HILIC 分析

著者

Peter Rye, PhD
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent RapidFire ハイスループット MS システムを用いて、オリゴヌクレオチドをイオンペアリングなしで特性解析するハイスループットメソッドについて説明します。この HILIC ベースのメソッドは 12 秒のサイクル時間を達成し、高い堅牢性と再現性を実現します。30 年以上の実績を持つ技術により、ターゲットの 0.5 % 未満の不純物を同定し、1 桁のナノモル範囲の検出下限および直線性のある濃度レスポンスを実現しています。未修飾の成分および大幅に修飾された成分で構成される 9 種類の独自のオリゴヌクレオチドの分析結果から、このメソッドが独自の修飾特性を持つサンプルに対して高い汎用性があることが示されました。

はじめに

従来のオリゴヌクレオチド（オリゴ）分析向けの LC/MS メソッドは、イオンペアリング逆相（IPRP）クロマトグラフィーをベースにしています。その理由は、通常このアプローチがネガティブモードで良好な分離と MS レスポンスを実現しているためです。ただし、多くのイオンペア試薬が、ポジティブモードにおいてシステムの性能を低下させるようなメモリ効果を示す場合があることを考えれば、IPRP メソッドは混合システムにとって負担になることがあり、多くのラボではイオンペアリングを用いない代替メソッドを求めるようになりました。この実験では、Agilent RapidFire 6545XT MS システムを用いて、イオンペアリングなしでオリゴを特性解析するハイスループットなメソッドを示します。このメソッドでは、Agilent HILIC-Z 樹脂と MS に適した酢酸アンモニウムベースの移動相の利点を活用することにより、フラッシングおよびハードウェアの変更を実行せずに、システムを後続のポジティブモードで使用できます。このメソッドでは 12 秒のサイクル時間を実現すると同時に、高品質のオリゴの特性解析において要求される堅牢性、再現性、ダイナミックレンジ、および感度を実現しています。また、試験を実施して、このメソッドが、アンチセンス（ASO）およびアプタマーサンプルなどの未修飾オリゴおよび大幅に修飾されたオリゴに対しても同様に効果的であることについても実証します。

実験方法

分析メソッドとサンプル

RapidFire/Q-TOF 機器は、Agilent RapidFire 365 ハイスループット MS システム、および Agilent Jet Stream イオン源搭載の Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の組み合わせで構成されています。オンラインでの固相抽出には、HILIC カートリッジ（タイプ H6、ベッドボリューム 4 µL、G9527）を使用しました。データは、RapidFire Acquisition ソフトウェア、バージョン 6.1、および LC/MS システム用 MassHunter Acquisition ソフトウェア、バージョン 10.1 を用いて取り込みました。この実験で使用した RapidFire および MS メソッドの詳細を

表 1 に示します。LC/MS グレードのアセトニトリルはアジレントで用意しました。純水は、Milli-Q システムで精製しました。移動相 A（MPA）および移動相 B（MPB）は、pH を調整せずに調製しました。この実験で使用した注入量はすべて 10 µL でした。

RapidFire でサンプリングしたサンプルをカートリッジに移し、MPA を使用して 1 mL/min で 5,000 ms の間脱塩しました（20 カートリッジ分の洗浄量）。次に、MPB を使用して 0.5 mL/min で 4,000 ms の間脱塩したオリゴ混合物（8 カートリッジ分の量）を、測定用として MS に溶出しました。生成された分離ピークの幅は約 6 秒であり、24 の固有のスペクトルで構成されていました。次のサンプルを導入する前に、MPA を使用して 1 mL/min

で 500 ms の間カートリッジを再平衡化しました（2 カートリッジ分の量）。ロード/洗浄、溶出、または再平衡化の時間を長くすることのメリットはほぼありませんでした（データは示していません）。プレート移動を含む最適化されたメソッドでは、12 秒のサイクル時間を維持しました。

取り込み後の MS データファイルは、RapidFire ソフトウェアにより、自動的に解析されて、個々の注入ファイルとなります。分析には、MassHunter BioConfirm ソフトウェア、バージョン 10.0 の抽出イオンクロマトグラムおよび最大エントロピーデコンボリューション手法を使用しました。

表 1. この実験で使用した RapidFire および 6545XT MS メソッド

RapidFire 条件		
カートリッジ	HILIC (PN G9527)	
カートリッジ温度	室温	
注入量	10 µL	
ポンプ 1	MPA = 85 % アセトニトリル + 15 mM 酢酸アンモニウム	1.0 mL/min
ポンプ 2	MPB = 50% アセトニトリル + 15 mM 酢酸アンモニウム	1.25 mL/min
ポンプ 3	MPB = 50% アセトニトリル + 15 mM 酢酸アンモニウム	0.5 mL/min
状態 1	サンプルの吸引（吸引センサオン）	600 ms
状態 2	ロード/洗浄（脱塩）	5,000 ms
状態 3	追加の洗浄	0 ms
状態 4	溶出（注入）	4,000 ms
状態 5	再平衡化	500 ms
6545XT Q-TOF 条件		
イオン極性	デュアル AJS ネガティブ	
データ保存	両方（セントロイドおよびプロファイル）	
ガス温度	300 °C	
乾燥ガス流量	11 L/min	
ネブライザガス	35 psi	
シースガス温度	350 °C	
シースガス流量	11 L/min	
キャピラリー電圧	3,500 V	
ノズル電圧	2,000 V	
フラグメンタ	175 V	
スキマ電圧	65 V	
Oct 1 RF Vpp	750 V	
質量範囲	100 ~ 3,200 m/z	
取り込みレート	4 スペクトル/秒	

この実験で使用したオリゴ（表 2）は、Integrated DNA Technologies（コーラルビル、アイオワ州）で標準の脱塩精製を実施したものを購入しました。購入したオリゴを水中で再懸濁して 1 mM の原液を調製し、分析用に MPA で希釈しました。使用した最終濃度については、実験に関する個別のセクションを参照してください。

結果と考察

さまざまなサイズのオリゴ

さまざまなサイズのオリゴに対する HILIC RapidFire/Q-TOF メソッドの適用性を評価するために、18-mer (PR8)、40-mer (PRL40)、および 60-mer (PRL60) を分析しました。各オリゴの 10 μM のサンプル（カートリッジ上では 100 pmol）を分析し、結果を IPRP 手法により以前に採取したデータと比較しました¹。図 1 に、各サンプルに対して HILIC データ (A) および IPRP データ (B) で観測された、いくつかの予想される荷電状態のイオンを示します。さらに、RapidFire データではいくつかの特有のスペクトル品質が観察されました。

まず、各オリゴに対する IPRP 条件により、非常に幅広い荷電状態のエンベロップが生成されました。二峰性分布が観察されたケースもありました。これは図 1B の 40-mer のデータに典型的に示されています。これらの幅広い二峰性分布は、オリゴの一部が未変性立体構造状態のまま残り（低荷電種をもたらす）、その他の部分が変性立体構造（高荷電種の形成を促進）に由来すると考えられています。HILIC 条件下で採取されたスペクトルは、低荷電種にシフトした非常に幅の狭い荷電状態分布を示しており、これらのオリゴが未変性状態に維持されていたことを示唆しています。この挙動は、例えば、酢酸アンモニウムが一般

的に使用されている天然タンパク質の分析など、その他の質量分析手法での観察結果と一致しています。

次に、IPRP 条件により、大きいオリゴは小さいオリゴと比較してより多くの荷電状態を示し、その結果、さまざまなサイズのオリゴのスペクトルイオンの m/z 範囲は、比較的一定となりました。実際に、18-mer で最もアバンドンスの多い荷電状態 (m/z がおよそ 1,375 で -4) は、60-mer で最もアバンドンスの多い荷電状態 (m/z がおよそ 970 で -19) と比較して m/z 値がより高くなっていました。HILIC 条件の場合、各オリゴで優勢な荷電状態の m/z 値は、オリゴのサイズが大きくなるにつれてより高くなる傾向を見せました。この結果は、HILIC 条件下でオリゴの未変性折りたたみ状態が維持され、電荷間の反発により高荷電種の形成が抑止されていることと一致しています。 m/z 範囲が制限されている質量分析計で大きいオリゴを分析する際には、この影響を緩和するための手法が必要になります。これらに関する実験は進行中であり、また別のところで説明する予定です。

表 2. この実験で使用したオリゴヌクレオチドおよびそれらに関連するコード表記。すべての配列は 5' から 3' 方向で記述されています。

名前	長さ	概数の分子量	シーケンス
PR1	20	6148	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
PR3	20	6007、6031、6047	TTTTTTTTTTTTTTTTTV
PR5	24	7289	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
PR7	21	6101	/5Phos/TTTTTTTTTTTTTTTTTT
PR8	18	5505	CTAGTTATTGCTCAGCGG
PRL40	40	12278	CTAGTTACTTGCTCAGCGGACTAGTTACTTGCTCAGCGGA
PRL60	60	18448	CTAGTTACTTGCTCAGCGGACTAGTTACTTGCTCAGCGGACTAGTTACTTGCTCAGCGGA
ASO	18	7127	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErA/*i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErG/
アプタマー	28	9116	/52FC/mGmGrArA/i2FU//i2FC/mAmG/i2FU/mGmAmA/i2FU/mG/i2FC//i2FU//i2FU/mA/i2FU/mA/i2FC/mA/i2FU//i2FC//i2FC/mG/3InvdT/

コード	説明	コード	説明
*	ホスホロチオエート結合	/32MOErG/	3' メトキシエトキシ G
A	2'-デオキシリボースアデニン	/5Phos/	5' リン酸
C	2'-デオキシリボースシトシン	/52FC/	5' フルオロ C
G	2'-デオキシリボースグアニン	/52MOErT/	5' 2-メトキシエトキシ T
T	2'-デオキシリボースチミン	/i2FC/	内部フルオロ C
mA	2'-O-メチル A	/i2FU/	内部フルオロ U
mG	2'-O-メチル G	/i2MOErA/	内部 2-メトキシエトキシ A
rA	リボースアデニン	/i2MOErC/	内部 2-メトキシエトキシ C
rG	リボースグアニン	/i2MOErT/	内部 2-メトキシエトキシ T
V	混合 C、A、および G	/i2MOErG/	内部 2-メトキシエトキシ G
/3InvdT/	3' 逆位 T		

さまざまなサイズのオリゴの MS 信号の強度を比較するために、Y 軸をリンクすることでスケールリングを除去しました。図 2A は、オリゴのサイズが増大するにつれて、HILIC 条件では m/z イオン強度が大幅に低下したことを示しています。具体的には、60-mer で優勢な荷電状態の高さは、18-mer の場合と比較して約 25 分の 1 未満でした。同様に、デコンボリューションのピーク高さを比較してみると（図 2B）、18 ~ 60-mer に増大するにつれて約 25 分の 1 に低下しています。IPRP で分析した際の 18-、40-、および 60-mer のデコンボリューションのピーク高さを比較してみると、最低値の 2 倍以内でした（データは示していません）。

これらの全般的な結果は以前に観察されたものです。特に、以前に Lobue 氏他が示した結果によると、オリゴの HILIC による分析を IPRP の場合と比較してみると、オリゴのサイズが大きくなるにつれて、(1) 荷電状態の分布の幅がより狭くなり、(2) 低荷電状態が優勢で、(3) 優勢な荷電状態が右にシフトしていることがわかっています。

再現性

HILIC RapidFire/Q-TOF メソッドの再現性をテストするために、5' リン酸 (PR7) を含む poly-dT オリゴの 24 回繰り返し注入を実行し、BioConfirm の自動分析メソッドを使用してデコンボリュートしました。次に、生成されたデコンボリューションスペクトルを、各スペクトルの最大ピークでスケールリングして重ね表示しました。結果は、各サンプル内の相対アバダンスの再現性が優れていることを示しており、24 本のスペクトルがほとんど完全に重ね合っています（図 3）。繰り返し分析のトータルイオンクロマトグラム（図 3 の挿入図）では、ピーク高さと形状が一致しており、相対信号に加えて絶対 MS 信号も、多数回の注入にわたって安定していることがわかります。

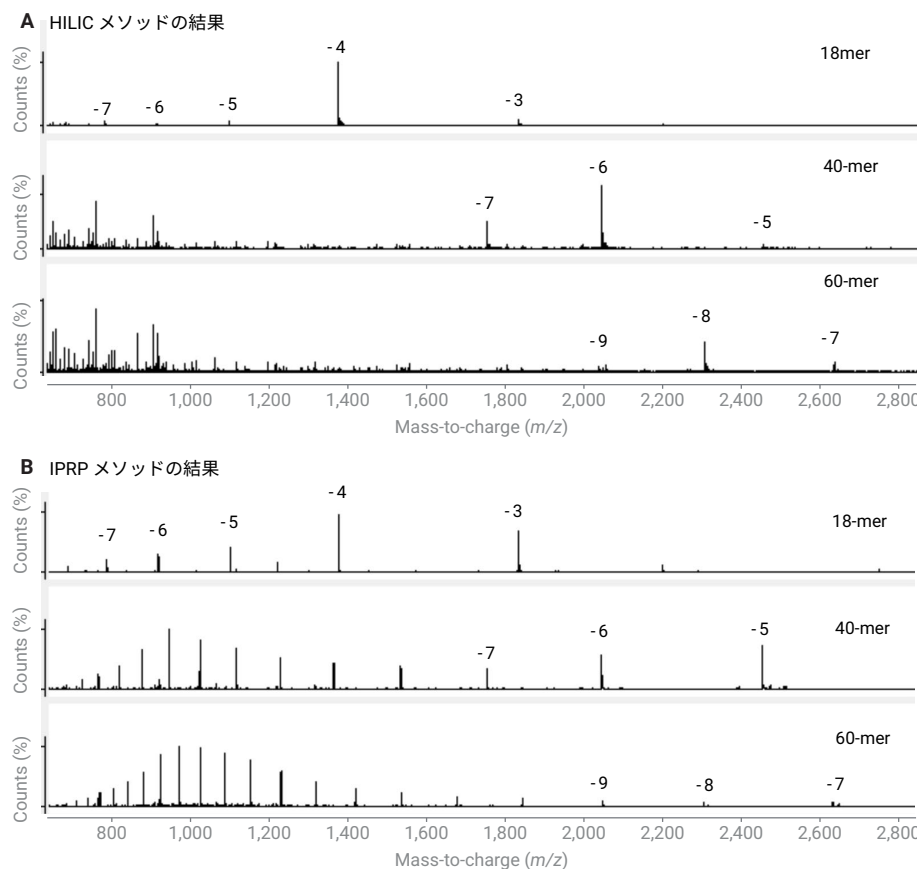


図 1. HILIC メソッド (A) で分析した 18-mer (上部)、40-mer (中間)、および 60-mer (下部) の未処理の m/z スペクトル、および比較用の IPRP メソッド (B)。すべてのスペクトルをそれぞれ、最大ピークでスケールリングしました。HILIC メソッドで優勢な荷電状態クラスターを、オリゴごとにラベル付けしています。

不純物の測定

多くの場合、オリゴサンプルには、切断された合成生成物、脱ピリミジン、脱プリンなど、多数の低アバダンス不純物が含まれています。そのため、オリゴの特性解析の分析メソッドでは、不純物の検出のために幅広いダイナミックレンジを実現していることが重要になります。このような状況は特にクロマトグラフィー以外のメソッドに当てはまります。その理由は、アバダンスの多いターゲットオリゴの存在下で低アバダンスの不純物が検出されない場合、算出した純度が過大評価されることがあるためです。

この実験で使用した 6545XT 質量分析計は、最大 5 桁のスペクトルダイナミックレンジを実現するように設定されました。しかし、このアプリケーションのダイナミックレンジは、いくつかのサンプルについて強度が大幅に異なるデコンボリュートした相対ピーク高さを比較することにより評価しました。

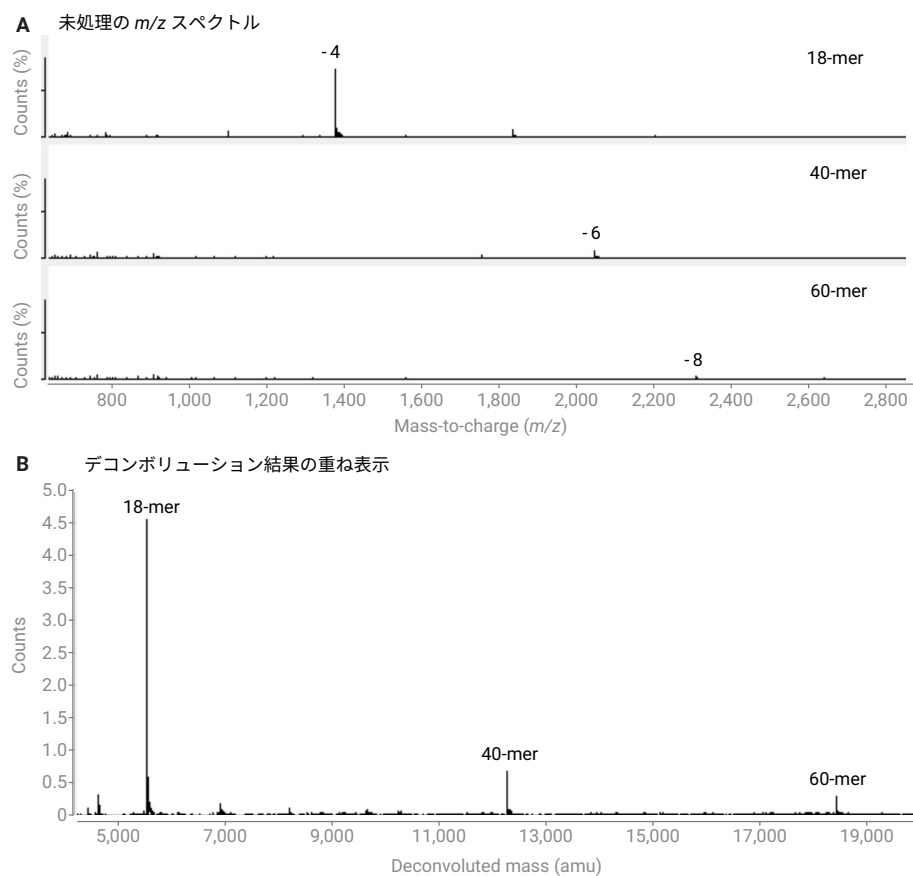


図 2. 18-mer、40-mer、および 60-mer の MS 信号強度の比較。Y 軸をリンクした未処理の m/z スペクトル (A) およびデコンボリューション結果の重ね表示 (B)

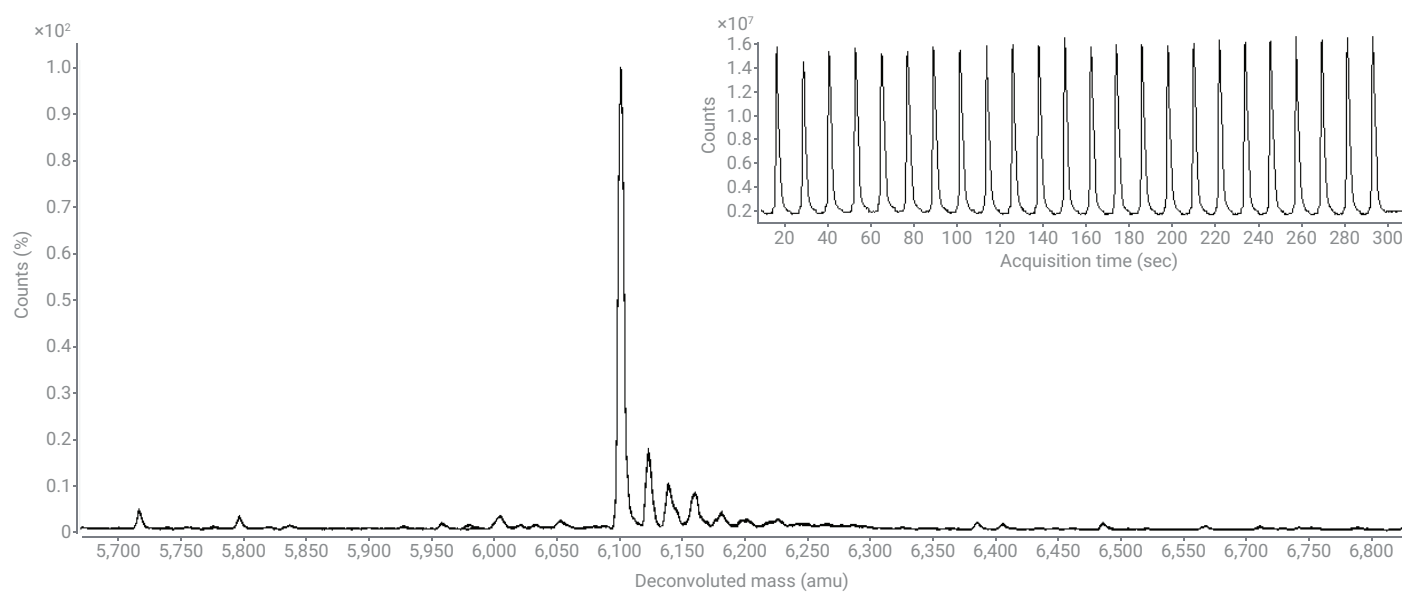


図 3. 24 回繰り返し分析したサンプルのトータルイオンクロマトグラムの再現性 (挿入図) およびデコンボリューション結果 (メインの図)

図 4 に、20-mer DNA 鎖 (PR1) の 10 μ M 注入 (カートリッジ上では 100 pmol) からデコンボリュートしたスペクトルを示します。最もアバンダンスの多いピークの質量は 6,148 Da であり、これはターゲットオリゴで算出した質量に一致しています。一般的に観察されるいくつかの金属付加物が、ターゲットよりも大きい質量で存在しており、低質量の不純物も多数観察されています。一般的に観察される脱プリン (depur) および切断 (trunc) 不純物の存在が予想される質量範囲を詳細に検査することにより、いくつかの低アバンダンスのピークの存在が明らかになりました。ターゲットとの質量差に基づいて、A の 5' 切断、G のガス相脱プリン、および G の加水分解脱プリンをすべて割り当てることができます。脱プリン不純物のピーク高さの相対アバンダンスは、ターゲットの 1 % 未満でした。

場合によっては、質量が近い個別の成分を含むオリゴ混合物を分析する必要が生じます。質量分離混合物および成分の個別の不純物に対する HILIC RapidFire/Q-TOF メソッドの能力を評価するために、3' 可変塩基 (C、A、または G) を含む 10 μ M (カートリッジ上では 100 pmol) の 20-mer poly-dT オリゴを注入しました (PR3)。図 5A の m/z スペクトルは予想される複数の荷電状態を示しており、挿入図は -4 種の同位体の質量分解能が良好であることを表しています。図 5B のデコンボリュートした結果は、3' 末端に C、A、または G があるオリゴの予想される質量および相対アバンダンスに一致する 3 つの優勢なピークを明確に示しています。さらに、これらの各種について、 $n-1$ および $n-2$ の不純物が観察されました。3 つの種から 5'-T が損失すると - 304 Da のピークが生成され、3 つの種から 5'-TT が損失すると - 608 Da (304 + 304) のピークが生成されました。3' G を持つオリゴの場合、ターゲット (2.5E5 カウント) および 5'-TT が損失した不純物 (0.75E3 カウント) に対応するピーク高さを比較してみると、サンプルおよびスペクトルが複雑であって

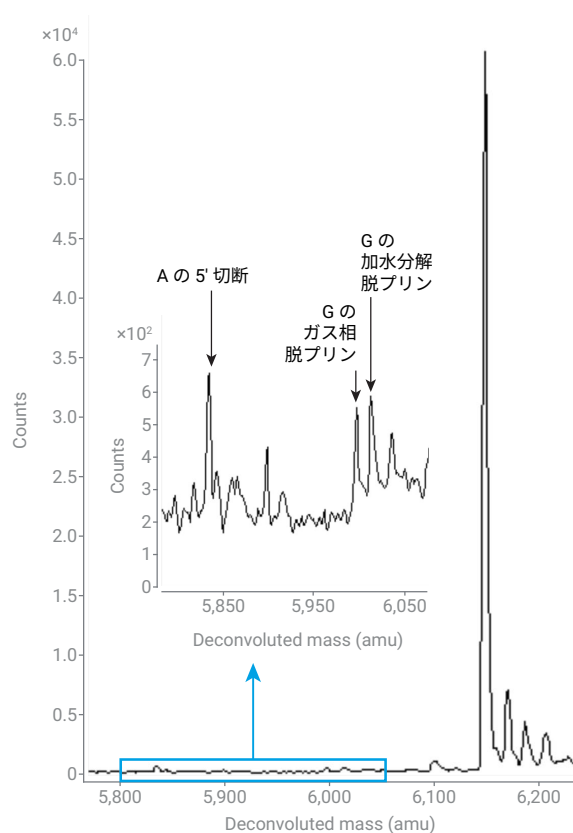


図 4. PR1 中の不純物の同定

も、0.3 % の不純物が容易に観察されていることがわかります。

この実験のもう 1 つの注目すべき観察結果として、poly-dT オリゴのスペクトルの荷電状態の分布が比較的広がったことがあげられます。上の観察結果と考察に基づいて考えてみると、 m/z スペクトルで観察される荷電状態を低減させるような二次構造は、poly-dT オリゴでは容易には形成されないようです。

メソッドの感度、直線性、およびキャリーオーバー

HILIC RapidFire/Q-TOF メソッドの感度と直線性を評価するために、PR7 の 8 種類の濃度とゼロを加えた 3 回分の注入を分析しました。MPA を使用して、1,250 nM から 9.7 nM ま

での 2 倍段階希釈を調製しました。範囲内の各濃度でのキャリーオーバーを調査できるように、各繰り返し分析間でゼロ濃度サンプルを注入しました。54 回のすべての注入で生成されたデータを 2 種類の方法で解析しました。1 つ目の方法では、ターゲット MS 測定において、-4 の荷電状態 (m/z がおよそ 1,524) の抽出イオンクロマトグラムを生成してスムージングし、積分しました。各濃度における繰り返し分析領域を平均化し、その濃度に対してプロットしました。図 6A と 6B に示すように、同じプロット上に値の標準偏差をエラーバーで表しました。2 つ目の方法では、図 6C のノンターゲットデコンボリューション結果において、-4 の荷電状態 (m/z がおよそ 1,524) の抽出イオンクロマトグラムを生成してスムージングし、

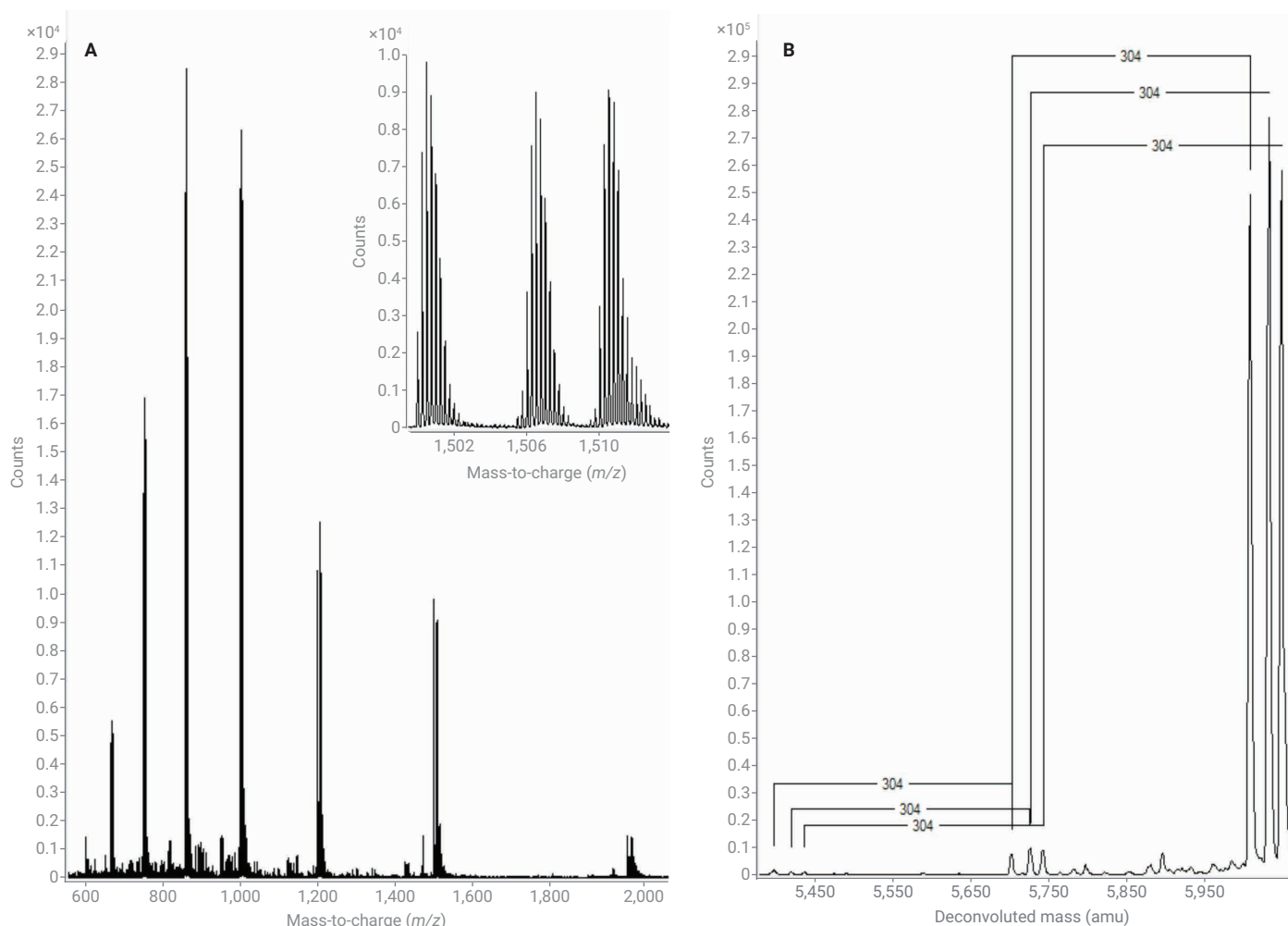


図 5. PR3 中の低アバンドンス不純物の同定。未処理の m/z スペクトル (A) およびデコンボリューション結果 (B)

積分しました。その後、積分したピークでの平均 m/z スペクトルを抽出して、デコンボリュートしました。

図 6A は、この実験で使用したオリゴは、調査した 9 種類の濃度にわたって直線性のあるレスポンスを示しており、最も適合性の高い検量線では $R^2 = 0.9988$ であったことを示しています。ブランクデータではおよそ 2.8 の傾きを示しているのに対し、サンプルではおよそ 192 の傾きを示しており、これより濃度範囲全体のキャリーオーバーが 1.5 % 未満であることがわかります。その後の実験では（データは示していません）、RapidFire の「各サンプル間でのブランク注入」機能を選択した際に、この値が 0.1 % 未満まで低下しました。

ただし、各サンプル間のブランクではサイクル時間を 2 倍にして、ブランクがない場合のキャリーオーバーが許容基準を満たしていたため、追加のブランクは不要であると判断しました。濃度データの低濃度域に注目してみると（図 6B）、濃度 0 と 9.7 nM の間の AUC に明らかな差が認められます。S/N 比については、9.7 nM では 4 を超過しており、19.5 nM ではほとんど 6 であり、39 nM では 28 でした。IPRP 条件の濃度レスポンスの傾きは非常に大きいですが（2,898、データは示していません）、S/N 比の値は HILIC 条件の場合とほぼ同等でした。

ノンターゲット方式でのターゲットオリゴの測定の限界について試験するために、各濃度でのスペクトルをデコンボリュートしました。低濃度注入における代表的な結果を図 6C に示します。2 桁 nM の低濃度サンプルのターゲットピークが容易に測定できています。予想したように、これらの結果は、ターゲット抽出では測定感度が高くなっているものの、低濃度サンプルのターゲット同定でも、ノンターゲットデコンボリューションが非常に有効であることを示しています。

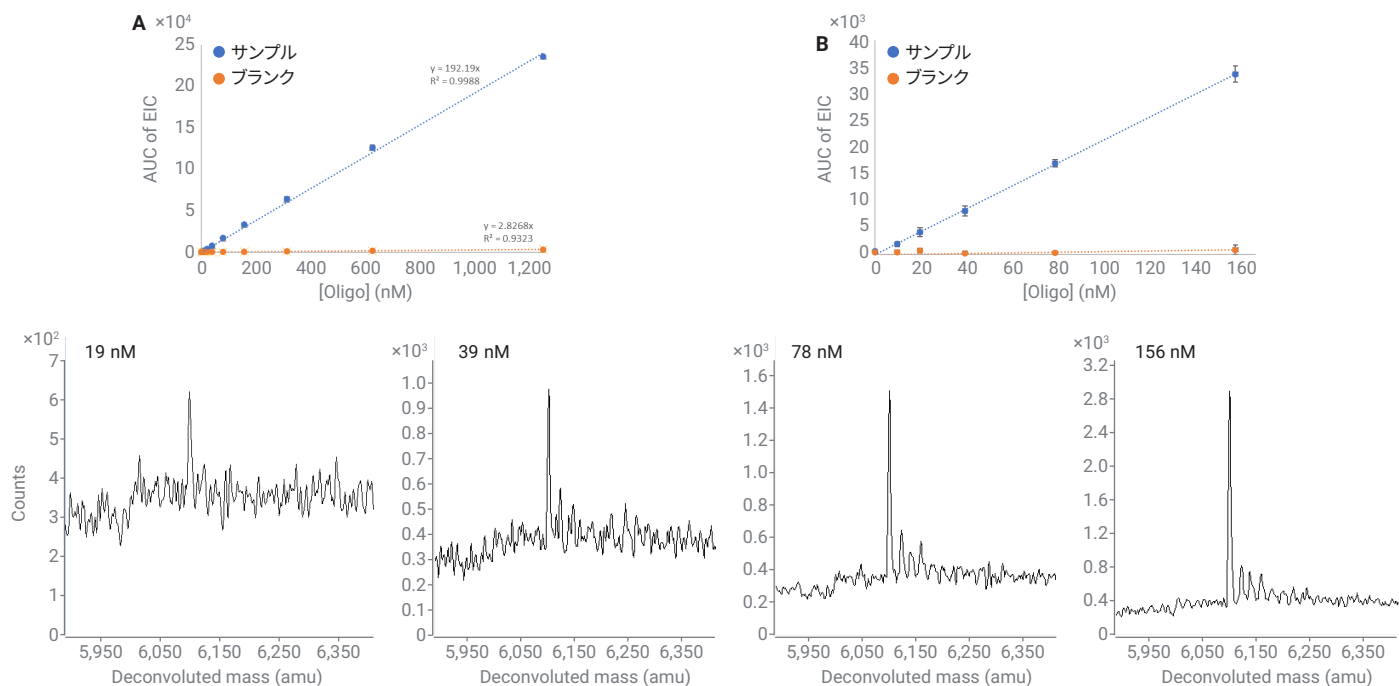


図 6. メソッドの感度、直線性、およびキャリアオーバーを評価するための PR7 の濃度レスポンス。濃度に対する信号のプロット (A)、低濃度範囲の拡大 (B)、およびデコンボリューション結果 (C)

他の研究者によって HILIC と IPRP メソッドの感度が比較されており、結果がさまざまなレポートにまとめられています。Lobue 氏は、IPRP の場合と比較して HILIC 条件での MS 信号のレスポンスがより大きいことを報告しており²、ゲインの原因は HILIC 条件下で移動相の有機物含有量が高いために、脱溶媒の効率が向上したことにあると考えています。他のケースでは、IPRP の場合と比較して HILIC 条件下でのターゲットのピーク高さが低下しているのは、Na および K 付加イオンの濃度が増大していることが原因であると考えられています。したがって、結果に影響を与える可能性のある多数の取り込みおよび分析パラメータを制御しながら、幅広いオリゴサイズおよび結合相でこれらの手法の感度を比較するには、詳細な調査を実施する必要があります。

メソッドの多様性

オリゴサンプルの結合相は、大きく異なる場合があります。塩基組成、リンカーの種類、修飾が異なるオリゴに対する HILIC RapidFire/Q-TOF メソッドの適用性を評価するために、最適化されたメソッドを使用して、多数のサンプルデータを取り込みました。これらの 10 μ M サンプルには、DNA 鎖（リン酸ジエステルリンカーおよび 5' リン酸含有）、ASO（ホスホロチオエートリンカーおよび 2-メトキシエトキシ構成要素含有）、およびアプタマー（逆位 T、2-メトキシエトキシ基、およびフッ素化塩基含有）が含まれていました。生成されたデコンボリューションスペクトルを、最大ピークでスケールリングしてお互いに重ね表示しました。図 7 の結果より、各サンプルについて、質量精度が優れ、アバUNDANCEの多い

ターゲットピークが確認できます。サンプルに共通する不純物を割り当てることもできます（データは示していません）。これらの結果から、HILIC RapidFire/Q-TOF メソッドは、18-mer から 28-mer 範囲の幅広いオリゴタイプと結合相に対して高品質のデータを提供できることがわかりました。

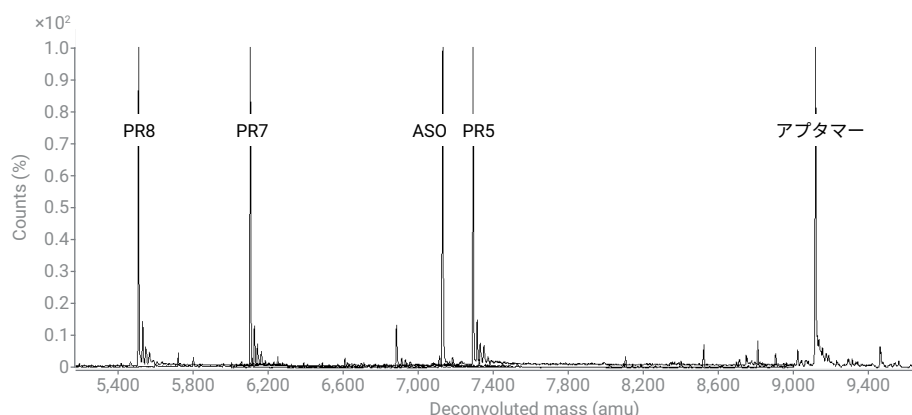


図 7. イオンペア試薬を使用せずに RapidFire MS で分析した、さまざまなオリゴ結合相のデコンボリューション結果の重ね表示

結論

Agilent RapidFire ハイスループット MS システムを Agilent 6545XT 質量分析計と組み合わせ、データ取り込み時にサンプルあたり 12 秒という高速のサイクル時間を維持することにより、ハイスループットのオリゴの特性解析を実現しています。取り込みメソッドには、以前に説明した IPRP 条件¹、および今回説明したイオンペアリングを使用しない HILIC 条件が含まれています。HILIC メソッドでは標準のアジレント製品を使用しているため、設定と使用が簡単であり、移動相の pH の調整も必要ありませんでした。

HILIC メソッドでは、高品質のオリゴの特性解析において要求される堅牢性、再現性、ダイナミックレンジ、および感度を実現しました。さまざまなオリゴに関する試験では、大幅に修飾された ASO およびアプタマーサンプルに対して、高いメソッド性能を示しました。一般的に、HILIC メソッドはサイズが約 25-mer のオリゴに対して使用されていますが、最大 60-mer においても品質データを生成しました。

参考文献

1. Rye, P. T.; Yang, Y. High-throughput Mass Spectrometry of Synthetic Oligonucleotides: A Comparison of Data from Fast LC and RapidFire Methods. *ASMS* **2020**. TP 434.
2. Lobue, P. A. et al. Oligonucleotide Analysis by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Absence of Ion-Pair Reagents. *J. Chromatogr. A* **2019**, 1595, 39-48.
3. Huang, M.; Xu, X.; Qiu, H.; Li, N. Analytical characterization of DNA and RNA oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2021**, 1648, 46-2184.

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。

DE54527408

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2022
Printed in Japan, June 22, 2022
5994-4945JAJP