

이온쌍 없는 고처리량 HILIC 올리고 뉴클레오타이드 분석 - Agilent RapidFire 결합 Q-TOF 질량 분석법 사용

저자

Peter Rye, PhD
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료는 Agilent RapidFire 고처리량 MS 시스템을 사용하여, 올리고뉴클레오타이드 특성 규명을 위한 고처리량의, 이온쌍을 사용하지 않는 분석법에 대해 설명합니다. HILIC 기반의 해당 분석법은 12초의 주기 시간을 달성하고, 높은 견고성과 재현성을 보여줍니다. 표적 물질 대비 0.5% 미만 수준의 불순물 식별, 한 자리 나노몰 농도 범위의 검출 한계, 10의 3승에 걸친 선형 농도 감응 등의 우수한 결과를 포함하고 있습니다. 변형되지 않았거나 크게 변형된 유형을 모두 포함하는 9가지 고유한 올리고뉴클레오타이드의 분석을 통해 해당 분석법이 고유한 화학적 특성을 가진 여러 시료에 대해 활용성이 매우 높음을 보여줍니다.

서론

올리고뉴클레오타이드(올리고) 분석을 위한 LC/MS 분석법이 전통적으로 이온쌍 역상 (IPRP) 크로마토그래피에 기반해 온 것은 이 접근법이 일반적으로 음이온 모드에서 우수한 분리와 MS 감응을 제공하기 때문입니다. 그러나 많은 이온쌍 시약이 양이온 모드에서 시스템 성능을 저하시킬 수 있는 기억 효과를 나타낼 수 있다는 점을 고려할 때, IPRP 분석법은 복합 용도의 시스템에 부담이 될 수 있으며, 이로 인해 많은 실험실에서 이온쌍을 사용하지 않는 대안을 찾고 있습니다. 이 연구에서는 이온쌍 없는 고처리량 올리고 분석법을 Agilent RapidFire 6545XT MS 시스템을 사용하여 제시합니다. 이 분석법은 Agilent HILIC-Z 레진과 MS 친화적인 암모늄 아세테이트 기반 이동상을 활용하므로 시스템에서 세척이나 하드웨어 변경 없이 연속적인 양이온 모드 사용이 가능합니다. 이 분석법은 주기 시간이 12초에 불과하며 이와 더불어 고품질 올리고 특성 규명에 요구되는 견고성, 재현성, 측정 범위(dynamic range) 및 감도 수준을 실현합니다. 또한 테스트 결과는 이 분석법이 안티센스(ASO) 및 압타머 시료를 포함하여 변형되지 않았거나 크게 변형된 올리고에 대해 동일하게 효과적임을 입증합니다.

실험

분석법 및 시료

RapidFire/Q-TOF 기기는 Agilent Jet Stream 소스가 장착된 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF와 Agilent RapidFire 365 고처리량 MS 시스템을 결합한 형태로 구성됩니다. HILIC 카트리지를 (타입 H6, 4µL 베드 볼륨, G9527)를 온라인 고체상 추출에 사용했습니다. RapidFire Acquisition 소프트웨어 버전 6.1 및 LC/MS 시스템용 MassHunter Acquisition 소프트웨어 버전 10.1을 사용하여 데이터를 수집했습니다. 이 연구에 사용된 RapidFire 및 MS 분석법을 표 1에 자세히 정리했습니다. LC/MS 등급 아세트오닐트릴은

애질런트 제품을 사용했습니다. 물은 Milli-Q 시스템을 통해 얻었습니다. 이동상 A(MPA) 및 이동상 B(MPB)는 pH 조정 없이 준비했습니다. 이 연구에서 모든 주입 부피는 10µL였습니다.

RapidFire에 의한 샘플링 과정에서, 시료를 카트리지로 전달하고 MPA를 사용하여 5,000ms동안 1mL/분으로(카트리지 부피 20배 세척) 탈염했습니다. 이어서, 탈염된 올리고 혼합물 측정을 위해 4,000ms 동안 0.5mL/분으로(카트리지 부피 8배) MPB를 사용하여 MS로 용리했습니다. 생성된 크로마토그래피 피크는 폭이 약 6초였으며 24개의 고유한 스펙트럼으로

구성되었습니다. 그리고, 다음 시료를 도입하기 전에 카트리지를 500ms 동안 1mL/분의 MPA로 재평형화했습니다. 로드/세척, 용리 또는 재평형화 시간을 더 증가시킨 경우의 이점은 미미했습니다 (데이터는 표시되지 않음). 최적화된 분석법은 플레이트 이동을 포함해 12초의 주기 시간을 유지했습니다.

수집의 경우, MS 데이터 파일은 RapidFire 소프트웨어에 의해 개별 주입 파일로 자동 파싱(parsing) 되었습니다. MassHunter BioConfirm 소프트웨어 버전 10.0에서는 추출 이온 크로마토그램과 최대 엔트로피 디콘볼루션 기술이 분석에 사용되었습니다.

표 1. 연구에 사용된 RapidFire 및 6545XT MS 분석법.

RapidFire 조건		
카트리지	HILIC (PN G9527)	
카트리지 온도	실온	
주입량	10µL	
펌프 1	MPA = 85% 아세트오닐트릴 + 15mM 암모늄 아세테이트	1.0mL/분
펌프 2	MPB = 50% 아세트오닐트릴 + 15mM 암모늄 아세테이트	1.25mL/분
펌프 3	MPB = 50% 아세트오닐트릴 + 15mM 암모늄 아세테이트	0.5mL/분
1단계	시료 흡입(sip 센서 켜짐)	600ms
2단계	로드/세척(탈염)	5,000ms
3단계	추가 세척	0ms
4단계	용리(주입)	4,000ms
5단계	재평형	500ms
6545XT Q-TOF 조건		
이온 극성	이중 AJS 네거티브	
데이터 저장	모두(중심 및 프로파일)	
가스 온도	300°C	
건조 가스 유속	11L/분	
Nebulizer 가스	35psi	
Sheath 가스 온도	350°C	
Sheath 가스 유속	11L/분	
캐필러리 전압	3,500V	
노즐 전압	2,000V	
Fragmentor	175V	
Skimmer	65V	
Oct 1 RF Vpp	750V	
질량 범위	100~3,200m/z	
수집 속도	4스펙트럼/초	

이 연구에 사용된 올리고(표 2)는 Integrated DNA Technologies(Coralville, Iowa)에서 구입했으며, 표준 탈염 정제를 거쳤습니다. 제품을 물에 재현탁하여 1mM 원액을 만들고 분석을 위해 MPA로 희석했습니다. 사용된 최종 농도는 개별 실험 섹션을 참조하세요.

결과 및 토의

다양한 크기의 올리고

HILIC RapidFire/Q-TOF 분석법을 다양한 크기의 올리고에 적용할 수 있는지 평가하기 위해 18-mer(PR8), 40-mer(PRL40) 및 60-mer(PRL60)를 분석했습니다. 각 올리고 시료 10µM(카트리지에 100pmol)을 분석하고 그 결과를 IPRP 기술을 사용하여 수집한 이전 데이터와 비교했습니다.¹ 그림 1은 각 시료에 대하여 HILIC 데이터(A) 및 IPRP 데이터(B)에서 관찰된 여러 예상 전하 상태에 대한 이온을 보여줍니다. 또한 RapidFire 데이터에서 몇 가지 고유한 스펙트럼 특성이 관찰되었습니다.

첫째, IPRP 조건은 각 올리고에 대해 훨씬 더 넓은 전하 상태 엔벨로프(전하 상태 분포)로 이어졌습니다. 몇몇 경우에는 양봉 분포가 관찰되었습니다. 이는 그림 1B의 40-mer 데이터에서 가장 잘 드러납니다. 이러한 넓은 양봉 분포는 비변형 형태로 남아 있는 올리고 부분(적게 하전된 화학종으로 이어지는)에서 비롯된 것으로 생각되며, 다른 부분은 변성된 형태(보다 많이 하전된 화학종의 형성을 촉진하는)로 존재합니다.

HILIC 조건에서 수집된 스펙트럼은 전하 상태 분포가 덜 하전된 화학종으로 이동하며 훨씬 더 좁아지는 모습을 보여주었으며, 이는 이들 올리고가 본래의 상태로 유지되었음을 시사합니다. 이러한 거동은 다른 질량 분석 기술(예: 암모늄 아세테이트가 일반적으로 사용되는 비변성 단백질 분석)의 관찰 결과와 일치합니다.

둘째, IPRP 조건에서는 더 큰 올리고가 더 작은 올리고보다 더 많은 전하를 나타내었으며, 이로 인해 크기가 다른 올리고의 스펙트럼 이온에 대해 상대적으로 일관된 m/z 범위가 얻어졌습니다. 실제로는, 18-mer에서 존재비가 가장 높은 전하 상태

($m/z \sim 1,375$ 에서 -4)가, 60-mer에서 가장 높은 존재비의 전하 상태($m/z \sim 970$ 에서 -19)보다 더 큰 m/z 값을 나타냈습니다. HILIC 조건의 경우, 각 올리고에서 가장 지배적인 전하 상태의 m/z 값이 올리고의 크기가 커질수록 높아지는 경향을 보였습니다. 다시 말해, 이 결과는 올리고의 고유한 접힘 상태를 보존하는 HILIC 조건, 그리고 더 높은 전하를 띤 화학종의 형성을 억제하는 전하-전하 반발과 일치합니다. m/z 범위가 제한적인 질량 분석기에서 더 큰 올리고를 분석하려면 이 효과를 완화하기 위한 전략이 필요합니다. 이러한 연구가 진행 중이며 별도의 자료에서 설명될 것입니다.

표 2. 연구에 사용된 올리고뉴클레오타이드 및 관련 코드 표기. 모든 시퀀스는 5'에서 3' 방향으로 작성되었습니다.

이름	길이	대략적 분자량	시퀀스
PR1	20	6148	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
PR3	20	6007, 6031, 6047	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT
PR5	24	7289	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
PR7	21	6101	/5Phos/TTTTTTTTTTTTTTTTTTT
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*/32MOErG/
압타머	28	9116	/52FC/mGmGrArA/i2FU//i2FC/mAmG/i2FU/mGmAmA/i2FU/mG/i2FC//i2FU//i2FU/mA/i2FU/mA/i2FC/mA/i2FU//i2FC//i2FC/mG/3InvdT/

코드	설명
*	Phosphorothioate 결합
A	2'-deoxyribose adenine
C	2'-deoxyribose cytosine
G	2'-deoxyribose guanine
T	2'-deoxyribose thymine
mA	2'-O-methyl A
mG	2'-O-methyl G
rA	Ribose adenine
rG	Ribose guanosine
V	C, A, 및 G 혼합
/3InvdT/	3' inverted T

코드	설명
/32MOErG/	3' methoxyethoxy G
/5Phos/	5' phosphate
/52FC/	5' Fluoro C
/52MOErT/	5' 2-methoxyethoxy T
/i2FC/	Internal Fluoro C
/i2FU/	Internal Fluoro U
/i2MOErA/	Internal 2-methoxyethoxy A
/i2MOErC/	Internal 2-methoxyethoxy C
/i2MOErT/	Internal 2-methoxyethoxy T
/i2MOErG/	Internal 2-methoxyethoxy G

다양한 크기의 올리고에 대한 MS 신호 강도를 비교하기 위해 Y축을 연동하여 스케일링을 제거했습니다. 그림 2A는 HILIC 조건에서 올리고의 크기가 증가함에 따라 m/z 이온 강도가 크게 감소했음을 보여줍니다. 특히, 60-mer의 가장 지배적인 전하 상태에 대한 높이는 18-mer의 높이보다 약 25배 작습니다. 마찬가지로, 디콘볼루션 피크 높이를 비교하면(그림 2B) 18-mer에서 60-mer로 가면서 대략 25배 감소한 것으로 나타나고 있습니다. 대조적으로, IPRP로 실행한 경우 18-, 40- 및 60-mer의 디콘볼루션 피크 높이는 가장 낮은 높이의 2배 이내였습니다(데이터는 표시되지 않음).

이러한 일반적인 관찰은 이전에도 이루어졌습니다. 구체적으로, Lobue 등은 앞서 IPRP와 비교한 올리고의 HILIC 분석을 통해 (1) 더 좁은 전하 상태 분포, (2) 더 낮은 전하의 가장 지배적인 전하 상태, 그리고 (3) 올리고 크기 증가에 따른 가장 지배적인 전하 상태의 오른쪽 이동이 나타날 수 있음을 입증한 바 있습니다.

재현성

HILIC RapidFire/Q-TOF 분석법의 재현성을 테스트하기 위해 5' phosphate인 poly-dT 올리고(PR7)의 24회 반복 주입을 실행하고 BioConfirm의 자동 분석법을 사용하여 디콘볼루션을 수행했습니다. 그 결과로 얻어진 디콘볼루션 스펙트럼을 각 스펙트럼에서 가장 큰 피크로 스케일링하고 중첩시켰습니다. 결과는 24개의 스펙트럼이 거의 완벽하게 중첩되어 각 시료 내 상대 존재비의 우수한 재현성을 입증하고 있습니다(그림 3). 반복 실행에 대한 총 이온 크로마토그램(그림 3 내 삽입)은 일관된 피크 높이와 모양을 보여주고 있으며, 이는 상대 신호와 더불어 절대 MS 신호가 여러 주입에 걸쳐 안정적임을 나타냅니다.

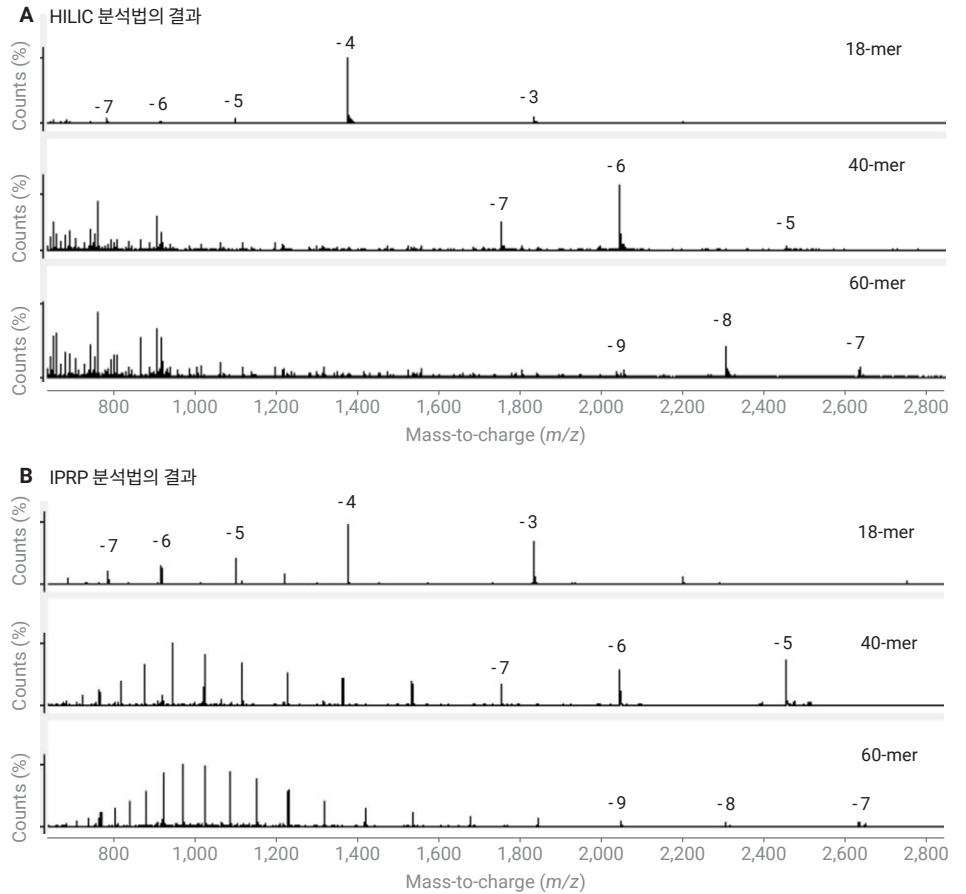


그림 1. HILIC 분석법(A), 및 비교용 IPRP 분석법(B)에 의해 실행된 18-mer(상단), 40-mer(중간) 및 60-mer(하단)의 원시 m/z 스펙트럼. 모든 스펙트럼은 각각 그 안에서 가장 큰 피크로 스케일링되었습니다. HILIC 분석법에서 지배적인 전하 상태 클러스터를 각 올리고에 표기했습니다.

불순물 측정

올리고 시료에는 종종 절단된 합성 생성물, 탈피리미딘화 및 탈퓨린화된 화합물을 포함한 다수의 저농도 불순물이 포함되어 있습니다. 따라서 올리고 특성 규명을 위한 분석법은 불순물 검출에 대해 넓은 측정 범위를 입증하는 것이 매우 중요합니다. 이는 크로마토그래피를 사용하지 않는 분석법의 경우에 특히 해당될 수 있는데, 존재비가 높은 표적 올리고가 있는 상태에서 낮은 존재비의 불순물이 검출되지 않으면 계산된 순도가 과대평가될 수 있기 때문입니다.

이 연구에 사용된 6545XT 질량 분석기는 최대 5차수의 스펙트럼 측정 범위를 제공하도록 설계되었습니다. 하지만 이 응용 연구를 위해, 여러 시료에서 매우 다른 강도의 상대적 디콘볼루션 피크 높이를 비교하여 측정 범위를 평가했습니다.

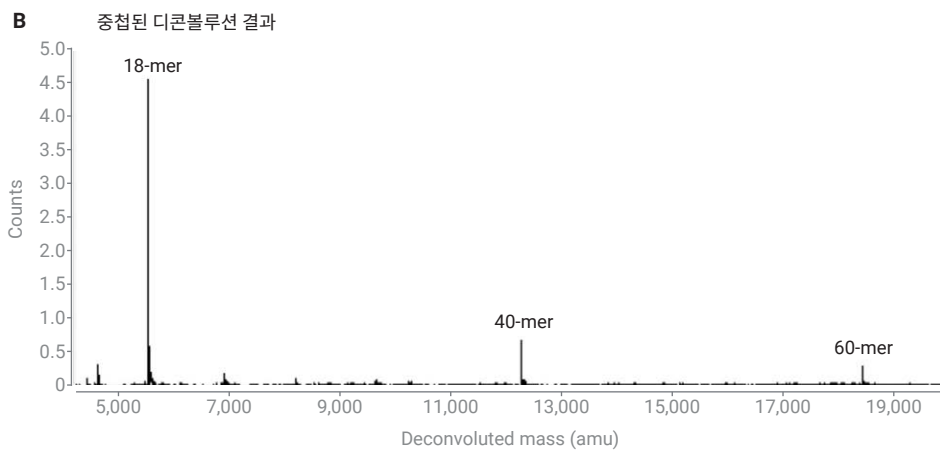
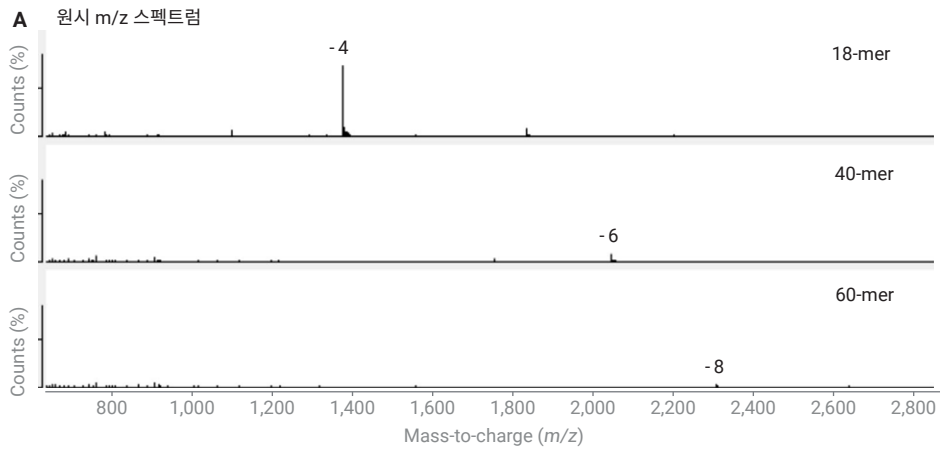


그림 2. 18-mer, 40-mer 및 60-mer에 대한 MS 신호 강도 비교. 연동된 Y축(A) 및 중첩된 디콘볼루션 결과(B)가 있는 원시 m/z 스펙트럼.

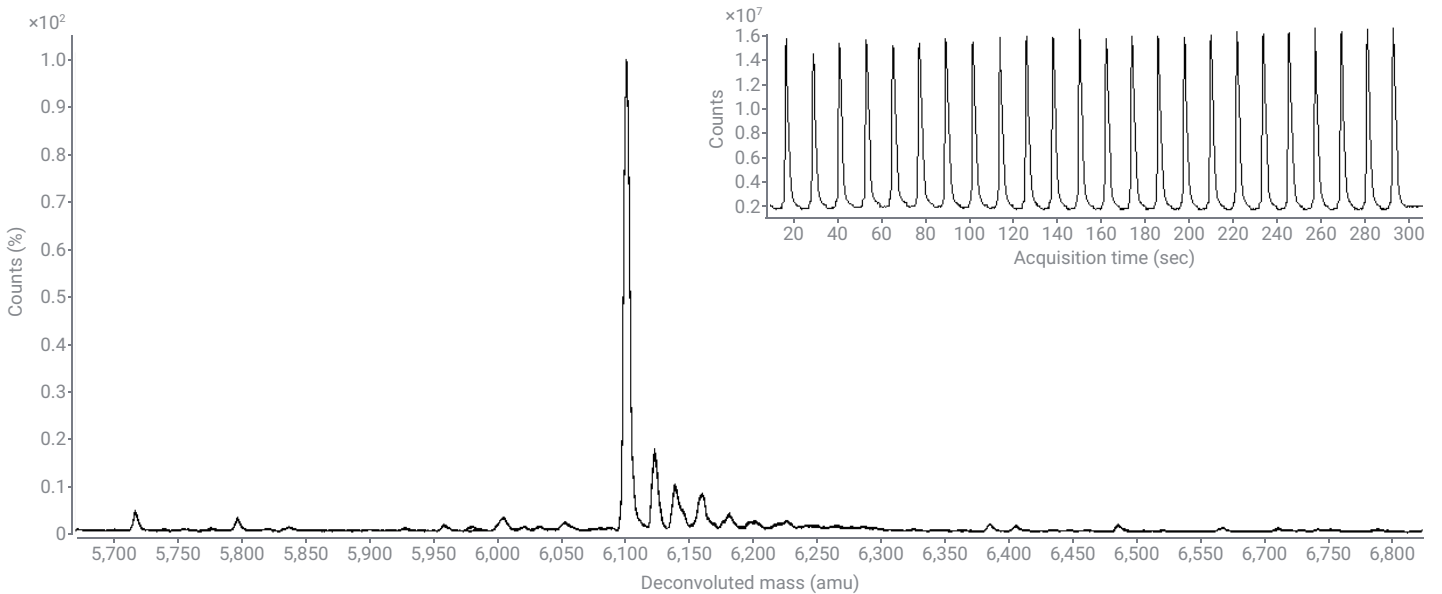


그림 3. 24회 반복 시료에 대한 총 이온 크로마토그램(삽도) 및 디콘볼루션 결과(주 그림)의 재현성.

그림 4는 20-mer DNA 가닥(PR1)의 10 μ M 주입(카트리지에 100pmol)으로 얻은 디콘볼루션 스펙트럼을 보여줍니다. 가장 풍부한 피크의 질량은 6,148Da으로, 표적 올리고의 계산된 질량과 일치합니다. 일반적으로 관찰되는 몇 가지 금속 부가물이 표적보다 큰 질량으로 존재하며, 많은 수의 낮은 질량 불순물도 관찰됩니다. 일반적으로 관찰되는 탈퓨린화(depur) 및 절단(trunc) 불순물이 예상되는 질량 범위를 면밀히 조사한 결과, 낮은 존재비를 가진 몇 개의 피크가 드러났습니다. 표적과의 질량 차이에 따라 A의 5' 절단, G의 기체상 탈퓨린화 및 G의 가수분해 탈퓨린화로 모두 할당될 수 있었습니다. 탈퓨린화 불순물의 피크 높이는 표적 대비 1% 미만의 상대 존재비를 가졌습니다.

경우에 따라 질량이 근접한 개별 성분을 포함하는 올리고 혼합물은 분석할 필요가 있습니다. HILIC RapidFire/Q-TOF 분석법으로 혼합물과 해당 성분의 개별 불순물 질량을 얼마나 잘 분해할 수 있는지 평가하기 위해 3' 가변 염기(C, A 또는 G)를 포함하는 20-mer poly-dT 올리고(PR3) 10 μ M(카트리지에 100pmol)를 주입했습니다. 그림 5A에 나타난 m/z 스펙트럼은 여러 예상 전하 상태를 보여주며, 삽입된 그림은 -4 화학종에 대한 동위원소의 질량이 잘 분해되었음을 보여줍니다. 그림 5B에 나타난 디콘볼루션 결과는 3' 말단에 C, A 또는 G가 있는 올리고의 예상 질량 및 상대 존재비와 일치하는 3개의 뚜렷한 피크를 명확하게 보여줍니다. 또한, 이들 화학종 각각에 대해 n-1 및 n-2 불순물이 관찰되었습니다. 세 가지 화학종에서 5'-T의 손실로 -304Da 피크가 생겼고, 세 가지 화학종에서 5'-TT의 손실로 -608Da(304 + 304) 피크가 생겼습니다. 3' G가 있는 올리고의 경우, 표적(2.5E5 카운트)과 5'-TT 손실 불순물(0.75E3 카운트)에 해당하는 피크 높이를 비교하면 시료 및 스펙트럼의 복잡성에도 불구하고 0.3% 불순물이 쉽게 관찰됨을 보여줍니다.

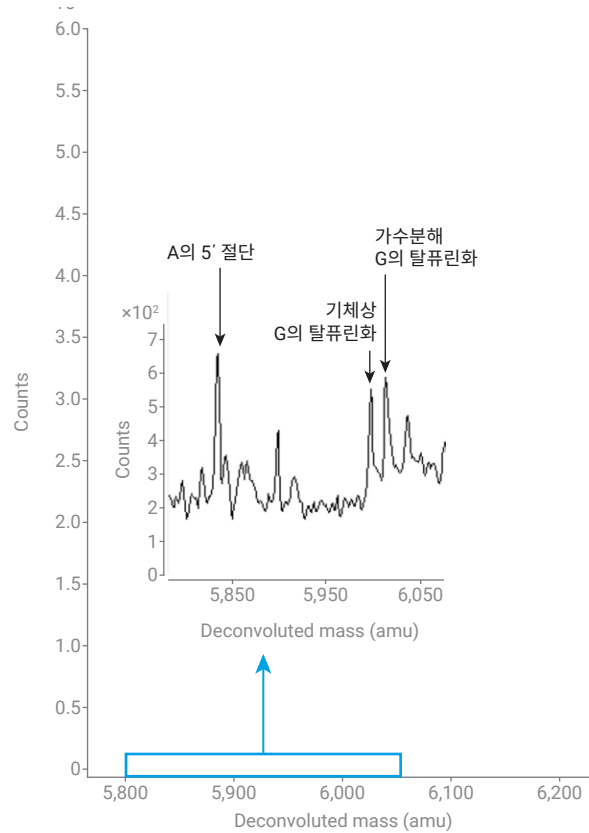


그림 4. PR1의 불순물 식별.

이 실험에서 주목할 만한 또 다른 관찰은 poly-dT 올리고에 대한 스펙트럼이 비교적 넓은 전하 상태 분포를 가지고 있다는 것입니다. 위의 관찰 내용과 논의를 기반으로 했을 때, poly-dT 올리고는 m/z 스펙트럼에서 관찰된 전하 상태를 감소시켰을 2차 구조를 쉽게 채택하지 않는 것으로 보입니다.

분석법 감도, 선형성 및 캐리오버

HILIC RapidFire/Q-TOF 분석법의 감도와 선형성을 평가하기 위해 0의 농도를 포함해 9개 농도의 PR7을 3회 주입하여 분석했습니다. MPA를 사용하여 1,250nM에서 시작해 2배 연속 희석하여 농도를

9.7nM까지 낮추었습니다. 전체 농도 범위에 걸쳐 각 농도에서 캐리오버를 연구할 수 있도록 각 반복 주입 사이에 0의 농도 시료를 주입했습니다. 54회의 모든 주입에 대한 결과 데이터를 두 가지 방식으로 분석했습니다. 첫째로, 표적 MS 측정을 위해 -4 전하 상태($m/z \sim 1,524$)에 대한 추출 이온 크로마토그램을 생성하고 평활화한 후, 적분했습니다. 각 농도에 대한 반복 시료 면적의 평균을 구하고 농도에 대해 도표로 작성했습니다. 값의 표준 편차를 그림 6A 및 6B에 표시된 동일한 도표에 오차 막대로 표시했습니다. 두 번째로, 그림 6C에 표시된 비표적 디콘볼루션 결과의 경우 -4 전하 상태($m/z \sim 1,524$)에 대한 추출 이온

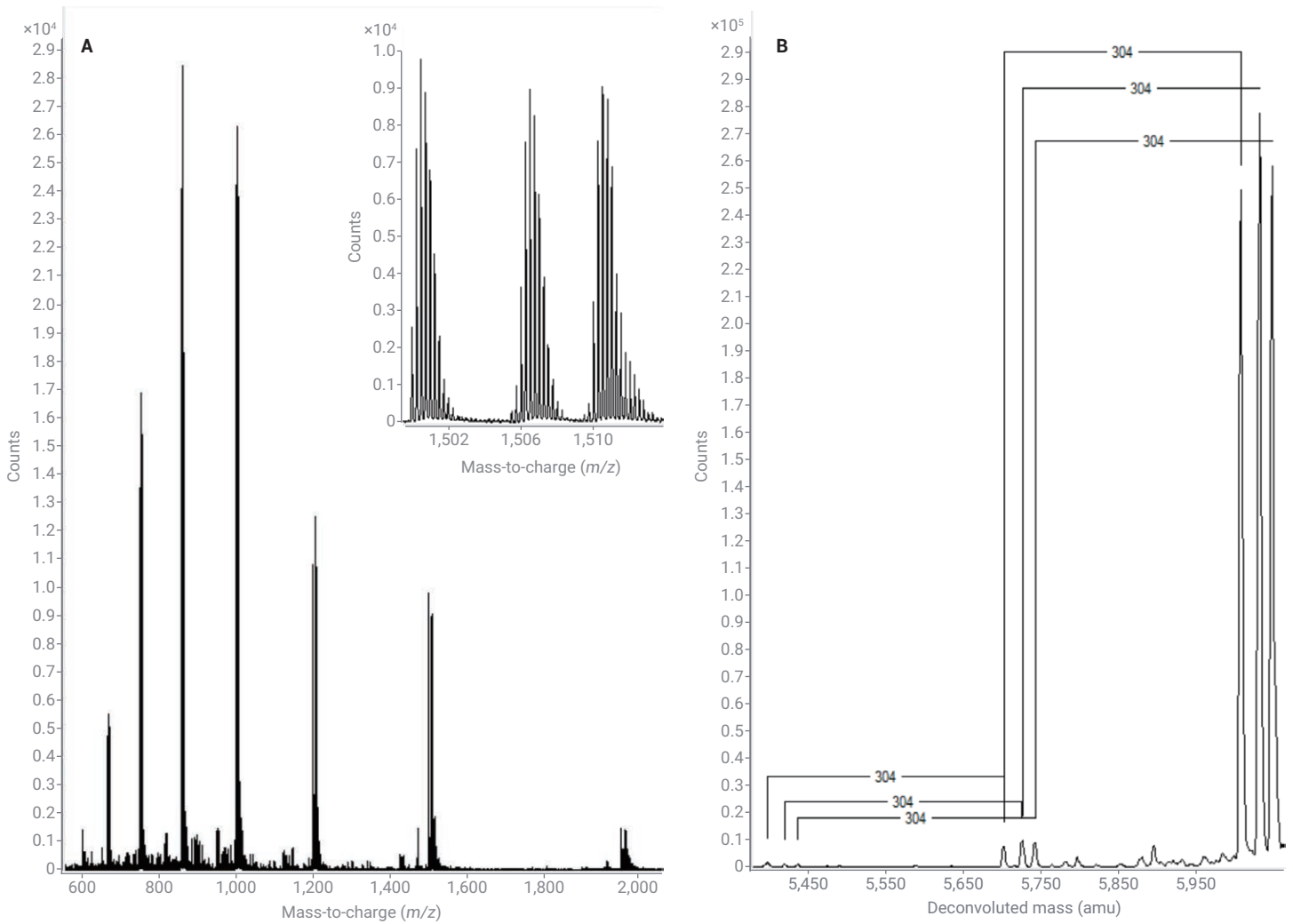


그림 5. PR3 내 저농도 불순물의 식별. 원시 m/z 스펙트럼(A) 및 디콘볼루션 결과(B).

크로마토그램을 생성하고 평활화한 후, 적분했습니다. 그런 다음 적분된 피크에 대한 평균 m/z 스펙트럼을 추출하고 디콘볼루션했습니다.

그림 6A는 이 연구에 사용된 올리고가 살피본 9개 농도에 대해 선형 감응을 가졌음을 보여주며 최적선에 대해 $R^2 = 0.9988$ 였습니다. 블랭크 데이터는 ~ 2.8 의 기울기를 보여(시료의 경우 ~ 192) 농도 범위 전체에서의 물질 혼입이 1.5% 미만임을 보여줍니다. 후속 실험에서 RapidFire의 “각 시료 사이에 블랭크 주입” 기능을 선택했을 때 이 값은 0.1% 미만까지 떨어졌습니다(데이터는 표시되지 않음).

그러나 각 시료 사이의 블랭크는 주기 시간을 두 배로 증가시키고, 이것을 사용하지 않는 경우에도 캐리어는 허용 기준을 충족했으므로 추가 블랭크 주입은 불필요한 것으로 간주되었습니다. 낮은 농도 쪽 데이터에 초점을 맞추면(그림 6B) 0과 9.7nM 농도 사이에서 AUC의 명확한 차이를 볼 수 있습니다. 신호 대 잡음비는 9.7nM에서 4 이상, 19.5nM에서 거의 6, 39nM에서 28이었습니다. 농도 감응의 기울기는 IPRP 조건(2,898, 데이터는 표시되지 않음)에서 훨씬 더 컸지만 신호 대 잡음 값은 HILIC 조건의 값과 거의 동일했습니다.

비표적 방식으로 표적 올리고를 측정할 때의 한계를 테스트하기 위해 각 농도에 대한 스펙트럼을 디콘볼루션했습니다. 저농도 주입에 대한 대표적인 결과를 그림 6C에 나타내었으며 낮은 두 자리 nM 시료에서 표적 피크를 쉽게 결정할 수 있습니다. 이러한 결과는 예상대로, 표적 추출이 더 많은 측정 감도를 제공하지만 비표적 디콘볼루션은 저농도 시료에서의 표적 식별에 여전히 매우 강력하다는 것을 의미합니다.

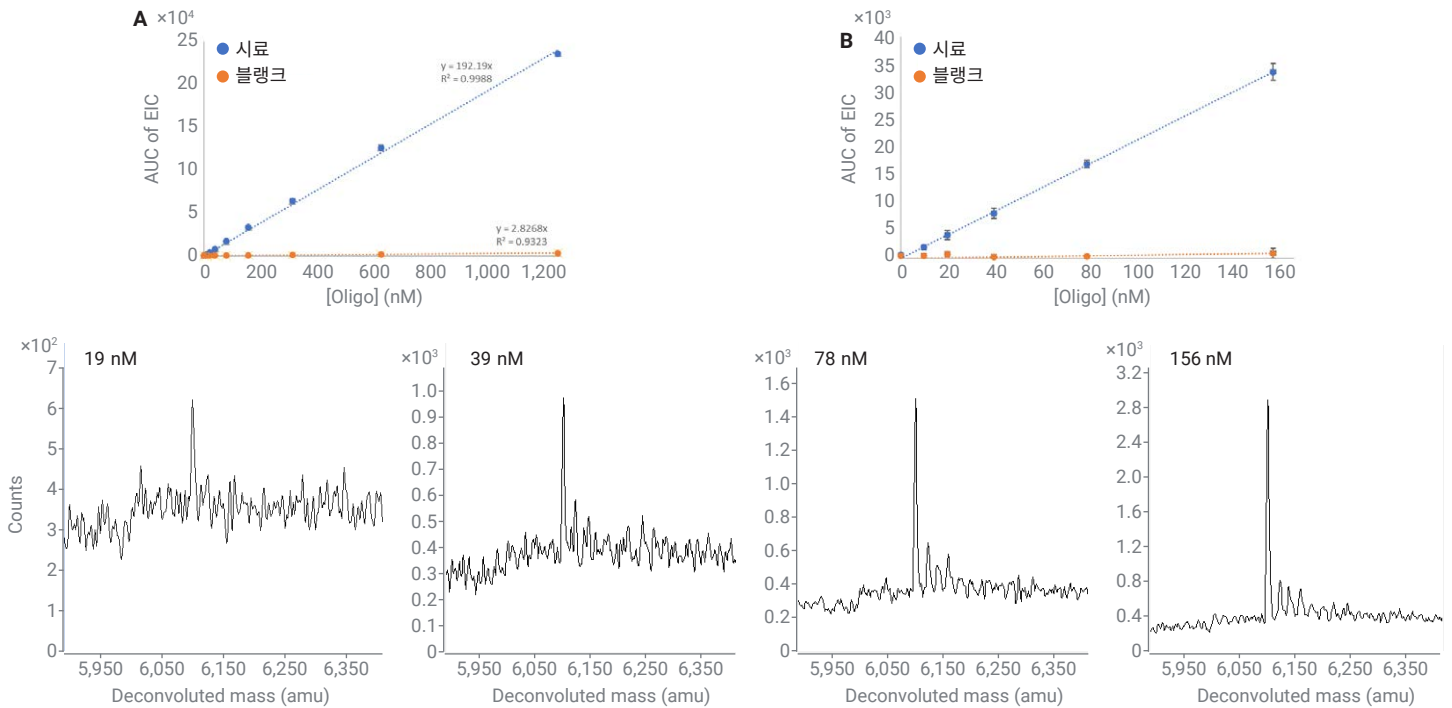


그림 6. 분석법 감도, 선형성 및 캐리어오버를 평가하기 위한 PR7의 농도 감응. 농도에 대한 신호 도표(A), 저농도 범위 확대(B) 및 디콘볼루션 결과(C).

HILIC 대 IPRP 분석법의 감도를 다른 사람들의 연구와 비교해 보면 서로 다른 내용을 엿볼 수 있습니다. Lobue는 IPRP에 비해 HILIC 조건에서 더 큰 MS 신호 감응을 보고했는데², 이는 HILIC 조건에서 더 높은 유기물 함량의 이동상 덕분에 탈용매화가 보다 효율적으로 이루어진 것으로 보았습니다. 다른 경우에는 IPRP에 비해 HILIC 조건에서 표적 피크 높이가 덜 강한 이유가 Na 및 K 부가 이온 농도의 증가 때문인 것으로 주장되었습니다. 따라서 결과에 영향을 미칠 수 있는 광범위한 수집 및 분석 파라미터를 제어하면서 다양한 올리고 크기 및 화학적 특성에 대한 이러한 기술의 감도를 비교하는 추가 조사가 필요합니다.

분석법의 다양성

올리고 시료의 화학적 특성은 크게 다를 수 있습니다. HILIC RapidFire/Q-TOF 분석법을 염기 조성, 링커 유형 및 변형이 서로 다른 올리고에 적용할 수 있는지 여부를 평가하기 위해 최적화된 분석법으로 다수의 시료에 대한 데이터를 수집했습니다. 이러한 10 μ M 시료에는 DNA 가닥 (phosphodiester 링커 및 5' phosphate 함유), ASO(phosphorothioate 링커 및 2-methoxyethoxy 빌딩 블록 함유) 및 압타머(inverted T, 2-methoxyethoxy 그룹 및 fluorinated base 함유)가 포함되었습니다. 생성된 디콘볼루션

스펙트럼은 각각 가장 큰 피크로 스케일링하고 서로 중첩시켰습니다. 그림 7에 나타난 결과는 각 시료에 대해 뛰어난 질량 정확도와 함께 매우 풍부한 표적 피크를 보여줍니다. 공통 불순물도 각 시료에 할당할 수 있었습니다(데이터는 표시되지 않음). 이러한 결과는 HILIC RapidFire/Q-TOF 분석법이 18~28-mer 범위의 광범위한 올리고 유형 및 화학적 특성에 대해 고품질 데이터를 제공할 수 있음을 보여줍니다.

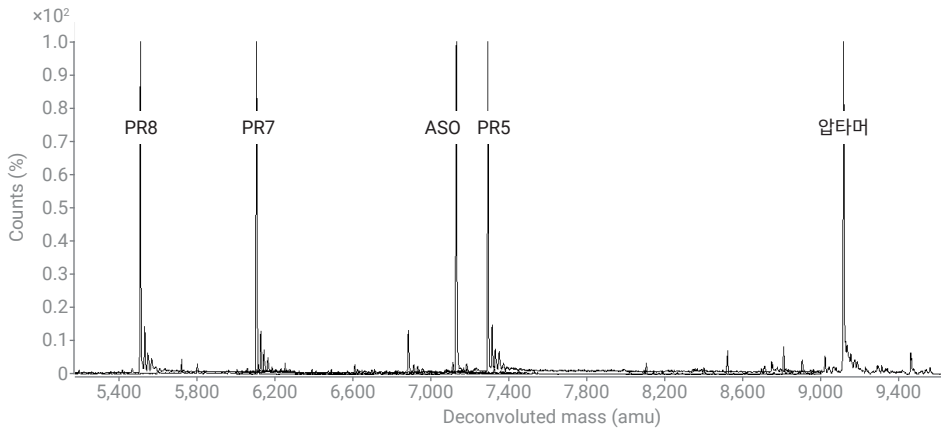


그림 7. 이온쌍 시약 없이 RapidFire MS에서 실행된 다양한 화학적 특성의 올리고에 대한 중첩된 디콘볼루션 결과.

결론

Agilent 6545XT 질량 분석기와 결합된 Agilent RapidFire 고처리량 MS 시스템은 데이터 수집 중 시료당 12초의 빠른 주기 시간을 유지함으로써 높은 처리량의 올리고 특성 규명을 제공합니다. 수집 방법은 앞서 설명한 IPRP 조건¹과 여기에 설명된 이온쌍 없는 HILIC 조건을 포함합니다. HILIC 분석법은 표준 애질런트 제품을 사용하고 이동상에 대한 pH 조절이 필요하지 않았기 때문에 설정과 사용이 간단했습니다.

HILIC 분석법은 고품질의 올리고 특성 규명에 요구되는 견고성, 재현성, 측정 범위 및 감도를 보여주었습니다. 다양한 올리고에 대한 테스트는 고도로 변형된 ASO 및 압타머 시료에서 높은 분석법 성능을 분명히 보여주었습니다. HILIC 분석법은 일반적으로 약 25-mer 크기의 올리고에 사용되지만, 최대 60-mer까지 고품질 데이터가 얻어졌습니다.

참고 문헌

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.

www.agilent.com

DE54527408

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
2022년 6월 22일 한국에서 발행
5994-4945KO

한국애질런트테크놀로지스(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