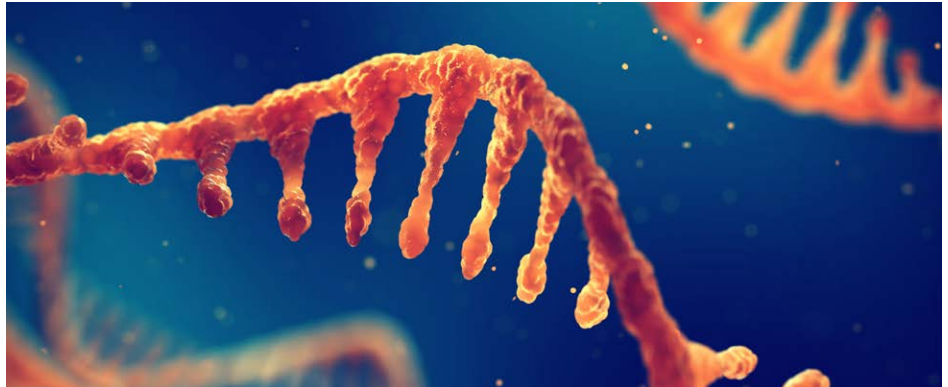


# 합성 올리고뉴클레오타이드의 고처리량 질량 분석

## Fast LC 및 RapidFire 분석법의 데이터 비교

### 저자

Peter Rye 박사 및  
Yanan Yang 박사  
Agilent Technologies, Inc.



### 서론

액체 크로마토그래피(LC) 및 질량 분석법(MS)은 합성 올리고뉴클레오타이드(올리고)의 특성화에서 중요한 역할을 하며, 지난 몇 년 사이에 올리고 생산 및 사용이 가속화되면서 더 높은 처리량의 분석법에 대한 요구가 증가했습니다. 분리가 필요한 기존의 올리고 LC/MS에는 몇 분의 실행 시간이 필요할 수 있습니다. 그러나 모든 응용 분야에 크로마토그래피 분리가 필요한 것은 아니며 MS 측정 전에 탈염으로 충분할 수 있습니다. 본 연구에서는 올리고의 고처리량 샘플링 및 탈염을 위한 Fast LC 및 RapidFire의 두 가지 분석법을 설명하고 비교합니다. 각 분석법은 18mer 분석 속도에 최적화되었으며, 그 후 18~100mer 길이의 합성 DNA 및 RNA 범위에서 성능을 특성화했습니다.

## 실험

Fast LC 분석법의 경우, Agilent 1290 Infinity II Multisampler는 스마트 오버랩을 통해 시료를 번갈아 사용하는 이중 주입 니들을 장착하여 한 니들에서 다른 니들로 시료를 추출하는 동시에 분석을 제공합니다(그림 1). MS의 분석 nebulizer에 직접 연결된 가드 컬럼을 통해 고유량으로 고속 그레디언트가 실행되어 실행 시간이 더욱 최적화되었습니다. 올리고를 빠르게 탈염하기 위해서는 Fast LC 분석법의 높은 유속이 필요했습니다. 결과적으로, 모든 크로마토그래피 피크에 걸쳐 최소 15개의 포인트를 보장하기 위해 (RapidFire 분석법의 경우 ~5초인 반면 ~2초) Fast LC 수집 속도는 초당 10개 스펙트럼으로 설정되었습니다. RapidFire 분석법(그림 2)의 경우, 시스템은 각 시료에 대해 6초의 탈염(펌프 1, 2단계) 후 6초 용리(펌프 3, 4단계)를 수행했습니다. 모든 결과 데이터는 MassHunter Bioconfirm B07을 사용하여 분석했습니다.

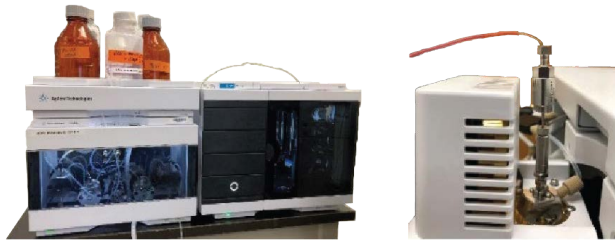


그림 1. 이중 주입 니들이 장착된 Agilent 1290 Infinity II Multisampler를 사용한 Fast LC 분석법



그림 2. Agilent RapidFire 400 고처리량 질량 분석 시스템

## Fast LC 조건

Agilent 1290 Infinity II Binary 펌프, 이중 니들이 있는 Multisampler			
컬럼	Agilent AdvanceBio Oligo UHPLC 가드 컬럼, 2.1 × 5mm, 1.7µm(품번 821725-921)		
컬럼 온도	실온		
주입 부피	10µL		
스마트 오버랩	사용됨, 교번 니들		
자동 시료 주입기 온도	5°C		
니들 세척	메탄올/물 50/50		
이동상	A) 물 + 15mM TEA + 400mM HFIP B) 메탄올		
유속	1.75mL/분		
그레디언트	Time(min)	Time(sec)	%B
	0.00	0.00	20
	0.03	1.80	20
	0.24	14.4	50
	0.25	15.0	100
	0.30	18.0	100
	0.31	18.6	20
	0.59	35.0	20
정지 시간	0.60분		
사후 시간	0.00분		

Agilent 6545 LC/Q-TOF	
이온 극성	이중 AJS 네거티브
데이터 저장	둘 모두(중심 및 프로파일)
가스 온도	350°C
건조 가스 유속	13L/분
Nebulizer 가스	60psi
Sheath 가스 온도	350°C
Sheath 가스 유속	12L/분
캐필러리 전압	3,500V
노즐 전압	2,000V
Fragmentor	200V
Skimmer	65V
Oct 1 RF Vpp	750V
질량 범위	400~3,200m/z
수집 속도	초당 10개 스펙트럼

## RapidFire 조건

Agilent RapidFire 400		
카트리지	Agilent PLRP-S, 30µm, 1,000Å, 4µL 베드 볼륨	
카트리지 온도	실온	
주입 부피	10µL	
펌프 1	물 + 7.5mM TEA + 200mM HFIP, 1.2mL/분	
펌프 2	50% 메탄올 + 7.5mM TEA + 200mM HFIP, 0.6mL/분	
펌프 3	50% 메탄올 + 7.5mM TEA + 200mM HFIP, 0.6mL/분	
1단계	시료 흡입(sip 센서 켜짐)	600msec
2단계	로드/워시(탈염)	6,000msec
3단계	추가 세척	0msec
4단계	용리(주입)	6,000msec
5단계	재평형	500msec

Agilent 6545 LC/Q-TOF	
이온 극성	이중 AJS 네거티브
데이터 저장	둘 모두(중심 및 프로파일)
가스 온도	275°C
건조 가스 유속	11L/분
Nebulizer 가스	35psi
Sheath 가스 온도	325°C
Sheath 가스 유속	11L/분
캐필러리 전압	3,500V
노즐 전압	2,000V
Fragmentor	200V
Skimmer	65V
Oct 1 RF Vpp	750V
질량 범위	400~3,200m/z
수집 속도	초당 4개 스펙트럼

## 결과 및 토의

### 처리량 및 재현성 – RapidFire

RapidFire 분석법의 처리량은 5가지 단계(~13초, 실험 참조)에 플레이트 스테이지 동작에 대한 ~1.5초를 더한 값의 합으로 결정되며 시료당 15초에 조금 못 미쳤습니다. RapidFire MS의 경우, MS 수집 시작/중지와 관련된 지연 시간을 피하기 위해 시료 세트당 단일 데이터 파일을 수집하고 수집 후 분석을 실시했습니다. 그림 3은 3개의 RapidFire 펌프 모두에 대한 압력을 24회 반복 주입 세트에 대한 하나의 연속 파일로 보여줍니다. 각 펌프에 대해 압력 피크와 밸리는 안정적이었고 안정적인 분석법과 일치하는 0.5~10MPa 범위였습니다.

### 처리량 및 재현성 – Fast LC

Fast LC 분석법의 처리량은 그레디언트 프로그램(~35초, 다음 시료 추출 시간 내에 최적화됨)과 MS 수집 중지/시작(~5초)에 의해 결정되며 시료당 40초였습니다.

그림 4는 24회 주입의 결과를 중첩한 펌프 압력 트레이스를 보여줍니다. 트레이스를 중첩해본 결과, 우수한 그레디언트 재현성이 드러납니다.

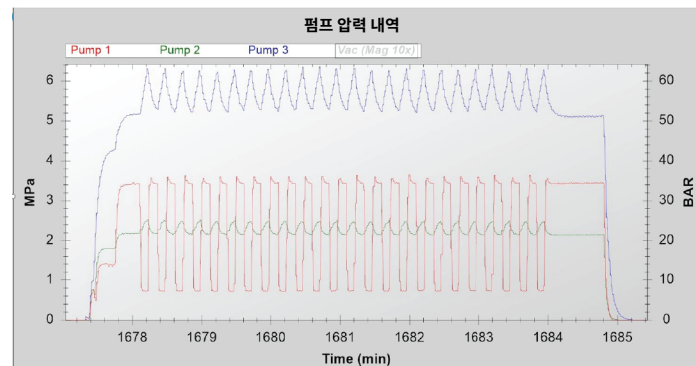


그림 3. 24회 반복 주입에 대한 3개의 RapidFire 펌프 오버레이

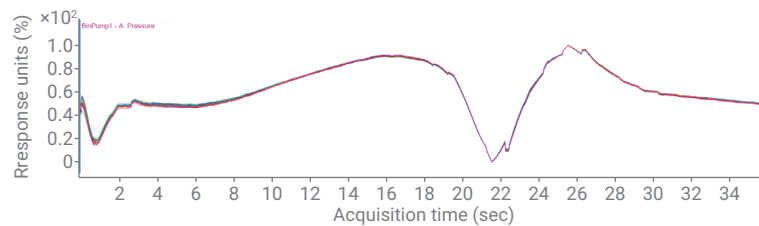


그림 4. 24회 주입에 대한 펌프 압력 트레이스로, 우수한 재현성을 보여줍니다.

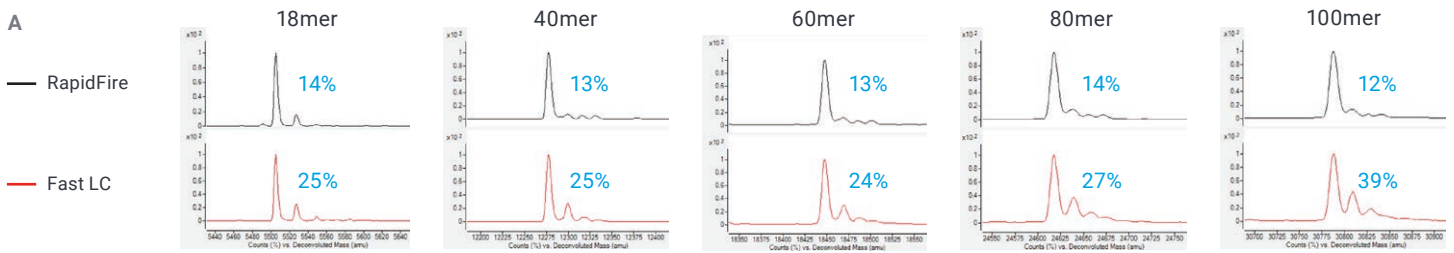
### 탈염 및 신호 강도

그림 5는 RapidFire 분석법(검정색) 및 Fast LC 분석법(빨간색)을 사용하여 얻은 정제되지 않은 18, 40, 60, 80 및 100mer 올리고의 디콘볼루션 스펙트럼을 보여줍니다. 그림 5A는 각 스펙트럼에서 가장 큰 피크에 맞게 스케일 조정된 데이터를 나타내며 피크 +22(Na) 및 +38(K) Da로 나타나는 염 부가물 감소에서 RapidFire 분석법이 Fast LC보다 더 효율적임을

보여줍니다. 각 스펙트럼에서 표적 피크에 대한 부가물의 상대 백분율은 파란색으로 표시됩니다. RapidFire 분석법에 의한 매우 효율적인 탈염은 4 $\mu$ L 베드 부피 카트리지에서 6초 2단계(실험 참조)일 때 기인되며, 이 경우 15카트리지 부피의 세척이 발생합니다. 그림 5B는 위쪽과 동일한 데이터를 보여주지만 연결된 각 올리고 크기가 Y축에 있습니다. 절대 피크 높이를 비교하면 Fast LC 분석법이 각

올리고에 대해 녹색으로 표시된 바와 같이 덜 풍부한 타겟 MS 신호를 제공한다는 것을 알 수 있습니다. 이온 억제를 감소시켜 신호를 증가시킬 수 있는 Fast LC의 분리 특성(그림 7 참조)에도 불구하고 Fast LC의 낮은 신호는 높은 펌프 유속(RapidFire의 경우 0.6mL/분인 반면 1.75), 빠른 수집 속도(RapidFire의 경우 초당 4개의 스펙트럼인 반면 10) 및 덜 효율적인 탈염이 종합적으로 영향을 미친 결과입니다.

각 스펙트럼에서 가장 큰 피크로 스케일을 조정했습니다. 표적 피크에 상대적인 염 부가물 비율은 파란색으로 표시했습니다.



연결된 Y축. 각 올리고 크기에 대한 표적 피크의 강도는 녹색으로 표시했습니다.

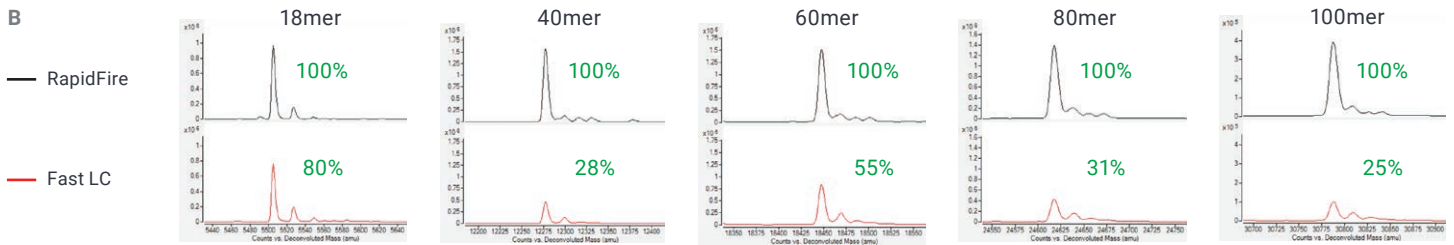


그림 5. RapidFire 및 Fast LC 분석법을 사용하여 얻은 비정제 올리고의 디콘볼루션 스펙트럼

### 올리고 머무름 - RapidFire

두 가지 분석법에 의한 올리고 분리를 평가하기 위해 길이가 18~100mer인 19개의 고유한 DNA 및 RNA 시료를 측정했습니다. RapidFire 분석법에서는 모든 올리고가 동일한 머무름 시간에 카트리지에서 용출되었습니다. 이는 작은 레진 부피(4  $\mu$ L) 카트리지를 사용하여 즉시 (밸브를 통해) 낮은 유기 조건에서 높은 유기 조건으로 전환하고 분석물/카트리지 상호작용을 최소화하기 위해 반대 방향으로 용리함으로써 분리를 방지하도록 RapidFire가 특별히 설계되었기 때문에 예상된 결과였습니다. 그림 6은 19개의 모든 시료에 대한 총 이온 크로마토그램(TIC) 오버레이를 보여줍니다.

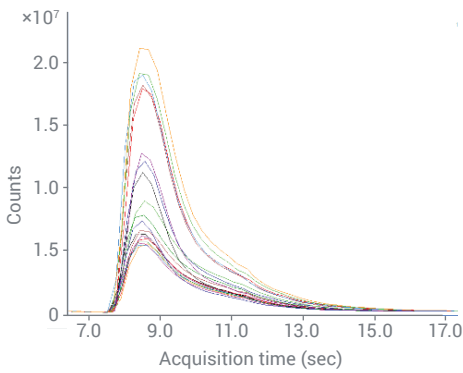


그림 6. 19개 시료에 대한 TIC. RapidFire 분석법에서는 모든 올리고의 머무름 시간이 동일했습니다.

### 올리고 머무름 - Fast LC

RapidFire 분석법과 달리 Fast LC 분석법에서는 다양한 머무름 시간이 관찰되었습니다. 그림 7A는 길이가 18에서 100mer에 이르는 19개의 고유한 DNA 및 RNA 시료에 대한 오버레이된 TIC를 보여줍니다. 이러한 시료의 경우 머무름 시간은 7초 범위 내에서 다양했습니다. 그림 7B는 단일 혼합물로 주입된 20, 40, 60, 80 및 100mer에 대한 추출 이온 크로마토그램의 오버레이로, 크로마토그래피와 질량의 조합에 따른 생성물의 분해능을 보여줍니다.

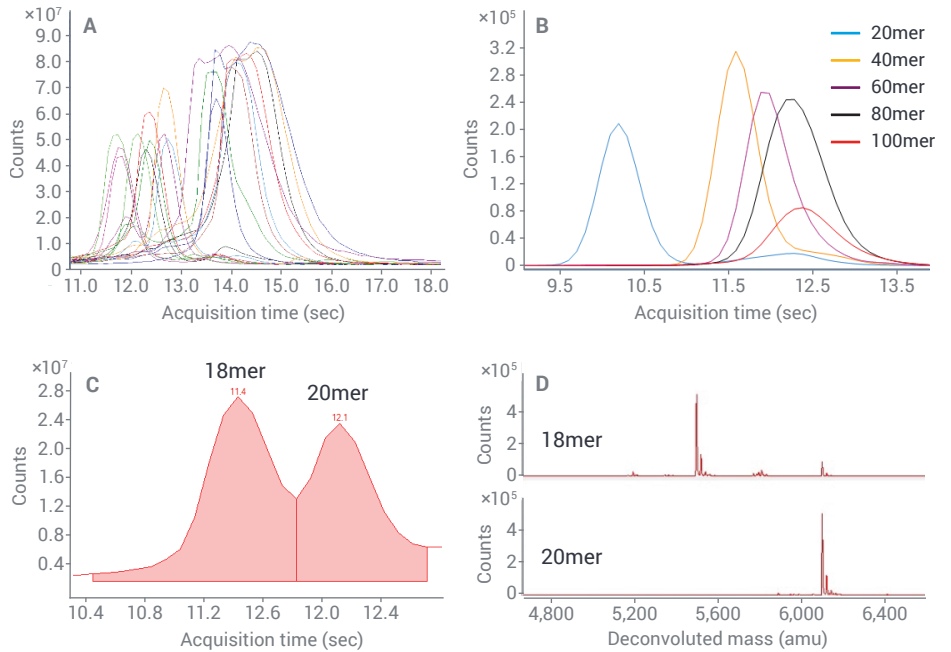


그림 7. (A) Fast LC 분석법으로 얻은 차동 RT. (B) 올리고 혼합물의 중첩된 EIC. (C) Fast LC에 의한 18 및 20mer 분리. (D) 올리고 분리가 데이터 해석을 단순화할 수 있는 이유를 보여주는 디콘볼루션 스펙트럼.

Fast LC 분석법이 크기가 비슷한 두 올리고를 분리하고 그에 대한 뚜렷한 디콘볼루션 결과를 생성하는 능력을 평가하기 위해 18 및 20mer의 1:1 혼합물을 분석했습니다. 그림 7C는 소프트웨어가 별도로 적분한 올리고 생성 피크를 보여주는 TIC를 나타낸 것입니다. 그림 7D는 두 종과 각각의 불순물을 나타내는 디콘볼루션된 결과 스펙트럼을 보여줍니다. 이 분리는 그레디언트 프로그램(표시되지 않음)을 약간 변경하여 쉽게 개선할 수 있습니다.

## 저농도 불순물 분석

올리고의 고처리량 순도 평가는 단일 크로마토그래피 피크에서 생성물을 질량 분해하여 수행할 수 있습니다. 종종 고농도의 표적과 함께 용리되는 저농도의 불순물들이 많이 존재하므로 넓은 동적 범위의 MS 측정은 물론 복잡한 스펙트럼을 디콘볼루션할 수 있는 소프트웨어가 중요합니다. 주 생성물과 동일한 크로마토그래피 피크에서 저농도 불순물의 검출 능력을 평가하기 위해 RapidFire 분석법을 사용하여 100mer 가이드 RNA를 분석했습니다. 그림 8은 크로마토그래피 분리가 전혀 없음에도 불구하고 디콘볼루션 결과에서 100mer RNA와 수많은 불순물이 발견되며, 많은 불순물의 상대 면적이 ~0.5%로 낮음을 보여줍니다. 예상대로 이 동적 범위는 분리/낮은 처리량 분석법에서 훨씬 더 우수했습니다(데이터는 나타내지 않음).

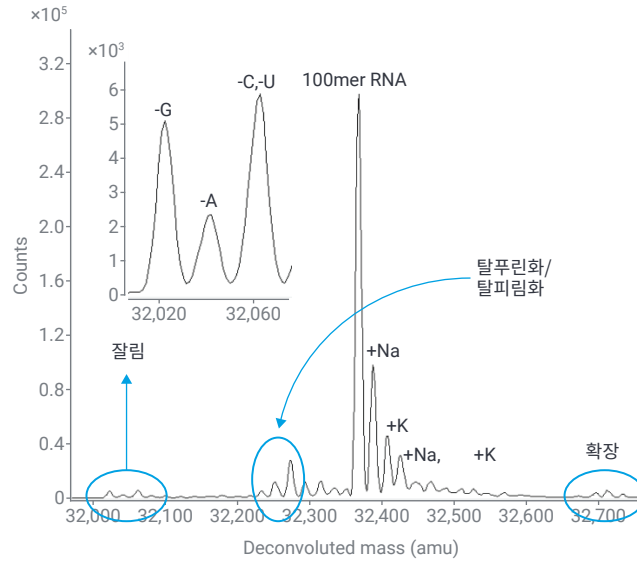


그림 8. 존재비가 낮은 불순물을 나타내는 디콘볼루션

## 결론

- RapidFire TOF 및 Fast LC TOF 분석법 모두 합성 올리고에 대해 재현 가능한 고품질 데이터를 생성했습니다.
- RapidFire 분석법은 시료당 15초의 처리량(시간당 240개 시료, 하루 5,760개)을 유지한 반면 Fast LC 분석법은 시료당 40초(시간당 90개 시료, 하루 2,160개)의 처리량을 유지했습니다.
- RapidFire 분석법은 올리고 크기가 증가함에 따라 약 2~3배, Fast LC보다 더 효율적으로 올리고를 탈염했습니다.
- Fast LC 분석법은 올리고 크기가 증가함에 따라 RapidFire의 80% ~ 25% 수준으로, 약한 강도의 표적 신호를 생성했습니다.
- 처리량을 다소 약화시키면서 Fast LC 분석법을 약간 변경하여 성능이 더욱 향상되었습니다.
- Fast LC 분석법은 혼합물의 데이터 해석을 단순화할 수 있는 특성인 올리고 종의 일부 분리를 제공했으며 애플리케이션의 처리량과 분리 요구의 균형을 맞출 수 있도록 조정할 수 있었습니다.
- 분리보다는 속도에 중점을 둔 접근 방식에도 불구하고 두 고처리량 시스템은 저농도의 많은 불순물을 질량 분해하여 우수한 올리고 데이터를 제공했습니다.

[www.agilent.com/chem/6545-lc-q-tof](http://www.agilent.com/chem/6545-lc-q-tof)

DE83824012

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022  
2022년 11월 15일, 한국에서 인쇄  
5994-3753KO

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