

# 合成オリゴヌクレオチドの ハイスループット質量分析

## 高速 LC および RapidFire メソッドのデータの比較

### 著者

Peter Rye, PhD and  
Yanan Yang, PhD  
Agilent Technologies, Inc.



### はじめに

液体クロマトグラフィー (LC) および質量分析 (MS) は、合成オリゴヌクレオチド (オリゴ) の特性解析においてきわめて重要な役割を果たしており、ここ数年でオリゴの製造量と使用量が増大するにつれて、ハイスループットの分析メソッドに対する需要が高まっています。オリゴの従来の LC/MS では、分離作業が要求されるため、何十分もの分析時間が必要になる場合があります。ただし、すべてのアプリケーションでクロマトグラフィーによる分離が必要になるわけではなく、MS 測定の前に脱塩すれば十分といえます。この実験では、オリゴのハイスループットサンプリングと脱塩に関する、高速 LC と RapidFire という 2 つのメソッドについて説明して比較します。各メソッドを 18 mer で速度について最適化した後、長さ 18 ~ 100 mer のさまざまな合成 DNA と RNA の特性について解析しました。

## 実験

高速 LC メソッドでは、Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラには、スマートオーバーラップによりサンプルごとに交互に切り替えできるデュアル注入ニードルが搭載されており、片方のニードルからサンプルを吸引すると同時に、もう片方のニードルで分析を実施できます (図 1)。さらに、MS のネブライザに直接取り付けられているガードカラムを通して、高流量の高速グラジエントにより分析時間を最適化しました。高速 LC メソッドでは、オリゴを即座に脱塩するために高流量が必要でした。次に、高速 LC の取り込みレートを 10 スペクトル/秒に設定し、すべての分離ピークにおいて最低 15 ポイントを確保しました (これは、幅にして約 2 秒であり、RapidFire メソッドでは約 5 秒でした)。RapidFire メソッド (図 2) では、サンプルごとに 6 秒の脱塩を実施した後 (ポンプ 1、状態 2)、6 秒の溶出を実施しました (ポンプ 3、状態 4)。得られたデータはすべて、MassHunter BioConfirm B07 で解析しました。



図 1. デュアル注入ニードル搭載の Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラを用いた高速 LC メソッド



図 2. Agilent RapidFire 400 ハイスループット質量分析システム

## 高速 LC 条件

Agilent 1290 Infinity II バイナリポンプ、デュアルニードル搭載のマルチサンプラ			
カラム	Agilent AdvanceBio オリゴ UHPLC ガードカラム、 2.1 × 5 mm、1.7 μm (p/n 821725-921)		
カラム温度	室温		
注入量	10 μL		
スマートオーバーラップ	使用可、ニードルを交互に切り替え		
オートサンプラ温度	5 °C		
ニードル洗浄	メタノール:水 50:50		
移動相	A) 水 + 15 mM TEA + 400 mM HFIP B) メタノール		
流量	1.75 mL/min		
グラジエント	時間 (分)	時間 (秒)	%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	
ストップタイム	0.60 分		
ポストタイム	0.00 分		

Agilent 6545 LC/Q-TOF	
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	350 °C
乾燥ガス流量	13 L/min
ネブライザガス	60 psi
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧	3,500 V
ノズル電圧	2,000 V
フラグメンタ電圧	200 V
スキマ電圧	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
質量範囲	400 ~ 3,200 m/z
取り込みレート	10 スペクトル/秒

## RapidFire 条件

Agilent RapidFire 400		
カートリッジ	Agilent PLRP-S, 30 µm, 1,000 Å, 4 µL ベッドボリューム	
カートリッジ温度	室温	
注入量	10 µL	
ポンプ 1	水 + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP, 1.2 mL/min	
ポンプ 2	50 % メタノール + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP, 0.6 mL/min	
ポンプ 3	50 % メタノール + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP, 0.6 mL/min	
状態 1	サンプルの吸引 (吸引センサオン)	600 msec
状態 2	ロード/洗浄 (脱塩)	6,000 msec
状態 3	追加の洗浄	0 msec
状態 4	溶出 (注入)	6,000 msec
状態 5	再平衡化	500 msec

Agilent 6545 LC/Q-TOF	
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	275 °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	325 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリ電圧	3,500 V
ノズル電圧	2,000 V
フラグメンタ電圧	200 V
スキマ電圧	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
質量範囲	400 ~ 3,200 m/z
取り込みレート	4 スペクトル/秒

## 結果と考察

### スループットと再現性 - RapidFire

RapidFire メソッドのスループットは、5 つの状態の合計 (約 13 秒、「実験」を参照) とプレートステージ移動の約 1.5 秒を合わせて算出しており、サンプルあたりわずか 15 秒程度でした。RapidFire MS では、MS 取り込みの開始/停止に関係する遅延時間を排除するために、サンプルセットごとに 1 つのデータファイルを取り込み、取り込み後に解析しています。図 3 は、1 セット 24 回繰り返し注入における 3 台すべての RapidFire ポンプの圧力を、1 つのファイルにまとめて示したものです。各ポンプにおいて、圧力のピークと谷は一定で、範囲は 0.5 ~ 10 MPa の間であり、安定したメソッドとなりました。

### スループットと再現性 - 高速 LC

高速 LC メソッドのスループットは、グラジエントプログラム (約 35 秒、次のサンプル吸引の時間内に平衡化) と MS 取り込みの停止/開始 (約 5 秒) を合わせて算出しており、サンプルあたり 40 秒でした。

図 4 は、24 回注入のポンプ圧力のトレースを重ねて表示したものです。トレースは重なり合っており、グラジエントの再現性が良好であることを示しています。

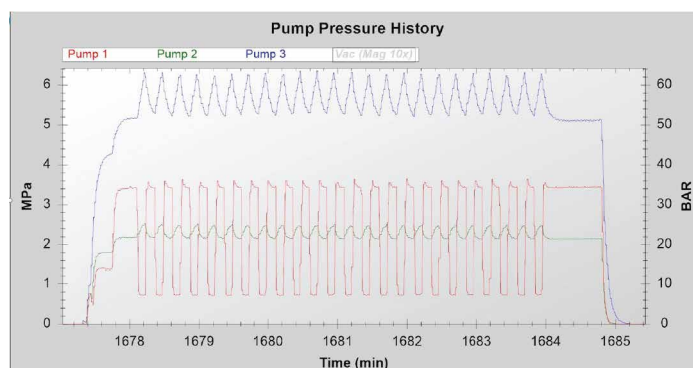


図 3. 24 回繰り返し注入における 3 台の RapidFire ポンプの重ね表示

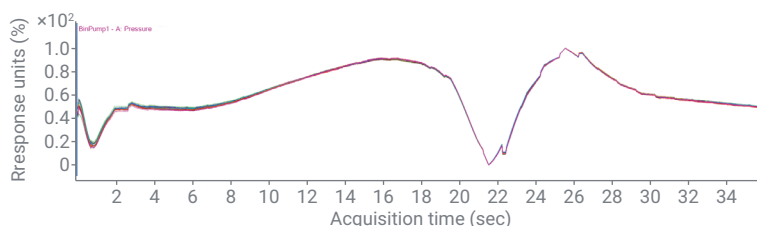


図 4. 24 回注入におけるポンプ圧力のトレース。良好な再現性を示しています。

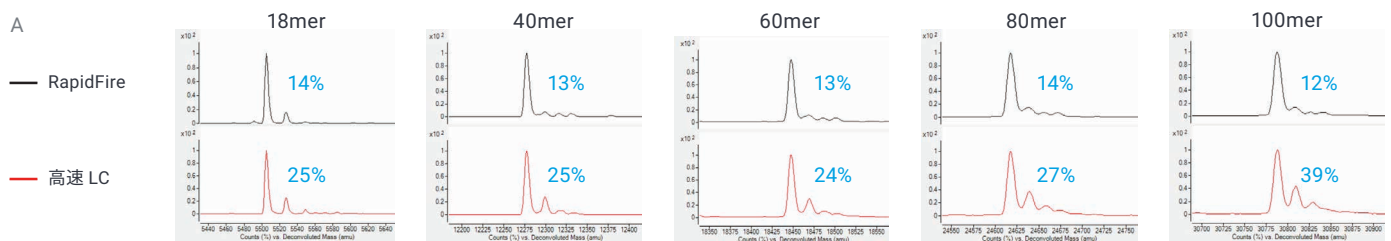
## 脱塩とシグナル強度

図 5 は、RapidFire メソッド (黒) と高速 LC メソッド (赤) で取り込んだ、未精製の 18、40、60、80、100 mer オリゴのデコンボリュートしたスペクトルを示しています。図 5A は、各スペクトルの最大ピークでスケールしたデータを表しており、高速 LC より RapidFire メソッドの方が塩付加物が少なくなりました。これは +22 (Na) と +38 (K) Da のピーク強度に顕著に現れています。各スペクトルにおいて、ターゲットピークに対する付加物の相対パーセントを青色で示しています。RapidFire

メソッドによる脱塩の効率が非常に高くなっているのは、4  $\mu$ L ベッドボリュームカートリッジの 6 秒の状態 2 (「実験」を参照) によるものであり、結果的に 15 カートリッジボリュームの洗浄が実施されます。図 5B は上と同じデータを示していますが、各オリゴサイズの Y 軸をリンクさせています。絶対ピーク高さを比較してみると、RapidFire メソッドの強度に比べて高速 LC メソッドではターゲット MS シグナルのアバンダンスが低くなっており、これをオリゴごとに緑色で示しています。高速 LC の分離特性 (図 7 を参照) は、イオン抑制を

低減させ、それによってシグナルを増大させることができるにもかかわらず、高速 LC の方がシグナルが低くなっているのは、高いポンプ流量 (RapidFire の 0.6 mL/min に対して 1.75 mL/min)、高速な取り込みレート (RapidFire の 4 スペクトル/秒に対して 10 スペクトル/秒)、および効率の低い脱塩が組み合わさった結果です。

各スペクトルの最大ピークでスケール。ターゲットピークを基準にした、塩付加物のパーセントを青色で示しています。



Y 軸をリンクさせた場合。各オリゴサイズのターゲットピークの強度を緑色で示しています。

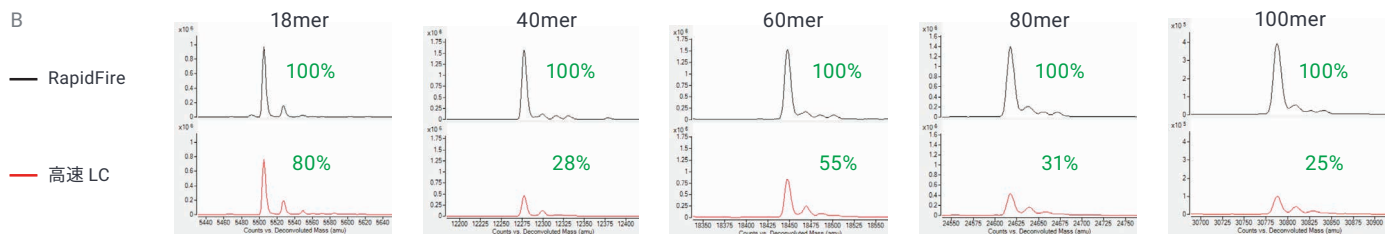


図 5. RapidFire および高速 LC メソッドで取り込んだ、未精製オリゴのデコンボリュートしたスペクトル

### オリゴのリテンション – RapidFire

2つのメソッドによるオリゴの分離を評価するために、長さ18～100merの範囲の19種類の異なるDNAおよびRNAサンプルを測定しました。RapidFireメソッドでは、すべてのオリゴが同じリテンションタイムでカートリッジから溶出しました。この結果は、RapidFireが、担体量が少ない(4 μL)カートリッジを使用して、低有機溶媒条件から高有機溶媒条件へ即座に切り替え(バルブにより)、分析対象物とカートリッジの相互作用を最小限に抑えつつ逆方向に溶出することにより、吸着を抑制するように特別に設計されているためと考えられます。図6は、19種類のサンプルすべてのトータルイオンクロマトグラム(TIC)を重ねて表示したものです。

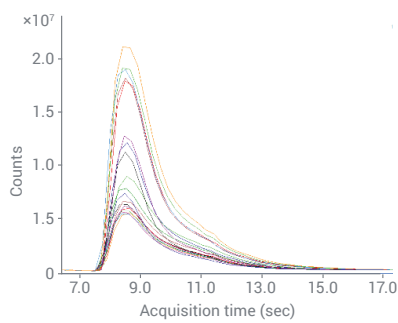
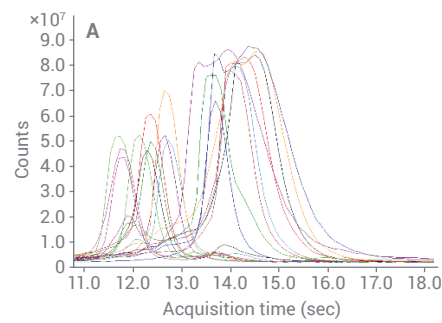


図6. 19種類のサンプルのTIC。RapidFireメソッドでは、すべてのオリゴのリテンションタイムが同じでした。

### オリゴのリテンション – 高速 LC

RapidFireメソッドとは対照的に、高速LCメソッドでは、リテンションタイムが分布していることがわかりました。図7Aは、長さ18～100merの19種類の異なるDNAおよびRNAサンプルのTICを重ねて表示したものです。これらのサンプルでは、リテンションタイムは、7秒の時間範囲内で分布していました。図7Bは、単一の溶液として注入された20、40、60、80、100merの抽出イオンクロマトグラムを重ねて表示したものであり、クロマトグラフィーと質量情報を組み合わせることで、これらの生成物が分離されていることを示しています。



サイズに近い2つのオリゴを分離して、個別のデコンボリューション結果を生成するという高速LCメソッドの能力を評価するために、18merと20merの1:1混合物を分析しました。図7CにTICを示していますが、これはソフトウェアが個別に積分して生成したオリゴのピークを表しています。図7Dは、最終的にデコンボリュートしたスペクトルを示しており、2つの種とそれぞれの不純物を表しています。この分離は、グラジエントプログラムに少し変更を加えるだけで、簡単に改善できます(示していません)。

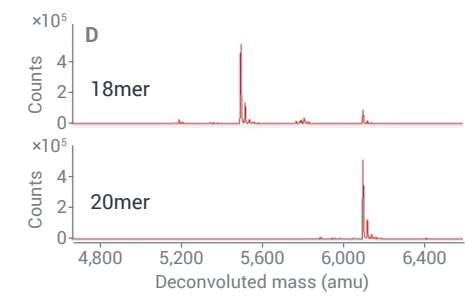
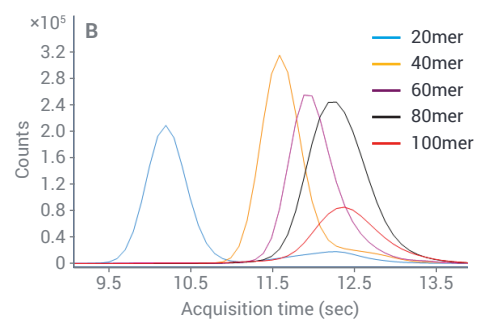
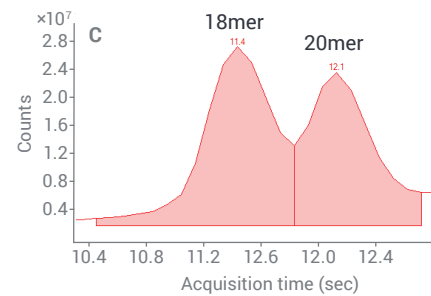


図7. (A) 高速LCメソッドでの分布しているRT。(B) オリゴ混合物のEICの重ね表示。(C) 高速LCによる18merと20merの分離。(D) デコンボリュートしたスペクトル。オリゴ分離により、データ解析が簡略化できる様子を示しています。

## 低アバンドンス不純物の分析

オリゴのハイスループット純度評価を実施するには、単一の分離ピークから生成物を質量分離します。たいていの場合、多くの低アバンドンス不純物は、高アバンドンスタージットと共溶出しており、MS 測定では、広いダイナミックレンジと、複雑なスペクトルをデコンボリュートできるソフトウェアが不可欠になります。主生成物と同じ分離ピークでの低アバンドンス不純物の検出について評価するために、RapidFire メソッドを使用して、100 mer ガイド RNA を分析しました。図 8 は、クロマトグラフィー分離がゼロであるにもかかわらず、デコンボリュート結果は 100 mer RNA と多数の不純物が得られていることを示しており、その多くの相対面積は約 0.5 % と低い値です。予想していたとおり、このダイナミックレンジは、分離/低スループットメソッドによりさらに向上しました（データは示していません）。

## 結論

- RapidFire TOF と高速 LC TOF の両方のメソッドにおいて、再現性が高く、高品質の合成オリゴ測定データが生成されました。
- RapidFire メソッドでは、サンプルあたり 15 秒のスループット（1 時間あたり 240 サンプル、1 日あたり 5,760 サンプル）を維持し、高速 LC メソッドでは、サンプルあたり 40 秒のスループット（1 時間あたり 90 サンプル、1 日あたり 2,160 サンプル）を維持しました。

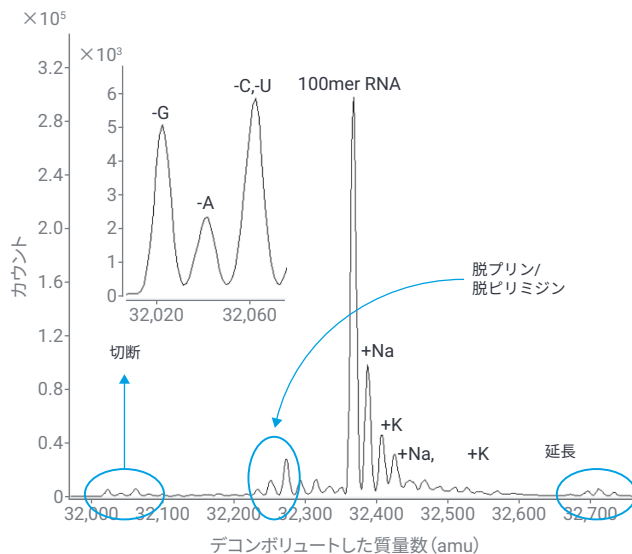


図 8. 低アバンドンス不純物を示すデコンボリュート

- RapidFire メソッドは、高速 LC より高い効率でオリゴを脱塩しており、オリゴのサイズが大きくなるにつれて、塩付加体の強度は約 1/2 ~ 1/3 になりました。
- 高速 LC メソッドでのターゲットシグナル強度は RapidFire より低く、オリゴのサイズが大きくなるにつれて、80 % から 25 % に低下しました。
- 高速 LC メソッドに少し変更を加え、スループットを若干低く抑えることで、性能がさらに向上しました。
- 高速 LC メソッドでは、オリゴ種をある程度分離することができ、この特性により、混合物のデータ解析を簡略化することができ、アプリケーションのスループットと分離ニーズのバランスをとるように調整することもできました。
- 両方のハイスループットシステムが、分離よりも速度を重視したアプローチであるにもかかわらず、大量の低アバンドンス不純物を検出できました。MS による質量分離により、オリゴの分析に必要な優れたデータを取得しました。

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

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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。

DE83824012

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, November 15, 2022

5994-3753JAJP