

Agilent 7100 모세관 전기영동 시스템의 모세관 겔 전기영동을 통한 올리고뉴클레오타이드 분석

저자

Jana Boden,
ICA Boden-Haumann-Mainka,
Langen

Jens Meixner
Agilent Technologies Inc.

개요

올리고뉴클레오타이드는 유사한 이동성(사슬 길이와 무관)으로 인해 기존의 모세관 구역 전기영동(CZE)을 적용했을 때 크기에 따라 분리할 수 없습니다. 그러나 겔의 역할을 할 수 있는 매트릭스(sieving matrix, 이하 체질 매트릭스)를 사용하면 이러한 분석물질을 분리할 수 있습니다. 이를 위해서는 분석물 분자의 크기에 따라 체질 매트릭스를 통과하는 이동 시간의 차이를 만들 수 있도록 캐필러리를 체질 매트릭스(겔)로 채웁니다. 본 연구에서는 세 가지 서로 다른 겔, 두 가지 검출기 필터 및 세 가지 중성 코팅 캐필러리를 네 가지 표준물질 분리를 통해 평가했습니다. 또한 분석 요구에 따라 분리를 최적화하기 위한 다양한 방법을 소개합니다.

서론

이 응용 자료는 올리고뉴클레오타이드 분석에 초점을 맞추고 있습니다. 서로 다른 겔, 필터, 온도 및 전압과 같은 상이한 파라미터를 사용하는 이 분석은 올리고뉴클레오타이드 시료 분석을 위한 출발점 겸 지침으로서 활용할 수 있습니다. Agilent 7100 모세관 전기영동 시스템은 프로그래밍 가능한 세척 단계, 다양한 파장 필터 및 바이알의 충전 수준을 쉽게 관찰할 수 있다는 점 등을 바탕으로 모세관 겔 전기영동(CGE)에 매우 적합합니다. CGE는 크기 차이에 따라 분석물질을 분리하는 데 완벽하기 때문에 이 분석에 사용되었습니다. 분리 파라미터를 최적화하면 한 단위의 차이만으로도 분리가 가능합니다.

실험

이 섹션에서는 적용된 소모품, 화학물질, 분석법 및 해당 준비 과정을 요약합니다.

재료

Polyethylene glycol 35000(BHA 안정화) (8.18892)은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입했습니다. Sigma-Aldrich(Darmstadt, Germany)에서 Polyethylene glycol 35000 구입 시, 두 가지 제품 번호 로트(94646/BCCD4303 및 03557/BCCF4480)로 주문했습니다. BisTris(0715)는 VWR(Darmstadt, Germany)에서 구입했습니다. 붕산(1.00165), 물(1.15333, LC/MS 등급) 및 아세토니트릴(1.00030)은 Merck(Darmstadt, Germany)에 주문했습니다. 사용된 모든 캐필러리(PVA 100µm(G1600-60419), µSIL WAX 100µm(197-7202), µSIL DNA 75µm(199-2602)), 필터(260nm 검출기 필터(G7100-62700) 및 280nm CIEF 필터 (G7100-68750)) 및 DNA Ladder(5190-9029), 그리고 RNA 분리 표준물질(5190-9028)은 Agilent Technologies(Waldbronn, Germany)에 주문했습니다. Oligo(dT)12-18 Primer(18418-012)는 Thermo Fisher

Scientific(Dreieich, Germany)에서 구입했습니다. 테스트 혼합물 Polyd(A), 40-60mer Oligos(362387)는 Sciex(Darmstadt, Germany)에 주문했습니다.

분석법 파라미터

표 1은 수집 방법의 실험 조건을 나타냅니다.

프리컨디셔닝

캐필러리 외부와 전극에서 겔의 오염 및 점착을 방지하기 위해, 표 2에 설명된 바와 같이 주입구 전극 세척(Wash Inlet Electrode) 기능에 이어 5초간 물에 담그는 과정을 프리컨디셔닝에 적용했습니다.

같은 이유로 여러 수위로 채워진 바이알이 사용되었습니다. 전해액 바이알 각각에는 1mL 전해액을 채우고 담금용 바이알에는 약 1.3mL의 물을 채웠습니다. 겔 바이알에는 0.5mL 겔만 넣었습니다. 시료 용액을 담기 위해 마이크로바이알을 사용했으며,

10~40µL의 시료를 채웠습니다. 사용자는 주입 단계에서 전극과 캐필러리가 반드시 시료 용액에 잠겨 있는지 확인해야 합니다. 모든 바이알에서 기포가 생기지 않도록 주의해야 합니다.

외부 압력을 가하여 퍼지 시간을 300초로 단축할 수 있습니다.

전해질 용액과 겔 준비

전해질 용액과 겔은 다음과 같이 준비했습니다.

전해질 용액: 200mM BisTris, 200mM 붕산

BisTris 4.18g과 붕산 1.24g을 칭량하여 100mL 메스플라스크에 함께 넣고 물을 표시선까지 채웠습니다. 초음파 수조에서 약 5분 처리한 후, 투명한 용액이 얻어졌습니다. 사용하기 전에 용액을 0.45µm 시린지 필터로 여과했습니다.

표 1. 실험 조건.

파라미터	값
장치	Agilent 7100 모세관 전기영동 시스템
펌웨어	B.07.021
CDS	Agilent OpenLab ChemStation C.01.10
전해질	200mM BisTris, 200mM 붕산
캐필러리	개별 섹션/그림 설명 참조 - 짧은 쪽에서부터 33cm
UV 인터페이스	“파란색” 인터페이스(G7100-60310)
주입	-10kV, 10sec. 짧은 쪽 테스트의 경우: +10kV, 5초(또는 그림 및 섹션의 설명에 따름)
검출	260nm(BW10), Ref off(또는 그림의 설명에 따름)
전압	-25kV(짧은 쪽 테스트의 경우: +25kV)(또는 그림의 설명에 따름)
온도	30°C

표 2. 프리컨디셔닝 파라미터.

기능	파라미터
주입구 전극 세척	주입구: 공기 배출구: 공기
플러시	600초 (주입구: 겔, 배출구: 물)
주입구 바이알 로딩	물
대기	5초
주입구 전극 세척	주입구: 공기 배출구: 공기

폴리머 용액(겔)

폴리에틸렌 글리콜(PEG) 2.7g을 칭량하여 10mL 메스플라스크에 넣고 여과한 전해질 용액을 표시선까지 채웠습니다. 투명한 용액을 얻기 위해 플라스크를 초음파 수조에서 15분 동안 3회 이상 처리했습니다. 그 사이에 플라스크를 손으로 약 5회 정도 흔들었습니다. 생성된 겔은 27% 폴리머, 200mM BisTris 및 200mM 붕산을 함유하게 됩니다. 이렇게 용액 사용 준비를 마쳤습니다.

20% 아세트오니트릴 함유 폴리머 용액(겔)

폴리에틸렌 글리콜 2.7g을 칭량하여 10mL 메스플라스크로 옮겼습니다. 아세트오니트릴 2mL를 첨가하고 여과한 전해질 용액을 표시선까지 플라스크에 채웠습니다. 투명한 용액을 얻기 위해 플라스크를 초음파 수조에서 15분 동안 3회 이상 처리했습니다. 그 사이에 플라스크를 손으로 약 5회 정도 흔들었습니다. 생성된 겔은 27% 폴리머, 20%(v:v) 아세트오니트릴, 160mM BisTris 및 160mM 붕산을 포함하게 됩니다. 이렇게 용액 사용 준비를 마쳤습니다.

현 테스트를 통틀어 총 4개의 겔을 준비했습니다.

1. **겔 1:** PEG, Sigma-Aldrich(제품 번호 94646)
2. **겔 2:** PEG, Merck(제품 번호 8.18892.1000)
3. **겔 3:** PEG, Sigma-Aldrich(제품 번호 03557)
4. **겔 4:** PEG, Merck, 제품 번호 8.18892.1000, 및 20% 아세트오니트릴

모든 겔은 준비 후 냉장고(2~8°C)에 보관했습니다. 테스트 기간 동안 모든 겔은 3주간 사용할 수 있었습니다. 더 오래 보관할 수도 있었겠지만 이 부분을 테스트하지는 않았습니다.

표준 용액 준비

- **표준 용액 1:** DNA Ladder
표준물질(애질런트): 1mL의 물을 원래의 시료 바이알에 첨가하고 용액을 2초 동안 불텍싱했습니다.
- **표준 용액 2:** RNA 분리
표준물질(애질런트): 1mL의 물을 원래의 시료 바이알에 첨가하고 용액을 2초 동안 불텍싱했습니다.
- **표준 용액 3:** Oligo(dT)12-18
Primer(Invitrogen): 해당 시료 용액은 즉시 사용 가능한 것이었습니다.
- **표준 용액 4:** 테스트 혼합물 Polyd(A), 40-60mer Oligos(Sciex): 0.5mL의 물을 원래의 시료 바이알에 첨가하고 용액을 2초 동안 불텍싱했습니다.

주입하기 전 표준 용액 1, 2 및 4를 직접 마이크로바이알에서 물과 1:2로 희석하고(예: 20μL 물 + 20μL 표준 용액) 약 2초 동안 불텍싱했습니다. 시료 용액 3은 사용하기 전에 물과 1:10으로 희석했습니다. 이를 위해 3μL의 시료를 27μL의 물에 첨가하여 2초 동안 불텍싱했습니다. 그 밖의 희석은 그림에 나와 있습니다.

결과 및 토의

다음 섹션에서는 아래 내용들을 자세히 살펴볼 것입니다.

- DAD 필터의 영향
- 겔 종류의 영향
- 다양한 종류의 캐필러리를 사용한 분리
- 연속 주입의 재현성
- 다양한 캐필러리 길이의 영향
- 온도 및 전압의 영향

파장 필터 260nm, 280nm 사용 및 미사용 테스트

첫 번째 테스트는 DAD 필터 없이 수행했습니다. 겔 1과 2는 PVA 캐필러리에 사용했으며 짧은 쪽(8cm)과 긴 거리 쪽(24cm) 모두에 대해서 분리를 수행했습니다. Figure 1에서 표준 1의 6개 피크가 검출 가능함을 알 수 있습니다. 다음 단계에서는 필터를 사용하여 측정을 수행했습니다. 이를 위해 DAD 앞에 260nm 필터와 280nm 필터를 번갈아 설치하고 각각의 경우에 겔 1과 PVA 캐필러리를 사용하여 모든 표준 용액을 테스트했습니다. Figure 1은 세 가지 검출 옵션 모두에 대한 표준 용액 1의 결과를 비교한 내용입니다. 대체적으로 세 가지 검출 방법 모두 6개의 피크를 검출할 수 있습니다. 날카로운 피크와 양호한 분리능을 얻으려면 DAD 필터를 사용해야 합니다. 이론적으로는 두 필터 모두 이 응용에 적합합니다. 그러나 표준 4에 들어 있는 pd(A) 올리고의 분리를 위해서는 260nm 필터 사용이 더 바람직합니다.

다양한 겔 테스트

PVA 캐필러리와 280nm 필터를 사용하여 네 가지 겔을 테스트했습니다. 처음에는 세 가지 서로 다른 배치(batch)의 PEG를 비교했습니다. 표준 용액 2의 경우 모든 피크가 분리되었습니다. 특히 마지막 두 피크(20mer 및 21mer)를 분리하기가 어려웠는데, 두 구조 사이의 차이가 1mer 밖에 되지 않기 때문입니다. 결론적으로, 3가지 PEG 모두가 해당 올리고뉴클레오타이드 분리에 적합합니다.

분리능을 높이기 위해 20% 아세트오니트릴(ACN)의 사용이 권장됩니다. 표준 1의 경우 ACN 겔을 사용하여 분리능을 개선할 수 있었습니다. 그러나 표준 2와 3의 경우 ACN이 있는 겔과 없는 겔을 사용한

분리능의 차이는 미미합니다. 표준 4의 경우는 분리능이 크게 향상되었습니다. 요약하면, 겔에 ACN을 사용하는 것은 시료의 종류에 따라 판단해야 합니다. 피크 분리가 어려운 일부 시료의 경우 ACN을 사용하는 것이 유리할 수 있습니다.

다양한 유형의 캐필러리 테스트

올리고뉴클레오타이드의 분리를 위해 세 가지 유형의 캐필러리를 테스트했습니다.

- 캐필러리 1: PVA, 100 μ m
- 캐필러리 2: μ SIL WAX, 100 μ m
- 캐필러리 3: μ SIL DNA, 75 μ m

모든 캐필러리 유형에 대해 총 길이는 33cm로 준비하고 짧은 쪽 검출, 280nm 필터 및 겔 1 조건으로 테스트했습니다. 이론적으로, 표준 용액 2의 네 가지 올리고뉴클레오타이드를 분리하는 경우에는 세 개의 캐필러리를 모두 적용할 수 있습니다. 피크의 분리능은 세 캐필러리 모두에서 유사합니다. 캐필러리 1과 2에서 더 우수한 신호 대 잡음비가 얻어집니다. 이는 해당 캐필러리의 보다 두꺼운 내경으로 그 이유를 설명할 수 있습니다.

요약하면, 캐필러리 1과 2를 사용하는 것이 더 바람직합니다. 그러나 캐필러리 1은 카세트에 설치할 때 다루기 더 쉽다는 한 가지 장점이 있습니다. 고정된 스톱퍼가 검출기의 올바른 조정을 보장하기 때문에 검출 창을 정렬 인터페이스에 더 안전하고 빠르게 배치할 수 있기 때문입니다.

이동 시간의 재현성

분석법의 재현성은 겔 1, 280nm 필터, PVA 및 μ SIL-WAX 캐필러리를 사용하여 표준 용액 2를 6회 연속 주입하는 것으로 테스트했습니다(Figure 2 참조). RSD가 1% 미만인 양호한 결과를 나타냈습니다(표 3). 따라서 두 캐필러리 모두 재현성 있는 분석을 위해 사용할 수 있습니다. 두 측정 모두에서 7~12번 주입의 재현성이 개선된 것으로 나타났습니다. 더 나은 캐필러리의 컨디셔닝 상태가 그 이유일 수 있습니다. 이동 시간의 상대 표준 편차(RSD)는 마지막 피크(21mer)에 대해 계산하였습니다.

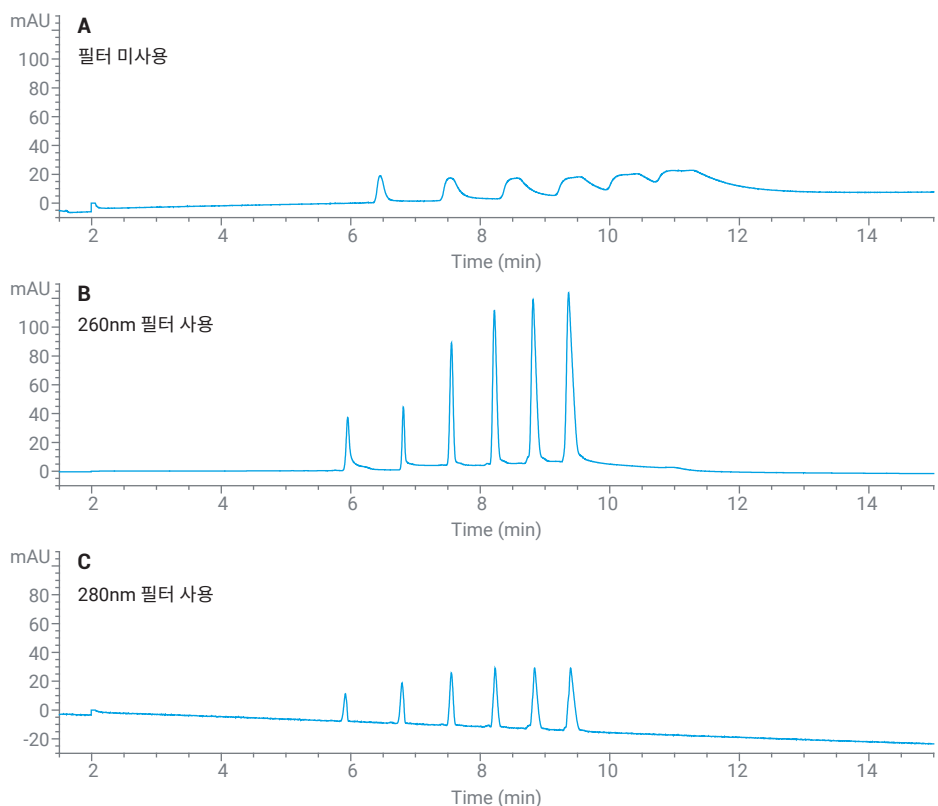


그림 1. 표준 용액 1(1:2 희석), 짧은 쪽, 겔 1, 다른 DAD 필터 적용.

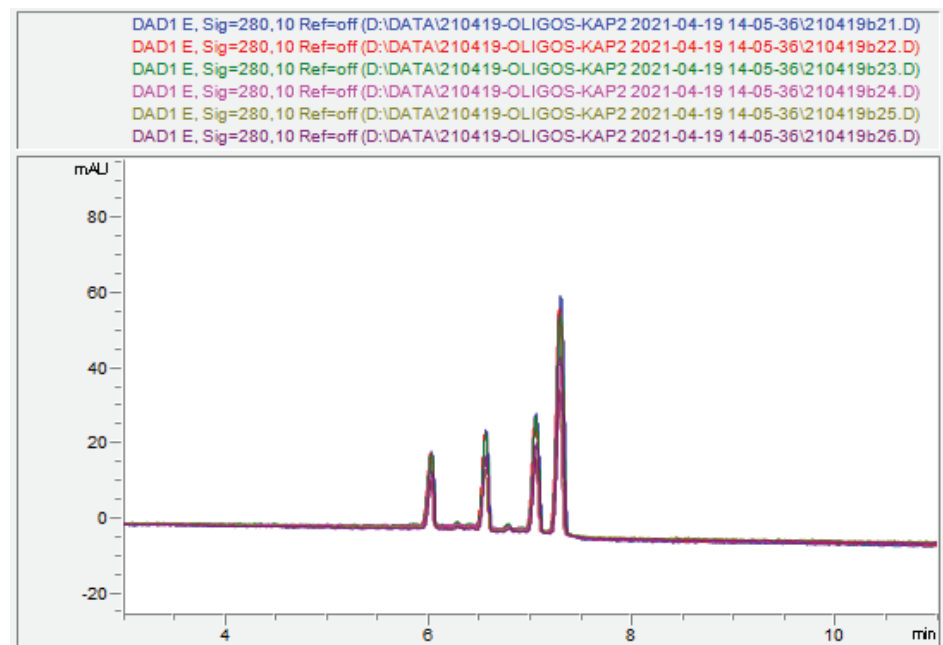


그림 2. 겔 1과 μ SIL-WAX 캐필러리를 사용한 연속 주입 오버레이.

유효 길이

33cm 캐필러리를 적용할 때, 두 가지 다른 분리 길이를 사용할 수 있습니다. 주입구 홈 바이알 쪽에서 시료를 주입하는 경우 검출기까지의 분리 길이는 24.5cm가 됩니다. 그런데 시료는 반대편(배출구 홈 바이알 쪽)에서도 주입할 수 있습니다. 이 쪽이 검출 지점에 더 가깝기 때문에 그 결과 분리 길이는 8.5cm(짧은 쪽 검출)에 불과하게 됩니다. 이런 식으로 분석법 최적화 중에 동일한 캐필러리로 두 가지 다른 길이를 편리하게 테스트할 수 있습니다. 비교 측정은 겔 1, PVA 캐필러리 및 260nm 필터를 사용하여 수행했습니다. Figures 3 ~ 5는 표준 용액 1~3에 대한 피크 영역을 확대하여 동일하게 나타낸 정기영동도입니다. 피크의 베이스라인 분리가 짧은 쪽 분리에서도 달성되는 것을 관찰할 수 있습니다. 더 긴 거리를 사용하면 분명히 훨씬 더 나은 분리능을 얻을 수 있습니다. 그러나 분석 시간이 상당히 길어진다는 단점이 있습니다. 표준 용액 4의 경우, Figure 6에서 볼 수 있듯이 긴 쪽 검출이 권장됩니다. 결론적으로는 두 선택 모두 캐필러리를 교환하지 않고 본 시료에 적용할 수 있습니다. 우선 순위는 사용자가 결정할 수 있습니다.

표 3. 상대 표준 편차.

테스트	캐필러리	RSD(%) (주입 1-6)	RSD(%) (주입 7-12)	RSD(%) (주입 1-12)
1	PVA	0.90	0.31	0.67
2	μSIL-WAX	0.51	0.11	0.36

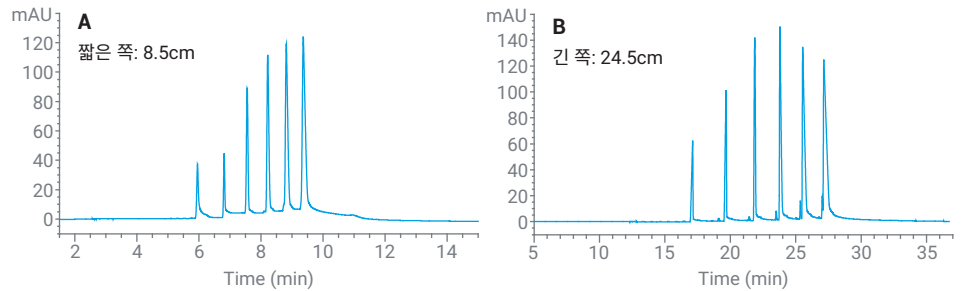


그림 3. 두 개의 서로 다른 분리 길이를 사용한 표준 1의 분리.

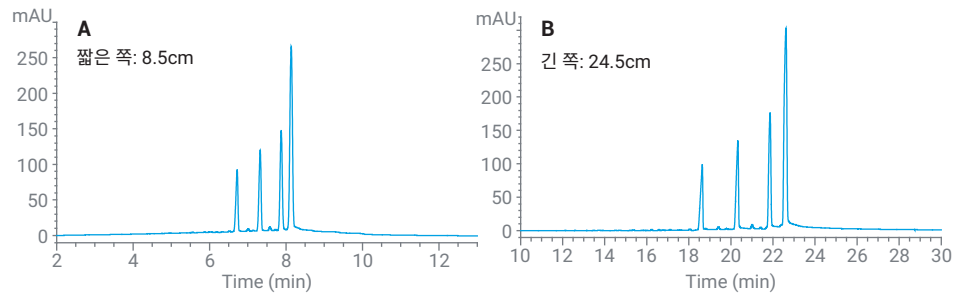


그림 4. 두 개의 서로 다른 분리 길이를 사용한 표준 2의 분리.

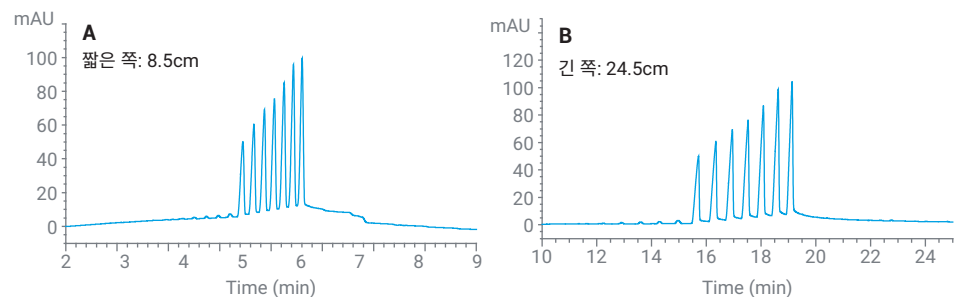


그림 5. 두 개의 서로 다른 분리 길이를 사용한 표준 3의 분리.

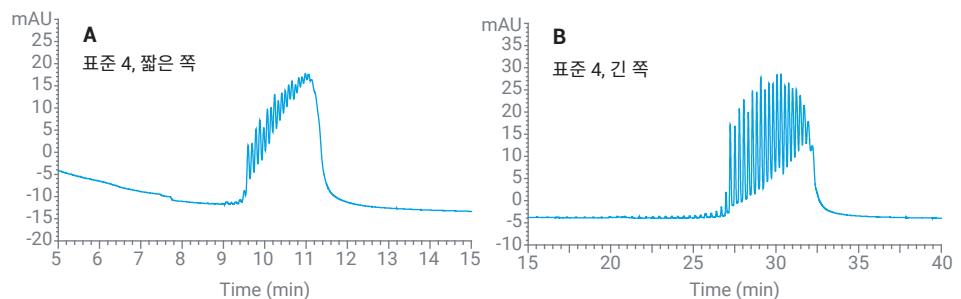


그림 6. 두 개의 서로 다른 분리 길이를 사용한 표준 4의 분리.

온도의 영향

온도에 변화를 주는 것은 분리를 최적화하는 간단한 방법이 될 수 있습니다. 표준 용액 2의 분리능 및 이동 시간에 미치는 온도의 영향을 20~35°C 범위에서 조사했습니다. Figure 7은 온도가 감소함에 따라 분리능이 향상됨을 보여주며, 각 경우에 마지막 두 피크의 분리능을 그림에 나타내었습니다. 반면에 온도를 낮출수록 점도가 높아지므로 분석 시간도 함께 길어집니다. 따라서 시료의 종류와 사용자의 목적에 따라 최적의 온도를 선택해야 합니다.

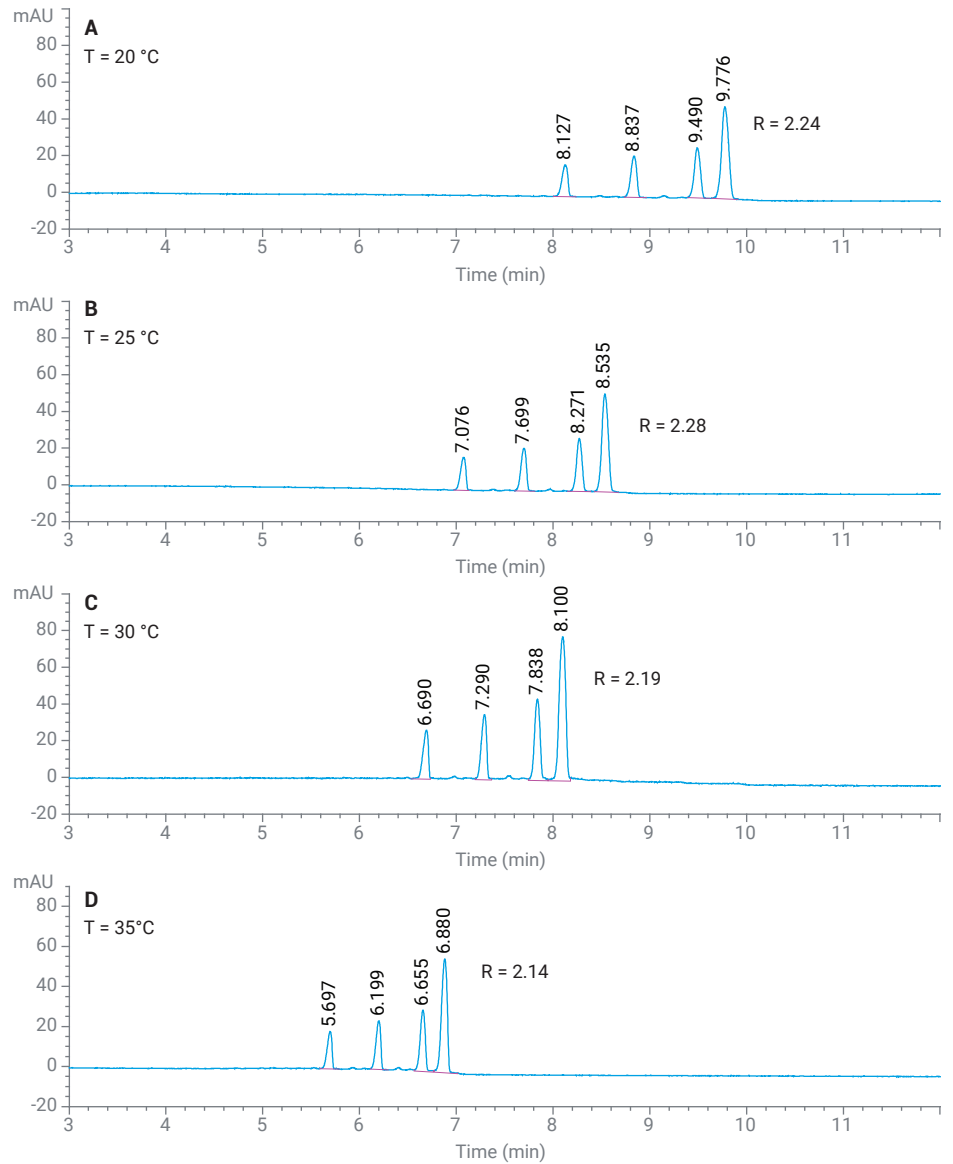


그림 7. 온도의 영향(겔 1, PVA 캐필러리 및 280nm 필터 사용).

전압의 영향

Figure 8에는 표준 용액 2에 대한 분리 전압의 영향을 조사한 결과를 나타냈습니다. 주된 관심사는 마지막 두 피크의 분리능으로, 각각 마지막 피크의 오른쪽에 표기되어 있습니다. 분석 시간에 큰 영향을 미친다는 것이 확연하게 드러납니다. 또한 전압이 증가함에 따라 피크도 더 날카로워지는 것으로 보아 더 빠른 분리로 인한 분리능 손실이 그리 크지 않음을 알 수 있습니다. Figure 8D의 높은 전압과 낮은 온도 조합의 경우에도 흥미로운 결과가 나타나는 것을 쉽게 알 수 있습니다. 여기에서 분리는 25kV(Figure 8B 참조)보다 빠르지만 분리능은 실질적으로 변하지 않고 있습니다. 결론적으로, 높은 분리 전압은 높은 시료 처리량을 계획하는 사용자에게 흥미로울 수 있습니다.

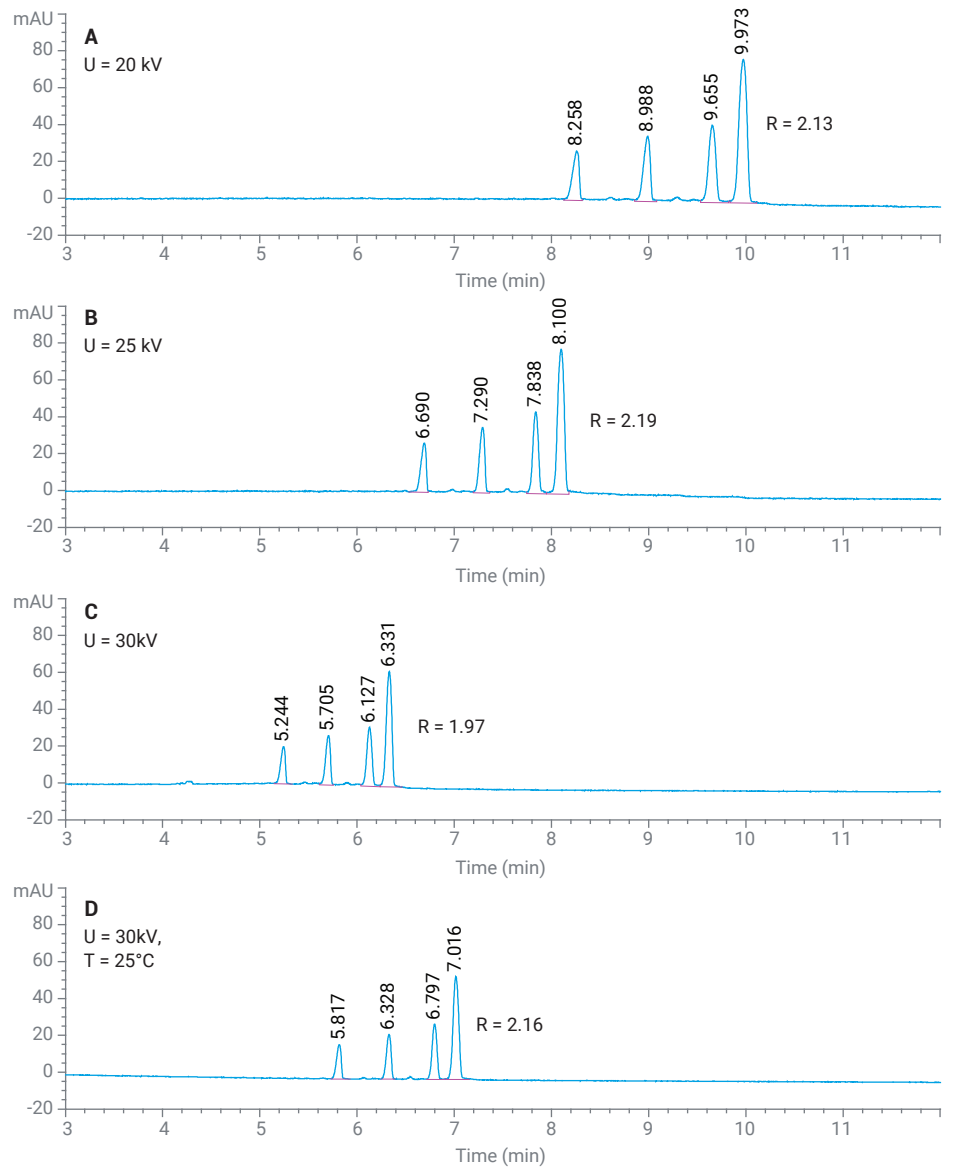


그림 8. 전압의 영향(겔 1, PVA 캐필러리 및 280nm 필터 사용).

표준 용액 4의 분리 최적화

표준 용액 4에서의 올리고 분리는 상대적으로 긴 사슬(40mer ~ 60mer)을 가진 20개의 연속적 pd(A) 올리고가 관련되어 있기 때문에 까다롭습니다. 따라서 캐필러리 길이의 영향, 아세토니트릴 첨가 및 전압 최적화를 조사했습니다. 실험을 위해 PVA 캐필러리와 260nm 필터를 적용하고 서로 다른 조건에서 전기영동도를 얻었습니다. 최상의 결과가 Figure 9에 나와 있으며, 스케일은 각각의 경우에 맞추어 조정되었습니다. 겔에 20% 아세토니트릴을 사용함으로써 분리가 크게 개선되었습니다 (Figure 9B 참조). 마지막으로 전압을 30kV로 증가시키면서 동시에 온도를 25°C로 낮추어 테스트했습니다. Figure 9C에서 이러한 변경으로 최상의 분리가 얻어졌음을 알 수 있습니다. 필요한 경우 추가적인 최적화를 수행할 수 있습니다. 예를 들어, 시료 농도 및 주입을 조정하거나 아세토니트릴 함량을 추가로 최적화 하는 것입니다. 따라서 난해한 올리고 분리의 경우에도 실험 조건을 간단하고 빠르게 조정하여 최적화가 가능하다는 것이 입증되었습니다.

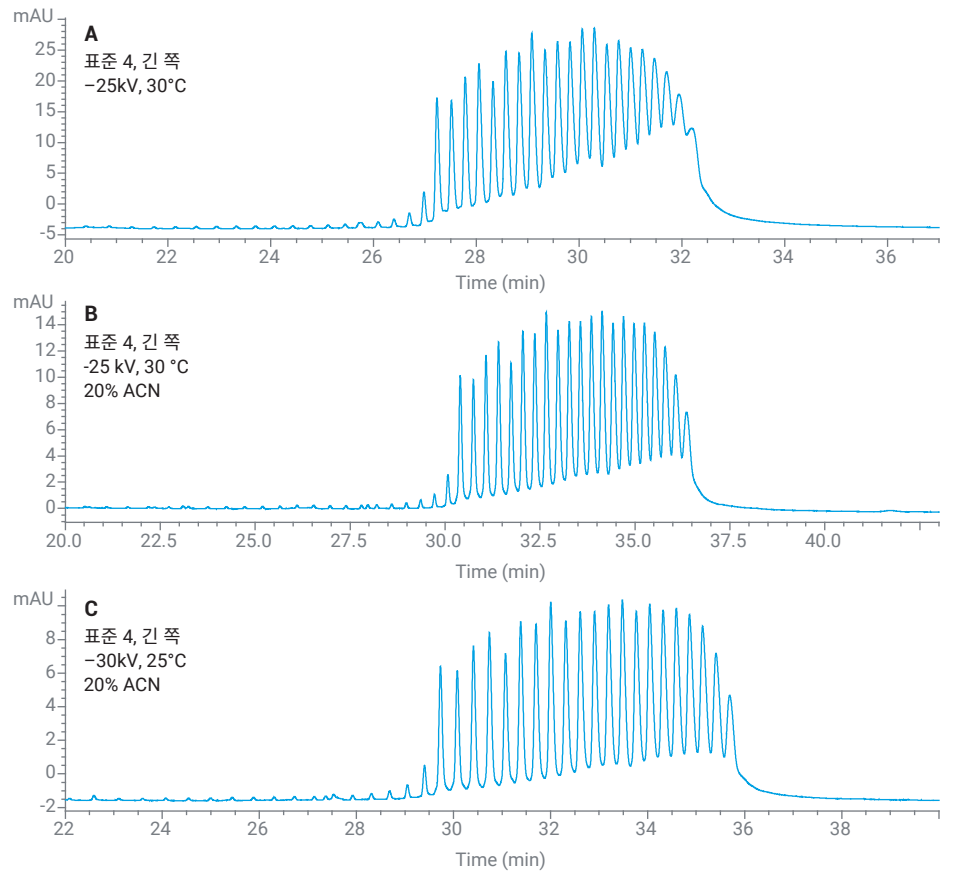


그림 9. 표준 용액 4(1:2 희석)에 대한 실험 조건 최적화.

결론

애질런트 모세관 전기영동 시스템을 사용한 올리고뉴클레오타이드 분석에 설명된 절차와 효과는 현재 사용 가능한 화학물질과 재료를 사용하여 잘 재현할 수 있습니다. 결과는 아래와 같이 간략하게 요약할 수 있습니다.

검출 가능성: 원칙적으로는 필터 없이도 분리를 수행할 수 있습니다. 그러나 피크 분리능과 재현성이 좋지 않으므로 권장하지는 않습니다. 260nm 또는 280nm 검출기 필터를 사용하여 우수한 분리능을 얻을 수 있었습니다. 두 필터 모두 원칙적으로 적합하지만 260nm 필터에서 더 나은 신호 대 잡음비를 얻었습니다. 특히 pd(A) 올리고의 경우 260nm 필터를 사용해야 합니다.

겔: 테스트한 3개의 PEG는 모두 해당 응용에 동일하게 적합합니다. 아세토니트릴을 첨가하면 일부 분리 성능을 향상시킬 수 있습니다. 따라서 현재 구매 가능한 화학물질을 이용해 분리를 성공적으로 수행할 수 있습니다. 준비된 겔은 최소 3주 동안 사용할 수 있습니다.

캐필러리: PVA 모세관과 μ SIL-WAX 캐필러리의 사용이 권장됩니다. 두 캐필러리 모두에서 우수한 분리능과 검출 강도를 얻었습니다. PVA 캐필러리는 인터페이스에 설치할 때 다루기 쉽다는 장점이 있습니다. μ SIL-DNA 캐필러리 사용은 권장되지 않습니다. 직경이 작을수록 검출 강도가 현저히 떨어지기 때문입니다.

재현성: PVA 캐필러리와 μ SIL-WAX 캐필러리를 사용하여 표준 용액 2의 21mer에 대한 이동 시간 재현성을 조사했습니다. 두 캐필러리 모두 12회 주입에서 우수한 RSD를 보였습니다. 그 값은 항상 1% 미만이었습니다. 피크 면적의 RSD를 조사하는 것은 의미가 없는 것이, 측정 사이에 시료의 고갈이 있기 때문입니다. 이것은 본 자료에서 사용된 동전기적 (electrokinetic) 주입에서 이유를 찾을 수 있는데, 여기에서는 하전된 분석물만(시료 용액의 분취물이 아닌) 주입되기 때문입니다.

최적화: 대부분의 경우 짧은 쪽 검출은 올리고를 성공적이고 신속하게 분리하기에 충분했습니다. 표준 4는 긴 쪽 검출이 필요했습니다. 또한, 아세토니트릴 겔을 사용하거나 전압과 온도를 조정하는 식으로 분석법을 쉽고 빠르게 최적화할 수 있음을 보여주었습니다.

Agilent 7100 모세관 전기영동 시스템은 pd(A), pd(T) 및 혼합 염기와 다양한 사슬 길이의 올리고를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 사용한 광범위한 분석에 적합합니다.

참고 문헌

1. Oligonucleotide Analysis with the Agilent Capillary Electrophoresis System. *Agilent Technologies application note*, publication number 5988-4303EN, **2001**.

www.agilent.com/chem

DE44371.9638657407

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 7월 27일, 한국에서 인쇄
5994-3864KO

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