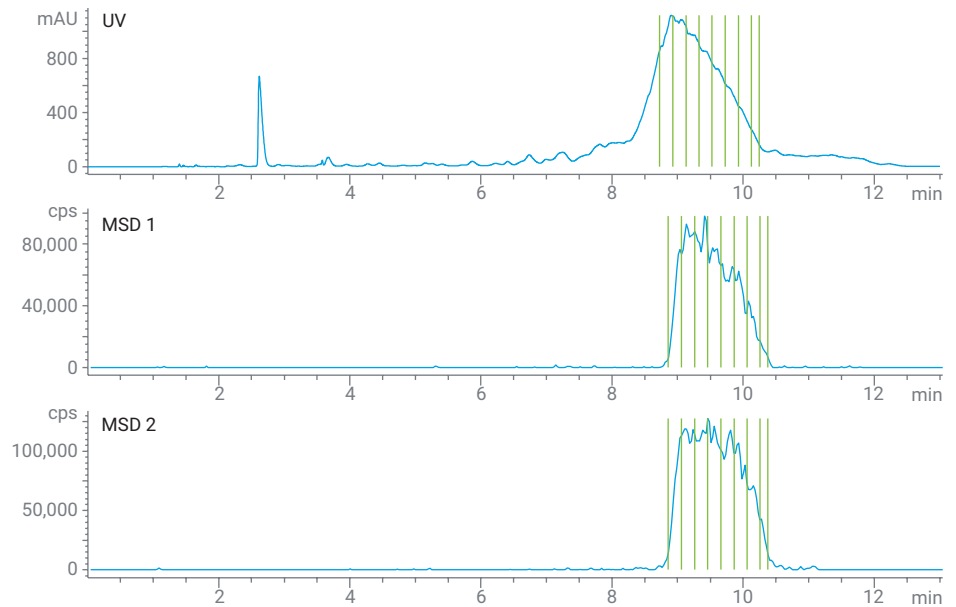


분취용 HPLC/MS 및 소프트웨어 지원을 사용한 올리고뉴클레오타이드의 빠르고 선택적인 정제



저자

Florian Rieck
Agilent Technologies, Inc.

개요

100개 미만의 뉴클레오타이드로 구성된 합성 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 분석 및 정제합니다. 선택성을 높이기 위해, hexafluoroisopropanol(HFIP)과 같은 고순도의 값비싼 시약이 필요함에도 불구하고 질량 선택적 검출(MSD) 기능이 필요한 경우가 많습니다. 이 응용 자료는 dibutylamine(DBA) 및 tris(hydroxymethyl)aminomethane(TRIS)을 기반으로 하면서도 여전히 MSD 신호에 의해 트리거되는 분획 분취가 가능한 정제 방법에 대해 설명합니다. 소프트웨어 지원과 표면 다공성 입자로 충전된 Agilent AdvanceBio Oligonucleotide 컬럼을 사용하여 기존 분석법 대비 더 빠르고 더 높은 순도로 표적 화합물을 수집했습니다.

서론

최근 몇 년 사이에 압타머, 가이드 RNA, siRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은 합성 올리고뉴클레오타이드(ON)가 생명과학 및 진단 연구의 주된 화두가 되었습니다. 이러한 분자는 일반적으로 100개 미만의 뉴클레오타이드 사슬 길이를 가지고 있어, 이온쌍 역상(IP-RP) HPLC를 사용하여 분석할 수 있습니다. 이 기술은 ON의 정제에도 성공적으로 적용되어 왔습니다.¹ MSD를 사용한 분석에서 더 높은 감도를 얻기 위해 triethylamine(TEA) 및 HFIP가 표준 이온 쌍 시약으로 고려되고 있습니다. 그러나 분취 조건으로 분석법을 스케일 업하려면 많은 양의 값비싼 HFIP가 필요하므로 이것이 제한 요소로 작용할 수 있습니다.

이 응용 자료는 이온쌍 및 pH 조절을 위해 DBA 및 TRIS를 사용하는 분취 정제법을 제시합니다. DBA는 이미 짧은 사슬 ON²에서 TEA보다 더 높은 분리능을 나타내는 것으로 입증되었으며 TRIS는 값비싼 HFIP를 대체하는 역할을 합니다.

실험

기기

모든 실험은 다음 모듈로 구성된 Agilent 1290 Infinity II 자동 스케일 분취용 LC/MSD 시스템에서 수행되었습니다.

- Agilent 1290 Infinity II Prep binary 펌프(G7161B)
- Agilent 1260 Infinity II Quaternary 펌프(G7111B); 액티브 쉴 워시 및 액티브 인렛 밸브 포함(옵션 030 및 032)

- Agilent 1290 Infinity II Prep Open-Bed 샘플러/분취기(G7158B); 5mL 분취용 시료 루프 포함(옵션 241)
- Agilent 1260 Infinity II 다파장 검출기(G7165A); 0.3mm 분취용 플로우 셀 포함(옵션 084)
- Agilent 1260 Infinity II 다이오드 어레이 검출기 WR(G7115A); 10mm 표준 플로우 셀 포함(옵션 018)
- Agilent 1260 Infinity II Prep 밸브 기반 분획 분취기(G7166A)
- Agilent 1290 Infinity II MS Flow Modulator(G7170B)
- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A); 2-포지션/14-포트 밸브(G4738A) 장착
- Agilent 1290 Infinity II Prep 컬럼 격실(G7163B)
- Agilent 1260 Infinity II Delay Coil Organizer(G9324A); 15~40mL/min용 Knitted 지연 코일(210) 포함
- Agilent LC/MSD XT(G6135B)

컬럼

- **분석 컬럼:** Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 3 × 100mm, 2.7µm(품번 695975-502)
- **분취용 컬럼:** Agilent AdvanceBio Oligonucleotide, 21.2 × 150mm, 4µm(품번 671150-702)

소프트웨어

- LC 및 LC/MS 시스템용 Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition, Rev. C.01.10 [287] 이상 버전
- OpenLab ChemStation용 Agilent Automated Purification 소프트웨어, Rev. A.01.08 [043] 이상 버전

화학물질 및 용매

HPLC 그라데이션 등급 아세토니트릴(ACN), tris(hydroxymethyl)aminomethane(TRIS) >99.9%, 분석 등급 염산(37%), HPLC 등급 dibutylamine(DBA) 및 hexylamine(HA)은 VWR(Darmstadt, Germany)에서 구입했습니다. 분석 등급 hexafluoroisopropanol(HFIP)은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입했습니다. 초순수의 경우 0.22µm 멤브레인 point-of-use 카트리지가(Millipore Sigma, Darmstadt, Germany)가 장착된 Milli-Q Integral 시스템에서 분석 전에 새로 얻었습니다.

시료

고객으로부터 30~50개 염기 길이의 DNA ON 시료 두 개를 제공받았습니다. 시료 농도는 짧은 ON의 경우 20mM PBS에서 3.1mM이었고 긴 ON의 경우 물에서 1.6mM이었습니다. 두 시료 모두 희석 또는 시료 전처리 없이 주입했습니다.

정제를 수행하기 전에 두 시료를 HPLC/MS 분리법(HA/HFIP 법, 표 1 참조)을 사용하여 분석했습니다. 이 분석법은 일반적인 품질 관리 절차로, 합성 제품의 순도와 정제에 사용할 표적 질량을 산출합니다. 자동 정제 소프트웨어로 스케일을 최적으로 확장하기 위해서는 분석 및 분취 분석법에서 동일한 이동상과 컬럼 케미스트리를 사용해야 합니다. 이를 위해, 정제에 사용되는 높은 유속에서 값비싼 HFIP 시약을 필요로 하지 않는 또 다른 분석법(DBA-TRIS 법, 표 2 참조)을 별도로 적용했습니다. 이 두 번째 방법은 TRIS 완충액이 휘발성이 아니기 때문에 질량 분석과 호환되지는 않습니다. 그렇지만, 능동 분할기 및 휘발성 보충 용매를 사용하여 유량의 일부만 MSD로 전송하기 때문에 질량 기반 분획 분취를 사용할 수 있습니다.

최대 100개 뉴클레오타이드의 ON 분석을 위한 최고의 선택은 Agilent AdvanceBio Oligonucleotide 시리즈 컬럼입니다. 이 시리즈 컬럼은 Agilent InfinityLab Poroshell 기술을 기반으로 하며 표면 다공성 입자(SPP)와 높은 pH(HPH) 코팅이 특징입니다. 높은 pH 및 온도에

대한 호환성과 더불어, AdvanceBio Oligonucleotide 컬럼의 모든 배치는 올리고뉴클레오타이드 분리에서 n/(n - 1) 분리를 달성하도록 품질 관리를 거칩니다. AdvanceBio Oligonucleotide 제품군에 분석 컬럼(스케일 조정용) 및 내경 21.2mm의 분취용 컬럼이 추가됨에 따라

이제 고분리능 분석법을 분취 조건으로 더 쉽게 전환할 수 있게 되었습니다. 분석 및 분취 스케일 모두에서 동일한 고정상을 사용하면 분석법을 조정할 필요가 줄어들고 분석법 이전에 대한 신뢰도가 높아집니다.

분석법 설정

표 1. 분석 실행의 크로마토그래피 조건, HA/HFIP 분석법.

파라미터	분석 실행												
이동상	A) Hexylamine 15mM + HFIP 200mM in H ₂ O (pH ca. 8.3) B) 메탄올												
유속	0.8mL/min												
그레디언트	<table border="1"> <tr> <td>시간(분)</td> <td>%B</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>71</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>9.5</td> <td>50</td> </tr> </table>	시간(분)	%B	0	50	7	71	8	100	9	100	9.5	50
시간(분)	%B												
0	50												
7	71												
8	100												
9	100												
9.5	50												
증지 시간	11분												
주입량	2µL												
샘플러 분석법 프리셋	프리셋 1: 극성 시료 매트릭스 180µL 루프 용매												
온도	실온												
UV 검출	260nm 10Hz 데이터 속도												
MS 검출	음이온 스캔 m/z 500 ~ 3,000												

표 2. 분석 및 분취 실행의 크로마토그래피 조건, DBA-TRIS 분석법.

파라미터	분석 실행	분취 실행
이동상	A) TRIS-HCl, pH 8.3, 75mM DBA의 7.5% ACN 용액 B) TRIS-HCl, pH 8.3, 75mM DBA의 80% ACN 용액	
유속	0.8mL/min	25mL/min
그레디언트	소프트웨어에 의해 계산된 스퀀링 및 집중 그레디언트	
주입량	2µL	1,000µL
샘플러 분석법 프리셋	프리셋 1: 극성 시료 매트릭스 180µL 루프 용매	프리셋 1: 극성 시료 매트릭스 800µL 루프 용매
온도	실온	실온
UV 검출	260nm 10Hz 데이터 속도	
MS 검출	음이온 스캔 m/z 500 ~ 3,000	음이온 스캔 m/z 500 ~ 3,000 EIC는 표적 질량을 기반으로 소프트웨어가 선택
MSD로의 분할 비율	전체 흐름	500:1 (모드 M1) 능동(12분 ~ 24분)
분취 분취	해당 없음	피크 기반 분취 모드, 논리곱(AND)으로 MSD 신호와 결합된 UV UV 임계값: 10mAU UV 상향 기울기: 2mAU/s UV 하향 기울기: 1mAU/s MSD 임계값: 2,000cps

표 3. MSD 스프레이 챔버 및 분취 분취 설정.

파라미터	값
보충 용매	0.1% 포름산 함유 메탄올/물(70/30) 용액
보충 유량	1.5mL/min
이온화원	애질런트 전자분무(ESI) 소스
Nebulizer 압력	40psig
건조 가스 온도	350°C
건조 가스 유속	13.0L/min
캐필러리 전압	-3,000V
스캔 범위	500 ~ 3,000m/z
표적 질량(m/z)	짧은 ON: 2,674.7; 2,139.8 긴 ON: 2,718.0; 2,264.1
이온 종	[M-H] ⁻ , [M-2H] ²⁻ , [M-3H] ³⁻

결과 및 토의

두 ON 시료 모두 HPLC/MS 분석법과 1290 Infinity II 자동스케일 분취용 LC의 분석용 유로를 사용한 분석 스케일에서 성공적으로 분리되었습니다. 50 ~ 71%B 범위의 최적화된 그레디언트를 통해 전체 길이 생성물(FLP)과 불완전한 ON 조각을 분리했습니다. 그림 1는 짧은 ON 분리의 UV 크로마토그램과 TIC를 보여줍니다. 긴 ON 분리는 그림 2에 표시되어 있습니다. 긴 ON은 짧은 ON보다 덜 순수해 보입니다. 그렇지만 두 시료 모두 각각의 FLP를 식별할 수 있을 만큼 충분히 분리되었습니다. 이러한 분석 분리 결과를 바탕으로 FLP 용리 시간에서의 질량 스펙트럼을 추출했습니다. OpenLab ChemStation의 통합 디콘볼루션 도구가 FLP의 분자량을 계산하고 스펙트럼의 신호를 전하 수(그림 3 및 4)와 연결했습니다. 그런 다음 식별된 다중 하전 이온을 사용하여 분취 실행에서 분획 분취를 트리거할 수 있었습니다.

두 ON을 정제하기 위해 이온쌍 시약으로 DBA를, 완충액으로 TRIS를 포함하는 이동상을 사용하도록 분석법을 변경했습니다. TRIS가 MS와 호환되지 않음에도, 분취 실행에서 MSD 신호에 의해 표적 ON을 검출하고 수집했습니다. 이는 전체 유량을 능동적으로 분할하고, MS 쪽으로 분할된 유량에는 MS 호환 가능한 보충 용매를 더하여 전달함으로써 이루어졌습니다. 유속은 분취용 컬럼의 증가된 내경과 입자 크기를 반영하여 25mL/min으로 조정했습니다. 그레디언트도 변경되어, 분석 스카우팅을 위한 선형 그레디언트가 자동 정제 소프트웨어에 의해 생성되었습니다. 마찬가지로, 최적화된 분리를 위한 집중 분취 그레디언트는 분석 분리 결과의 표적 피크의 선택을 기반으로 소프트웨어를 통해 계산되었습니다.

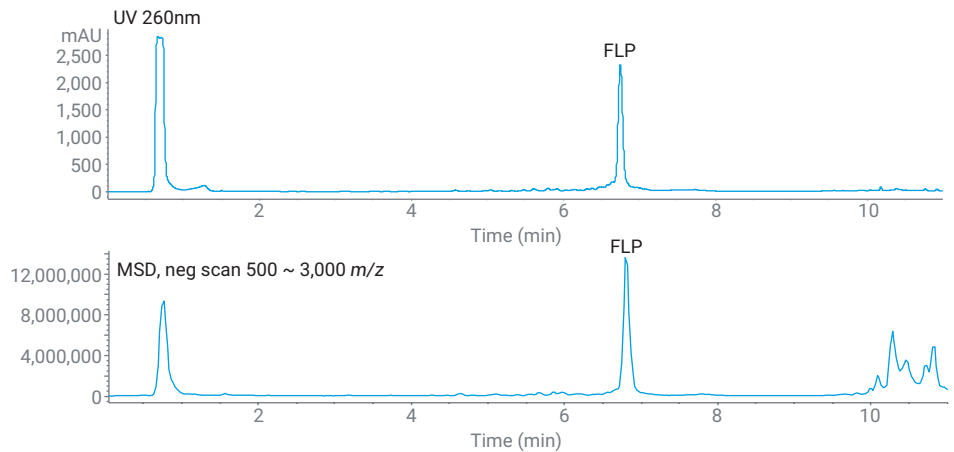


그림 1. HA/HFIP 및 최적화된 그레디언트를 사용한 짧은 ON 분리.

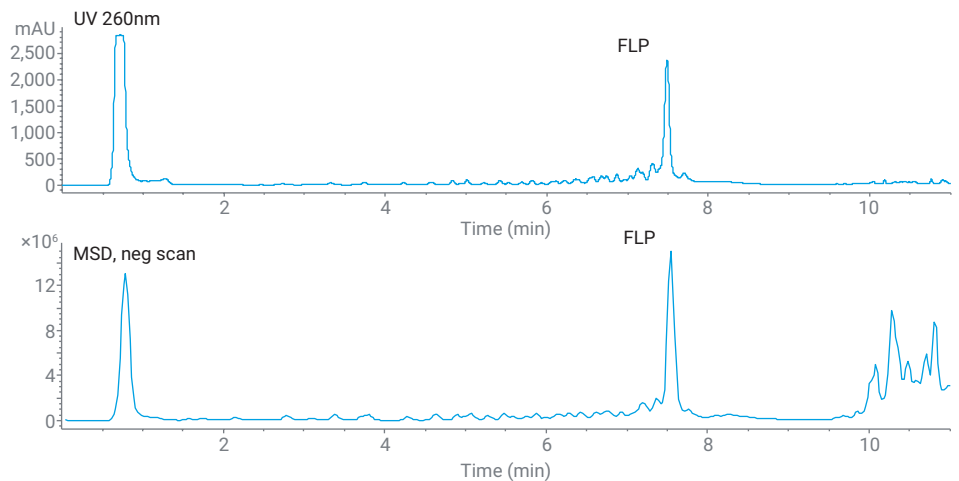


그림 2. HA/HFIP 및 최적화된 그레디언트를 사용한 긴 ON 분리.

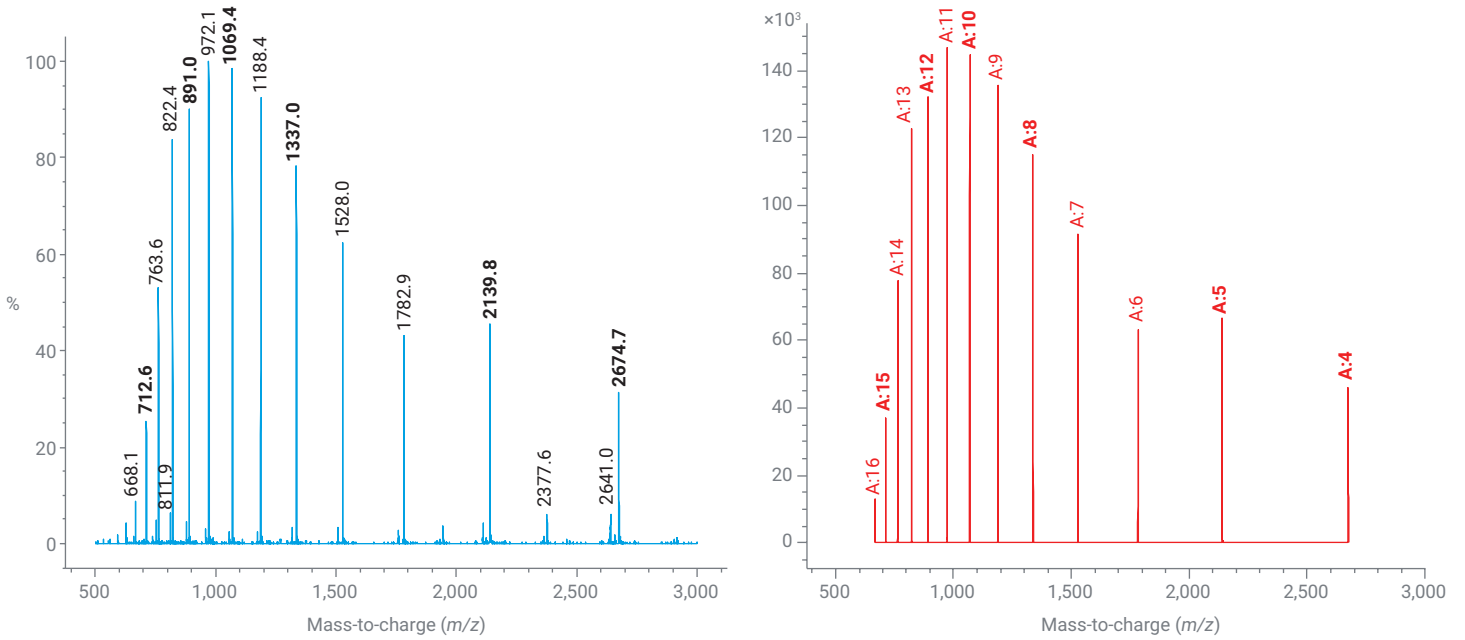


그림 3. 디콘볼루션에 의해 계산된 짧은 ON의 스펙트럼 및 다중 하전 이온(A: 전하 수). FLP의 계산된 분자량은 10,704Da였습니다. 분획 트리거로 사용된 이온은 붉은 글꼴로 강조 표시했습니다.

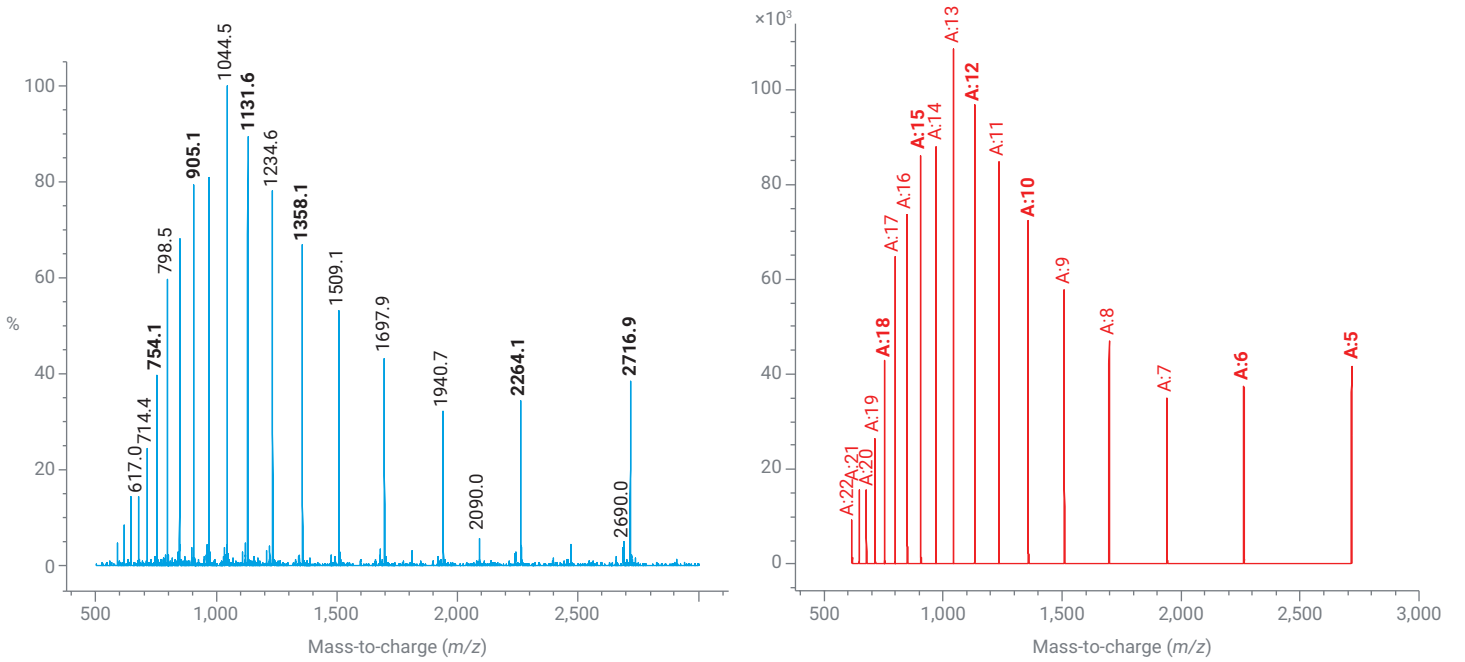


그림 4. 디콘볼루션에 의해 계산된 긴 ON의 스펙트럼 및 다중 하전 이온(A: 전하 수). FLP의 계산된 분자량은 13,592Da였습니다. 분획 트리거로 사용된 이온은 붉은 글꼴로 강조 표시했습니다.

DBA/TRIS 분리의 분석 크로마토그램을 그림 5 및 6에 나타내었습니다. 해당 분석 그래디언트의 목적은 최고 분리능을 제공하기 위함이 아니라 표적 피크의 머무름 시간에서 용매 조건을 결정하는 데 있습니다. 이 계산을 시작하기 위해 사용자가 크로마토그램에서 피크를 선택하고 **Assign As Target(표적으로 지정)**을 클릭합니다. 그러면 자동 정제 소프트웨어가 표적 피크의 용리 시점을 계산할 뿐만 아니라 전체 그래디언트를 생성하여 표적 분리를 최적화합니다. 이 그래디언트는 예를 들어, 표적이 집중 그래디언트의 중앙에서 용출되어야 하는지, 아니면 끝에서 용출되어야 하는지를 제어하도록 미세 조정할 수 있어 조기 용출되는 불순물에 시간적 여유를 줄 수 있습니다. 짧은 ON을 정제하기 위해 적용된 그래디언트를 그림 7에 나타내었습니다.

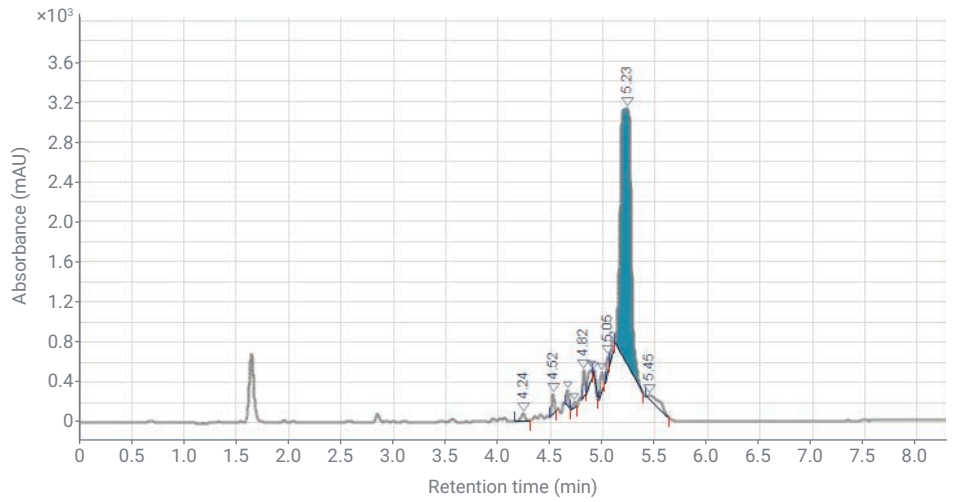


그림 5. DBA/TRIS 및 일반 그래디언트를 사용한 짧은 ON 분리. FLP는 파란색으로 강조 표시했습니다.

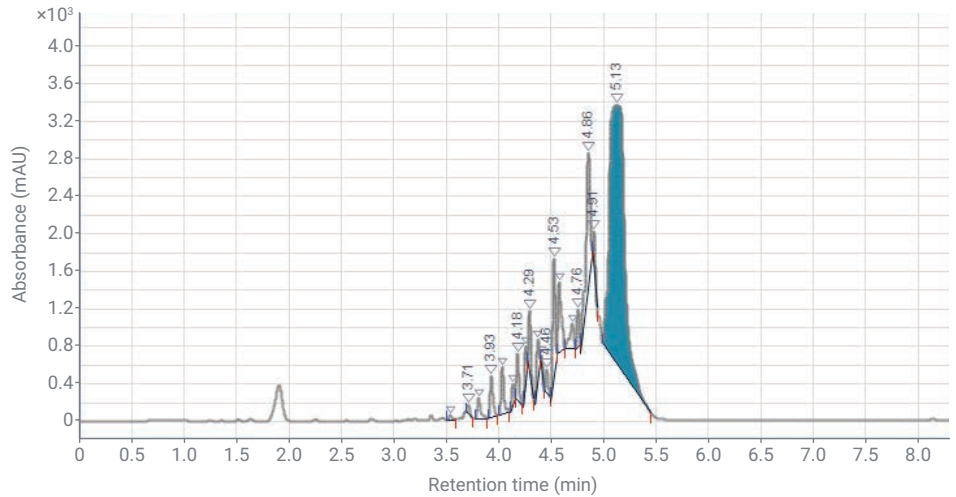


그림 6. DBA/TRIS 및 일반 그래디언트를 사용한 긴 ON 분리. FLP는 파란색으로 강조 표시했습니다.

집중 그레디언트를 사용하여 정제 실행을 시작하기 전에는 분획 분취를 트리거할 표적 질량을 정의해야 합니다. 각 ON에 대해 두 개의 표적 질량을 선택했으며, 이는 짧은 ON의 경우 [M-4H]⁴⁺ 및 [M-5H]⁵⁻를, 긴 ON의 경우 [M-5H]⁵⁻ 및 [M-6H]⁶⁻를 나타냅니다(그림 3 및 4 참조). 이중 및 삼중 하전된 표적 질량에 대해 자동 트리거를 활성화하면 짧은 ON의 경우 [M-8H]⁸⁻, [M-10H]¹⁰⁻, [M-12H]¹²⁻ 및 [M-15H]¹⁵⁻, 긴 ON의 경우 [M-10H]¹⁰⁻, [M-12H]¹²⁻, [M-15H]¹⁵⁻ 및 [M-18H]¹⁸⁻에서도 수집이 트리거됩니다. 그림 8 짧은 ON에 대한 분취 분리와 분획 분취를 보여줍니다. 8개의 타임 슬라이스가 수집되었고 MSD 신호에 의해 성공적으로 트리거되었습니다. UV 신호와의 오버레이(서로 다른 지연 시간에 대해 분획 눈금을 보정함)는 MSD에 의한 선택성의 이득을 입증합니다. 분취를 트리거하는 데 UV 신호만 사용했다면 수집이 너무 일찍 시작되어 많은 불순물이 수집되었을 것입니다. MSD 신호를 기반으로 하는 트리거 작동은 스크리닝, 풀링 및 건조할 분획의 수를 줄여주어 결과적으로 분획이 더 순수하고 전체 정제 프로세스가 더 빨라지게 됩니다. 긴 ON에 대한 정제 실행은 수집된 10개의 분획 슬라이스와 함께 유사한 결과를 산출했습니다(표시되지 않음). 수집을 미리 정의된 시간 또는 볼륨 슬라이스로 분리하여 단일 분취를 재분석하거나, 생성물을 포함하고 순도 요구 사항을 충족하도록 해당 분취를 풀링할 수 있습니다.³

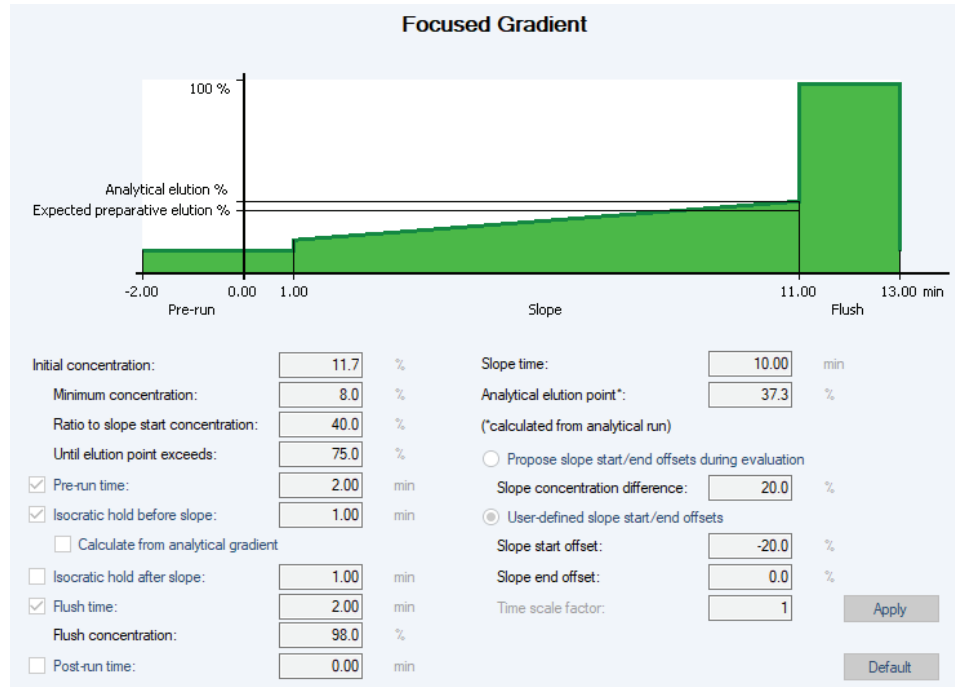


그림 7. 짧은 ON에 대해 계산된 집중 그레디언트 프로파일, 미세 조정 옵션 포함.

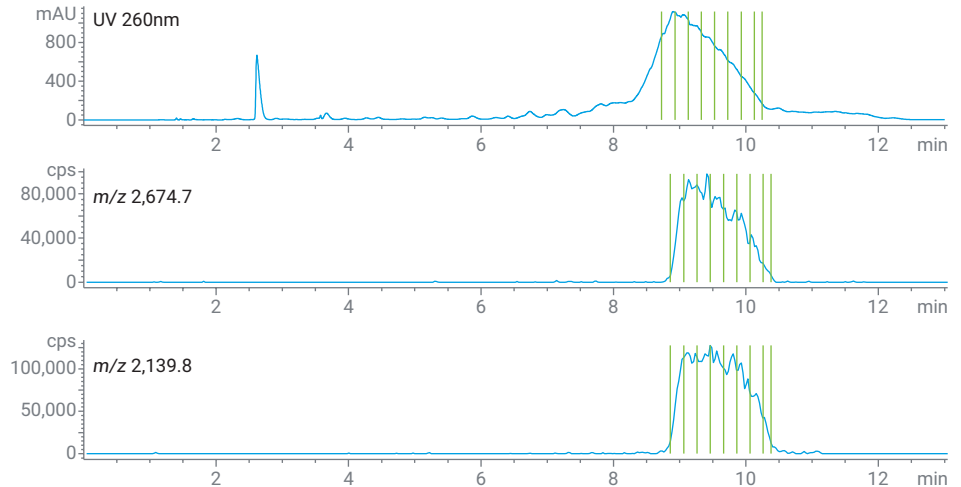


그림 8. DBA/TRIS 및 집중 그레디언트를 사용한 짧은 ON의 분취 정제 실행. 녹색 막대는 분취 분취의 시간 슬라이스를 나타냅니다.

짧은 ON 정제를 실행하는 동안 수집된 8개의 슬라이스에 대한 분획 재분석 결과는 그림 9에 나와 있습니다. 첫 번째 슬라이스(파란색 트레이스)에는 갈라진 피크로 드러나는 불순물이 포함되어 있습니다. 다른 모든 슬라이스는 순도가 99% 이상이며 최종 생성물 풀에 사용할 수 있습니다. 긴 ON 정제를 실행하는 동안 수집된 10개의 슬라이스도 재분석했으며 유사한 모습을 보였습니다. 첫 번째 슬라이스는 부분적으로 불순물로 오염된 반면 나머지 슬라이스는 >99% 순도였습니다(표시되지 않음). 제품 회수율을 극대화하기 위해 더 짧은 간격으로 더 많은 슬라이스를 수집할 수 있습니다. 정량적 재분석 방법을 적용하면 순도 및 제품 함량을 기재한 폴링 테이블을 생성하여 주어진 순도 요구 사항에 대한 수율을 극대화하는 데 사용할 수 있습니다.³

결론

MSD 신호로 트리거되는 분획 분취에 의한 분취용 HPLC를 사용하여 30~50개 뉴클레오타이드로 구성된 두 개의 ON 시료를 성공적으로 정제했습니다. 두 시료 모두 MS 호환 분석법(HA/HFIP)을 사용하여 분석했으며, 이를 통해 분획 분취를 선택적으로 트리거하는 데 필요한 질량 스펙트럼을 얻었습니다. 분취 정제에서 DBA/TRIS를 사용한 또 다른 분석법을 채택하여 값비싼 HFIP 시약의 사용을 피했습니다. TRIS는 MS와 호환되지 않지만 MSD로의 분할 유량에 적절한 보충 용매를 사용해 높은 선택성과 신뢰도를 갖는 질량 기반의 분획 분취를 수행할 수 있었습니다. 자동 정제 소프트웨어는 일반 분석 그레디언트를 최적화된 집중

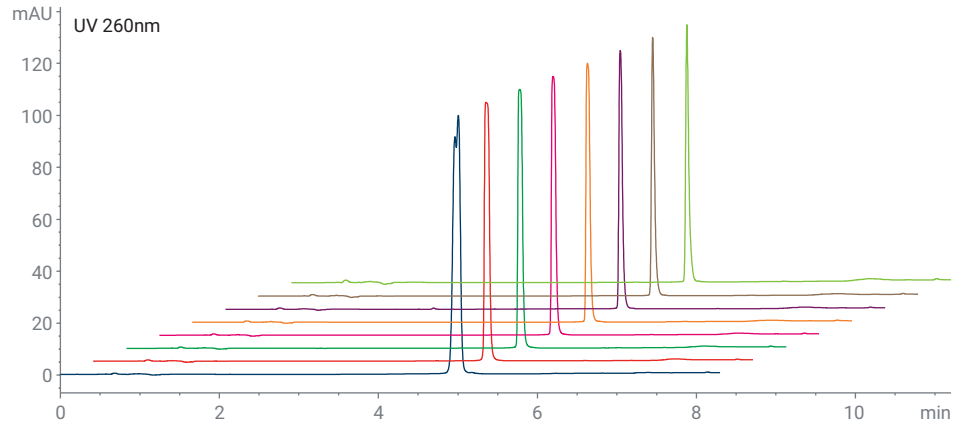


그림 9. 짧은 ON 정제 실행에서 수집된 8개 분획의 분석에 대한 크로마토그램 오버레이.

그레디언트로 변환하여 분취 실행을 단축하고 순수한 화합물을 더 빠르게 얻을 수 있게 해주었습니다. 두 ON의 분획 슬라이스를 성공적으로 수집하였으며, 순도 요구 사항을 충족하는 분획의 재분석과 선택적 폴링이 가능했습니다. 모든 실행을 Agilent AdvanceBio Oligonucleotide 컬럼 제품으로 수행한 덕분에 분석에서 분취 응용으로 쉽고 빠르게 스케일 업 할 수 있었습니다.

감사문

본 연구는 KKS SYNERGY 프로젝트 “디지털 도구를 사용한 프로세스 및 품질 관리용 개선된 분석법”(보조금 번호 20210021)을 통해 Swedish Knowledge Foundation의 지원을 받았습니다. 올리고뉴클레오타이드 시료를 제공해 주신 Qiagen DNA Synthesis의 Olle Ståhlberg 박사에게 감사드립니다.

참고 문헌

1. Catani, M. *et al.* Oligonucleotides: Current Trends and Innovative Applications in the Synthesis, Characterization, and Purification. *Biotechnology Journal* **2020**, *15*, 8.
2. Evaluation of Different Ion-Pairing Reagents for LC/UV and LC/MS Analysis of Oligonucleotides. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2957EN, **2021**.
3. Purification of Single-Stranded RNA Oligonucleotides Using High-Performance Liquid Chromatography. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-3514EN, **2021**.

www.agilent.com

DE68918377

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
2022년 12월 6일 한국에서 발행
5994-4877KO

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

 **Agilent**
Trusted Answers