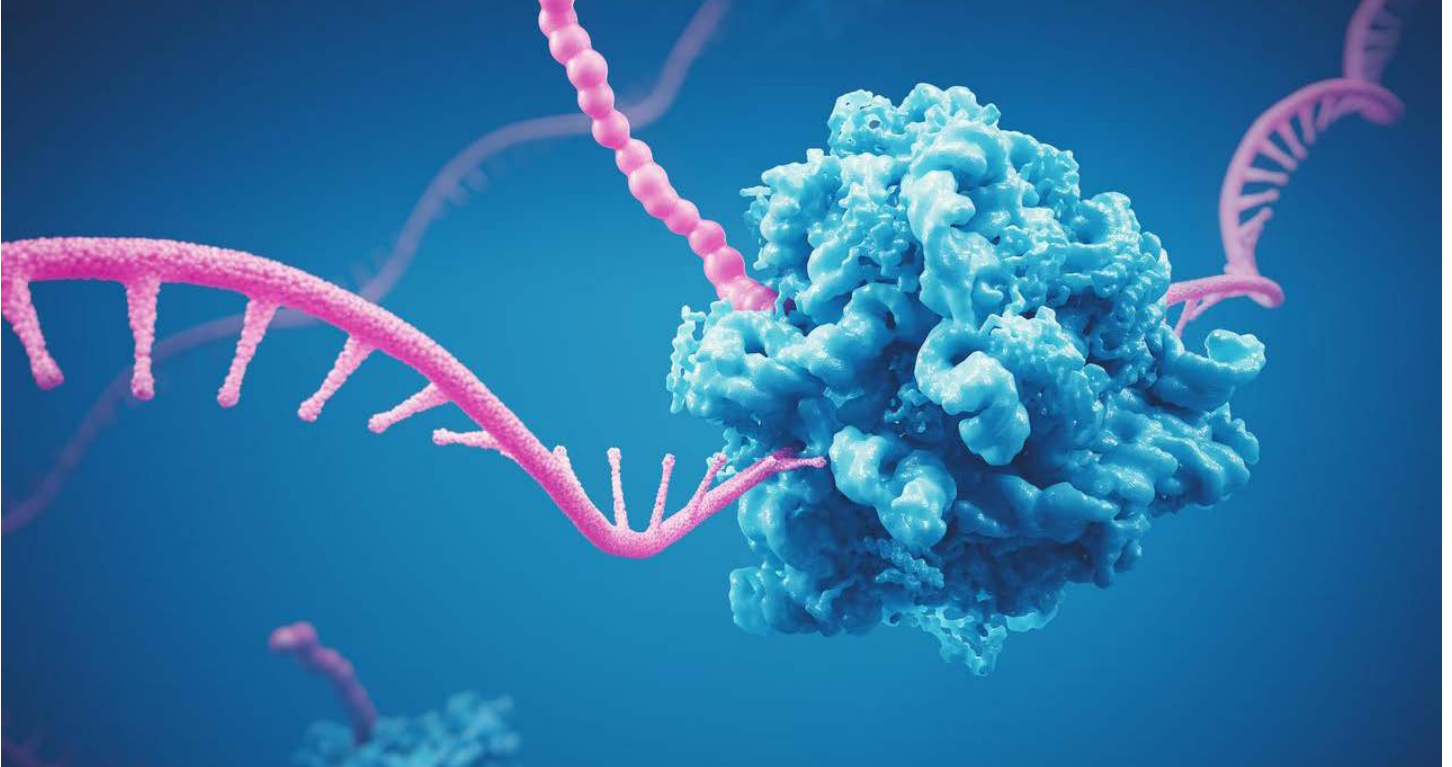


올리고 워크플로 리소스 가이드

# 올리고뉴클레오타이드 분석을 위한 엔드-투-엔드 워크플로 솔루션

연구 발견부터 생산 QA/QC까지



합성 올리고뉴클레오타이드는 연구 및 유전자 검사에 널리 사용됩니다. 이러한 형태의 짧은 핵산 폴리머에는 작은 간섭 RNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 압타머 및 CRISPR 가이드가 포함됩니다. 이러한 거대분자의 인기는 이를 특성화하기 위한 강력한 분석법과 사용하기 쉬운 데이터 분석 워크플로에 대한 필요성이 증가하고 있음을 의미합니다. 일반적인 관심 대상 속성에는 특정 불순물의 질량, 시퀀스, 순도 및 상대적인 양이 포함됩니다.

### 올리고뉴클레오타이드 순도 분석

합성 올리고뉴클레오타이드의 정제는 매우 어려울 수 있습니다. 전체 길이 제품의 합성과 관련된 불순물에는 잘림, 불완전한 티올화 및 염기 손실을 나타내는 분자가 포함되는 경우가 많습니다. 정제 방법을 개발할 때 이러한 구조를 고려해야 합니다.

애질런트는 올리고 분리를 최적화하기 위한 체계적인 접근 방식을 개발했습니다 (그림 1). 이 방법은 강한 음이온 교환 (SAX) 또는 이온쌍 역상(IP-RP) 크로마토그래피를 사용하는데, 후자는 질량 분석법과 잘 작동합니다. 또한 애질런트는 올리고뉴클레오타이드의 SAX 분별을 수행하고 LC/UV 또는 LC/MS 분석법을 사용하여 시료 순도를 확인하기 위한 별도의 워크플로를 개발했습니다.

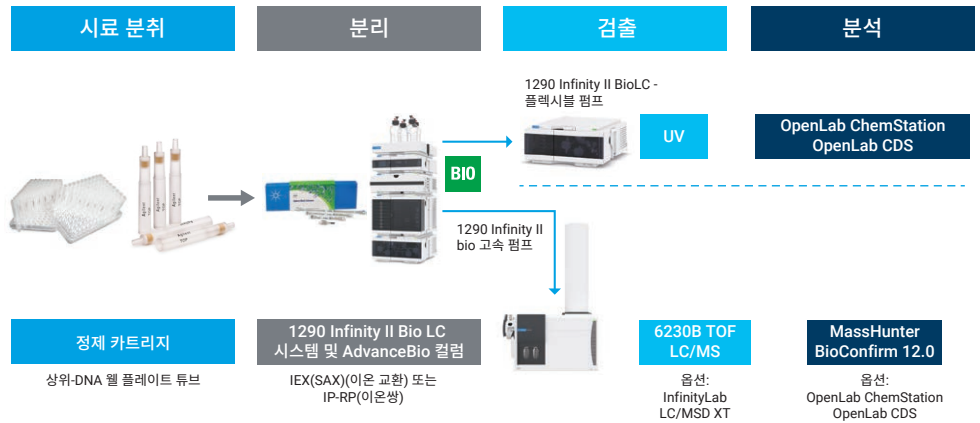


그림 1. 워크플로 1: 올리고뉴클레오타이드 순도 분석

## Oligonucleotide Target Plus Impurities(TPI) 분석

제품 관련 불순물의 특성 규명은 새로운 바이오 치료제 개발에서 중요한 과제입니다. 일반적인 불순물 소스에는 phosphorothioate에서 phosphodiester로의 전환, 절단, 확장 및 염기가 소실된 올리고뉴클레오타이드 등이 포함됩니다.

LC/MS 분석과 같은 고급 분석법은 표적 올리고뉴클레오타이드 및 그 불순물의 특성을 분석하는 데 필수적입니다. 불순물의 수가 많고 그 양은 매우 적으며 서로 결합되어 발견되는 경우가 많기 때문에 고급 기술이 요구됩니다. 불순물의 특성 분석은 어려울 수 있으므로 불순물 프로파일링을 지원하고 자동화하는 소프트웨어가 중요할 수 있습니다. 그림 2와 3은 불순물 분석을 위한 애질런트 솔루션의 워크플로를 보여줍니다.

### 생산물 관련 불순물 분석을 위한 LC/MS 기반 접근 방식

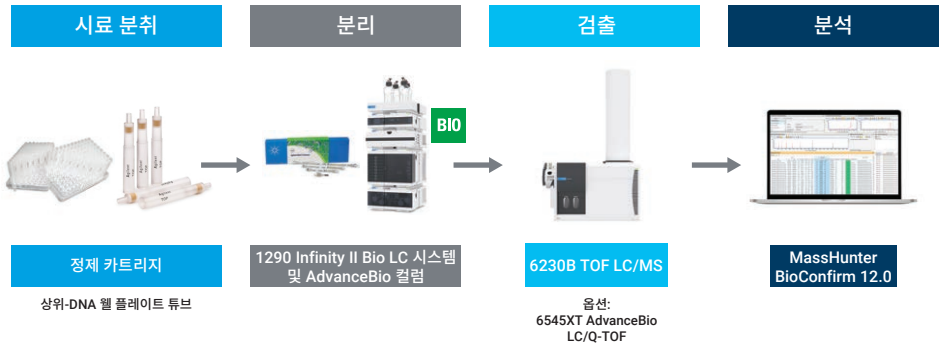


그림 2. 워크플로 2: Oligonucleotide Target Plus Impurities(TPI) 분석

### Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어 12.0의 TPI(Target Plus Impurities) 데이터 분석 워크플로

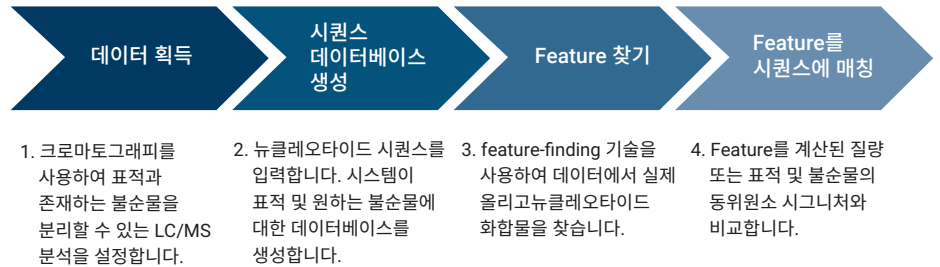


그림 3. 워크플로 2: Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어 12.0의 TPI(Target Plus Impurities) 데이터 분석 워크플로

## 올리고뉴클레오타이드 시퀀스 확인

이 시퀀스 확인 워크플로에는 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF와 결합된 Agilent 1290 Infinity II bio LC 시스템이 사용됩니다(그림 4 및 5). 이 워크플로에서는 올리고 시퀀스에서 계산된 예상되는 동위원소 패턴을 매칭시켜 MS2 수준에서 조각을 확인하는 방법이 사용됩니다. 이 매칭 기능은 BioConfirm 소프트웨어의 새로운 기능입니다. 이는 고분해능 정밀 질량 시스템과 표적 MS/MS 데이터를 결합할 때의 강력한 파워를 보여줍니다. 이 접근법에서, 올리고뉴클레오타이드는 크게 변형된 시퀀스를 확인하고 특정 화학 그룹의 위치를 결정함으로써 구조적 특성이 규명됩니다.

전체 길이 생산품 및 불순물 분석을 위한 LC/MS/MS 기반 접근 방식

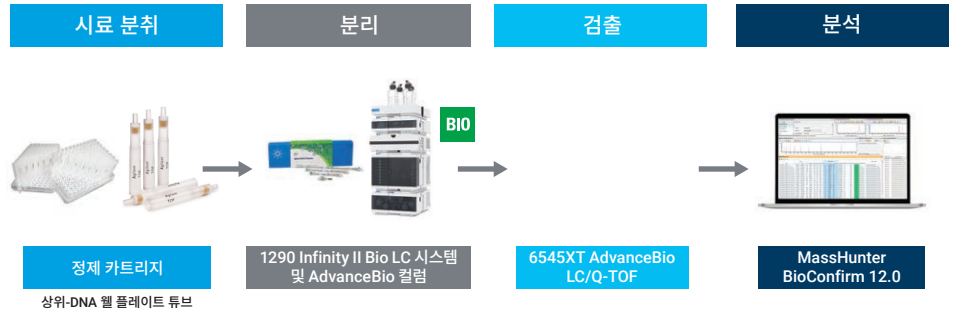


그림 4. 워크플로 3: 올리고뉴클레오타이드 시퀀스 확인

### Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어 v12.0의 올리고뉴클레오타이드 시퀀스 확인 데이터 분석 워크플로



1. 존재하는 표적 시퀀스에 대해 MS/MS를 사용하여 이온 조각을 생성하는 LC/MS/MS 실행을 설정합니다.
2. 뉴클레오타이드 시퀀스를 입력합니다. 시스템이 가능한 모든 올리고 조각 이온 유형에 대한 이론적 목록을 자동으로 생성합니다.
3. 이론적 조각을 획득된 MS/MS 스펙트럼과 비교합니다. 일치하는 조각에 주석을 담니다.

그림 5. 워크플로 3: Agilent MassHunter BioConfirm 소프트웨어 12.0의 올리고뉴클레오타이드 시퀀스 확인 데이터 분석 워크플로

## 올리고뉴클레오타이드 정제 솔루션

애질런트는 액체 크로마토그래피에 의한 시료 정제에서 가장 폭넓은 포트폴리오를 통해 유연하면서도 믿을 수 있는 솔루션을 제공합니다. 필요로 하는 LC 정제의 스케일이 어떠하든, 애질런트는 고성능 기기, 컬럼, 소프트웨어, 서비스 등을 통해 가장 높은 순도와 최고의 회수율을 보장합니다. 그림 6은 올리고뉴클레오타이드 정제를 위한 애질런트 워크플로를 보여주며, 그림 7은 다양한 스케일에서 작동하는 애질런트 시스템의 분석물의 양과 유량을 비교한 내용입니다.



그림 6. 워크플로 4: 올리고뉴클레오타이드 정제

	분석		반분취		분취
	마이크로그램(μg)	밀리그램(mg)			그램(g)
생산성 범위					
Agilent 1290 Infinity II 분취용 LC 시스템		1~50mL/분			4~200mL/분
Agilent 1260 Infinity II 분취용 LC 시스템		1~50mL/분			
Agilent 1220/1260/1290 Infinity II 분석 스케일 LC 정제 시스템	0.01~10mL/분				
컬럼 내경(mm)	4.6	10	20~25	30	50
일반 유속(mL/분)	1	4.7	20~25	42	118

그림 7. 다양한 스케일에서 작동하는 애질런트 시스템의 분석물 양과 유량 비교

## 참고 문헌

### 올리고뉴클레오타이드 순도 분석

1. Hsiao, J.; Apffel, A.; Turner, M. Optimizing Separation of Oligonucleotides with Anion-Exchange Chromatography. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-4753EN, 2022.
2. Schneider, S. 네 가지 LC 시스템에서의 뉴클레오타이드 분석 비교 연구. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-4392KO, 2021.
3. Pulliere, F.; Christopher Welsby, C. 시판 올리고뉴클레오타이드 출발물질의 포장재 투과 식별 Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-4239KO, 2021.
4. Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계를 이용한 핵산 열 안정성 측정 모범 사례. Agilent Technologies 백서, 발행 번호 5994-4028KO, 2022.
5. Boden, J.; Meixner, J. Agilent 7100 모세관 전기영동 시스템의 모세관 겔 전기영동을 통한 올리고뉴클레오타이드 분석. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-3864KO, 2021.
6. Feith, A. Analyzing Raw Material for Oligonucleotide Synthesis. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-3498EN, 2021.

### Oligonucleotide Target Plus Impurities (TPI) 분석

1. Grossman, J.; Herck, N. V.; Thibaut, F.; Verlyuyten, W.; Deckers, A.; Boon, J. P. and Hellings, M. OpenLab CDS용 Custom Calculator 도구의 고급 활용: 올리고뉴클레오타이드의 예. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-5654KO, 2023.
2. Rye, P.; Schwarzer, C. MS1 Oligonucleotide Characterization Using LC/Q-TOF with HILIC Chromatography. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-5631EN, 2023.

3. Rye, P. 이온쌍 없는 고처리량 HILIC 올리고뉴클레오타이드 분석 - Agilent RapidFire 결합 Q-TOF 질량 분석법 사용. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-4945KO, 2022.
4. Wong, D. L.; Rye, P. 애질런트 고분해능 LC/(Q-)TOF 질량 분석기를 통한 올리고뉴클레오타이드 및 불순물 분석의 통합 워크플로. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-4817KO, 2022.
5. Hsiao, J.; Apffel, A.; Turner, M. Optimizing Separation of Oligonucleotides with Anion-Exchange Chromatography. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-4753EN, 2022.
6. Schneider, S. 네 가지 LC 시스템에서의 뉴클레오타이드 분석 비교 연구. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-4392KO, 2021.
7. Liao, B. 고분해능 LC/MS를 이용한 mRNA 5' 캡핑의 신속 분석. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-3984KO, 2021.
8. Rye, P.; Yang, Y. 합성 올리고뉴클레오타이드의 고처리량 질량 분석. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-3753KO, 2022.
9. Vanhoenacker, G.; Lecluyse, C.; Debyser, G.; Sandra, P.; Sandra, K.; Schipperges, S.; Schneider, S.; Huber, U. Evaluation of Different Ion-Pairing Reagents for LC/UV and LC/MS Analysis of Oligonucleotides. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-2957EN, 2021.
10. Wong, D. L. Mass Spectrometric Characterization of Antibody-siRNA Conjugates using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-2155EN, 2020.
11. Duong, P.; Bidlingmeyer, B. A.; Zhu, A.; Luke, S. Fast and High-Resolution Reversed-Phase Separation of Synthetic Oligonucleotides. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5991-6006EN, 2017.

### 올리고뉴클레오타이드 시퀀스 확인 분석

1. Li, G.; Rye, P. MS/MS Oligonucleotide Sequencing Using LC/Q-TOF with HILIC Chromatography. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-5632EN, 2023.
2. Wong, D. L.; Rye, P. Comprehensive and Integrated Workflow for Oligonucleotide Sequence Confirmation by Agilent High-Resolution LC/Q-TOF. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-5071EN, 2022.
3. Liao, B. 고분해능 LC/MS를 사용한 mRNA Poly-A 서열 변이 분석. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-3005KO, 2021.

### 올리고뉴클레오타이드 정제









1. Rieck, F. 부취용 HPLC/MS 및 소프트웨어 지원을 사용한 올리고뉴클레오타이드의 빠르고 선택적인 정제. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-4877KO, 2022.
2. Coffey, A. Dynamic Binding Capacity of Oligonucleotides on PLRP-S Columns and Stationary Phases. Agilent 기술 개요, 발행 번호 5994-4526EN, 2022.
3. 원하는 대로 정제하세요 Agilent Lock & Load 컬럼. Agilent Technologies 브로셔, 발행 번호 5994-3907KO, 2021.
4. Rieck, F. Purification of Single-Stranded RNA Oligonucleotides Using High-Performance Liquid Chromatography. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5994-3514EN, 2021.
5. Krieger, S.; Dickhut, C. 수동 정제 없이 생산 공정 중 올리고뉴클레오타이드의 직접 분석. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 5991-9490KO, 2018.

## 최적화된 워크플로: 구성 및 주문 정보





### 워크플로 1: 올리고뉴클레오타이드 순도 분석

번들	워크플로 1A - LC/UV	워크플로 1B - LC/MSD XT	워크플로 1C - LC/TOF
시료 분취	1µmol 스케일용 TOP-DNA 웰 플레이트 튜브, 150mg, 96/pk(7572915C)		
컬럼	 <p><b>AdvanceBio</b> 올리고뉴클레오타이드 (659750-702) 또는 <b>Agilent PL-SAX</b> (PL1951-1502)</p>	 <p><b>AdvanceBio</b> 올리고뉴클레오타이드 (659750-702) 또는 <b>Agilent PLRP-S</b> (PL1912-1502)</p>	 <p><b>AdvanceBio</b> 올리고뉴클레오타이드 (659750-702) 또는 <b>Agilent PLRP-S</b> (PL1912-1502)</p>
LC	 <p><b>1290 Infinity II BioLC</b> 필수: G7131A 또는 G7132A, G7137A 및 G7116B 다음 중 하나: G7114B(VWD) 또는 G7117B(DAD)</p>	 <p><b>1290 Infinity II BioLC</b> 필수: G7131A 또는 G7132A, G7137A 및 G7116B 옵션: G7114B(VWD) 또는 G7117B(DAD)</p>	 <p><b>1290 Infinity II BioLC</b> 필수: G7131A 또는 G7132A, G7137A 및 G7116B 옵션: G7114B(VWD) 또는 G7117B(DAD)</p>
MS		 <p><b>LC/MSD XT:</b> G6135BA(OpenLab ChemStation 포함) 또는 G6135CA(OpenLab CDS 포함)</p>	 <p><b>6230B LC/TOF:</b> G6230BA</p>
SW	 <p>고객이 타사 CDS를 보유하고 있는 경우 UV 전용에 한해 아래 소프트웨어가 옵션으로 제공됩니다.  <b>OpenLab CDS:</b> M8414AA 또는 <b>OpenLab ChemStation:</b> M8380AA, M8510AA</p>	 <p><b>OpenLab ChemStation</b> (G6135BA) 또는 <b>OpenLab CDS</b>(G6135CA) 가 포함되어 있습니다. <b>Deconvolution</b>(M8363AA) 추가</p>	 <p><b>BioConfirm 12</b>(M6025AA) 단일 워크스테이션: M6026AA 또는 M6027AA 네트워크 워크스테이션의 경우: M6035AA 또는 M6036AA 또는 M6037AA</p>











### 워크플로 2: Oligonucleotide Target Plus Impurities(TPI) 분석

번들	워크플로 2A - LC/TOF	워크플로 2B - LC/Q-TOF
시료 분취	1µmol 스케일용 TOP-DNA 웰 플레이트 튜브, 150mg, 96/pk(7572915C)	
컬럼	 <p><b>AdvanceBio</b> 올리고뉴클레오타이드(659750-702) 또는 <b>Agilent PLRP-S</b>(PL1912-1502)</p>	 <p><b>AdvanceBio</b> 올리고뉴클레오타이드(659750-702) 또는 <b>Agilent PLRP-S</b>(PL1912-1502)</p>
LC	 <p><b>1290 Infinity II BioLC</b> 필수: G7131A 또는 G7132A, G7137A 및 G7116B 옵션: G7114B(VWD) 또는 G7117B(DAD)</p>	 <p><b>1290 Infinity II BioLC</b> 필수: G7131A 또는 G7132A, G7137A 및 G7116B 옵션: G7114B(VWD) 또는 G7117B(DAD)</p>
MS	 <p><b>6230B LC/TOF:</b> G6230BA</p>	 <p><b>6545XT LC/Q-TOF:</b> G6549AA</p>
SW	 <p><b>BioConfirm 12</b>(M6025AA) 단일 워크스테이션: M6026AA 또는 M6027AA 네트워크 워크스테이션의 경우: M6035AA 또는 M6036AA 또는 M6037AA</p>	 <p><b>BioConfirm 12</b>(M6025AA) 단일 워크스테이션: M6026AA 또는 M6027AA 네트워크 워크스테이션의 경우: M6035AA 또는 M6036AA 또는 M6037AA</p>

### 워크플로 3: 올리고뉴클레오타이드 시퀀스 확인

번들	워크플로 3 - LC/Q-TOF	
시료 분취	1µmol 스케일용 TOP-DNA 웰 플레이트 튜브, 150mg, 96/pk(7572915C)	
컬럼		AdvanceBio 올리고뉴클레오타이드 (659750-702) 또는 Agilent PLRP-S(PL1912-1502)
LC		<b>BIO</b> 1290 Infinity II BioLC 필수: G7132A, G7137A, G7116B 옵션: G7114B(VWD) 또는 G7117B(DAD)
MS		6545XT LC/Q-TOF: G6549AA
SW		BioConfirm 12(M6025AA) 단일 워크스테이션: M6026AA 또는 M6027AA 네트워크 워크스테이션의 경우: M6035AA 또는 M6036AA 또는 M6037AA

### 워크플로 4: 올리고뉴클레오타이드 분석 및 분취 스케일 정제

번들	워크플로 4A - 분석 LC/UV	워크플로 4B - 분취 LC/UV	워크플로 4C - 분취 LC/MSD XT
컬럼	 AdvanceBio 올리고뉴클레오타이드 (659750-702)	 AdvanceBio 올리고뉴클레오타이드 (671150-702) 또는 PLRP-S 분취용 컬럼 (PL1212-3800)	 AdvanceBio 올리고뉴클레오타이드 (671150-702) 또는 PLRP-S 분취용 컬럼 (PL1212-3800)
LC	 <b>BIO</b> 1260 Infinity II Bio-Inert 분석 스케일 LC 정제 시스템(분취 분취기 포함) G5654 및 G5664B	 <b>BIO</b> 1290 Infinity II 분취용 LC G7161B, G7158B, G7114A, G7163B, G7166A(옵션)	 <b>BIO</b> 1290 Infinity II 분취용 LC G7161B, G7111B, G7158B, G7114A, G7115A, G7170B, G9324A, G1170A, G4738A, G7163B, G7166A(옵션)
MS			 LC/MSD XT: G6135BA(OpenLab ChemStation 포함)
SW	 OpenLab ChemStation M8380AA 및 M8510AA	 OpenLab ChemStation용 자동 정제 소프트웨어 M8368AA	 OpenLab ChemStation용 자동 정제 소프트웨어 M8368AA

추가 정보:

[www.agilent.com/oligonucleotides](http://www.agilent.com/oligonucleotides)

온라인 구매:

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

Agilent Community에서 기술적 질문에 대한 해답을 얻고 리소스에 액세스하세요.

[community.agilent.com](http://community.agilent.com)

미국 및 캐나다

**1-800-227-9770**

[agilent\\_inquiries@agilent.com](mailto:agilent_inquiries@agilent.com)

유럽

[info\\_agilent@agilent.com](mailto:info_agilent@agilent.com)

아시아 태평양

[inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:inquiry_lsca@agilent.com)

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

DE73547804

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2023  
2023년 12월 1일, 한국에서 발행  
5994-5790KO

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](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)

