

포스터 재인쇄

ASMS 2020
TP 434

합성 올리고뉴클레오타이드의 고처리량 질량 분석: Fast LC 및 RapidFire 분석법 데이터 비교

Peter Rye, Ph.D. 및 Yanan Yang, Ph.D.

애질런트 테크놀로지스

액체 크로마토그래피(LC) 및 질량 분석법(MS)은 합성 올리고뉴클레오티드(oligo, 이하 ‘올리고’)의 특성 규명에 중요한 역할을 하며, 올리고 생산 및 사용의 가속화와 함께 지난 몇 년 동안 고처리량의 분석법에 대한 요구가 증가했습니다. 분리가 필요한 기존의 올리고 LCMS는 수 분의 실행 시간이 필요할 수 있습니다. 그러나, 모든 응용에 크로마토그래피 분리가 필요한 것은 아니며 MS 측정 전의 탈염만으로 충분할 수 있습니다. 본 연구 문서에서는 올리고의 고처리량 샘플링과 탈염 측면에서 Fast LC 및 RapidFire의 두 가지 분석법을 설명하고 비교합니다. 각 분석법은 18mer기준 고속 분석법으로 최적화한 다음, 길이가 18~100mer인 다양한 합성 DNA 및 RNA에 대해 성능 특성을 규명했습니다.

Fast LC 분석법



LC Conditions, Agilent 1290 Infinity II Binary pump, Multisampler with Dual Needles			
Column	AdvanceBio Oligo UHPLC Guard column, 1.7 µm, 2.1 x 5mm pr: 821725-921		
Column temperature	room temperature		
Injection volume	10 µL		
Smart Overlap	Enabled, alternating needle		
Autosampler temp	5 °C		
Needle wash	Methanol/Water 50:50		
Mobile phase	A = Water + 15 mM TEA + 400 mM HFIP B = Methanol		
Flow rate	1.75 mL/min		
Gradient program	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
Stop time	0.60 min		
Post time	0.00 min		

6545LC/Q-TOF Conditions	
Ion Polarity	Dual AJS Negative
Data Storage	Both (Centroid and Profile)
Gas temperature	350 °C
Drying gas flow	13 L/min
Nebulizer gas	60 psi
Sheath gas temperature	350 °C
Sheath gas flow	12 L/min
Capillary voltage	3500V
Nozzle voltage	2000V
Fragmentor	200 V
Skimmer	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
Mass Range	400 – 3200 m/z
Acquisition Rate	10 spectra/sec

RapidFire 분석법

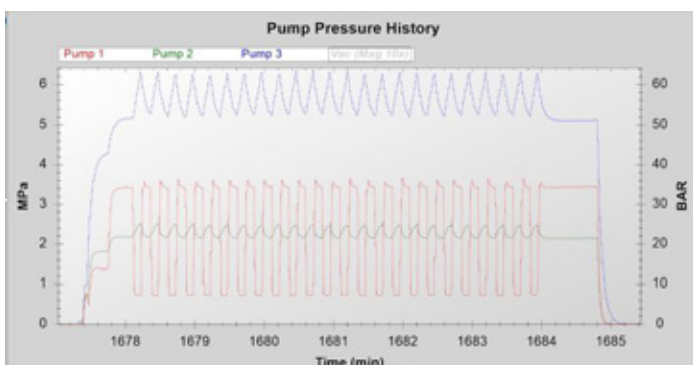


RapidFire Conditions		
Cartridge	PLRP-S, 30 µm 1000A, 4 µl bed volume	
Cartridge Temperature	room temperature	
Injection volume	10 µL	
Pump 1	Water + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP	1.2 ml/min
Pump 2	50% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP	0.6 ml/min
Pump 3	50% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP	0.6 ml/min
State 1	Aspirate sample (sip sensor on)	600 msec
State 2	Load/wash (desalt)	6,000 msec
State 3	Extra wash	0 msec
State 4	Elute (inject)	6,000 msec
State 5	Reequilibrate	500 msec

6545LC/Q-TOF Conditions	
Ion Polarity	Dual AJS Negative
Data Storage	Both (Centroid and Profile)
Gas temperature	275 °C
Drying gas flow	11 L/min
Nebulizer gas	35 psi
Sheath gas temperature	325 °C
Sheath gas flow	11 L/min
Capillary voltage	3500V
Nozzle voltage	2000V
Fragmentor	200 V
Skimmer	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
Mass Range	400 – 3200 m/z
Acquisition Rate	4 spectra/sec

Fast LC 분석법의 경우, Agilent 1290 Infinity II multisampler에는 스마트 오버랩으로 시료를 번갈아 주입하여 하나의 니들에서 분석을 수행하는 동시에 다른 니들에서 시료를 흡입(drawing)하는 이중 주입 니들이 장착되었습니다. 실행 시간은 가드 컬럼을 MS의 분석용 nebulizer에 직접 연결하여 높은 유속의 빠른 그레디언트로 더욱 최적화했습니다. Fast LC 분석법의 높은 유속은 올리고를 빠르게 탈염하기 위해 필요했습니다. 최종적으로, Fast LC의 획득 속도는 모든 크로마토그래피 피크에서 최소 15개의 포인트를 확보하도록 초당 10개 스펙트럼으로 설정되었습니다(약 5초 폭의 RapidFire 분석법 대비 약 2초의 폭이었음). RapidFire 분석법의 경우, 시스템은 각 시료에 대하여 6초 탈염(Pump 1, State 2) 후 6초 용리(Pump 3, State 4)를 수행했습니다. 모든 결과 데이터는 MassHunter Bioconfirm B07을 사용하여 분석했습니다.

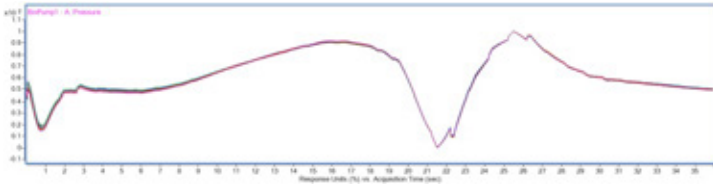
처리량 및 재현성 – RapidFire



RapidFire 분석법의 처리량은 5개 State 시간의 합(약 13초, 실험 참조)에 플레이트 스테이지 모션을 위한 약 1.5초를 더한 것으로 결정되며 시료 당 15초 미만이었습니다. RapidFire MS의 경우, MS 획득 시작/중단과 관련된 지연 시간을 피하기 위해 시료 세트당 하나의 데이터 파일을 획득하고, 획득 후 분석을 수행했습니다. 이 그림은 3개의 RapidFire 펌프 모두에 대한 압력을 24회 반복 주입을 1 세트로 한 하나의 연속 파일로 보여줍니다. 각 펌프의 압력 정점과 골은 0.5~10MPa 범위에서 일정하게 유지되어 안정된 분석법과 일치했습니다.

결과 및 토의

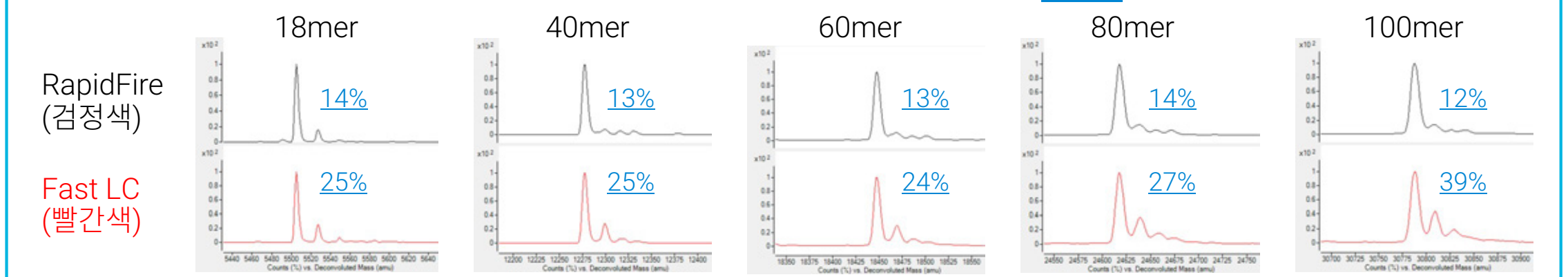
처리량 및 재현성 - Fast LC



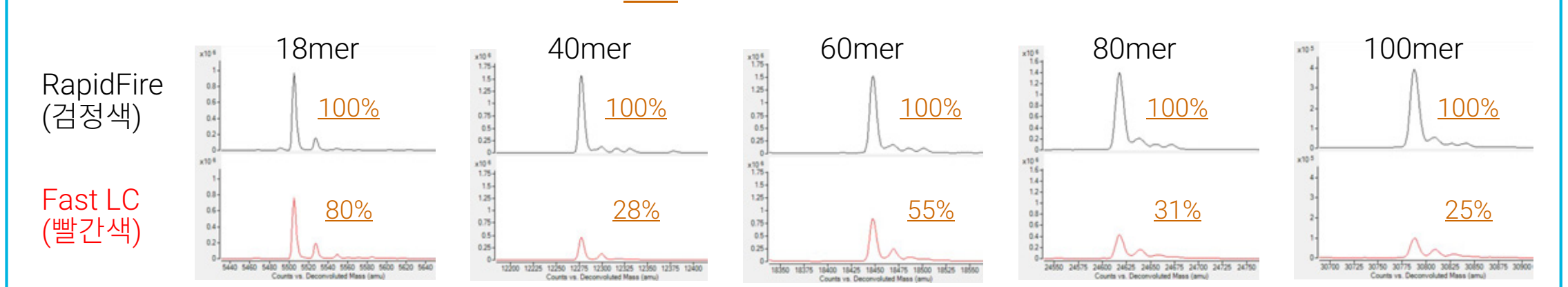
Fast LC 분석법의 처리량은 그레디언트 프로그램(약 35초, 다음 시료 흡입 시간 이내로 최적화)과 MS 획득 중단/시작(약 5초)에 의해 결정되며, 시료 당 40초였습니다. 이 그림은 24회 주입의 펌프 압력을 오버레이 한 데이터를 보여줍니다. 데이터가 중첩되어 있어 양호한 그레디언트 재현성을 나타냅니다.

탈염 및 신호 강도

각 스펙트럼에서 가장 큰 피크에 맞게 스케일 조정. 표적 피크 대비 염 부가물 백분율을 **파란색**으로 표시.



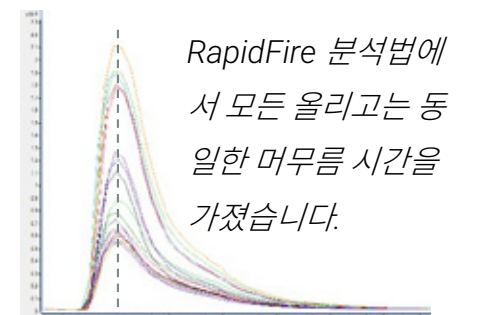
연결된 Y-축. 각 올리고 길이별 표적 피크의 강도를 **갈색**으로 표시.



위의 패널은 RapidFire 분석법(검정색) 및 Fast LC 분석법(빨간색)을 사용하여 획득한 정제되지 않은 18, 40, 60, 80 및 100mer 올리고의 디컨볼루션 스펙트럼을 보여줍니다. 상단 그림은 각 스펙트럼에서 가장 큰 피크를 기준으로 스케일 조정된 데이터를 나타내며, RapidFire 분석법이 피크 +22 (Na) 및 +38 (K) Da로 나타나는 염 부가물 감소 측면에서 Fast LC보다 더 효율적임을 보여줍니다. 각 스펙트럼에서 표적 피크 대비 부가물의 상대적 비율은 **파란색**으로 표시되어 있습니다. RapidFire 분석법에 의한 매우 효율적인 탈염은 4ul 베드 부피 카트리지에서 6초간 State 2(실험 참조)로부터 얻어지며, 결과적으로 카트리지 부피의 15배로 세척한 것입니다. 하단 그림은 상단과 동일한 데이터를 보여주지만 각 올리고 크기에 대한 Y 축이 연결되어 있습니다. 절대 피크 높이를 비교해 보면, Fast LC 분석법이 이온 억제를 감소시켜 신호를 증가시킬 수 있는 Fast LC(아래 참조)의 분리 특성에도 불구하고, Fast LC에서 나타난 낮은 신호는 높은 펌프 유속(1.75 vs RapidFire 0.6mL/분), 더 빠른 획득 속도(10 vs. RapidFire 초당 4 스펙트럼) 및 덜 효율적인 탈염이 모두 작용하여 만들어진 결과입니다.

올리고 머무름 - RapidFire

두 가지 분석법으로 올리고 분리를 평가하기 위해 18~100mer 길이의 19가지 고유한 DNA 및 RNA 시료를 측정했습니다. RapidFire 분석법에서는 모든 올리고가 동일한 머무름 시간에 카트리지에서 용리되었습니다. RapidFire가 낮은 유기 조건에서 높은 유기 조건으로 즉시 전환하고(밸브를 통해), 레진 부피가 작은 카트리지(4ul)를 사용하며, 분석물질과 카트리지 상호 작용을 최소화하기 위해 역방향으로 용리하는 등, 분리를 방지하도록 특별히 설계되었기 때문에 이는 예상되는 결과였습니다. 이 그림은 19개 시료 모두를 오버레이한 총 이온 크로마토그램(TIC)을 보여줍니다.



올리고 머무름 - Fast LC

RapidFire 분석법과는 대조적으로 Fast LC 분석법에서는 다양한 머무름 시간이 관찰되었습니다. 그림 A는 길이가 18~100mer인 19개의 고유한 DNA 및 RNA 시료에 대한 TIC의 오버레이를 보여줍니다. 이러한 시료의 머무름 시간은 7초 범위에서 변동했습니다. 그림 B는 단일 혼합물로 주입된 20, 40, 60, 80 및 100mer에 대한 추출 이온 크로마토그램(EIC) 오버레이를 보여주며, 크로마토그래피와 질량을 결합하여 얻어진 이들 생성물의 분해능을 보여줍니다.

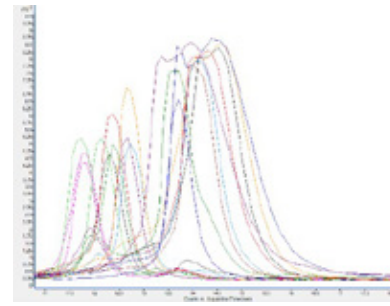


그림 A. Fast LC 분석법에서의 RT 차이

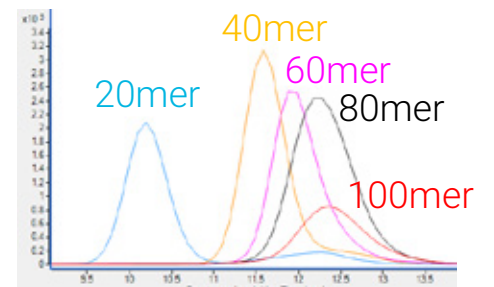


그림 B. 올리고 혼합물의 EIC 오버레이

Fast LC 분석법에서 길이가 근접한 두 올리고를 얼마나 잘 분리하고 고유한 디컨볼루션 결과를 잘 생성할 수 있는지 평가하기 위해, 18mer와 20mer의 1:1 혼합물의 분석을 실행했습니다. 그림 C는 TIC이며, 소프트웨어가 개별적으로 적분한 올리고 생성 피크를 보여줍니다. 그림 D는 최종 디컨볼루션 스펙트럼이며, 두 종과 각각의 불순물을 보여줍니다. 이러한 분리는 그레디언트 프로그램(표시되지 않음)의 사소한 변경만으로 쉽게 개선할 수 있습니다.

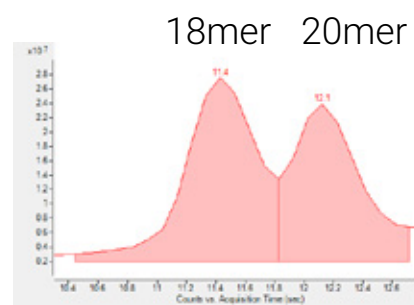


그림 C. Fast LC 에 의한 18mer 와 20mer 의 분리

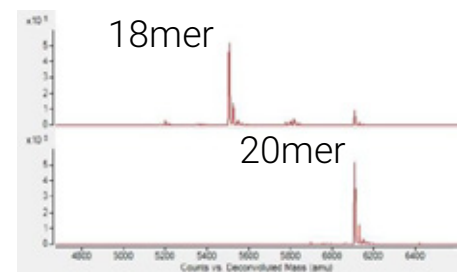
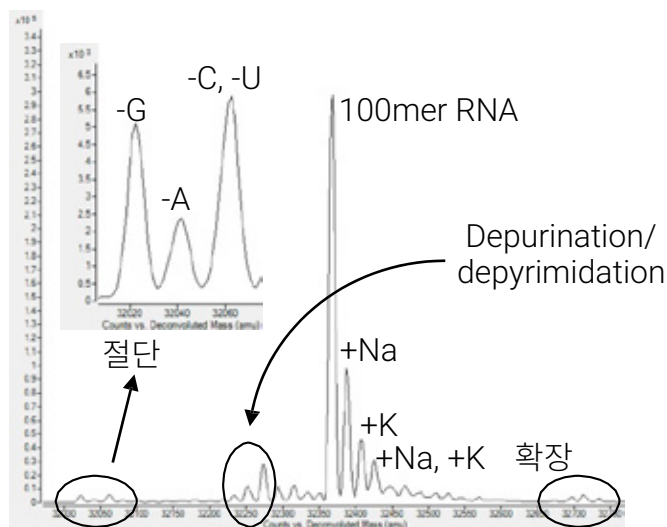


그림 D. 올리고 분리로 데이터 해석을 단순화할 수 있음을 보여주는 디컨볼루션 스펙트럼

낮은 존재비의 불순물 분석



단일 크로마토그래피 피크에서 생성물을 질량으로 분리하는 방법을 이용해 올리고 순도를 높은 처리량으로 평가할 수 있습니다. 존재비가 높은 표적물질과 함께 낮은 존재비의 많은 불순물이 동시 용리되는 경우가 종종 있는데, 이때는 넓은 측정 범위(dynamic range)의 MS 측정과 복잡한 스펙트럼을 디컨볼루션 처리할 수 있는 소프트웨어가 매우 중요합니다. 주요 생성물과 동일한 크로마토그래피 피크에 존재하는 낮은 존재비의 불순물에 대한 검출을 평가하기 위해 RapidFire 분석법을 사용해 100mer 가이드 RNA를 분석했습니다. 이 그림은 크로마토그래피 분리가 전혀 없었음에도 불구하고 디컨볼루션 결과 100mer RNA와 수많은 불순물의 존재가 드러나며, 많은 불순물의 상대적 면적이 약 0.5% 정도로 낮다는 사실을 보여줍니다. 예상하는 바와 같이, 이 측정 범위는 분리를 사용한/저처리량 분석법에서 훨씬 탁월했습니다(데이터는 표시하지 않음).

결론

- RapidFire TOF 및 Fast LC TOF 분석법 모두 합성 올리고에 대해 재현성 있는 고품질 데이터를 생성했습니다.
- RapidFire 분석법은 시료 당 15초(시간 당 240개, 하루 5,760개 시료)의 처리량을 유지한 반면, Fast LC 분석법은 시료 당 40초(시간 당 90개, 하루 2,160개 시료)의 처리량을 유지했습니다.
- RapidFire 분석법은 Fast LC보다 더 효율적으로(올리고 크기가 증가함에 따라 약 2~3배) 탈염했습니다.
- Fast LC 분석법은 RapidFire에 비해 약한(올리고 크기 증가에 따라 80%~25% 범위) 표적 신호를 생성했습니다.
- 처리량에 다소 영향이 있지만 Fast LC 분석법을 약간 변경하여 성능을 높일 수 있었습니다.
- Fast LC 분석법은 일부 올리고 종을 분리할 수 있어 혼합물의 데이터 해석을 단순화하고, 응용에서 요구되는 처리량과 분리 사이의 균형을 유지하도록 조정할 수 있는 특성을 가지고 있었습니다.
- 분리 성능보다 속도에 중점을 둔 접근 방식임에도 불구하고, 두 가지 고처리량 시스템은 존재비가 낮은 대량의 불순물을 질량 분해하여 우수한 올리고 데이터를 제공했습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.