



Agilent 7100 CE および CE/MS を用いた 合成核酸の分析



〈要旨〉

キャピラリー電気泳動(CE)およびシングル四重極 CE/MS を用いて合成核酸の分析を行いました。CE での測定ではキャピラリーゲル電気泳動モードによる分離により一塩基の差異の試料を分離することが可能です。またシングル四重極 CE/MS での測定ではキャピラリーゾーン電気泳動モードが用いられ、合成核酸はデコンボリューション可能な多価のイオンとして検出されます。本方法では HPLC のイオンペア試薬を用いることなく、また少量の試料での核酸の測定が実現可能です。

Key Words: 合成核酸、キャピラリー電気泳動、デコンボリューション

1. はじめに

合成核酸の分析には HPLC での逆相分配分離および UV 検出が行われます。並行して MALDI-TOF などによる質量分析計により平均分子量の算出を行い、得られた分子量と合成した核酸の分子量の比較を行います。この方法では LC の移動相にトリエチルアミンなどのイオンペア試薬を添加する必要があります。

本アプリケーションノートでは、HPLC とは異なる分離メカニズムを持つキャピラリー電気泳動(CE)により合成核酸を分離し、UV 検出及びシングル四重極 CE/MS による検出を行いました。CE (UV 検出) ではキャピラリーゲル電気泳動モード (CGE) により分離を行いました。また CE/MS を用いた測定ではキャピラリーゾーン電気泳動モード (CZE) により分離を行い、合成核酸は多価のイオンとして検出されました。これらの多価イオンをデコンボリューションすることにより、平均分子量が算出されます。

2. 実験条件

Oligonucleotide Resolution Standard(各 20-40 nmol/mL)および Oligonucleotide Ladder Standard (各 20 nmol/mL) を CE 測定に、合成核酸(PolyT, 20 mer)を CE/MS 測定に用いました。

表 1. 試料

Oligonucleotide Ladder Standard (p/n 5190-9029)	
15 mer	TTTTT TTTTT TTTTT
20 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT
25 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT
30 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT
35 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT
40 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT

Oligonucleotide Resolution Standard (p/n 5190-9028)	
14 mer	rCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU
17 mer	rUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU
20 mer	rUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU
21 mer	rGrUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

表 2. CE 分析条件

CE: Agilent 7100 CE	
キャピラリー	PVA コーティングキャピラリー 内径 100 μ m, 有効長 28 cm, 全長: 36.5 cm (p/n G1600-61419 をカットして使用)
泳動緩衝液 (buffer)	200 mM Bis-Tris, 200 mM Boric acid pH 7.2
ポリマー溶液 (polymer sol.)	27 (w/v)% polyethylene glycol 40000 in buffer
プレコンディショニング	300 sec high pressure flush (6.0 bar) with polymer sol.
注入	-10 kV, 20 sec
印加電圧	-25 kV
キャピラリー温度	30 °C
検出	UV 260 nm (bandwidth: 8 nm) 光学フィルタ (p/n G1600-62700) 使用



Agilent Technologies

表 3. CE/MS 分析条件

CE: Agilent 7100 CE	
キャピラリー	フューズドシリカキャピラリー 内径: 50 μ m, 全長: 90cm (GL Science, カットして使用)
泳動緩衝液 (buffer)	10mM 炭酸アンモニウム pH 7.9
プレコンディショニング	300 sec flush with buffer
注入	50 mbar, 20 sec
印加電圧	25 kV
泳動時加圧	10 mbar
キャピラリー温度	20 $^{\circ}$ C
MS: Agilent 6130 SingleQuad LC/MS	
イオン源	ESI-Negative
ドライガス	N ₂ , 7 L/min, 300 $^{\circ}$ C, 7 psig
ソース液	5 mM NH ₄ OH/MeOH(1/1), 8 μ L/min
キャピラリー電圧	3500 V
シグナル	Scan, m/z 500-3000
フラグメンター電圧	250 V
デコンボリューション ソフトウェア	LC/MSD バイオアナリシスツール (M8363AA) (OpenLab CDS アドオン)

3. 結果及び考察

図 1 に CE 分析のエレクトロフェログラムを示します。いずれの試料でも良好な分離を示し、一塩基の差異を分離することができました。

図 2, 3 に CE/MS 分析のトータルイオンエレクトロフェログラム (TIE)、マスペクトルおよびデコンボリューション結果を示します。プロトン脱離イオンとしてデコンボリューションした結果、分子量 6324.6 と計算され、理論分子量 (6325 Da) に対して誤差の少ない結果となりました。また SIM (m/z 1580.6) にて測定を行ったところ、0.02 – 10 μ g/mL の範囲で良好な直線性を確認しました。

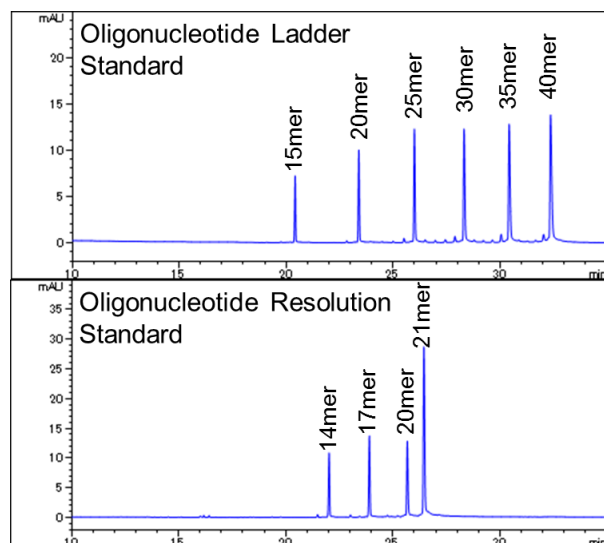


図 1 CE 分析 エレクトロフェログラム

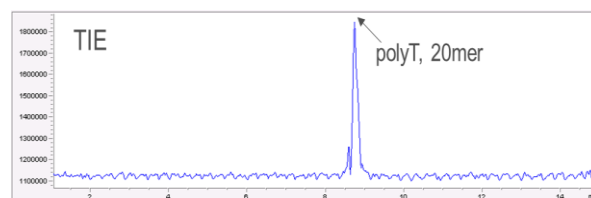


図 2 CE/MS 分析 TIE

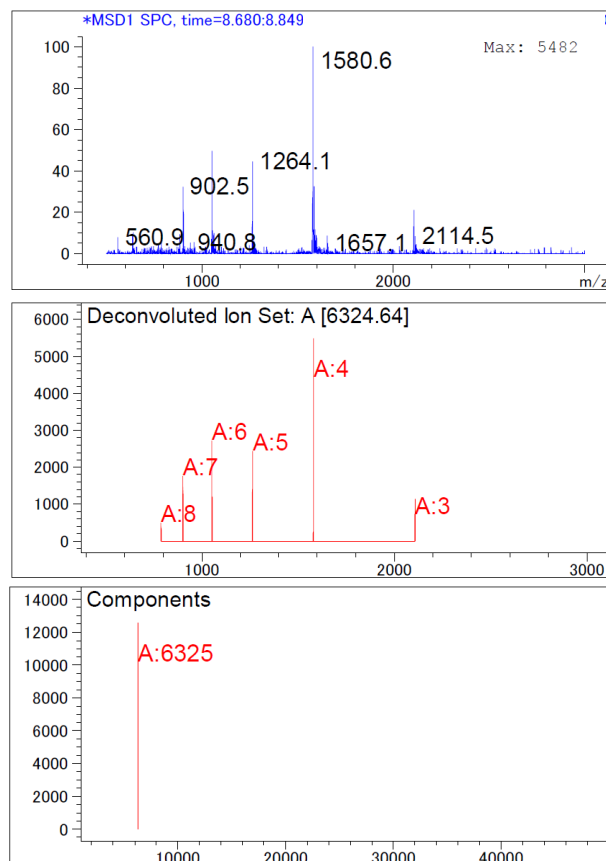


図 3 マスペクトルおよびデコンボリューション結果

4. まとめ

合成核酸を CE および CE/MS システムで分析しました。CE を用いると、HPLC のイオンペア試薬を使用することなく、鎖長の異なる核酸を良好に分離することが可能でした。また CE/MS を用いると、合成核酸は多価のイオンとして検出され、デコンボリューションスペクトルから平均分子量の算出が可能であることが示されました。

【LC-MS-201707NA-001】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies