

LC/MSD iQ によるオリゴ核酸の分析



Authors

林 慶子
外山 大純
瀬崎 浩史
林 明生

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

合成したオリゴ核酸の品質管理のために HPLC による UV 検出だけでなく、LC/MS による分子量確認のニーズが高まっています。

オリゴ核酸は、ESI イオン源を搭載した LC/MS で測定すると多価イオンとして観測されます。解析には、マススペクトルのデコンポリューションにより平均分子量を算出するのが一般的ですが、この計算には質量精度や質量範囲に優れた LC/TOF が有用です。

このアプリケーションノートではシングル四重極形 LC/MS を使用し、オリゴ核酸を分離・検出しました。ここでは、分子量既知のオリゴ核酸を分析する際に、平均分子量をターゲットマスとして入力しました。入力した平均分子量に基づいて観測される m/z を計算し、その EIC を描画してターゲットの存在の有無を容易に確認できる自動解析ワークフローと判別レポートを作成しました。

Key words : 合成核酸、分子量確認、レポート出力

システム

1260 Infinity II Prime LCポンプ(G7104C)
 1290 Infinity II Vialsampler+ICC (G7129C)
 1260 Infinity II Diode Array Detector(G7117C)
 InfinityLab LC/MSD iQ (G6160AA)

分析対象

Oligonucleotide Resolution Standard(PN:5190-9028)に水1 mLを添加し試料としました。

表1. 配列と分子量

鎖長	配列	平均分子量 (Da)	濃度 (nM)
14 mer	rCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	4397.7	2
17 mer	rUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	5339.1	2
20 mer	rUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	6279.0	2
21 mer	rGrUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	6624.3	4

分析条件

表2. HPLC条件

HPLC	
カラム	AdvancedBio Oligonucleotide, 2.1 x 100 mm, 2.7 μm (PN: 655750-702)
移動相A	400 mM HFIP, 15 mM TEA
移動相B	移動相A : MeOH=1 : 1
グラジエント	25 %B(0 min) -70 %B(7 min)
流速	0.6 mL/min
カラム温度	65 °C
注入量	10 μL
UV	260 nm

表3. LC/MS条件

LC/MSD iQ	
極性	Negative
乾燥ガス	350 °C, 11 L/min
ネブライザ	60 psi
キャピラリ電圧	3500 V
測定	Scan ($m/z=450-1450$)

結果

図1にTICを示しました。TIC上にUVピークと対応するピークを認めました。

21 merのピーク部分のマススペクトルを図2に示しました。計算すると5価（予測：1323.8,実測：1323.4）から13価（予測：508.5, 実測：508.4）のイオンが観測されました。

次に、ターゲットの存在の有無を迅速に確認するため、解析の自動化について検討しました。図3にOpenLab2.5のサンプルエントリ画面の一部を示しました。サンプルエントリの際にターゲットの欄に平均分子量を入力し、自動解析を実施しました。

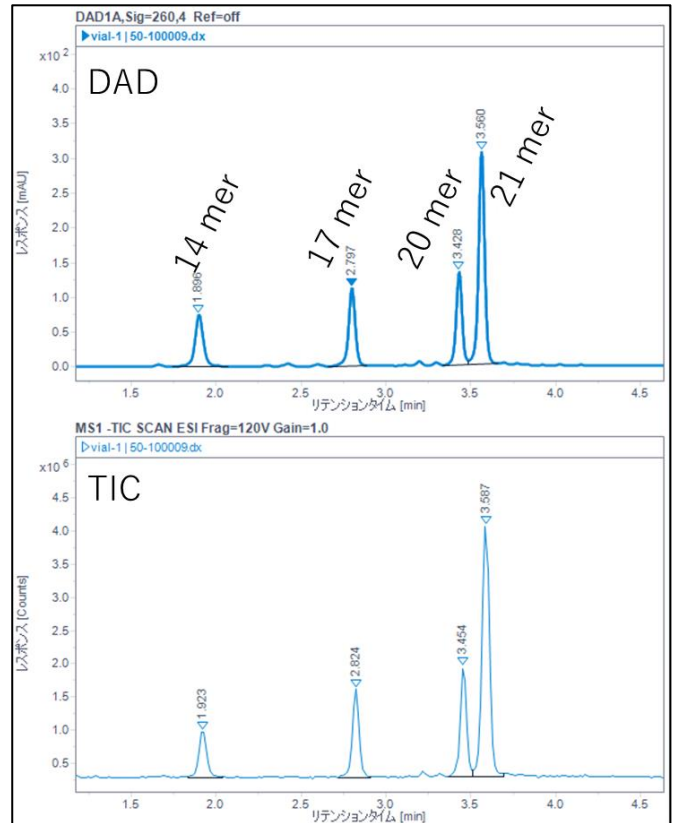


図1. UVクロマトグラム（上）とTIC（下）

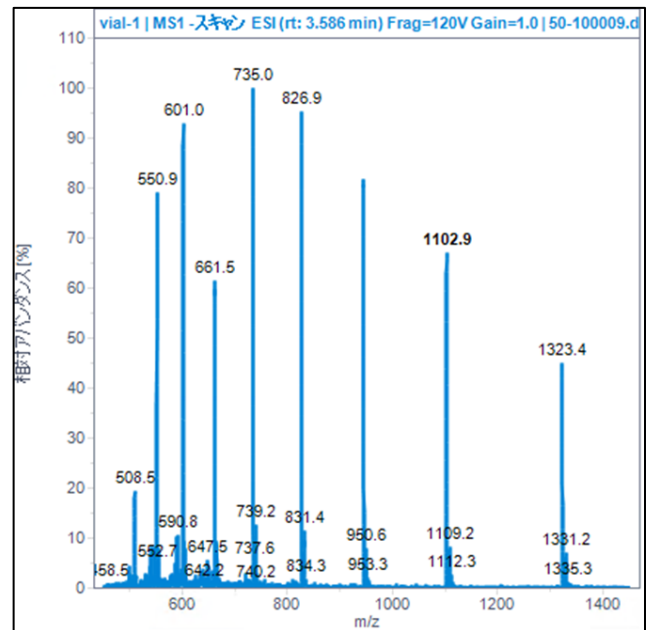


図2. 21 merのマススペクトル

▲ 解析セクション				
サンプルアmount	0			
ISTD アmount				
倍率	1	1	1	1
希釈率	1	1	1	1
ターゲット	6624.3	6279.0	5339.1	4397.7
LIMS ID				
<input type="checkbox"/> キャリブレーション	レベル			

図3. ターゲットマスの設定

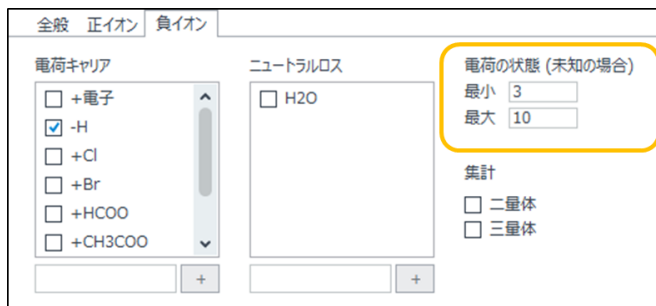


図4. EIC抽出の設定

図4に解析画面の一部を示しました。オリゴ核酸は一般的にプロトン脱離体を多価イオンで観測するため、-Hを選択し、電荷を3~10価としました。(一般的な低分子成分は1価)。OpenLab2.5では最大10価までのイオンの計算を実施できます。

このメソッドは分析の際に解析メソッドとして設定することで、分析後に自動的に、入力したターゲットから抽出するイオンを計算し、EICを描画します。ターゲット成分の有無を判別するため、TICのレスポンスとEICのレスポンスを比較し、ターゲット成分が存在した場合にはターゲット検出「はい」と表示するレポートを作成しました。図5には21 merをターゲットとした場合の結果を示しました。上からUVクロマトグラム、TIC、EICの重ね書きおよびピークの検出の有無が示されています。図3のように複数のターゲットピークを設定した場合も一括でピーク有無の判定を行うことが可能です。

まとめ

シングル四重極LC/MSで20mer程度の鎖長のオリゴ核酸を分析しました。良好なイオン化及び質量精度のマススペクトルを得ました。

サンプル分析時にターゲット質量を入力することで、分子量に基づき、成分の有無を自動で判断することが可能でした。

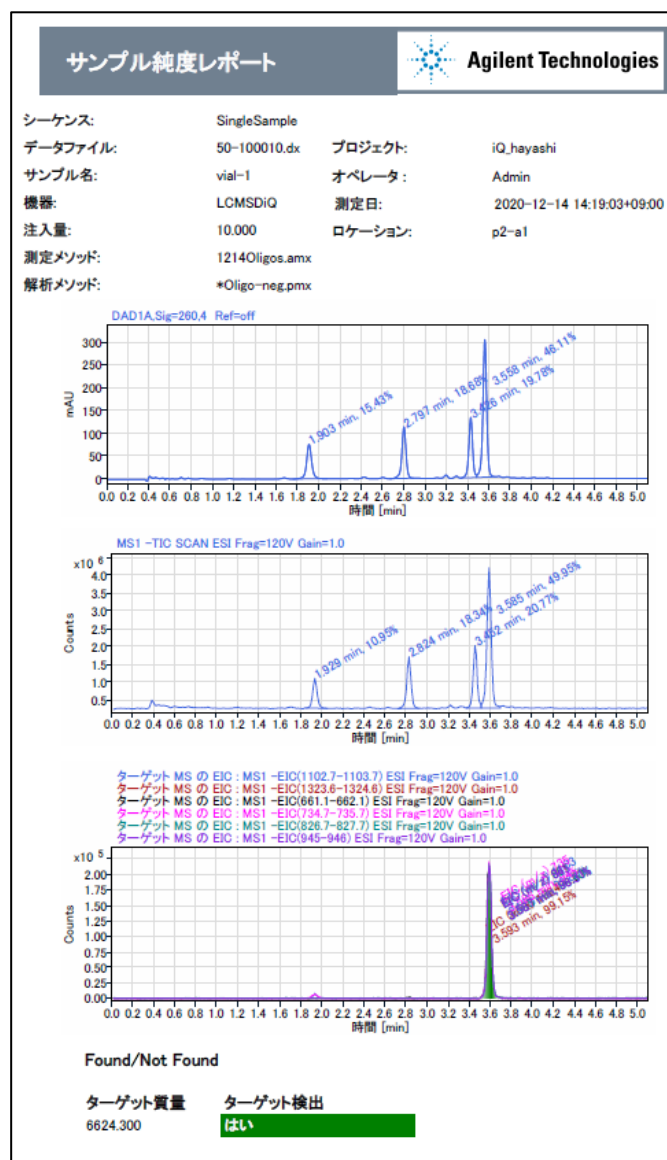


図5. レポートの例

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

LC-MS-202012HK-001

DE44180.8977662037