

Poster Reprint

ASMS 2020
TP434

合成オリゴヌクレオチドの ハイスループット質量分析： 高速LC メソッドと RapidFire メソッドの データの比較

Peter Rye, Ph.D. and Yanan Yang, Ph.D.

Agilent Technologies

はじめに

液体クロマトグラフィー（LC）および質量分析（MS）は、合成オリゴヌクレオチド（オリゴ）の特性解析においてきわめて重要な役割を担っています。近年のオリゴの製造および使用の加速的増加を受け、分析メソッドのハイスループット化に対する要求が高まっています。従来の LCMS では、オリゴのクロマトグラフィー分離が期待されますが、この分析にはかなりの時間を要する可能性があります。ただし、すべてのオリゴのアプリケーションにクロマトグラフィー分離が必要なわけではなく、MS 測定前の脱塩で十分な場合もあります。ここでは、高速 LC メソッドと RapidFire メソッドについて取り上げ、この 2 つのメソッドによるオリゴのハイスループットのサンプリングおよび脱塩結果を比較します。各メソッドは、18 mer でのスピードに最適化した後、長さ 18~100 mer の多様な合成 DNA および RNA に対する性能を特性解析しました。

実験方法

高速 LC メソッド



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 pn: 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)	8 (%)
	0.00	0.00	20
	0.03	1.80	30
	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		

6545L C/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 メソッド



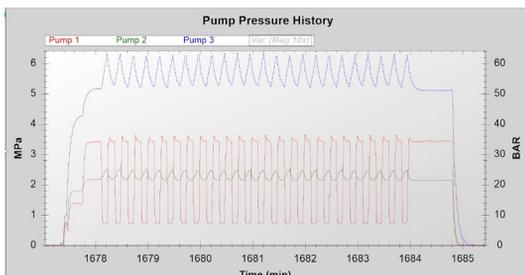
RapidFire Conditions			
Cartridge	PLRP-S, 30 µm 1000A, 4 ul bed volume		
Cartridge Temperature	room temperature		
Injection volume	10 µL		
Pump 1	Water + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP	1.2 ml/min	
Pump 2	50% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP	0.6 ml/min	
Pump 3	50% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP	0.6 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	

6545L C/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

高速 LC メソッドには、デュアルニードルを装着した Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラを使用しました。ニードルは、スマートオーバーラップによりサンプルごとに交互に切り替え、一方のニードルによる分析と他方のニードルによる次のサンプルの吸引を並行して行いました。分析時間は、MS のネブライザに直接装着したガードカラムを通して高流量で高速グラジエントを行うことにより、さらに最適化しました。高速 LC メソッドでは、オリゴの脱塩を迅速に行うために、高い流量が必要でした。また、分離ピーク全体（RapidFire メソッドの約 5 秒に対して約 2 秒）でデータポイントが少なくとも 15 個になるように、高速 LC の取り込みレートを 10 スペクトル/秒に設定しました。RapidFire メソッドでは、各サンプルに対し、システムにより 6 秒の脱塩（ポンプ 1、状態 2）に続いて 6 秒の溶出（ポンプ 3、状態 4）を実行しました。すべての結果データの解析には、MassHunter Bioconfirm B07 を使用しました。

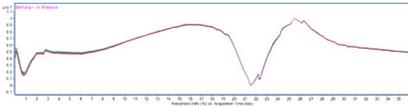
結果と考察

スループットと再現性 - RapidFire



RapidFire メソッドのスループットは、5 つの状態（約 13 秒、「実験方法」を参照）と約 1.5 秒のプレートステージ操作の合計として求め、サンプルあたり 15 秒弱でした。RapidFire MS では、MS 取り込みの開始/停止に伴う遅延時間によるスループットの低下を避けるために、サンプルセットごとに 1 つのデータファイルが取り込まれ、取り込み後に解析されます。左図は、24 回にわたる一連の繰り返し注入に対する 3 つの RapidFire ポンプすべての圧力を 1 つの連続ファイルとして示したものです。どのポンプも、圧力のピークと谷が 0.5~10 MPa の範囲で一定しており、これがメソッドの安定性の高さに現れています。

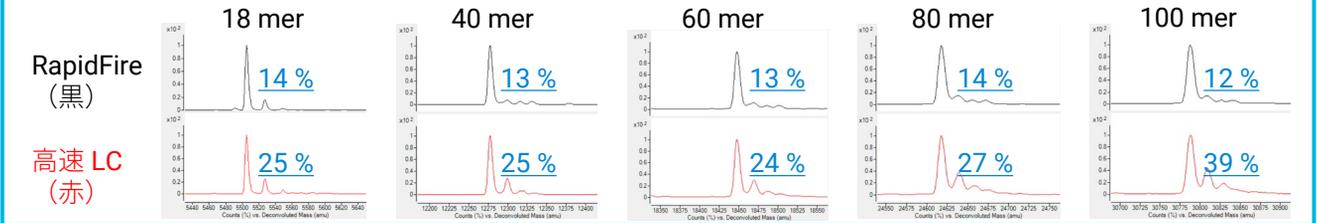
スループットと再現性 - 高速 LC



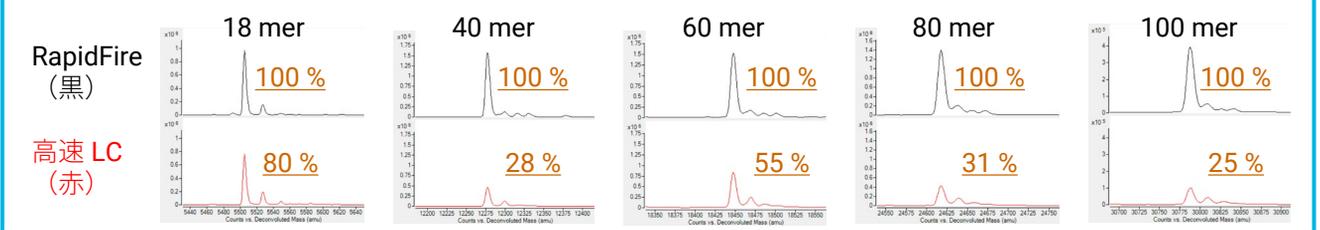
高速 LC メソッドのスループットは、グラジエントプログラム（約 35 秒、次のサンプルのサンプリング時間に最適化）と MS 取り込みの停止/開始（約 5 秒）の合計として求め、1 サンプルあたり 40 秒でした。左図は、24 回の注入で得られたポンプ圧力のトレースを重ね表示したものです。トレースがほぼ一致していることから、グラジエントの再現性が良好であることがわかります。

脱塩とシグナル強度

各スペクトルで最大ピークを 100% とした場合。ターゲットピークに対する塩付加物の割合を青色で表記しています。



Y 軸に同じスケールを適用した場合。各オリゴサイズについて、ターゲットピークの強度を茶色で表記しています。



上図は、RapidFire メソッド (黒) および高速 LC メソッド (赤) により取り込んだ、18、40、60、80、および 100 mer の未精製オリゴのデコンボリュートしたスペクトルです。上段は、各スペクトルで最大ピークを 100% とした場合のデータです。この結果から、高速 LC より RapidFire メソッドの方が、+22 (Na) および +38 (K) Da のピークとして現れる塩付加物を除去する脱塩効率が高いことがわかります。各スペクトルには、ターゲットピークに対する付加物の相対割合が青色で表記されています。RapidFire メソッドで非常に効率的に行える脱塩は、ベッドボリューム 4 μ L のカートリッジでの 6 秒の状態 3 (カートリッジボリュームの 15 倍相当の溶液による洗浄、「実験方法」を参照) によってもたらされます。下段の図は、オリゴサイズごとに Y 軸に同じスケールを適用して、上段と同じデータを示したものです。絶対ピーク高さの比較から、高速 LC メソッドで得られたクロマトグラムの方が、各オリゴについて茶色で表記されたターゲット MS のシグナルよりも低くなっていることがわかります。高速 LC には、イオン抑制を減少させることでシグナルを増大できるという分離特性があります (以下を参照)。それにもかかわらず高速 LC の方のシグナルが低いのは、高いポンプ流量 (RapidFire の 0.6 mL/min に対して 1.75 mL/min)、頻繁な取り込みレート (RapidFire の 4 スペクトル/秒に対して 10 スペクトル/秒)、低い脱塩効率の影響が総合的に現れた結果です。

オリゴのリテンションタイム - RapidFire

2つのメソッドによるオリゴの分離を評価するために、長さ 18~100 mer のユニークな DNA および RNA サンプル 19 種類を測定しました。RapidFire メソッドでは、すべてのオリゴが同じリテンションタイムでカートリッジから溶出しました。RapidFire は、低有機条件から高有機条件へ (バルブにより) 瞬時に切り替え、少量のレジン (4 μ L) のカートリッジを使用し、成分/カートリッジの相互作用を最小化するために逆方向に溶出することにより、分離を回避するように設計されているため、これは予測通りの結果です。右図は、19 種類すべてのサンプルのトータルイオンクロマトグラム (TIC) を重ね表示したものです。



RapidFire メソッドでは、すべてのオリゴが同じリテンションタイムで溶出

オリゴのリテンションタイム – 高速 LC

RapidFire メソッドとは対照的に、高速 LC メソッドでは、リテンションタイムに変動が観察されました。図 A は、長さ 18~100 mer のユニークな DNA および RNA サンプル 19 種類で得られた TIC を重ね表示したものです。これらのサンプルでは、リテンションタイムの変動幅は 7 秒以内でした。図 B は、混合物で一度に注入した 20、40、60、80、および 100 mer の抽出イオンクロマトグラムを重ね表示したものです。クロマトグラフィーと質量分析の組み合わせにより、これらのオリゴが高い分解能で分離されていることが示されています。

サイズが近い 2 種類のオリゴを分離して、個別のデコンボリューション結果を生成する高速 LC メソッドの能力を評価するために、18 mer および 20mer の 1:1 混合物を測定しました。図 C に、その TIC を示します。ソフトウェアにより個別に積分され、生成されたオリゴのクロマトグラムピークが現れています。図 D は、デコンボリュートした結果のマススペクトルです。2 つのオリゴ種とそれぞれの不純物が示されています。この分離は、グラジエントプログラムをわずかに変更することで、容易に改善することができました（図では示していません）。

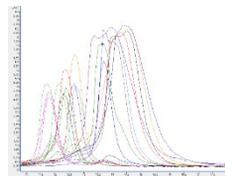


図 A. 高速 LC メソッドによる RT の差異

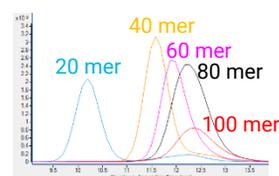


図 B. オリゴ混合物の EIC の重ね表示



図 C. 高速 LC による 18 mer および 20 mer の分離結果

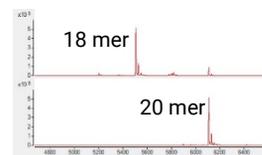
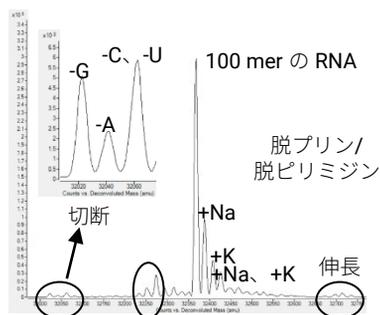


図 D. デコンボリュートしたスペクトル。オリゴの分離によりデータの解釈が容易になることがわかります。

低いアバンダンスの不純物分析



オリゴのハイスループットの純度評価は、単一の分離ピークからオリゴを質量分離することにより行えます。一般に、多数の低いアバンダンス不純物が高いアバンダンスのターゲット化合物と共溶出することから、この質量分離では、広いダイナミックレンジの MS 測定と、複雑なスペクトルをデコンボリュートすることが可能なソフトウェアがきわめて重要になります。主産物と同じ分離ピークとして溶出する低いアバンダンス不純物の検出能力を評価するために、RapidFire メソッドを使用して 100 mer のガイド RNA を分析しました。左図に示すように、デコンボリューション結果には、クロマトグラフィーでは分離されなかった 100 mer の RNA と多数の不純物が現れています。これらの不純物の多くは、相対面積が約 0.5 % 程度です。予測どおり、このダイナミックレンジにより、分離メソッド/低スループットのメソッド（データは非掲載）よりも良好な結果が得られています。

結論

- RapidFire TOF および高速 LC/TOF のどちらのメソッドでも、合成オリゴについて再現性の高い高品質のデータが得られました。
- RapidFire メソッドではサンプルあたり 15 秒（1 時間あたり 240 サンプル、1 日あたり 5760 サンプル）、高速 LC メソッドではサンプルあたり 40 秒（1 時間あたり 90 サンプル、1 日あたり 2160 サンプル）というスループットが達成されました。
- RapidFire メソッドは高速 LC より脱塩効率がが高く、オリゴサイズが増加するにつれて約 2~3 倍になりました。
- 高速 Fast LC メソッドでは、ターゲットピークのシグナル強度が RapidFire より低く、オリゴサイズが増加するにつれて 80~25 % になりました。
- 高速 LC メソッドをわずかに変更することで、スループットは多少低下しますが、メソッド性能がさらに向上しました。
- 高速 LC メソッドでは、オリゴ種がある程度分離されました。この特性により、混合物で得られたデータの解釈が容易になり、アプリケーションで求められるスループットと分離のバランスを調整することもできました。
- どちらのハイスループットシステムも分離よりスピードを重視したアプローチですが、多数の低いアバンダンス不純物を質量分離することで、優れたオリゴデータが得られました。