

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

	E co	LC Cond	fitions, Agilent 1290 Infinity II Binary pump, Multis	ampler with Dual Needles	6545LC/Q-TOF Conditions	
<i></i>		Column	AdvanceBio Oligo UHPLC Guard column, 1.	7 um, 2.1 x 5mm pn: 821725-921	Ion Polarity	Dual AJS Negative
高速 LC メソッド	A survival	Column temperature	room temperature		Data Storage	Both (Centroid and Profil
		Injection volume	10 µL		Gas temperature	350 °C
	and and a second se	Smart Overlap	Enabled, alternating needle		Doving gas flow	131/min
		Autosampler temp	5 °C		Nebulizer.goe	60 ppi
		Needle wash	MethanoLivväter 90:50 A = Water + 15 mM TEA + 400 mM HFIP B = Methanol		Cheeth ees temperature	350.00
		Mobile phase			Cheeth ges fleur	101 /min
		Flow rate	1.75 mL/min		Sneath gas flow	12 L/min
		Gradient program	Time (min)         Time (sec)           0.00         0.00           0.03         1.80           0.24         14.4           0.25         15.0           0.30         18.0           0.21         19.6	8(%) 20 20 50 100 20	Capillary voltage	3500V
					Nozzle voltage	2000V
					Fragmentor	200 V
					Skimmer	65 V
			0.59 35.0	20	Oct 1 RF Vpp	750 V
		Stontime	0.60 min		Mass Range	400 - 3200 m/z
		otop time				
		Posttime	0.00 min RapidFire Conditions		Acquisition Rate 6545LC/Q-TOF Conditions	10 spectra/sec
		Post time Cartridge PL	0.00 min RapidFire Conditions LRP-S, 30 um 1000A, 4 ul bed volume		Acquisition Rate 6545LC/Q-TOF Conditions Ion Polarity	10 spectra/sec
<u>۲</u>		Cartridge PL Cartridge PL Cartridge ro	0.00 min RapidFire Conditions LRP-S, 30 um 1000A, 4 ul bed volume com temperature		Acquisition Rate 6545LC/Q-TOF Conditions Ion Polarity Data Storage	10 spectra/sec Dual AJS Negative Both (Centroid and Profi
<u>بر</u> ک		Post time Post time Cartridge PI Cartridge ro Temperature	0.00 min RepidFire Conditions LRP-S, 30 um 1000A, 4 ul bed volume som temperature		Acquisition Rate 6545LC/O-TOF Conditions Ion Polarity Data Storage Gas temperature	10 spectra/sec Dual AJS Negative Both (Centroid and Profi 275 ℃
ド シ ン		Cartridge PL Cartridge PL Cartridge Temperature ro Injection 10	0.00 min RapidFire Conditions LRP-S, 30 um 1000A, 4 ul bed volume born temperature 0 ul.		Acquisition Rate 6545LC/Q TOF Conditions Ion Polarity Data Storage Gas temperature Drying gas flow	10 spectra/sec Dual AJS Negative Both (Centroid and Profi 275 °C 11 L/min
ドシン		Post time Post time Cartridge PL Cartridge ro Injection Injection 10 Pump 1 W	0.00 min RapidFire Conditions LRP-S, 30 um 1000A, 4 ul bed volume com temperature 0 uL. /ater 4 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP	1.2 m/min	Acquisition Rate 6545LC/QTOF Conditions Ion Polarity Data Storage Gas temperature Drying gas flow Nebulizer gas	10 spectra/sec Dual AJS Negative Both (Centroid and Profi 275 ℃ 11 L/min 35 psi
ドッンメ		Post time Post time Cartridge Cartridge Temperature Volume Pump 1 W	0.00 min RepidFire Conditions LRP-S; 30 um 1000A, 4 ul bed volume som temperature 0 uL (ater + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP // S mM TEA + 200 mM HFIP //	1.2 ml/min 0.6 ml/min	Acquisition Rate 65451.C/Q TOF Conditions Ion Polarity Data Storage Gas temperature Drying gas flow Nebulizer gas Sheath gas temperature	10 spectra/sec Dual AJS Negative Both (Centroid and Profi 275 °C 11 L/min 35 psi 325 °C
e X U V K		Cartridge Cartridge Cartridge Temperature Injection Pump 1 W Pump 2 50	0.00 min RapidFire Conditions LRPS, 30 um 1000A.4 ul bed volume icom temperature 0 ul. vider + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP 0% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP 0% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP	1.2 ml/min 0.6 ml/min 0.6 ml/min	Acquisition Rate 6545LC/Q TOF Conditions Ion Polanity Data Storage Gas temperature Drying gas flow Nebulizer gas Sheath gas temperature Sheath gas flow	10 spectra/sec Dual AJS Negative Both (Centroid and Profi 275 °C 11 L/min 35 psi 325 °C 11 L/min
ire メンッド		Posttime Posttime Cartridge Temperature Injection Unjection Pump 1 W Pump 2 50 Pump 3 50	0.00 min RapidFire Conditions LRP-S, 30 um 1000A, 4 ul bed volume born temperature 0 uL 4ater + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP 0% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP % Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP	1.2 ml/min 0.6 ml/min 0.6 ml/min	Acquisition Rate 6545LC/Q TOF Conditions Ion Polarity Data Storage Gas temperature Drying gas flow Nebulizer gas Sheath gas temperature Sheath gas tonyenture Sheath gas flow Capillary voltage	10 spectra/sec Dual AJS Negative Both (Centroid and Profi 275 °C 11 L/min 35 pri 325 °C 11 L/min 3500V
dFire メソッド		Post time Post time Cartridge PI Cartridge ro Injection 10 Pump 1 W Pump 2 50 Pump 3 50 State 1 As	0.00 min     RepidFire Conditions     IRP-S, 30 um 1000A, 4 ul bed volume     soom temperature     0 uL     vater + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP     70% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP     70% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP     spirate sample (sip sensor on)	1.2 ml/min 0.6 ml/min 0.6 ml/min 600 maec	Acquisition Rate 65451.C/Q1DF Conditions Ion Polarity Data Storage Gas temperature Drying gas flow Nebulizer gas Sheath gas temperature Sheath gas temperature Sheath gas flow Capillary voltage Nozzle voltage	10 spectra/sec Dual AJS Negative Both (Centroid and Profi 275 °C 111 L/min 38 psi 325 °C 111 L/min 38 psi 325 °C 111 L/min 2000V 2000V
oidFire メソッド		Post time Post time Cartridge Temperature Injection Volume Pump 1 Pump 3 State 1 Attach State 2 Lo	0.00 min RapidFire Conditions LRP-S, 30 um 1000A, 4 ul bed volume som temperature 0 uL vater + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP 0% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP 0% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP 0% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP pirate sample (cip senor on) advash (cesht)	1.2 ml/min 0.6 ml/min 0.6 ml/min 600 mæc 6.000 mæc	Acquisition Rate 6545LC/Q TOF Conditions Ion Polanity Data Storage Gas temperature Drying gas flow Nebulizer gas Sheath gas flow Capillary voltage Nozde voltage Fragmentor	10 spectra/sec Dual AJS Negative Both (Centroid and Poff 275 °C 11 L/min 325 °C 11 L/min 33500 2000V 2000V
apidFire メンッド		Post time Post time Cartridge Temperature Injection Pump 1 W Pump 2 State 1 State 2 Lo	0.00 min RapidFire Conditions LRP-S, 30 um 1000A.4 ul bed volume com temperature 0 uL vater + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP 0% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP 0% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP spirate sample (sip sensor on) coad/wash (desalt) vater wash	1.2 ml/min 0.6 ml/min 0.6 ml/min 600 maec 6.000 maec 0 maec	Acquisition Rate 6545LC/Q TOF Conditions Ion Polarity Data Storage Gas temperature Drying gas flow Nebulizer gas Shreeth gas temperature Shreeth gas flow Capillary voltage Nozzle voltage Fragmentor Skimmer	10 spectra/sec Dual AJS Negative Both (Centroid and Profi 275 °C 11 L/min 35 pai 325 °C 11 L/min 3500V 2000V 2000V 65 V
RapidFire メソッド		Post time Post time Cartridge Temperature Injection Unjection Pump 1 W Pump 2 State 1 State 3 State 4 State 4 State 4 State 4 State 4 State 4 State 3 State 4 State	0.00 min Repdf-ire Conditions RRP-S, 30 um 1000A, 4 ul bed volume com temperature 0 ul. dater + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP 0% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP 0% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP spirate sample (sip sensor on) coad/wash (desait) xtra wash tue resized)	1.2 ml/min 0.6 ml/min 0.6 ml/min 600 msec 6.000 msec 0 msec 0 msec	Acquisition Rate 65451LC/Q1DF Conditions Ion Polarity Data Storage Gas temperature Drying gas flow Nebulizer gas Sheath gas temperature Sheath gas flow Ccalillary voltage Nozzle voltage Fragmentor Skimmer Oct 1 RF Vpp	10 spectra/sec Dual AJS Negative Both (Centroid and Profi 275 °C 111 L/min 35 psi 325 °C 111 L/min 3500V 2000V 2000V 65 V 750 V
RapidFire メソッド		Post time Post time Post time Post time Cartridge Temperature rought Pump 1 W Pump 2 SC Pump 3 SC State 1 Az State 2 Lc State 3 EP State 4 EP	0.00 min RapidFire Conditions LRP-S; 30 um 1000A, 4 ul bed volume som temperature 0 uL (ater + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP 0% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP 9% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP spirate sample (sip sensor on) oad/wash (desail) xtra wash lute (inject)	1.2 ml/min 0.6 ml/min 0.0 ml/min 600 msec 6,000 msec 0 msec 6,000 msec	Acquisition Rate 6545LC/Q TOF Conditions Ion Polarity Data Storage Gas temperature Drying gas flow Nebulker gas Sheath gas temperature Sheath gas temperature Sheath gas tow Capillary voltage Nozzle voltage Fragmentor Skimmer Oct 1 RF typ Mass Range	10 spectra/sec Dual AJS Negative Both (Centroid and Profi 275 °C 11 L/min 35 psi 325 °C 11 L/min 3500V 200V 200V 2

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。

## 結果と考察

## 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



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<u>青色</u>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 uL 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<u>茶色</u>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、イオンサプレッション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 uL)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 予測どおりの結果です。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



### 結果と考察

## 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 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。

ホームページ www.agilent.com/chem/jp 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。

カストマコンタクトセンタ 0120-477-111 email\_japan@agilent.com

アジレント・テクノロジー株式会社 © Agilent Technologies, Inc. 2020 Printed in Japan, June 1, 2020

