

Application News

No. 12-MO-482-K

MALDI-TOF Mass Spectrometry Analysis MALDI-8030

Dual Polarity Benchtop MALDI-TOF 질량분석기 MALDI-8030을 이용한 합성 올리고뉴클레오타이드의 Negative mode 분석

Negative Mode Analysis of Synthetic Oligonucleotides using the MALDI-8030 Dual Polarity Benchtop MALDI-TOF Mass Spectrometer

사용자 활용 포인트

- ◆ Benchtop MALDI-TOF의 negative mode를 이용해 부가생성물을 줄이고, 올리고뉴클레오타이드를 간편하게 분석할 수 있다.
- ◆ 우수한 질량 정확도 및 양질의 질량 스펙트럼은 PCR 후 겔-에티디움 브로마이드(gel-Ethidium bromide) 검출법의 대안으로 MALDI-TOF 분석법을 제공한다.
- ◆ 실험실의 학생들에게 질량 분석법을 소개하는 데 유용한 유전형 분석 절차를 소개한다.

■ 서론

합성 올리고뉴클레오타이드는 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의한 DNA 염기서열결정(DNA sequencing) 및 증폭에 사용되는 프라이머와 같은 분자 생물학 분야에서 사용되는 짧은 DNA 또는 RNA 서열이다. 최근 합성 올리고뉴클레오타이드는 여러 질병에 대한 치료, 진단 및 DNA 기반 진단 키트 개발을 위해 연구가 이루어지고 있다.

낭포성 섬유증은 DNA 수준에서 발생하는 질환의 한 예이다(그림 1). 백인에서 가장 흔한 상염색체 열성 질환으로 7q31.2 염색체 영역에 위치하며 27개의 엑손을 포함하는 낭포성 섬유증 막힘단 전도 조절자(CFTR) 유전자의 돌연변이에 의해 발생한다^[1]. CFTR 유전자의 돌연변이는 염화물 수송 및 나트륨 흡수 억제를 통해 기도 및 관 내 분비물의 정상적인 수화 유지를 방해한다. 이는 주로 기도의 상피, 땀샘, 위장관(췌장 및 담도계 포함) 및 비호생식계와 같이 CFTR 단백질이 주로 발현되는 영역에서 발생한다^[1].

낭포성 섬유증은 임상 관련성 외에도, 다수의 분자 분석법으로 다양한 돌연변이(>1500) 확인이 가능하기 때문에 교육을 위한 실험실에서 유전자형 워크플로우를 설명하는 데 유용하다^[1]. 이 분석은 일반적으로 PCR법과 관련된 것으로, ARMS-PCR (Amplification Refectory Mutation System)은 Phe508del, Gly542X, Asn1303Lys 돌연변이 분석에 사용될 수 있고^[1], PCR-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)은 Arg1303Lys, Arg347Pro, Arg334Try 돌연변이 분석^[3], 그리고 헤테로듀플렉스 분석(Heteroduplex Analysis)은 Phe508del, Ile507del, 1677delTA 돌연변이 분석에 이용 가능하다^[3]. 이러한 분석에서는 일반적으로 PCR 증폭 후, 겔 전기영동으로 검출하고 UV 박스에서 에티디움 브로마이드로 염색하여 판독하므로 워크플로우가 노동 집약적이고 느리며 비용이 많이 든다^[1, 3]. 따라서 MALDI-TOF로 대체하여 검출하는 것이 보다 더 쉽다.

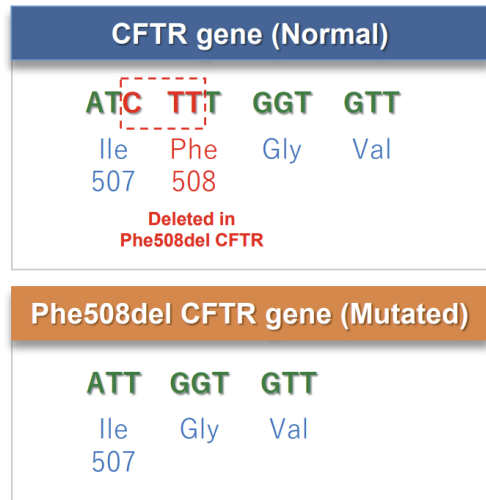


그림 1. 낭포성 섬유증에서 CFTR 유전자의 가장 흔한 돌연변이(Phe508del)의 기전

MALDI-TOF 질량분석법은 올리고뉴클레오타이드 분석에 널리 사용되는 기술로, 빠르고 간단하며 서열 뿐만 아니라 분자 식별에 대한 정보를 제공할 수 있다. Positive ion mode 질량 분석법으로 올리고뉴클레오타이드를 검출할 때 어려운 점 중 하나는 용액에서 나트륨 또는 칼륨 부가생성물이 형성되기 때문에 정제를 하지 않으면 감도와 피크 분해능이 감소할 수 있다. 그러나 negative ion mode 분석에서는 염 부가생성물이 검출되지 않기 때문에 정제 과정을 피할 수 있다.

여기서는 낭포성 섬유증 질환(Phe508del 돌연변이)을 예로 들어 유전형 분석을 위한 Dual polarity benchtop MALDI-8030 질량 분석기를 제안한다(그림 2).

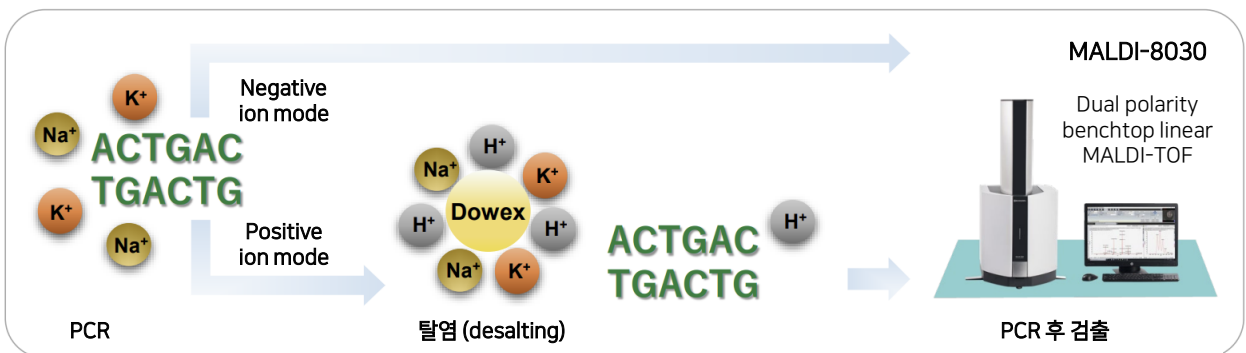
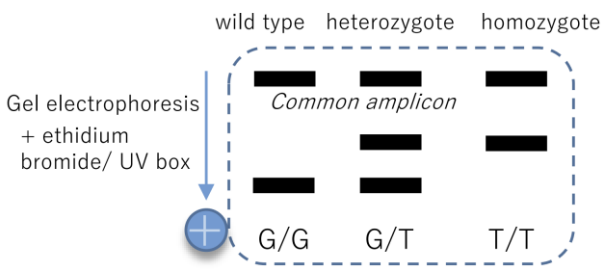
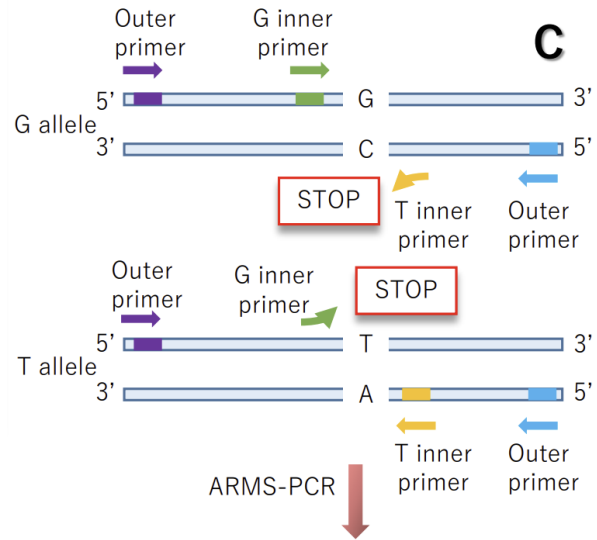
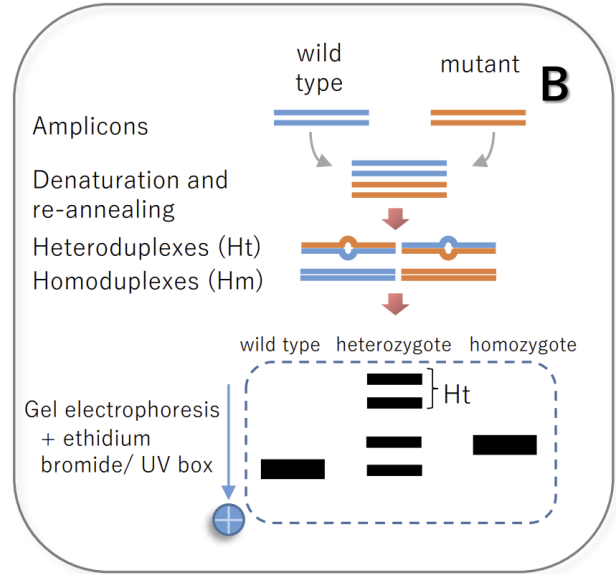
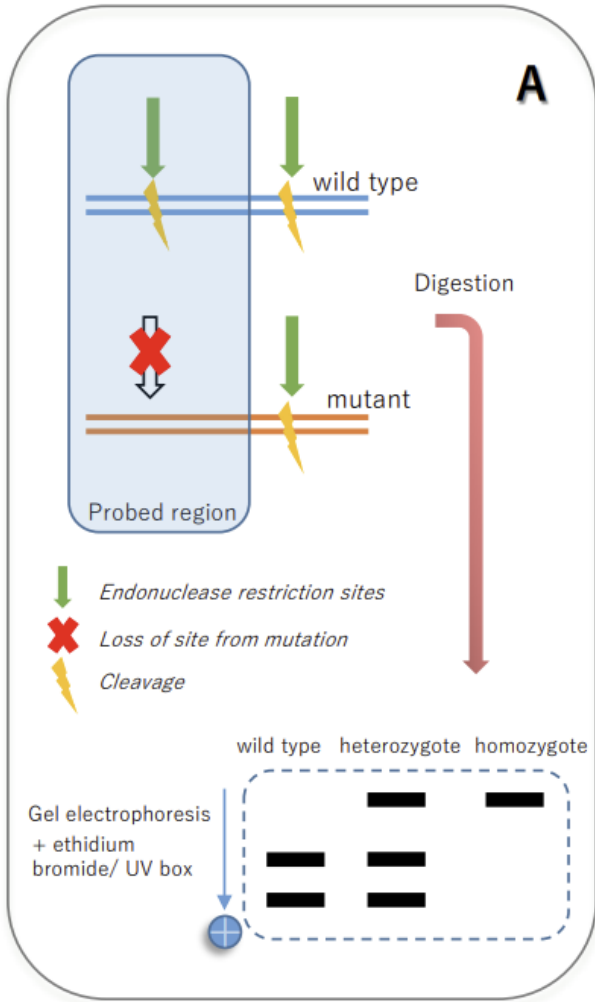


그림 2. 합성 뉴클레오타이드 시료 분석 절차

이 뉴스레터에서는 염 부가생성물 간섭을 제거하여 샘플 전처리 및 질량 스펙트럼 해석을 단순화하는 negative mode의 이점을 보여준다.

또한 올리고뉴클레오타이드의 분리 및 검출을 나타내었고, 아래에 설명된 접근 방식은 PCR 후 젤 전기영동/ 에티디움 브로마이드에 대한 유용한 대안책이 될 수 있다(그림 3).



Products

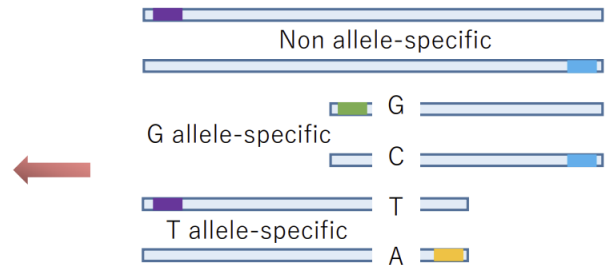


그림 3. 젤 전기영동, 에티디움 브로마이드/UV 박스에서 올리고뉴클레오타이드 생성물질의 검출에 수행되는 일반적인 PCR 방법. A) PCR-RFLP; B) heteroduplex PCR 분석; 및 C) ARMS-PCR. [4], [5], [6]을 기반으로 한 그림.

■ 분석조건과 시료

PCR 후 올리고뉴클레오티드가 생성되는 시나리오를 시뮬레이션하였다. 여기서는 낭포성 섬유증 대립 유전자를 기반으로 예를 들었다. 낭포성 섬유증을 유발하는 돌연변이가 발생한 CFTR 유전자의 서열에 해당하는 합성 올리고뉴클레오티드 시료는 Merck Life Science에서 구입하였다: ATCTTTGGTGTT (wild type / normal CFTR gene); ATTGGTGTT (Phe508del CFTR mutated gene). Ammonium citrate dibasic, Dowex® 이온 교환 수지 및 3-하이드록시 피콜린산(3-HPA) MALDI 매트릭스도 Merck Life Science에서 구입하였다. 올리고뉴클레오티드는 UHQ-water 로 희석하여 100 µM 농도로 조제하였다. 3-HPA 매트릭스를 조제하기 위해 Ammonium citrate dibasic은 acetonitrile/water(70/30)로 희석하여 5 mg/mL 농도로 준비하였다.

Positive ion mode에서의 분석을 위해 시료의 탈염이 진행되었다. Dowex 양이온 교환 수지는 수소를 나트륨 및 기타 염과 교환하는 방식으로 작용한다. Negative mode 분석을 위해서는 탈염 과정을 하지 않았다. 시료는 MALDI 타겟에 점적하기 전 매트릭스(1:2)로 미리 혼합하였다.

MALDI-8030을 이용하여 positive 및 negative ion mode로 각각 탈염 및 비탈염 시료를 분석을 하였다. Negative mode 분석은 스펙트럼의 품질을 손상시키지 않고 샘플 전처리를 단순화하여 positive mode에 비해 이점이 있다는 것을 입증하였다.

■ 낭포성 섬유증 유전형 분석 결과 (합성 올리고뉴클레오티드)

그림 4는 낭포성 섬유증의 상이한 유전자형을 대표하는 올리고뉴클레오티드의 MALDI negative mode 스펙트럼을 나타낸다: A) 대상체는 양쪽 부모(wild type)로부터 정상 CFTR 유전자를 물려받았다; B) 대상체는 양쪽 부모(homozygote)로부터 돌연변이의 Phe508del CFTR 유전자를 물려받았다. C) 대상체는 하나의 정상 CFTR 유전자와 하나의 돌연변이 Phe508del CFTR 유전자(heterozygote)를 물려받았다.

정확한 m/z 값은 평균 [M - H]⁻ 중에 대해 계산되었다: m/z 3656.43 (ATCTTTGGTGTT, 정상 CFTR 유전자) 및 m/z 2758.85 (ATTGGTTT, Phe508del CFTR 돌연변이 유전자). 모든 올리고뉴클레오티드 종은 우수한 질량 정확도를 보였다.

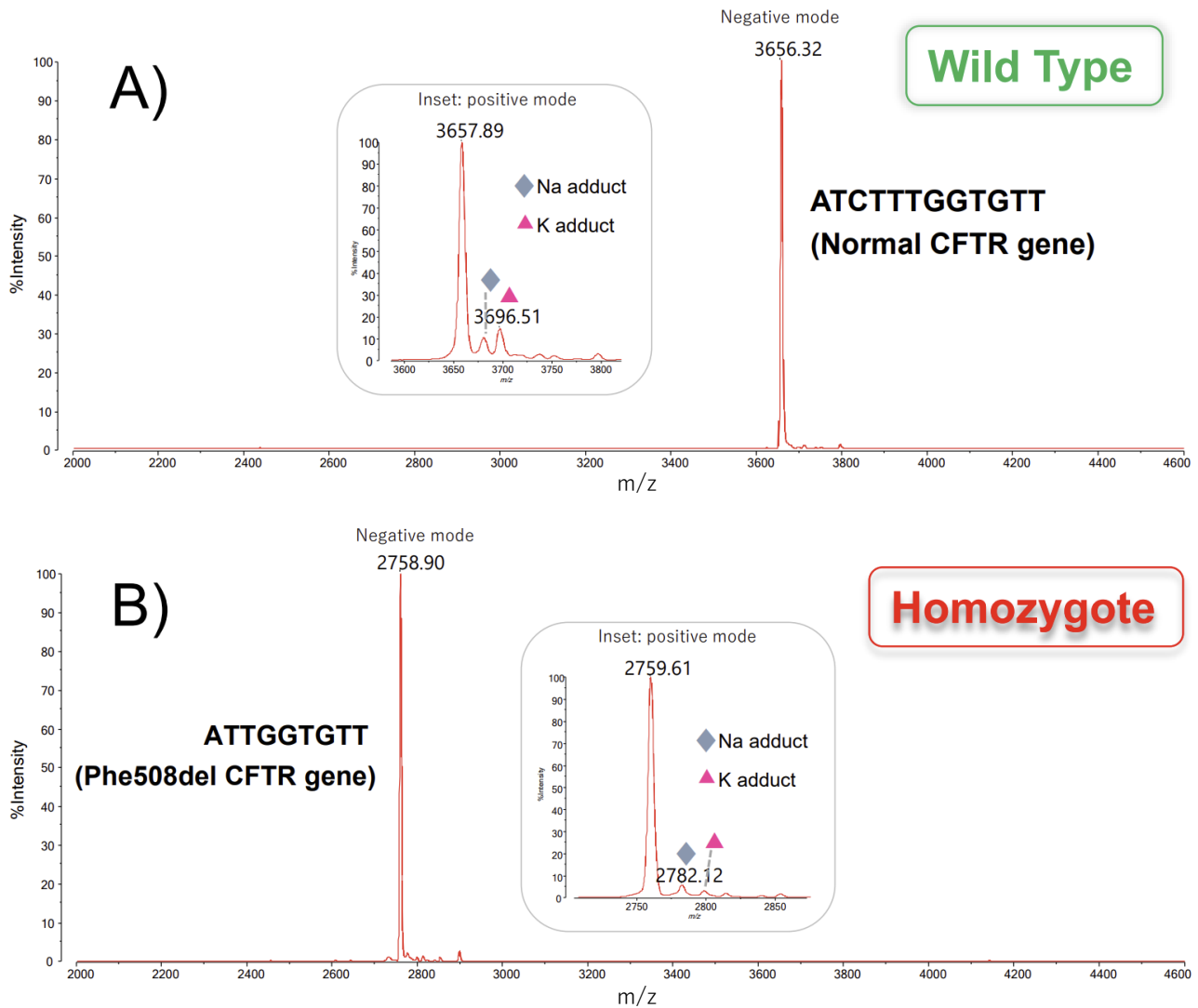


그림 4. (다음 페이지에 계속) 낭포성 섬유증의 3가지 상이한 유전자형을 대표하는 올리고뉴클레오티드의 MALDI negative mode 스펙트럼: A) 정상 CFTR 유전자(wild type). A)의 그림은 positive mode 분석으로 얻은 해당 올리고뉴클레오티드 피크를 나타냄. 평균 [M + H]⁺ 중에 대해 계산된 m/z 값은 m/z 3658.44(ATCTTTGGTGTT, normal CFTR gene). B) Phe508del CFTR 돌연변이 유전자(homozygote), 따라서 질병을 발현함. B)의 그림은 positive mode 분석으로 얻은 해당 올리고뉴클레오티드 피크를 나타냄. 평균 [M + H]⁺ 중에 대해 계산된 m/z 값은 m/z 2760.86(ATTGGTGTT, Phe508del CFTR CFTR mutated gene).

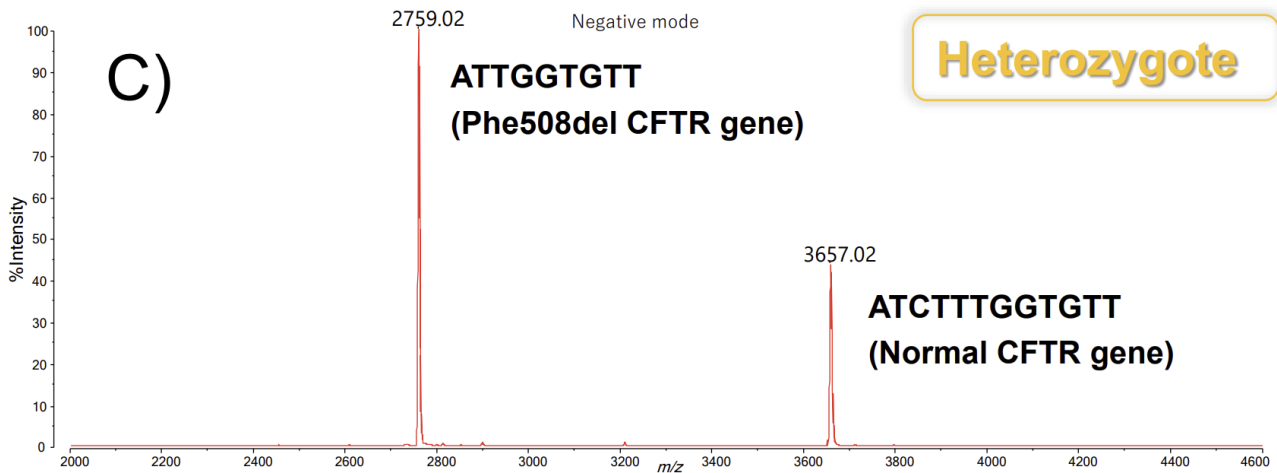


그림 4. (이전 페이지에서 계속). 낭포성 섬유증의 3가지 상이한 유전자형을 대표하는 올리고뉴클레오타이드의 negative mode MALDI 스펙트럼: C) 하나의 정상 CFTR 유전자 및 하나의 Phe508del CFTR 돌연변이 유전자(heterozygote)가 유전되므로 질병의 보인자.

그림 4A 및 그림 4B 스펙트럼의 그림은 positive mode 분석으로 얻은 해당 올리고뉴클레오타이드 피크를 보여준다. 관찰할 수 있는 바와 같이, 탈염(양이온 교환)을 사용해도 약간의 나트륨 및 칼륨 부가생성물이 positive mode에서 여전히 검출된다. 대조적으로, negative mode에서 얻은 해당 스펙트럼은 더 깨끗하고 염 부가생성물이 보이지 않는다(탈염이 필요하지 않음).

또한, 그림 4 A-C는 강한 피크의 신호 세기에서 볼 수 있듯이 MALDI-TOF를 사용하여 올리고뉴클레오타이드의 검출이 우수함을 보여준다. 질량 분해능은 또한 heterozygote에서 정상 CFTR 올리고뉴클레오타이드와 Phe508del CFTR 돌연변이 올리고뉴클레오타이드의 분리를 가능하게 하므로(그림 4C) wild type, homozygote 및 heterozygote에 대한 세 가지 결과 모두의 유전형 분석이 쉽게 가능하다.

■ 결론

이 뉴스레터에서는 합성 올리고뉴클레오타이드를 Dual polarity MALDI-8030로 쉽게 검출하고 분석하는 기능을 보여준다. 올리고뉴클레오타이드 분석에서 시료의 탈염 단계를 제거하여도 우수한 감도를 보이는 negative ion mode의 이점을 확인하였다. 전체 분석의 워크플로우는 겔 전기영동을 수행할 때보다 간단하고 빠르다. 따라서 이 기술은 학생들을 가르치는 실험실에서의 교육 및 유전자형 분석 업무에도 유용할 것으로 보인다.

■ 참고문헌

[1] Hakkak, Atieh Mehdizadeh, et al. "Analysis of CFTR gene mutations in children with cystic fibrosis, first report from NorthEast of Iran." Iranian journal of basic medical sciences 16.8(2013): 917.

[2] Ferrie, Richard M., et al. "Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene." American journal of human genetics 51.2 (1992): 251.

[3] Frențescu, Lucian, et al. "The study of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in a group of patients from Romania." Journal of Cystic Fibrosis 7.5 (2008): 423-428.

[4] "Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)". Ncbi.Nlm.Nih.Gov,2021,https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/. Accessed 7 Jan 2021.

[5] Srinivasan, Srilakshmi, and Jyotsna Batra. "Single Nucleotide Polymorphism Typing." (2019): 432-440.

[6] Peng, Bao-yu, et al. "A novel and quick PCR-based method to genotype mice with a leptin receptor mutation (db/db mice)." Acta Pharmacologica Sinica 39.1 (2018): 117-123.

