

台式 MALDI-TOF MS 测定反义寡核苷酸药物的序列

MALDI-041

摘要: 反义寡核苷酸药物 (ASO) 是目前研究较多的核酸类药物, 而核苷酸序列确认是 ASO 质控中的重要环节。本文介绍了应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 快速测定反义寡核苷酸药物的核苷酸序列的案例, 通过对 ISD (源内裂解) 模式产生的碎片离子进行分析, 实现 ASO 核苷酸序列的确认。该方法操作简便, 图谱简单易解析。

关键词: MALDI-TOF 反义寡核苷酸 源内裂解 序列解析

技术特点:

- ❖ 正离子模式分析反义寡核苷酸药物序列。
- ❖ 前处理简单, 图谱易于解析。

核酸药物疗法作为一种新的治疗模式, 近年来引起了人们的广泛关注。与传统生物制药不同, 核酸药物可以通过具有高性价比的化学合成来生产。寡核苷酸药物通常指由人工合成的长度 50 个以内核苷酸组成的一类药物。诺西那生钠注射液是全球首个用于治疗罕见病脊髓性肌萎缩症的精准靶向治疗药物。

基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 可以柔和地电离寡核苷酸样品而不引起不需要的碎裂。通过使用一种特定的 MALDI 基质, 增加激光照射能量, 就有可能同时引起样品电离和产生碎片离子。源内裂解 (ISD)

产生的碎片离子可用于结构分析。核酸的 MALDI-ISD 碎裂可以提供通过简单的裂解提供连续的碎片离子, 因此对寡核苷酸药物的测序非常有用。

本文展示了应用台式双极性基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪 MALDI-8020 快速测定诺西那生钠仿制药核苷酸序列的案例。本方法基于 MALDI-TOF MS 源内裂解 (ISD) 的碎裂方式, 通过简单提高激光照射能量, 即可实现寡核苷酸的源内裂解, 并倾向生成 a 离子与 w 离子。与 CID (碰撞诱导解离) 相比, MALDI-ISD 产生的图谱更加简单, 更易于解析。

■ 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020



芯片靶板



MALDI-8020

图 1 芯片靶板及 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式
激光器：355 nm 固态激光器
扫描范围：m/z 500-10000
脉冲引出质量 (Da)：10000

激光能量：110-150
离子门限值：500

1.3 样品前处理

取反义寡核苷酸药物 ASO 样品加水稀释为 150 μM ，作为样品工作液。取 0.5 μL 样品工作液点样到已预先涂敷 3-HPA 基质的芯片靶板（图 1，购自北京毅新博创生物科技有限公司），自然干燥后将靶板送入质谱分析。

■ 结果与讨论

使用 MALDI-8020 在正离子模式下对 ASO 药物进行分析，以 3-HPA 为基质，激光能量 110 时，ASO 样品检测到带一个正电荷 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 及带两个正电荷 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 的化合物离子，质谱图信噪比良好，实测分子量与理论值一致（图 2）。

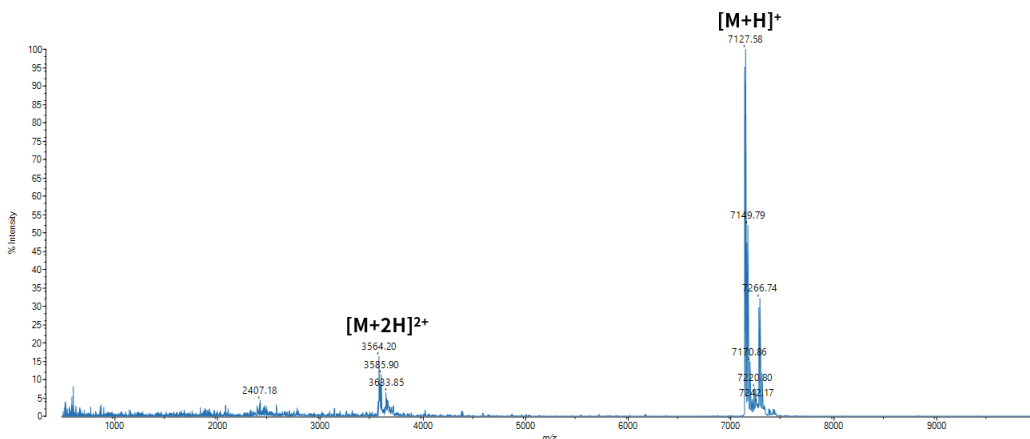


图 2 寡核苷酸 ASO 的一级质谱图（激光能量 110）

寡核苷酸经源内裂解后，倾向产生 a 离子与 w 离子，裂解模式见图 3。通过提高质谱采集的激光能量到 150，实现寡核苷酸药物的源内裂解（ISD），结果见图 4。质谱图上观测到规律性分布的 a 系列离子与 w 系列离子，除 5'-末端的 a1、a17 与 3'-末端的 w1 等与基质干扰信号重叠的离子外，检测到其他全部 a 离子与 w 离子，并与寡核苷酸的理论序列 5'- $\text{MeU}^{\text{Me}}\text{CA}^{\text{Me}}\text{C}^{\text{Me}}\text{U}^{\text{Me}}\text{U}^{\text{Me}}\text{U}^{\text{Me}}\text{CA}^{\text{Me}}\text{UAA}^{\text{Me}}\text{UG}^{\text{Me}}\text{C}^{\text{Me}}\text{UGG}-3'$ 正确匹配。以上结果表明，使用 MALDI-8020 的正离子模式，可轻松实现合成寡核苷酸的分子量确认，并可通过 ISD 碎片 a 离子与 w 离子的匹配快速确认核苷酸序列。

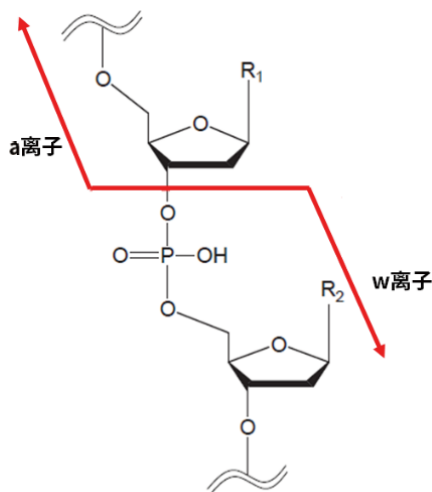


图 3 寡核苷酸 ISD 裂解模式

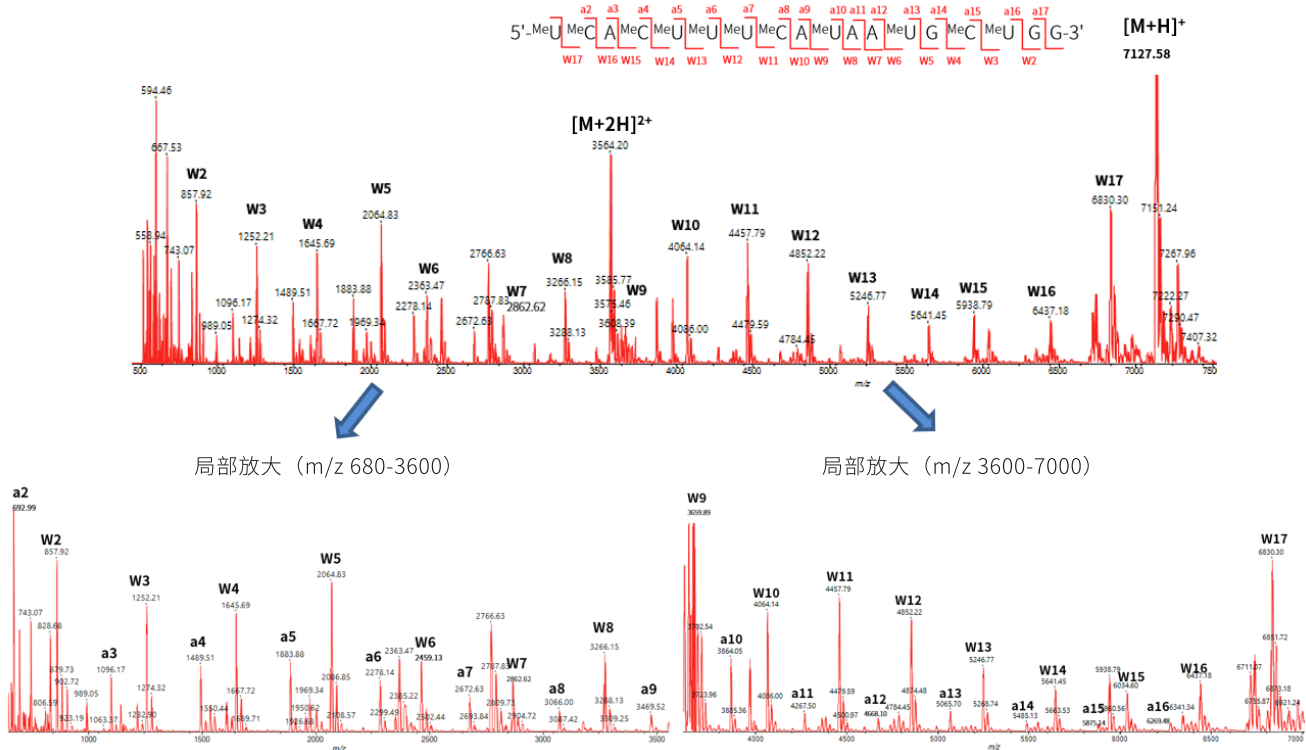


图4 寡核苷酸 ASO 的 ISD 质谱图 (激光能量 150) 及 a 离子、w 离子的归属
(注: ASO 序列中 Me 代表甲基化修饰)

■ 结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 在正离子模式下分析反义寡核苷酸 ASO 药物, 可轻松测定 ASO 的分子量。在源内裂解模式下, 通过质谱图中 a 离子、w 离子与核苷酸序列的匹配, 可以实现反义寡核苷酸 ASO 序列的快速确认。本方法前处理简单, 图谱简单易解析, 可作为合成寡核苷酸药物质量控制中序列分析的参考。

岛津应用云

