

使用 MALDI-8030 和 LCMS<sup>TM</sup>-9030 分析  
寡核苷酸

山崎 雄三、加藤 纪子

## 特点描述

- ◆ 可实现高可靠性的寡核苷酸表征。
- ◆ 可通过 ESI-QTOF 获得元素组成。
- ◆ 可通过 MALDI-ISD 获得序列信息。

## 简介

由于核酸药物是在生物反应作用机制的上游发挥作用，不良反应相对较少，而被视为治疗多种疾病的有希望的药物，因此利用质谱对核酸分析进行表征是目前备受关注的研究方向。尽管高分辨率及高精度的 ESI 质谱仪能够对核酸的质量进行准确测定，但使用 ESI 质谱仪进行常规寡核苷酸序列分析仍依然存在困难。使用经典的 ESI-MS/MS 技术很难获得完整的内部寡核苷酸序列。另一方面，据报道使用 MALDI-TOF MS 的 In Source decay (ISD) 是核酸序列分析的一种有用的方法，尽管该仪器的性能不像 ESI 质谱仪一样可以对核酸的质量进行准确测定。本文将介绍使用 LCMS - 9030 (ESI - QTOF) 和 MALDI - 8030 (配备双极性台式线性 MALDI - TOFMS) 进行核酸表征的案例。

## 测定条件和样品分析

## ● 合成核酸

两种具有不同糖组分结构的硫代寡核苷酸 (LNA-Oligo 和 S-Oligo)，购自 GeneDesign (日本)。寡核苷酸的序列如图 1 所示。所有的核酸都使用 Milli-Q 水配制，浓度为 10 pmol/mL。

## ● MALDI-TOFMS

以 3- 羟基吡咯烷酮 (3-HPA) 为基质，柠檬酸铵为添加剂进行 ISD 测定。将基质溶液和样品层叠在不锈钢 MALDI 靶板上。使用双极性台式线性 MALDI-TOF MS 的 MALDI-8030 进行负离子的 ISD 分析。

## ● ESI-QTOF

使用 LCMS - 9030 的负离子模式进行精确质量分析。以 50 mmol/L HFIP、10 mmol/L DIPEA 和乙腈为流动相，流速为 0.2 mL/min。QTOF 的 MS 范围设置为 m/z 500 至 3000。通过 LabSolutions Insight<sup>TM</sup> 的 ReSpect 对 ESI 质谱图进行解卷积。

## 结果

使用 LCMS-9030 在负离子模式下对图 1 所示的两种寡核苷酸进行了精确的质量分析。可以观察到从 [M-4H]<sup>4-</sup> 到 [M-6H]<sup>6-</sup> 分布的寡核苷酸的多电荷离子 (图 2 及图 3 的插图)。通过对 ESI 质谱图进行解卷积计算，得到这两个寡核苷酸的精确质量。由图 2 和图 3 可知：LNA-oligo 的分子量为 6711.6733，S-OligoL 的分子量为 6431.7241。如图 4 所示，由于 LNA- 和 S-oligo 的理论质量分别为 6711.6731 和 6431.7240，m/z 的观测值与理论值的偏差分别为 0.03 ppm 和 0.02 ppm，因此可确认这两种寡核苷酸的检测结果。

接下来，使用 MALDI-8030 对两个寡核苷酸进行了负离子模式 ISD 分析。MALDI-8030 从 MS 测量到 ISD 模式，只需要简单地增加激光能量，快速且容易。MALDI-ISD 裂解序列结果如图 5 和图 6 所示。图中标记为 a 及 w 的碎片离子，通过与理论平均质量匹配进行归属。在质谱图中几乎可以找到寡核苷酸序列产生的所有 w 离子。只有对应于从 3' 端开始的第一个或第二个单元的 w 离子由于与基质产生的信号重叠而不能被归属。在 S- 寡核苷酸的分析中，除了两个 5'- 端单元外，几乎检测到了一系列完整的 a 离子。而在 LNA- 寡核苷酸的分析中，检测到的 a 离子完全来自内部序列，说明在这种情况下，这些 a 离子信息可以补充 w 离子所提供的序列信息。

## 结论

使用 LCMS-9030 对寡核苷酸进行精确质量分析，得到的结果与理论质量一致性很高。使用 MALDI-8030 的 ISD 得到了寡核苷酸的内部序列信息。因此，可以认为 MALDI-ISD 和 ESI-QTOF 在寡核苷酸的表征中是有效的组合。

## 参考文献

1) Shimizu H, Jinno F, Morohashi A, Yamazaki Y, Yamada M, Kondo T, Asahi S. J Mass Spectrom. 2012 Aug;47(8):1015-22.



MALDI-8030

LCMS<sup>TM</sup>-9030

**LNA-Oligo** G(L)<sup>5</sup>(L)<sup>5</sup>(L)<sup>5</sup>(L)<sup>5</sup>T(L)<sup>5</sup>(L)<sup>5</sup>a<sup>5</sup>g<sup>5</sup>t<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>t<sup>5</sup>g<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>t<sup>5</sup>t<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>G(L)<sup>5</sup>(L)<sup>5</sup>A(L)<sup>5</sup>(L)<sup>5</sup>(L)<sup>5</sup>(L)<sup>5</sup>

**S-Oligo** g<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>t<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>a<sup>5</sup>g<sup>5</sup>t<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>t<sup>5</sup>g<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>t<sup>5</sup>t<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>g<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>a<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>(x)<sup>5</sup>

图例 N(L) : LNA\*(A, T, G) (微特性): DNA  
 5(L) : LNA\*(5-mC DNA) 5(x) : 5-甲基-dC  
 \*LNA: 锁核酸 ^ : 硫代磷酸酯化

图 1 寡核苷酸的序列

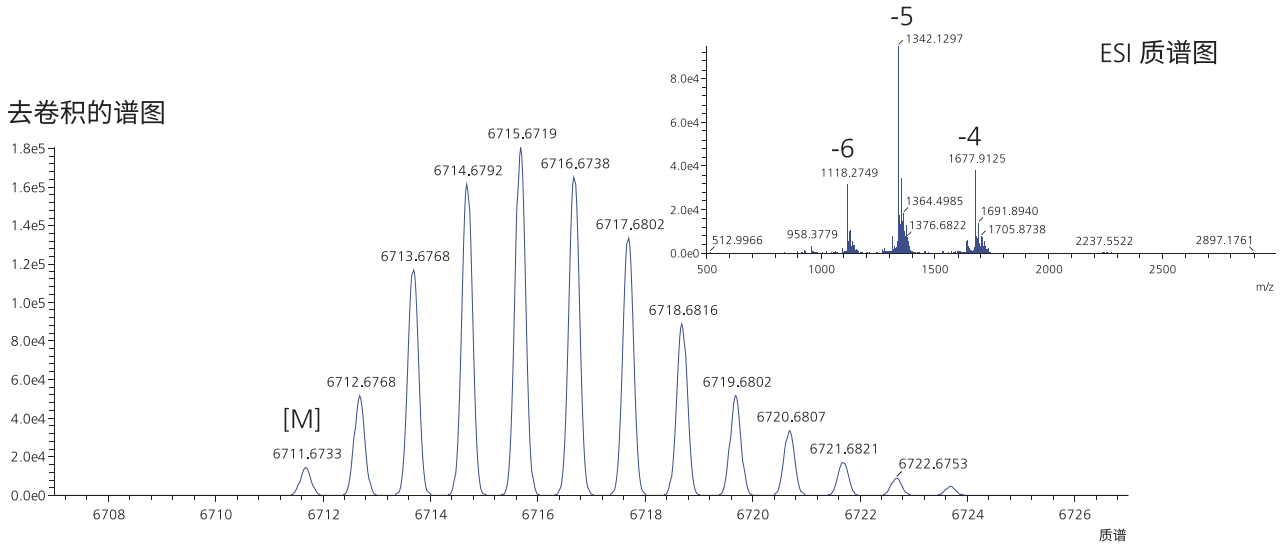


图 2 LNA-Oligo 的精确质量分析结果

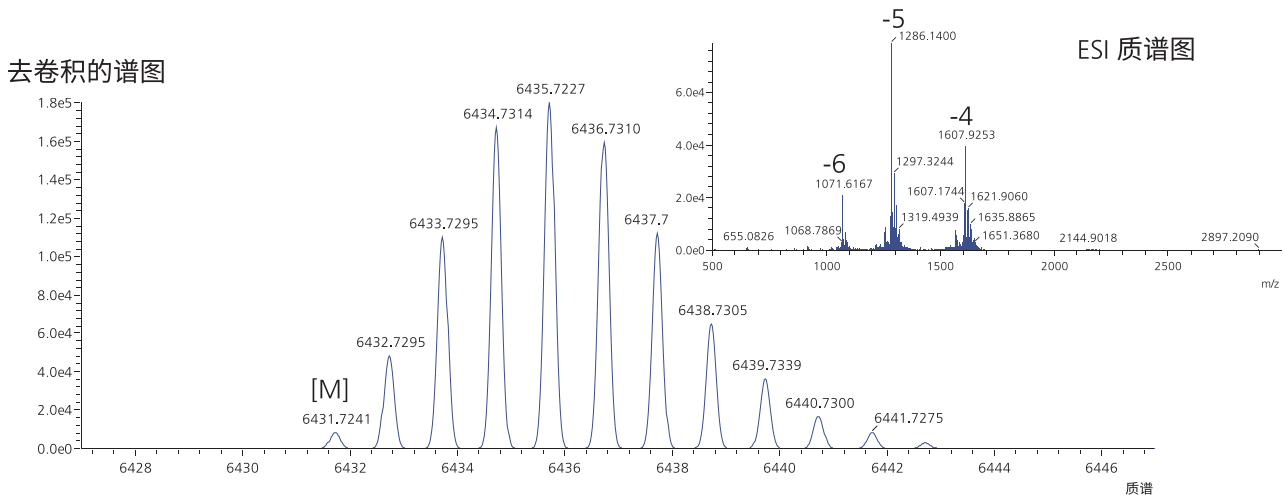


图 3 S-Oligo 的精确质量分析结果

LNA-Oligo	C <sub>210</sub> H <sub>264</sub> N <sub>67</sub> O <sub>112</sub> P <sub>19</sub> S <sub>19</sub>	S-Oligo	C <sub>200</sub> H <sub>264</sub> N <sub>67</sub> O <sub>102</sub> P <sub>19</sub> S <sub>19</sub>
calc.[M]	6711.6731	calc.[M]	6431.7240
Obs.[M]	6711.6733	Obs.[M]	6431.7241
diff./ppm	0.03	diff./ppm	0.02

图 4 寡核苷酸质量分析的准确度

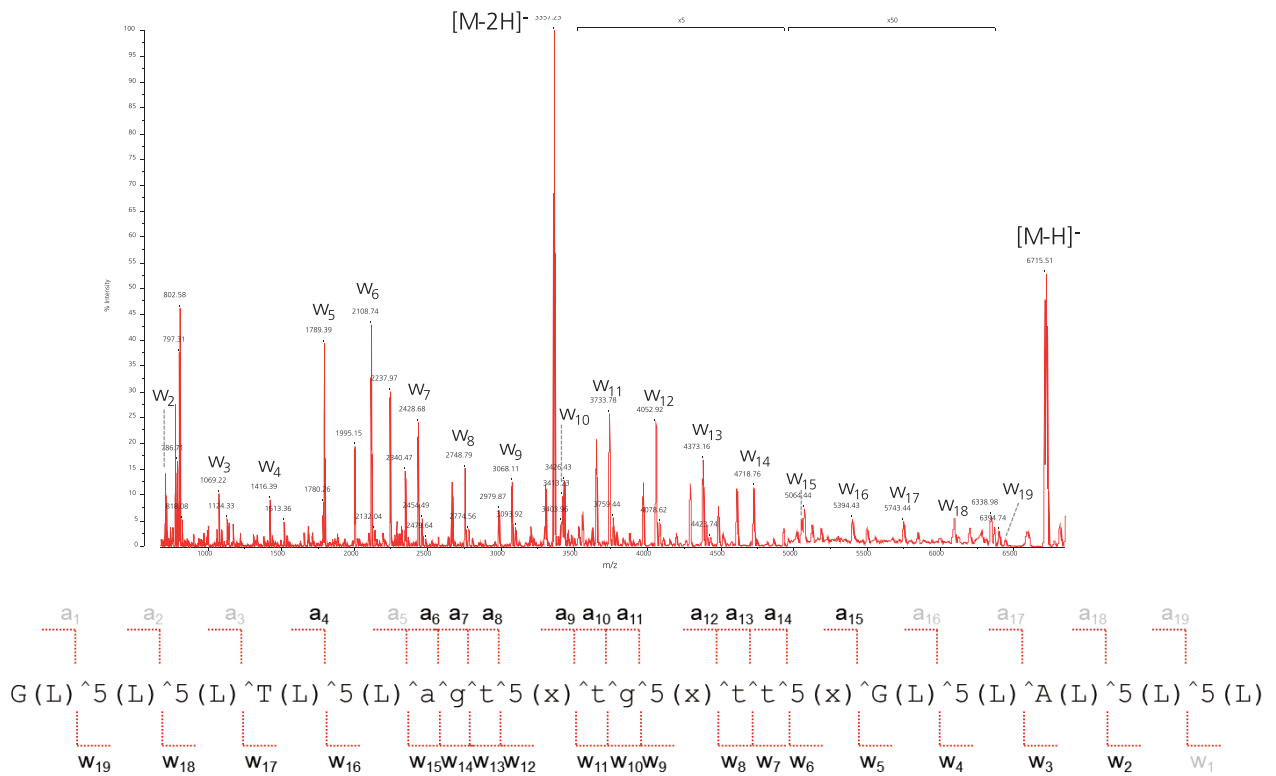


图 5 LNA-Oligo 的 ISD、及 a、w 离子的归属

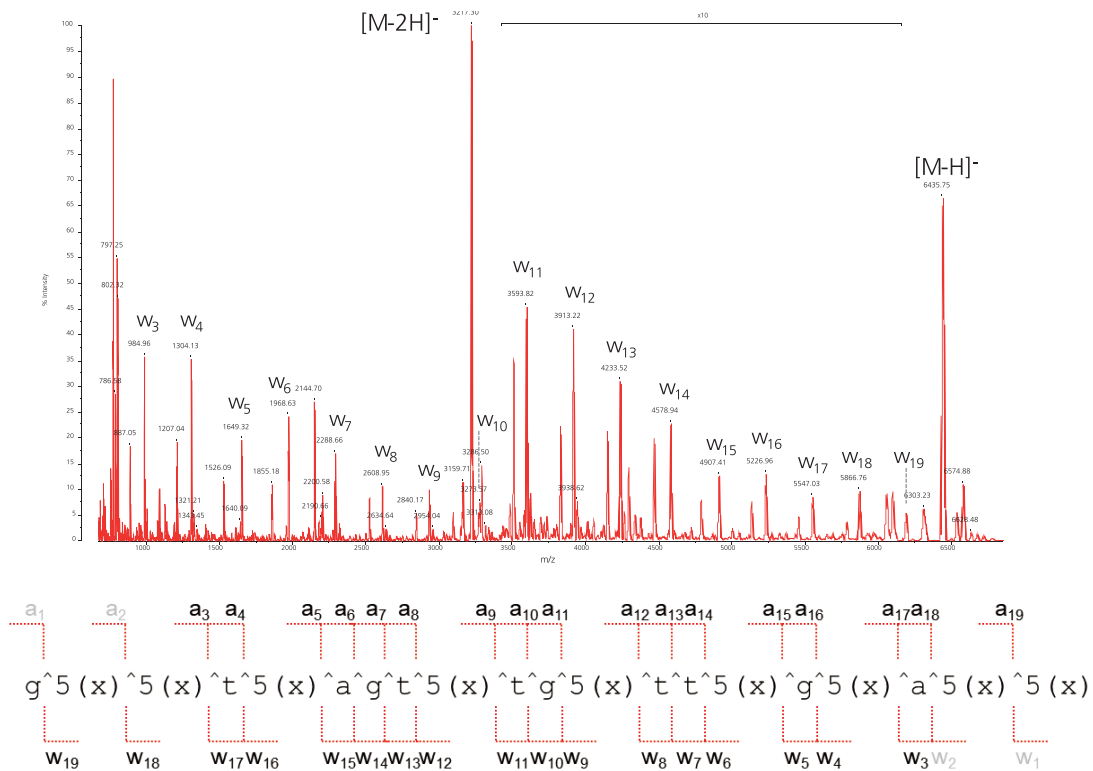


图 6 S-Oligo 的 ISD、及 a、w 离子的归属

岛津应用云



LCMS 及 LabSolutions Insight 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司  
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明：

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；  
\* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。  
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2022 年 2 月