

利用超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱进行寡核苷酸分子量测定和序列确认

LCMS-QTOF-047

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱进行寡核苷酸分子量测定和序列确认的方法。目标寡核苷酸是长度为 21mer、进行了 2'-O-methyl 修饰的 RNA 类型的寡核苷酸。使用 Insight Explore CSD 软件中 Respect 算法进行多电荷解卷积处理，寡核苷酸各同位素峰分离良好，单同位素质量误差 0.16 ppm。使用 Protein metrics 中 Oligo 模块进行了寡核苷酸序列确认，结果显示目标寡核苷酸序列与设计序列匹配良好。可为寡核苷酸分子量测定和序列确认提供参考。

关键词： Q-TOF LCMS-9030 寡核苷酸 分子量测定 序列确认

寡核苷酸药物通常指由化学合成生产的长度 50 个以内核苷酸组成的一类药物，包含单链或双链 DNA 或 RNA。目前研究较多的是反义寡核苷酸药物 (ASO) 和小干扰 RNA 药物 (siRNA)。与小分子药物和单抗药物靶向蛋白质不同，寡核苷酸药物通常靶向 mRNA，从转录后水平进行治疗，具有特异性好、有效性高和长效性突出的优势。

寡核苷酸药物通过固相化学合成生产，其碱基序列通常是已知的，但在合成、纯化等工艺过程中，其结构有可能发生改变，故对寡核苷酸进行分子量

测定和碱基序列确认，是保证寡核苷酸碱基序列与设计序列一致的重要技术手段。寡核苷酸药物为酸性强极性化合物，通过离子对反相色谱质谱法进行分子量表征是经典的分析方法。

本文采用超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱，利用高精度一级质量数和二级碎裂离子信息，结合数据处理软件，对长度为 21mer 的 RNA 型的寡核苷酸进行了分子量测定和序列确认，供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9030 超高效液相色谱—四极杆飞行时间质谱，具体配置为：

系统控制器：CBM-40

脱气机：DGU-20A₅

输液泵：LC-40AD X3×2

自动进样器：SIL-40C X3

柱温箱：CTO-40C

飞行时间质谱仪：LCMS-9030

色谱工作站：LabSolutions Ver.5.114、LabSolutions Insight Explore CSD

Protein metrics 软件 Oligo 模块

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：XBridge Oligonucleotide C18 50 mm x 2.1 mm I.D., 2.5 μm；

流动相：A-15 mM TEA+400 mM HFIP；

流速：0.2 mL/min

B- 甲醇和流动相 A 等体积混合

进样体积：1 μL

柱温：60°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
10.00	Pumps	Pump B Conc.	40
11.00	Pumps	Pump B Conc.	40
12.00	Pumps	Pump B Conc.	100
13.00	Pumps	Pump B Conc.	100
13.10	Pumps	Pump B Conc.	20
15.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI-

加热模块温: 400°C

接口温度: 350°C

DL 温度: 250°C

扫描范围 m/z: MS1 500-2000

MS2 100-2000

雾化气流速: 3 L/min

加热气流速: 10 L/min

干燥气流速: 10 L/min

扫描模式: MS、MS/MS

碰撞能量: 10~80 V

1.3 样品处理

将寡核苷酸样品用超纯水溶解并稀释成 100 pmol/ μ L 的样品溶液, 直接进样分析。

21mer 寡核苷酸序列信息如下:

5'-rGmUrArAmCmCrArArGrArGmUrAmUmUmCmCrAmUTT-3'

注: “r” 表示 RNA; “m” 表示 2'-O-methyl 修饰。

单同位素质量: 6761.07876

■ 结果与讨论

2.1 寡核苷酸精确分子量测定

使用 LCMS-9030 分析寡核苷酸样品, TIC 图和一级质谱图分别见图 1 和图 2。TIC 图中可观察到明显的寡核苷酸目标峰。一级质谱图中可观察到从 $[M-4H]^{4-}$ 到 $[M-10H]^{10-}$ 之间分布的寡核苷酸多电荷离子。使用 LabSolutions Insight Explore CSD 的 “ReSpect” 算法进行多电荷解卷积处理, 得到去卷积后的谱图, 如图 3 所示。由图可知, 寡核苷酸各同位素峰基本实现基线分离, 实测单同位素质量为 6761.07764, 与理论同位素质量 6761.07876 相比, 质量误差为 0.16 ppm, 质量准确度好。

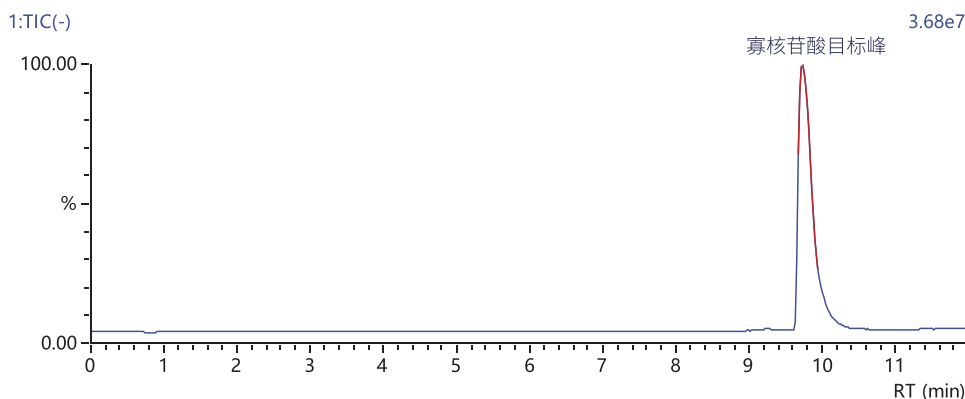


图 1 寡核苷酸样品 TIC 图

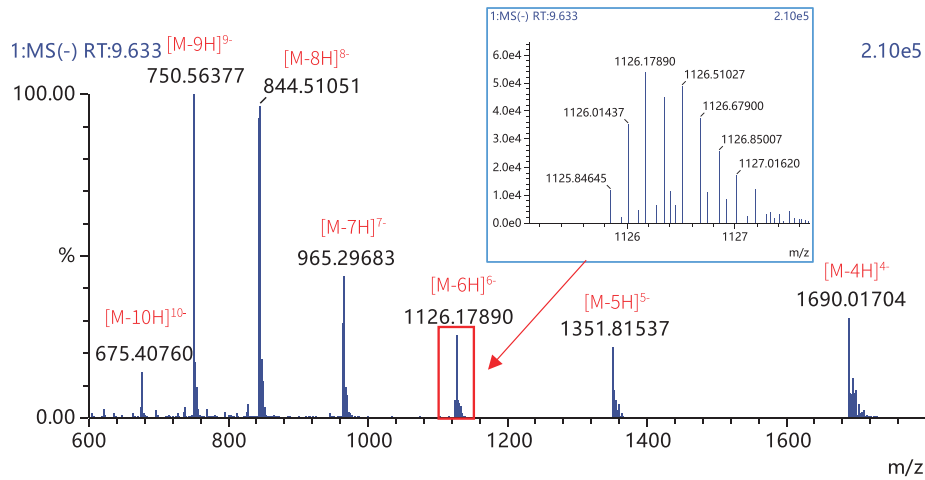


图 2 寡核苷酸一级质谱图

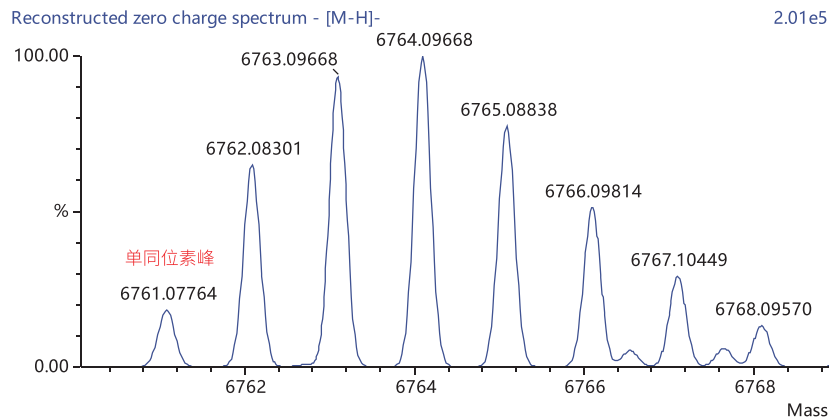


图 3 寡核苷酸去卷积谱图

2.2.4 寡核苷酸序列确认

使用 Protein metrics 软件中的 Oligo 模块，将 LCMS-9030 采集的原始数据载入，输入寡核苷酸的设计序列，即可自动进行寡核苷酸序列确认，结果见图 4。该图是 ESI 二级质谱图，可以看到丰富的寡核苷酸碎片离子，图中已标记出匹配上的寡核苷酸碎片离子类型。图中右上角是寡核苷酸设计序列，折线符号表示该位置实测碎片离子和理论碎片离子一致。由此可知，该寡核苷酸序列与设计序列匹配度良好。

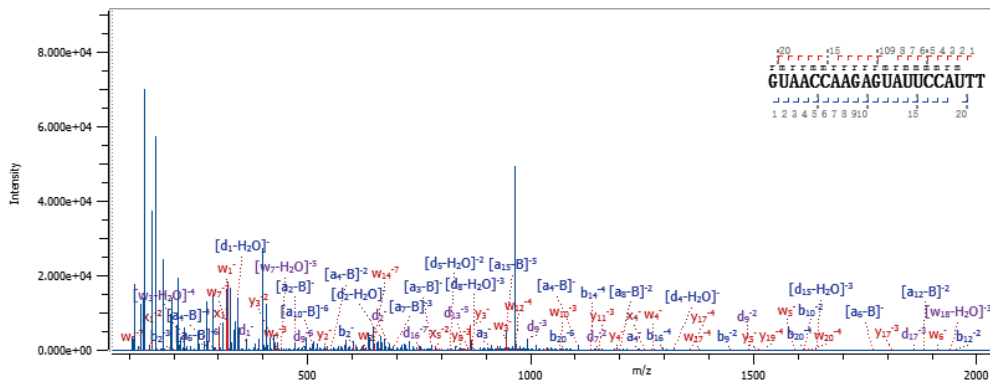


图 4 寡核苷酸序列确认结果

■ 结论

使用岛津超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱结合 Insight Explore CSD 和 Protein metrics 数据处理软件，建立了寡核苷酸分子量测定和序列确认的方法。岛津 Q-TOF 具有高分辨、高质量数准确性和高灵敏度的特点，可以测得寡核苷酸及其碎片离子的精确质量。通过 Insight Explore CSD 中 Respect 算法可以进行高效的多电荷解卷积处理，去卷积后寡核苷酸同位素峰基本达到基线分离，轻松得到精确单同位素质量，与理论值质量误差为 0.16 ppm，质量准确度好。通过 Protein metrics 中 Oligo 模块可自动、批量、快速地进行寡核苷酸序列确认，结果直观准确。本方法操作简便、准确度高，适用于寡核苷酸药物分子量表征和序列确认。

岛津应用云

