

使用 Agilent LC/MSD XT 和 OpenLab CDS 对寡核苷酸进行分子确认



作者

Lee Bertram 和 Brian Rivera
安捷伦科技有限公司

摘要

质谱 (MS) 是合成寡核苷酸开发过程中用于质量控制的重要工具。本应用简报介绍了合成寡核苷酸的分子量 (MW) 确认和简单的表征工作流程，该工作流程使用 Agilent LC/MSD XT 单四极杆 LC/MS 以及 Agilent OpenLab CDS 2.8 中的质谱图解卷积功能。

前言

寡核苷酸是使用亚磷酸胺化学法（一种根据目标互补序列结合核苷酸的分步合成方法）生产的短核酸序列。根据应用的不同，合成寡核苷酸会经过大量修饰。这些修饰可以发生在核碱基、核糖或脱氧核糖上，如果考虑到硫代磷酸酯的硫化作用，甚至可以发生在磷酸骨架上。因此，有必要确认全长产物的分子量，尤其是在先导物开发等中高通量应用中。

寡核苷酸的分子量测定通常采用高分辨精确质量，在需要表征和鉴定杂质的情况下尤其如此。然而，单位质量检测器（例如单四极杆质谱仪）可快速提供结果，并具有足够高的准确度以用于确认预期序列。

本应用简报对寡核苷酸标准品（包括 poly dT 分子量标准品和反义寡核苷酸 (ASO)）进行了分析，以展示使用 LC/MS 的分子确认工作流程。此外，还展示了使用 LC/MSD XT 单四极杆 LC/MS 和谱图解卷积功能进行基本表征的能力。

实验部分

试剂与标准品

安捷伦 DNA 分子量标准品（部件号 5190-9029）。完全硫醇化的合成寡核苷酸购自 Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA)。

样品前处理

寡核苷酸分子量标准品在使用前用 1 mL 去离子水 (DI) 溶解。最终浓度为 4 nmol/μL。

方法

液相色谱

表 1. Agilent 1290 Infinity II 液相色谱方法

Agilent 1290 Infinity II		
参数	值	
色谱柱	Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm (部件号 659750-702)	
进样器温度	4 °C	
流动相 A	100 mmol/L HFIP 和 15 mmol/L TEA 水溶液	
流动相 B	甲醇	
流速	0.5 mL/min	
进样量	2 μL	
柱温	65 °C	
梯度程序	时间 (min)	%B
	0.0	15
	10.0	30
	11	95

质谱

表 2. Agilent LC/MSD XT 方法

安捷伦 LC/MSD XT (G6135C)	
参数	值
离子源	AJS
极性	负
干燥气温度	275 °C
干燥气流速	12 L/min
雾化器压力	35 psi
正离子化的毛细管电压	4500 V
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	12 L/min
喷嘴电压	2000 V
扫描范围	m/z 1000 至 3000
扫描时间	1500 ms
碎裂电压	175 V

所有合成寡核苷酸样品也用 1 mL 去离子水溶解。然后将样品稀释至 50 μg/mL。

仪器

利用配备安捷伦电喷雾电离 (ESI) 离子源 (G1948B) 的 LC/MSD XT (G6135C) 分析寡核苷酸样品。本分析可使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱 或经钝化处理的 Agilent 1290 Infinity II LC。分析所用的液相色谱方法参数见表 1，质谱参数见表 2。

软件

利用具有 MS 谱图解卷积功能的 OpenLab CDS 2.8 操作 LC/MS 仪器并进行寡核苷酸分析。对 OpenLab CDS 中用于谱图解卷积的算法进行了优化，以简化由单位质量仪器获得的多电荷分子的谱图。如果质谱图质量较高，则仅需对参数进行细微调整。表 3 汇总了针对目标分析物选择的设置。请注意，高级设置（包括 MW 算法、MW 算法阈值和分布包迹阈值）针对 15 mer 至 40 mer 之间的寡核苷酸进行了优化。

结果与讨论

在电喷雾电离过程中，寡核苷酸通常处于高电荷态，这可能使 LC/MS 分析和分子量确认工作流程变得复杂。例如，21 mer（图 1）可能表现出宽电荷分布，其中最主要的是 8 或 9 电荷态。所得质谱图也可能呈非高斯分布，且分布较宽，可能与较低 m/z 值处的干扰物质重叠。此外，流动相、寡核苷酸长度和序列可能影响电荷态分布，因此在采用 LC/MS 方法进行常规检测之前，根据经验确定分子行为至关重要^[1,2]。

因此，应采用合适的标准品（例如安捷伦 DNA 分子量标准品）对采集方法进行优化。由于测试混标含有不同长度（15、20、25、30 和 35 mer）的寡核苷酸，因此采用该标准品评估方法性能可确保 LC/MS 方法适用于不同类型的寡核苷酸。

软件

表 3. 用于 DNA 分子量标准品的 Agilent OpenLab CDS 谱图解卷积处理方法

参数	值
谱图提取类型	峰顶点谱图
背景模式	峰起点和终点处的谱图
使用 m/z 范围	已禁用
低分子量	4000
高分子量	13000
最大电荷	40
数据集中的最小峰	4
MW 一致性 (0.01%)	5
绝对噪音阈值	1000
相对丰度阈值 (%)	15
MW 算法	曲线拟合
MW 算法阈值	40
分布包迹阈值	10

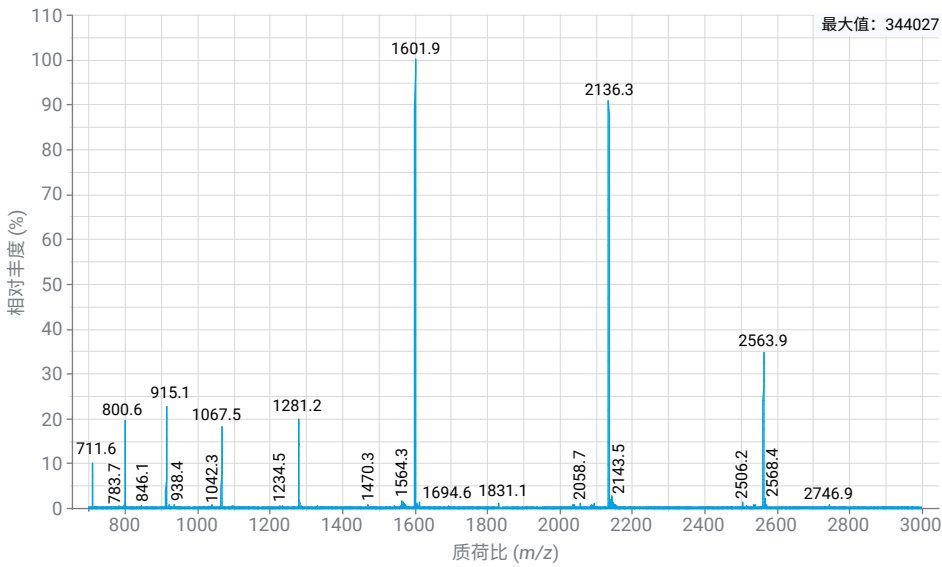


图 1. 21 mer DNA 寡核苷酸的质谱图

尽管高度依赖于离子源和流动相，但一般而言，较长的寡核苷酸具有更高的电荷态和更宽的分布。图 2 显示了 poly dT 分子量标准品以及针对各寡核苷酸观察到的电荷态分布差异的示例。15 mer poly dT 寡核苷酸主要有一个电荷态 ($z = 3$ ，在 m/z 1499.3 处)，而 40 mer 在 m/z 750 至 2500 范围内具有明显更多的电荷态，范围为 5 至 13。LC/MSD XT 检测大分子物质的质量范围上限为 m/z 3000，是各种寡核苷酸的理想选择。

另外，还应优化数据分析处理方法，以适应具有不同长度和序列的寡核苷酸的不同电荷分布包迹。表 4 所示的解卷积结果展示了如何将相同的数据分析参数用于不同长度的寡核苷酸。对数据集中的最小峰和分布包迹阈值 (%) 进行了优化，以分别适应电荷态和分布的变化。寡核苷酸的解卷积质量误差在 ± 1 道尔顿范围内，符合对不同分子量的寡核苷酸进行单位质量检测的预期结果。

尽管在分析多种类型的样品时，用于 DNA 分子量标准品的设置可能是适用的，但仍有必要对处理方法进行优化。这在偏离常规检测时非常有用，例如在观察到意外色谱峰或质谱图异常时，进行临时初步表征。

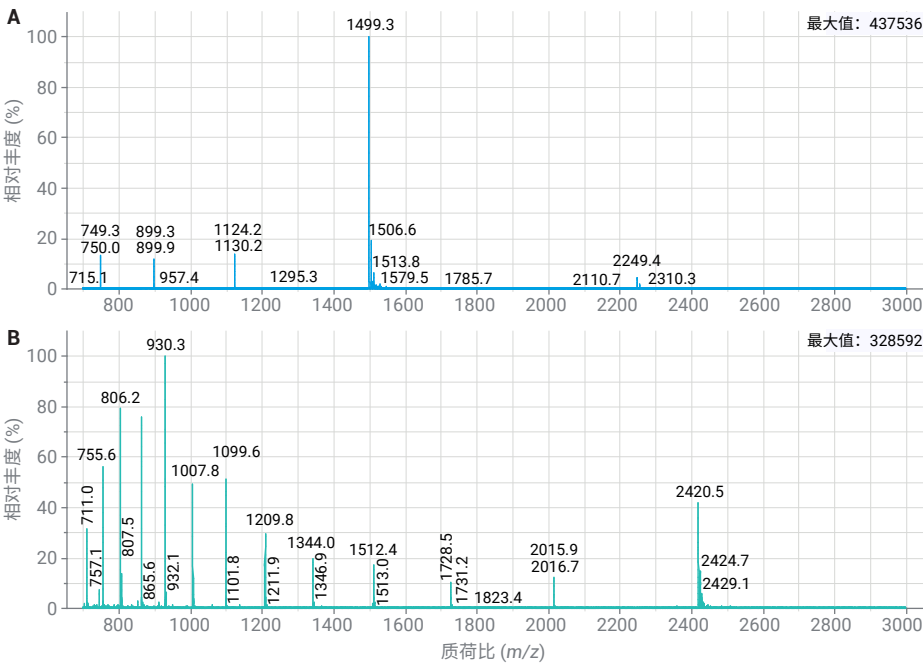


图 2. 15 mer DNA 寡核苷酸 (A) 和 40 mer DNA 寡核苷酸 (B) 质谱图比较。较长的寡核苷酸通常具有更高的电荷态以及更宽的电荷态分布。这与离子源和流动相/注入溶剂均有关

表 4. DNA 分子量标准品解卷积结果，标准设置

样品名称	谱图 RT (min)	质量计算值	质量实验值 (Da)	Δ 质量 (Da)	质量准确度 (ppm)
15 mer	2.38	4501.0	4501.0	0.0	9
20 mer	3.594	6022.0	6022.0	0.1	11
25 mer	4.387	7543.0	7543.6	0.6	84
30 mer	4.924	9063.9	9064.5	0.5	59
35 mer	5.274	10584.9	10585.5	0.5	51
40 mer	5.554	12105.9	12106.8	0.9	76

对于 18 mer 和 20 mer ASOs 的解卷积，将目标质量范围缩小至 6000 至 8000 MW；其他所有参数均与表 3 所示相同。这样可以准确鉴定全长产物以及短链和长链杂质。解卷积质量列于表 5 中；计算值与实测值之间的 Δ 质量在单位质量仪器的预期性能范围内。

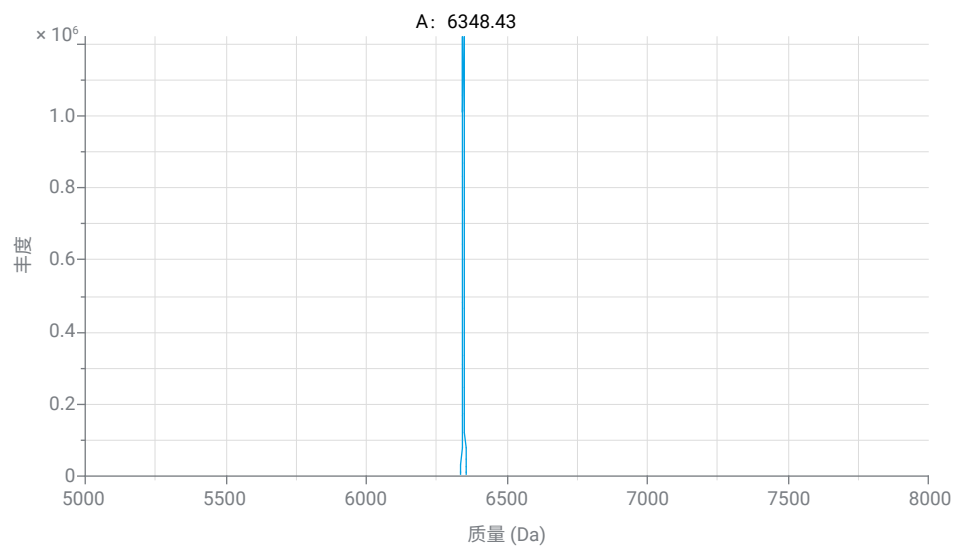


图 3. 使用优化的解卷积参数所得到的 18 mer ASO 的解卷积质谱图

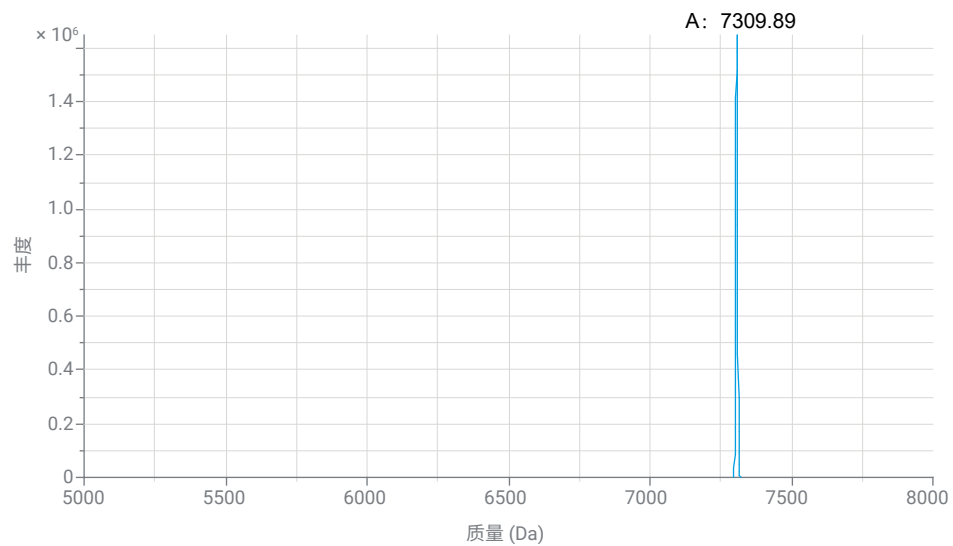


图 4. 20 mer ASO 的解卷积质谱图

表 5. 18 mer 和 20 mer 反义寡核苷酸的解卷积结果

样品	序列	谱图 RT (min)	质量 计算值	质量实验值 (Da)	Δ 质量 (Da)	质量准确度 (ppm)
18 mer	5'- U*/i2MOErC/*i2MOErA/* /i2MOErC/*U*U* U*/i2MOErC/*i2MOErA/* U*/i2MOErA/*i2MOErA/* U*/i2MOErG/*C* U*/i2MOErG/*G -3'	5.764	6348.2	6348.4	0.2	36
20 mer	5'- U*/i2MOErC/*U* U*/i2MOErG/*T* T*/i2MOErA/*i2MOErC/* /i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErG/* /i2MOErA/*i2MOErA/*i2MOErA/* U*/i2MOErC/*i2MOErC/* /i2MOErC/*C -3'	7.280	7309.2	7309.9	0.7	94
20 mer, n-1	NA	7.012	NA	6913.49	0.7	NA

当数据分析处理方法经过优化，具有足够高的分离度和信号强度时，仍可检出低含量杂质。图 5 显示了 18 mer ASO 的总离子流色谱图 (TIC)，其中推断的低分子量杂质获得基线分离。进行质谱图提取和解卷积，结果 (6913.49) 充分表明其确实为 n-1 杂质，且按解卷积质谱图的绝对丰度计占主峰的 0.12%。

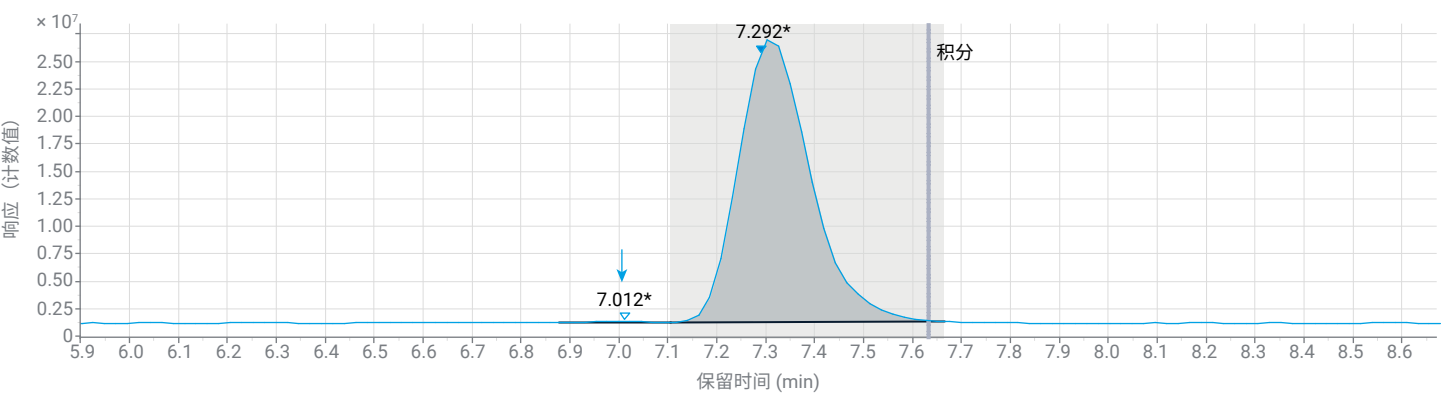


图 5. 20 mer 寡核苷酸的总离子流色谱图 (TIC)。对较早洗脱的杂质进行手动积分，并提取谱图进行解卷积

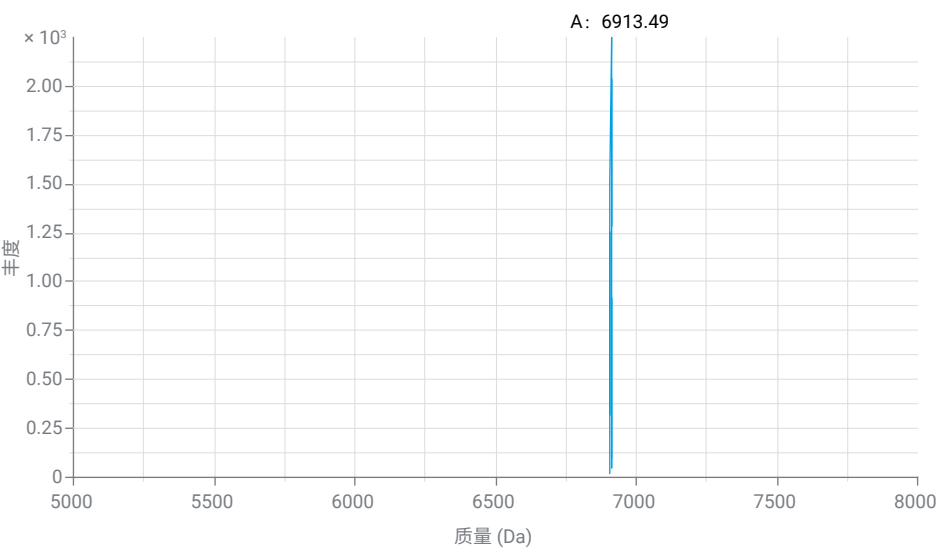


图 6. 较早洗脱的杂质的解卷积谱图。6913.49 Da 的解卷积质量充分表明其为 n-1；需要使用精确质量检测进行进一步的确认和表征。

结论

Agilent 1290 Infinity II LC/MSD XT 与具有 MS 谱图解卷积功能的 OpenLab CDS 2.8 的组合是寡核苷酸快速分子量确认和纯度评估的实用工具。这一分析工具组合提供了界面友好的软件和可靠的硬件，实现了以分析速度为先的寡核苷酸分析工作流程。DNA 分子量标准品的分析结果证明，OpenLab CDS 中的谱图解卷积功能可用于对不同长度的寡核苷酸进行常规分子量确认。

参考文献

1. Chen, B.; Mason, S. F.; Bartlett, M. G. The Effect of Organic Modifiers on Electrospray Ionization Charge-State Distribution and Desorption Efficiency for Oligonucleotides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2013**, 24(2), 257–264. <https://doi.org/10.1007/s13361-012-0509-5>
2. Basiri, B.; Murph, M. M.; Bartlett, M. G. Assessing the Interplay Between the Physicochemical Parameters of Ion-pairing Reagents and the Analyte Sequence on the Electrospray Desorption Process for Oligonucleotides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2017**, 28(8), 1647–1656. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1671-6>

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE91792165

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2024
2024 年 2 月 28 日，中国出版
5994-7083ZHCN