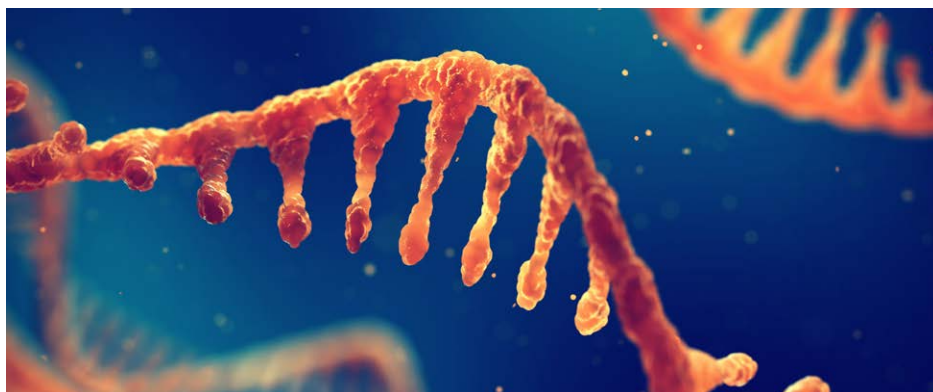


合成寡核苷酸的高通量质谱分析

快速 LC 和 RapidFire 方法的数据比较

作者

Peter Rye 博士和
Yanan Yang 博士
安捷伦科技有限公司



前言

液相色谱 (LC) 和质谱 (MS) 在合成寡核苷酸 (oligo) 的表征中起着至关重要的作用，并且随着寡核苷酸生产和使用的加速，对高通量分析方法的需求在过去几年中也不断增加。传统的寡核苷酸 LC/MS 分析需要进行分离，使运行时间长达数分钟。但是，并非所有应用都需要色谱分离，在进行 MS 测量之前进行脱盐就已足够。本研究介绍并比较了用于寡核苷酸高通量进样和脱盐的两种方法：快速 LC 和 RapidFire 方法。每种方法均针对 18 mer 的寡核苷酸进行了速度优化，然后使用长度为 18-100 mer 的多种合成 DNA 和 RNA 进行性能表征。

实验部分

对于快速 LC 方法，在 Agilent 1290 Infinity II Multisampler 上配备了双进样针，可通过智能重叠在样品间切换，在使用一根进样针进行分析的同时可使用另一根进样针吸取样品（图 1）。在直接连接到 MS 分析雾化器的保护柱上以高流速实现快速梯度，从而进一步优化运行时间。快速 LC 方法需要高流速使寡核苷酸快速脱盐。因此，将快速 LC 采集速率设置为 10 谱图/秒，以确保在所有色谱峰上至少存在 15 个点（峰宽约 2 s，而 RapidFire 方法约为 5 s）。在 RapidFire 方法（图 2）中，系统对每个样品进行 6 s 脱盐（泵 1，状态 2），然后进行 6 s 洗脱（泵 3，状态 4）。使用 MassHunter BioConfirm B07 分析所有结果数据。

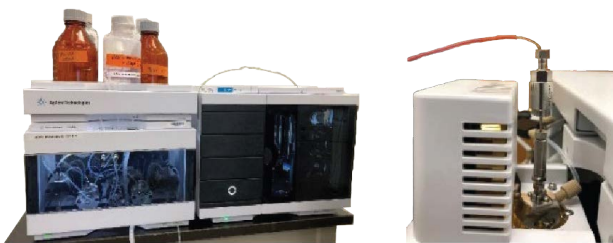


图 1. 使用配备双进样针的 Agilent 1290 Infinity II Multisampler 的快速 LC 方法



图 2. Agilent RapidFire 400 高通量全自动质谱样品前处理系统

快速 LC 条件

Agilent 1290 Infinity II 二元泵，配备双针头的 Multisampler			
色谱柱	Agilent AdvanceBio 寡核苷酸分析 UHPLC 保护柱, 2.1 × 5 mm, 1.7 μm (货号 821725-921)		
柱温	室温		
进样量	10 μL		
智能重叠	启用，交替针		
自动进样器温度	5 °C		
进样针清洗	甲醇/水 50/50		
流动相	A) 水 + 15 mmol/L TEA + 400 mmol/L HFIP B) 甲醇		
流速	1.75 mL/min		
梯度	时间 (min)	时间 (s)	%B
	0.00	0.00	20
	0.03	1.80	20
	0.24	14.4	50
	0.25	15.0	100
	0.30	18.0	100
	0.31	18.6	20
	0.59	35.0	20
停止时间	0.60 min		
后运行时间	0.00 min		

Agilent 6545 LC/Q-TOF	
离子极性	双 AJS 负离子模式
数据存储	两种（棒状图和轮廓图）
气体温度	350 °C
干燥气流速	13 L/min
雾化器气体	60 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	2000 V
碎裂电压	200 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
质量范围	400–3200 m/z
采集速率	10 质谱图/秒

RapidFire 条件

Agilent RapidFire 400		
小柱	Agilent PLRP-S, 30 μm , 1000 \AA , 柱床体积 4 μL	
小柱温度	室温	
进样量	10 μL	
泵 1	水 + 7.5 mmol/L TEA + 200 mmol/L HFIP, 1.2 mL/min	
泵 2	50% 甲醇 + 7.5 mmol/L TEA + 200 mmol/L HFIP, 0.6 mL/min	
泵 3	50% 甲醇 + 7.5 mmol/L TEA + 200 mmol/L HFIP, 0.6 mL/min	
状态 1	吸取样品 (打开传感器)	600 ms
状态 2	上样/清洗 (脱盐)	6000 ms
状态 3	额外清洗	0 ms
状态 4	洗脱 (进样)	6000 ms
状态 5	再平衡	500 ms

Agilent 6545 LC/Q-TOF	
离子极性	双 AJS 负离子模式
数据存储	两种 (棒状图和轮廓图)
气体温度	275 $^{\circ}\text{C}$
干燥气流速	11 L/min
雾化器气体	35 psi
鞘气温度	325 $^{\circ}\text{C}$
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	2000 V
碎裂电压	200 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
质量范围	400–3200 m/z
采集速率	4 质谱图/秒

结果与讨论

通量与重现性 — RapidFire

RapidFire 方法的通量取决于 5 个状态的总时间 (约 13 s, 请参见实验部分) 加上微孔板平台运动时间约 1.5 s, 每个样品用时略少于 15 s。在 RapidFire MS 分析中, 为了避免与 MS 采集开始/停止相关的延迟, 每组样品采集一个数据文件, 并在采集后进行解析。图 3 通过一组 24 次重复进样的连续文件显示了所有 3 个 RapidFire 泵每个泵压力峰值和谷值都稳定于 0.5–10 MPa 之间, 与稳定方法一致。

通量与重现性 — 快速 LC

快速 LC 方法的通量取决于梯度程序 (约 35 s, 在下次样品吸取时间内进行了优化) 和 MS 采集停止/开始的用时 (约

5 s), 每个样品用时 40 s。图 4 显示了 24 次进样的泵压力叠加曲线。这些曲线相互重叠, 显示出良好的梯度重现性。

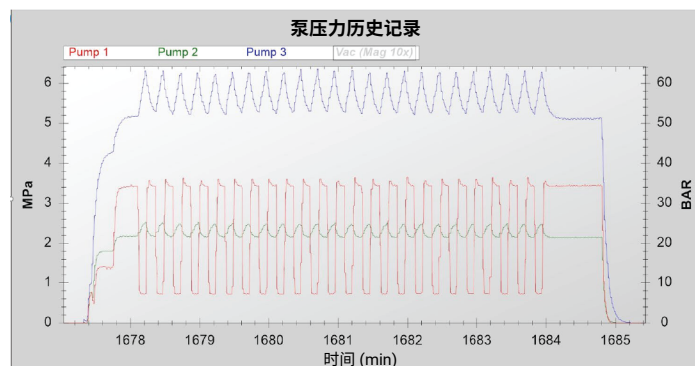


图 3. 24 次重复进样中三个 RapidFire 泵的叠加图

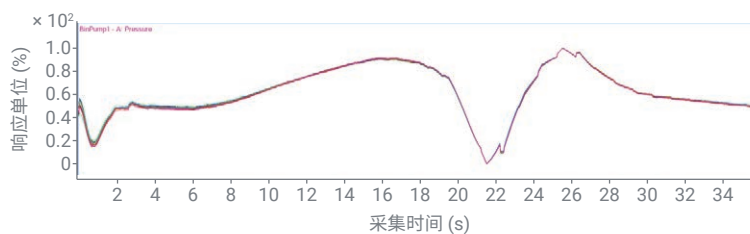


图 4. 24 次进样的泵压力曲线显示出良好的重现性

脱盐和信号强度

图 5 显示了使用 RapidFire 方法（黑色）和快速 LC 方法（红色）采集的未纯化的 18、40、60、80 和 100 mer 寡核苷酸的解卷积谱图。图 5A 代表根据每个谱图中的最高峰按比例进行调整后的数据，表明 RapidFire 方法在减少盐加合物上效率高于快速 LC 方法，其中加合物显示为 +22 (Na) 和 +38 (K) Da 的峰。每个谱图中，

加合物相对于目标峰的相对百分比以蓝色表示。RapidFire 方法极高的脱盐效率得益于 4 μ L 柱床体积小柱上进行的 6 s 状态 2（参见实验部分），其可实现 15 个柱体积的冲洗。图 5B 与上方的图显示相同的数据，但每个寡核苷酸长度之间的 Y 轴比例同步。对绝对峰高的比较表明，快速 LC 方法提供的目标质谱信号丰度较低，在每种寡核苷酸长度中均以绿色

表示。尽管快速 LC 方法可实现分离（见图 7），能够降低离子抑制，从而增强信号，但更高的泵流速（1.75 mL/min，而 RapidFire 方法中为 0.6 mL/min）、更快的采集速率（10 张谱图/秒，而 RapidFire 方法中为 4 张谱图/秒）和更低的脱盐效率导致快速 LC 的信号更低。

根据每个谱图中的最高峰按比例进行调整。相对于目标峰的盐加合物百分比显示为蓝色。

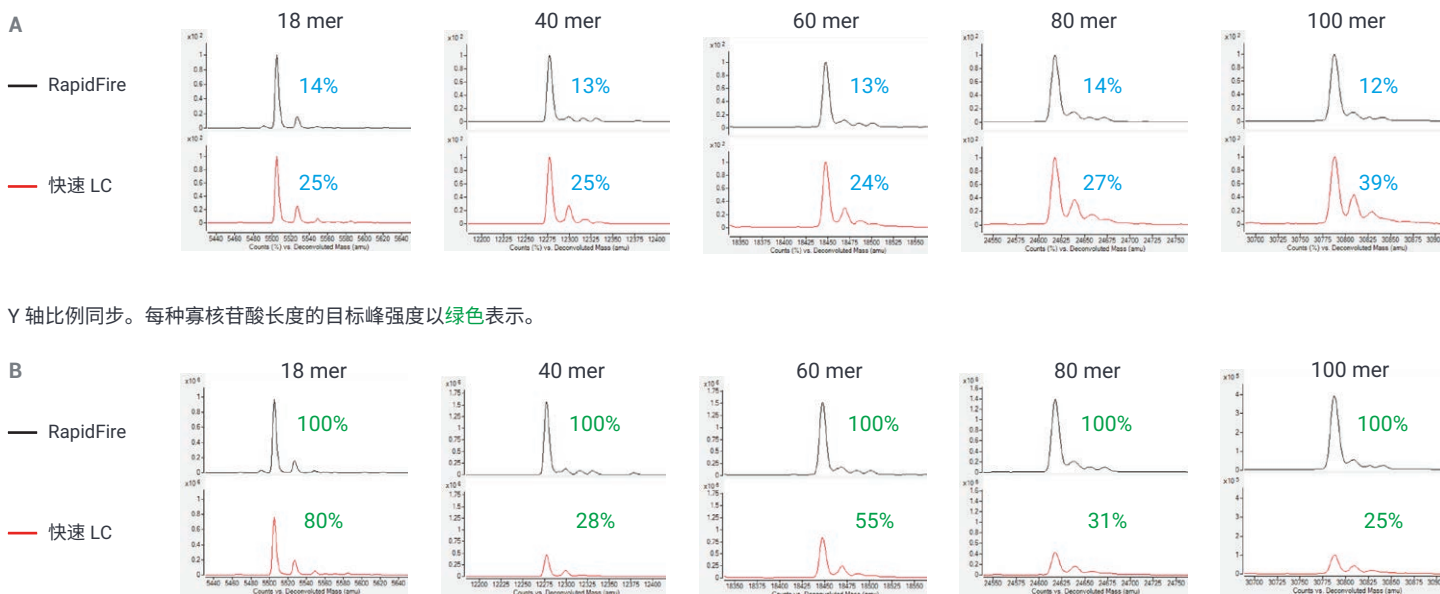


图 5. 使用 RapidFire 和快速 LC 方法采集的未纯化寡核苷酸的解卷积谱图

寡核苷酸保留 — RapidFire

为了评估两种方法的寡核苷酸分离，测定了 19 种不同的 DNA 和 RNA 样品，长度为 18–100 mer。在 RapidFire 方法中，所有寡核苷酸均以相同的保留时间从小柱上洗脱。此结果符合预期，因为 RapidFire 方法专为避免分离而设计，其通过阀门实现从低有机条件至高有机条件的快速切换，并使用树脂体积小 (4 μ L) 的小柱，以相反方向洗脱，从而尽可能减少分析物与小柱之间的相互作用。图 6 显示了所有 19 个样品的叠加总离子流色谱图 (TIC)。

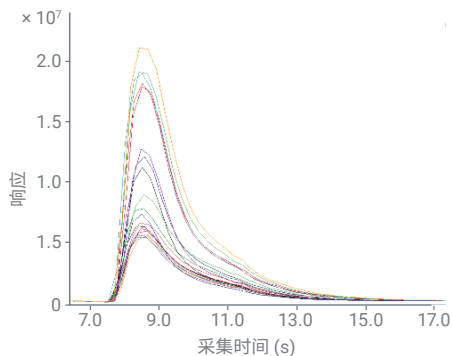


图 6. 19 个样品的 TIC。在 RapidFire 方法中，所有寡核苷酸都具有相同的保留时间

寡核苷酸保留 — 快速 LC

与 RapidFire 方法不同，使用快速 LC 方法时，可观察到不同的保留时间。图 7A 显示了长度为 18–100 mer 的 19 种不同 DNA 和 RNA 样品的叠加 TIC。这些样品的保留时间在 7 s 窗口内变化。图 7B 显示了 20、40、60、80 和 100 mer 混合物单次进样的叠加提取离子色谱图，以展示色谱质谱联用对此类物质的分离情况。

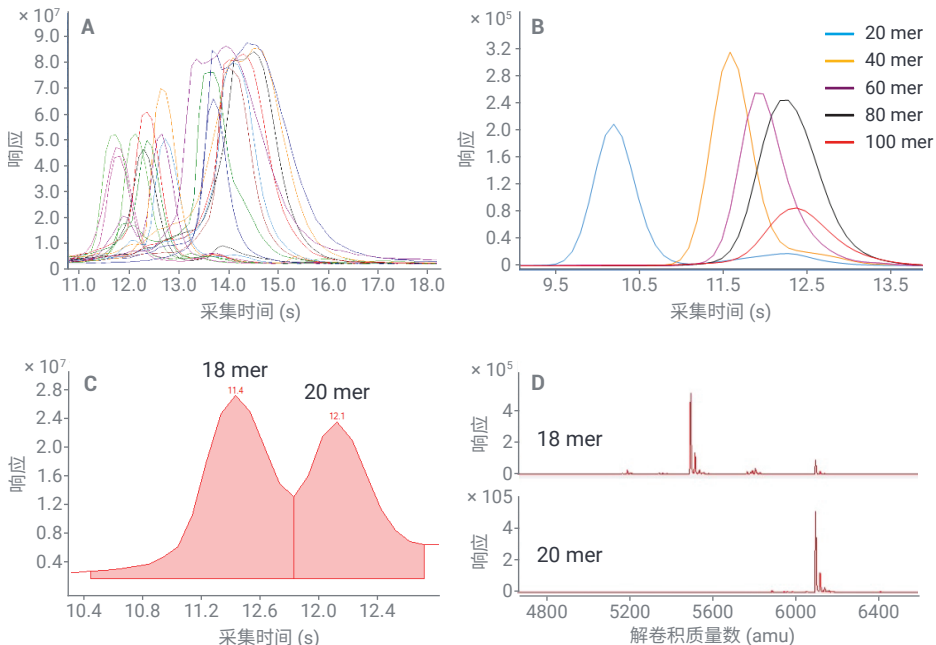


图 7. (A) 快速 LC 方法的保留时间差异。(B) 寡核苷酸混合物的叠加 EIC。(C) 快速 LC 分离 18 mer 和 20 mer 寡核苷酸。(D) 解卷积谱图，展示了寡核苷酸分离如何简化数据解析

为了评估快速 LC 方法对两种长度接近的寡核苷酸进行分离并产生不同的解卷积结果的性能，运行了长度相近的 18 mer 和 20 mer 寡核苷酸的 1:1 混合物。图 7C 显示了 TIC，表明寡核苷酸产生的峰可以通过软件进行分别积分。图 7D 显示了所得的解卷积谱图，展示了两种物质及其各自的杂质。只需对梯度程序进行少量更改，即可轻松改善分离效果 (未展示)。

低丰度杂质分析

寡核苷酸的高通量纯度评估可通过从单个色谱峰中对产物进行质量数分辨来实现。许多低丰度杂质通常会与高丰度目标物一起洗脱，这使具有较宽动态范围的 MS 测量以及能够对复杂谱图进行解卷积处理的软件至关重要。为了评估从与主要产物相同的色谱峰中检测出低丰度杂质的性能，使用 RapidFire 方法分析了 100 mer RNA。图 8 表明，尽管色谱中分离度为零，但解卷积结果仍显示出 100 mer RNA 及大量杂质，其中许多杂质的相对峰面积低至约 0.5%。正如预期，在使用高分离性或低通量的方法时，该动态范围将更出色（数据未展示）。

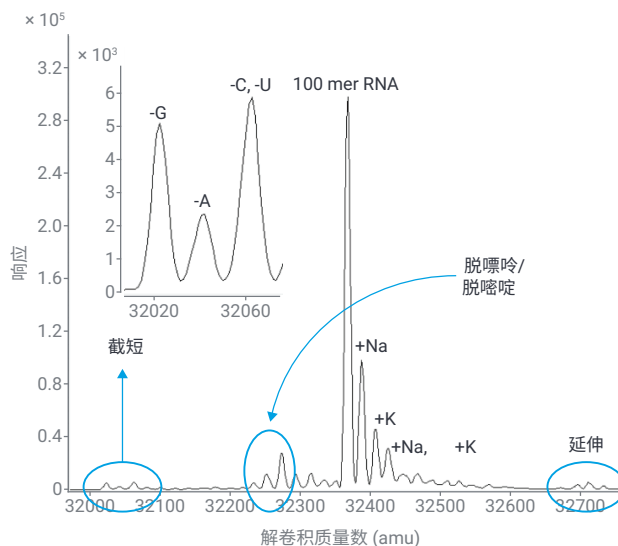


图 8. 揭示了低丰度杂质的解卷积

结论

- RapidFire TOF 和快速 LC TOF 方法均可对合成寡核苷酸生成高质量的可重现数据
- RapidFire 方法可保持 15 秒/样品的通量（每小时 240 个样品，每天 5760 个样品），而快速 LC 方法的通量为 40 秒/样品（每小时 90 个样品，每天 2160 个样品）
- RapidFire 方法的寡核苷酸脱盐效率高于快速 LC 方法，并且随着寡核苷酸长度的增加效率可高出大约 1-2 倍
- 快速 LC 方法产生的目标信号强度弱于 RapidFire 方法，随着寡核苷酸长度的增加可从 80% 降至 25%
- 对快速 LC 方法进行少量更改，即可在略微影响通量的情况下进一步提高方法性能
- 快速 LC 方法可以对寡核苷酸实现一定分离，此特性可以简化对混合物数据的解析，并可以进行调整以平衡应用的通量和分离需求
- 尽管两种高通量系统注重速度多于分离度，但均可通过质量数分辨大量低丰度杂质，从而提供出色的寡核苷酸数据

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/chem/6545-lc-q-tof

DE83824012

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，2022
2022 年 11 月 15 日，中国出版
5994-3753ZHCN

 **Agilent**
Trusted Answers