

寡核苷酸工作流程资源指南

用于寡核苷酸分析的端到端 工作流程解决方案

从研发到生产 QA/QC



合成寡核苷酸广泛用于研究和基因检测。这类短链核酸聚合物包括小干扰 RNA、反义寡核苷酸、适配体和 CRISPR 向导。这些大分子的普及，意味着对使用稳定分析方法和简便易用的数据分析工作流程开展表征工作的需求日益增加。常见的目标属性包括特定杂质的质量、序列、纯度和相对含量。

寡核苷酸纯度分析

合成寡核苷酸的纯化具有独特的挑战性。全长产物合成涉及的杂质通常包括显示截短、不完全硫醇化和碱基缺失的分子。在开发纯化方法时必须考虑此类结构。

安捷伦开发了一种优化寡核苷酸分离的系统方法（图 1）。该方法使用强阴离子交换 (SAX) 或离子对反相 (IP-RP) 色谱；后者与质谱法配合良好。此外，安捷伦还开发了单独的工作流程，用于对寡核苷酸进行 SAX 分馏，并使用 LC/UV 或 LC/MS 方法确认样品纯度。

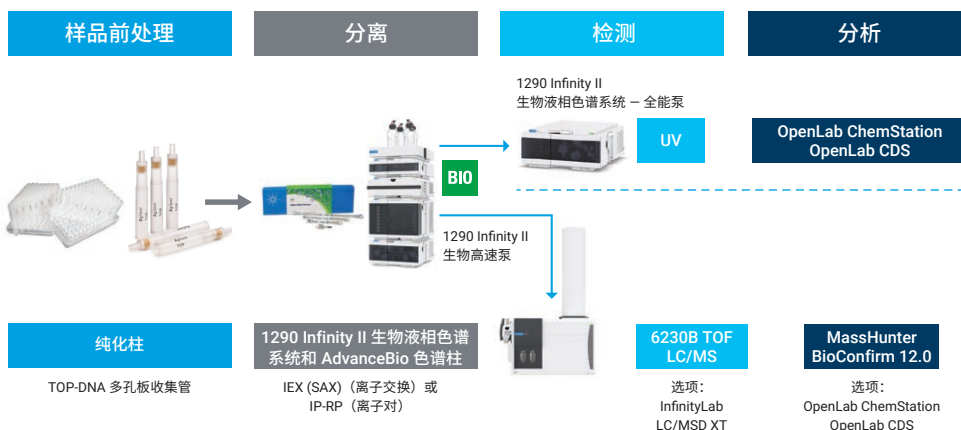


图 1. 工作流程 1：寡核苷酸纯度分析

寡核苷酸目标物与杂质 (TPI) 分析

产品相关杂质的表征是新生物治疗药物开发中的一项重要任务。常见杂质的来源包括硫代磷酸酯转化为磷酸二酯、截短、延伸以及形成碱基切除的寡核苷酸。

LC/MS 等先进的分析方法对于表征目标寡核苷酸及其杂质必不可少。需要先进的技术是因为杂质通常数量众多，丰度极低，并且相互结合。由于杂质的表征具有挑战性，因此支持和自动进行杂质分析的软件非常重要。图 2 和图 3 显示了适用于杂质等的安捷伦分析工作流程。

基于 LC/MS 的产品相关杂质分析方法



图 2. 工作流程 2: 寡核苷酸目标物与杂质 (TPI) 分析

Agilent MassHunter BioConfirm 软件 12.0 中的目标物与杂质 (TPI) 数据分析工作流程

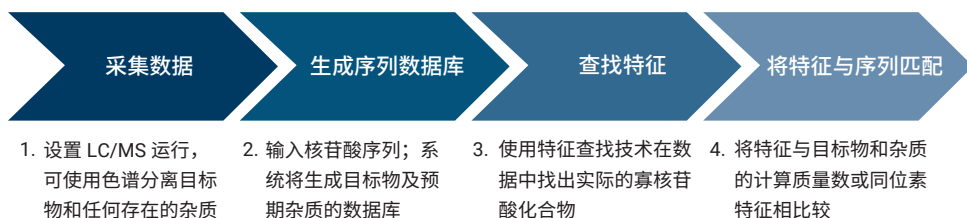


图 3. 工作流程 2: Agilent MassHunter BioConfirm 软件 12.0 中的目标物与杂质 (TPI) 数据分析工作流程

寡核苷酸序列确认

该序列确认工作流程使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱和 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的联用系统（图 4 和图 5）。工作流程使用 MS2 水平的片段确认，将同位素模式与根据寡核苷酸序列计算得到的期望值匹配。这种匹配是 BioConfirm 软件的一项新功能。它展示了将高分辨率精确质量系统与靶向 MS/MS 数据结合的强大功能。在这种方法中，通过确认高度修饰的序列和确定特定化学基团的位置，对寡核苷酸进行结构表征。

基于 LC/MS/MS 的全长产物及其杂质的分析方法



图 4. 工作流程 3: 寡核苷酸序列确认

Agilent MassHunter BioConfirm 软件 12.0 版中的寡核苷酸序列确认数据分析工作流程

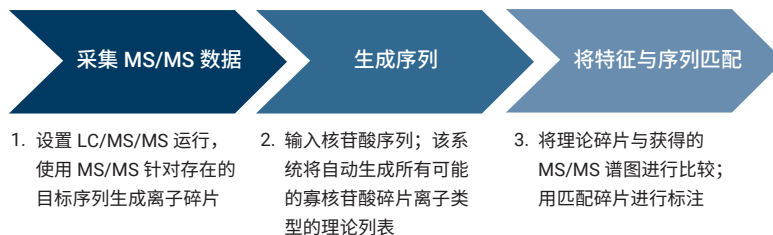


图 5. 工作流程 3: Agilent MassHunter BioConfirm 软件 12.0 中的寡核苷酸序列确认数据分析工作流程

寡核苷酸纯化解决方案

安捷伦的全面产品组合为液相色谱样品纯化提供了灵活可靠的解决方案。无论进行何种规模的液相色谱纯化，安捷伦都能为您提供高性能的仪器、色谱柱、软件和服务，确保您获得更高的纯度和回收率。

图 6 显示了安捷伦寡核苷酸纯化工作流程，图 7 比较了在不同规模下运行的安捷伦系统的分析物数量和流速。

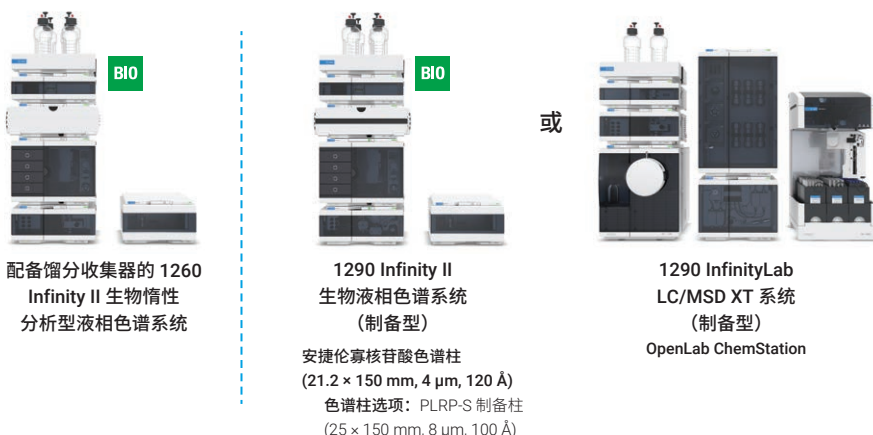


图 6. 工作流程 4: 寡核苷酸纯化

	分析型		半制备型		制备型
	微克 (µg)	毫克 (mg)	毫克 (mg)	毫克 (mg)	克 (g)
产量范围					
Agilent 1290 Infinity II 制备型液相色谱系统		1 - 50 mL/min			4 - 200 mL/min
Agilent 1260 Infinity II 制备型液相色谱系统		1 - 50 mL/min			
Agilent 1220/1260/1290 Infinity II 分析型液相色谱纯化系统	0.01 - 10 mL/min				
色谱柱内径 (mm)	4.6	10	20 - 25	30	50
典型流速 (mL/min)	1	4.7	20 - 25	42	118

图 7. 在不同规模下运行的安捷伦系统的分析物数量和流速比较

参考文献

寡核苷酸纯度分析

1. Hsiao, J.; Apffel, A.; Turner, M, Optimizing Separation of Oligonucleotides with Anion-Exchange Chromatography (优化寡核苷酸的阴离子交换色谱分离), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-4753EN](#), 2022
 2. Schneider, S. 四种不同的液相色谱系统分析核苷酸的可比性研究, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-4392ZHCN](#), 2021
 3. Pulliere, F.; Christopher Welsby, C. 穿透容器直接鉴定市售寡核苷酸原料, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-4239ZHCN](#), 2021
 4. 使用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计进行核酸热稳定性测量的最佳操作规程, 安捷伦科技公司白皮书, 出版号 [5994-4028ZHCN](#), 2022
 5. Boden, J; Meixner, J. 使用 Agilent 7100 毛细管电泳系统通过毛细管凝胶电泳分析寡核苷酸, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-3864ZHCN](#), 2021
 6. Feith, A. Analyzing Raw Material for Oligonucleotide Synthesis (分析寡核苷酸合成原料), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-3498EN](#), 2021
- ### 寡核苷酸目标物与杂质 (TPI) 分析
1. Grossman, J.; Herck, N. V.; Thibaut, F.; Verluyten, W.; Deckers, A.; Boon, J. P. and Hellings, M. OpenLab CDS 自定义计算器工具的高级使用方法: 寡核苷酸分析示例, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-5654ZHCN](#), 2023
 2. Rye, P.; Schwarzer, C. MS1 Oligonucleotide Characterization Using LC/Q-TOF with HILIC Chromatography (使用配备 HILIC 色谱的 LC/Q-TOF 进行 MS1 寡核苷酸表征), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-5631EN](#), 2023
 3. Rye, P. Agilent RapidFire 联用四极杆飞行时间质谱仪对寡核苷酸进行无需离子对试剂的高通量 HILIC 分析, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-4945ZHCN](#), 2022
 4. Wong, D. L.; Rye, P. 使用安捷伦高分辨率 LC/(Q-)TOF 质谱分析寡核苷酸及其杂质的一体化工作流程, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-4817ZHCN](#), 2022
 5. Hsiao, J.; Apffel, A.; Turner, M, Optimizing Separation of Oligonucleotides with Anion-Exchange Chromatography (优化寡核苷酸的阴离子交换色谱分离), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-4753EN](#), 2022
 6. Schneider, S. 四种不同的液相色谱系统分析核苷酸的可比性研究, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-4392ZHCN](#), 2021
 7. Liao, B. 使用高分辨 LC/MS 快速分析 mRNA 5' 端加帽, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-3984ZHCN](#), 2021
 8. Rye, P.; Yang, Y. 合成寡核苷酸的高通量质谱分析, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-3753ZHCN](#), 2022
 9. Vanhoenacker, G.; Lecluyse, C.; Debysier, G.; Sandra, P.; Sandra, K.; Schipperges, S.; Schneider, S.; Huber, U. 用于寡核苷酸 LC/UV 和 LC/MS 分析的不同离子对试剂的评估, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-2957ZHCN](#), 2021
 10. Wong, D. L. Mass Spectrometric Characterization of Antibody-siRNA Conjugates using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (使用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 对抗体-siRNA 偶联物进行质谱表征), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-2155EN](#), 2020
 11. Duong, P.; Bidlingmeyer, B. A.; Zhu, A.; Luke, S. 合成寡核苷酸的快速与高分离度反相色谱分离, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5991-6006ZHCN](#), 2017

寡核苷酸序列确认分析

1. Li, G.; Rye, P. MS/MS Oligonucleotide Sequencing Using LC/Q-TOF with HILIC Chromatography (使用配备 HILIC 色谱的 LC/Q-TOF 进行 MS/MS 寡核苷酸测序), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-5632EN](#), 2023
2. Wong, D. L.; Rye, P. Comprehensive and Integrated Workflow for Oligonucleotide Sequence Confirmation by Agilent High-Resolution LC/Q-TOF (使用安捷伦高分辨率 LC/Q-TOF 进行寡核苷酸序列确认的全面、一体化工作流程), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-5071EN](#), 2022
3. Liao, B. 使用高分辨 LC/MS 分析 mRNA Poly-A 序列变异体, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-3005ZHCN](#), 2021

寡核苷酸纯化

1. Rieck, F. 使用制备型 HPLC/MS 和软件支持快速选择性纯化寡核苷酸, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-4877ZHCN](#), 2022. Coffey, A. 寡核苷酸在 PLRP-S 柱和固定相上的动态结合容量, 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 [5994-4526ZHCN](#), 2022
2. 轻松应对纯化挑战: Agilent Lock & Load 色谱柱, 安捷伦科技公司产品样本, 出版号 [5994-3907ZHCN](#), 2021
3. Rieck, F. 使用高效液相色谱纯化单链 RNA 寡核苷酸, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-3514ZHCN](#), 2021
4. Krieger, S.; Dickhut, C. 无需手动纯化直接分析合成的寡核苷酸, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5991-9490ZHCN](#), 2018

优化的工作流程：配置和订购信息

工作流程 1：寡核苷酸纯度分析

套装	工作流程 1A — LC/UV	工作流程 1B — LC/MSD XT	工作流程 1C — LC/TOF
样品前处理	TOP-DNA 多孔板收集管, 适合 1 μ mol 规模, 150 mg, 96/包 (7572915C)		
色谱柱	 <p>AdvanceBio 寡核苷酸 (659750-702) 或 Agilent PL-SAX (PL1951-1502)</p>	 <p>AdvanceBio 寡核苷酸 (659750-702) 或 Agilent PLRP-S (PL1912-1502)</p>	 <p>AdvanceBio 寡核苷酸 (659750-702) 或 Agilent PLRP-S (PL1912-1502)</p>
LC	 <p>1290 Infinity II 生物液相色谱系统 必需: G7131A 或 G7132A、G7137A 和 G7116B 可以 G7114B (VWD) 或 G7117B (DAD)</p>	 <p>1290 Infinity II 生物液相色谱系统 必需: G7131A 或 G7132A、G7137A 和 G7116B 可选: G7114B (VWD) 或 G7117B (DAD)</p>	 <p>1290 Infinity II 生物液相色谱系统 必需: G7131A 或 G7132A、G7137A 和 G7116B 可选: G7114B (VWD) 或 G7117B (DAD)</p>
MS		 <p>LC/MSD XT: G6135BA (配备 OpenLab ChemStation) 或 G6135CA (配备 OpenLab CDS)</p>	 <p>6230B LC/TOF: G6230BA</p>
软件	 <p>如果客户拥有第三方 CDS 且仅包含 UV, 则以下软件可选。 OpenLab CDS: M8414AA 或 OpenLab ChemStation: M8380AA、M8510AA</p>	 <p>包括 OpenLab ChemStation (G6135BA) 或 OpenLab CDS (G6135CA)。增加 解卷积 (M8363AA)</p>	 <p>BioConfirm 12 (M6025AA) 单一工作站: M6026AA 或 M6027AA 网络工作站: M6035AA、M6036AA 或 M6037AA</p>

工作流程 2：寡核苷酸目标物与杂质 (TPI) 分析

套装	工作流程 2A — LC/TOF	工作流程 2B — LC/Q-TOF
样品前处理	TOP-DNA 多孔板收集管, 适合 1 μ mol 规模, 150 mg, 96/包 (7572915C)	
色谱柱	 <p>AdvanceBio 寡核苷酸 (659750-702) 或 Agilent PLRP-S (PL1912-1502)</p>	 <p>AdvanceBio 寡核苷酸 (659750-702) 或 Agilent PLRP-S (PL1912-1502)</p>
LC	 <p>1290 Infinity II 生物液相色谱系统 必需: G7131A 或 G7132A、G7137A 和 G7116B 可选: G7114B (VWD) 或 G7117B (DAD)</p>	 <p>1290 Infinity II 生物液相色谱系统 必需: G7131A 或 G7132A、G7137A 和 G7116B 可选: G7114B (VWD) 或 G7117B (DAD)</p>
MS	 <p>6230B LC/TOF: G6230BA</p>	 <p>6545XT LC/Q-TOF: G6549AA</p>
软件	 <p>BioConfirm 12 (M6025AA) 单一工作站: M6026AA 或 M6027AA 网络工作站: M6035AA、M6036AA 或 M6037AA</p>	 <p>BioConfirm 12 (M6025AA) 单一工作站: M6026AA 或 M6027AA 网络工作站: M6035AA、M6036AA 或 M6037AA</p>

工作流程 3: 寡核苷酸序列确认

套装	工作流程 3 — LC/Q-TOF	
样品前处理	TOP-DNA 多孔板收集管, 适合 1 μmol 规模, 150 mg, 96/包 (7572915C)	
色谱柱		AdvanceBio 寡核苷酸 (659750-702) 或 Agilent PLRP-S (PL1912-1502)
LC		1290 Infinity II 生物液相色谱系统 必需: G7132A、G7137A 和 G7116B 可选: G7114B (VWD) 或 G7117B (DAD)
MS		6545XT LC/Q-TOF: G6549AA
软件		BioConfirm 12 (M6025AA) 单一工作站: M6026AA 或 M6027AA 网络工作站: M6035AA、M6036AA 或 M6037AA

工作流程 4: 寡核苷酸分析和制备级纯化

套装	工作流程 4A — 分析型 LC/UV	工作流程 4B — 制备型 LC/UV	工作流程 4C — 制备型 LC/MSD XT
色谱柱	 AdvanceBio 寡核苷酸 (659750-702)	 AdvanceBio 寡核苷酸 (671150-702) 或 PLRP-S 制备柱 (PL1212-3800)	 AdvanceBio 寡核苷酸 (671150-702) 或 PLRP-S 制备柱 (PL1212-3800)
LC	 配备馏分收集器的 1260 Infinity II 生物惰性分析型液相色谱纯化系统 G5654 和 G5664B	 1290 Infinity II 制备型液相色谱 G7161B、G7158B、G7114A、G7163B、G7166A (可选)	 1290 Infinity II 制备型液相色谱 G7161B、G7111B、G7158B、G7114A、G7170B、G9324A、G1170A、G4738A、G7163B、G7166A (可选)
MS			 LC/MSD XT: G6135BA (配备 OpenLab ChemStation)
软件	 OpenLab ChemStation M8380AA 和 M8510AA	 用于 OpenLab ChemStation 的自动纯化软件 M8368AA	 用于 OpenLab ChemStation 的自动纯化软件 M8368AA

了解更多信息：

www.agilent.com/oligonucleotides

如需获取技术问题的答案和安捷伦社区的资源，
请访问：

community.agilent.com

安捷伦客户服务中心：

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

DE73547804

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，2023
2023 年 12 月 1 日，中国出版
5994-5790ZHCN

