

研究展报

ASMS 2020

TP 434

合成寡核苷酸的高通量质谱分析： 比较来自快速 LC 和 RapidFire 方法的数据

Peter Rye 博士，Yanan Yang 博士

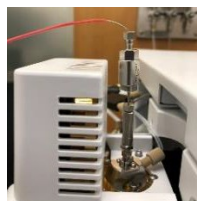
安捷伦科技公司

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 LCMS 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

快速 LC 方法



LC Conditions, Agilent 1290 Infinity II Binary pump, Multisampler with Dual Needles			
Column	AdvanceBio Oligo UHPLC Guard column, 1.7 μ m, 2.1 x 5mm pn: 821725-921		
Column temperature	room temperature		
Injection volume	10 μ L		
Smart Overlap	Enabled, alternating needle		
Autosampler temp	5 $^{\circ}$ C		
Needle wash	Methanol:Water 50:50		
Mobile phase	A = Water + 15 mM TEA + 400 mM HFIP B = Methanol		
Flow rate	1.75 mL/min		
Gradient program	Time (min)	Time (sec)	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
Stop time	0.60 min		
Post time	0.00 min		

6545LC/Q-TOF Conditions	
Ion Polarity	Dual AJS Negative
Data Storage	Both (Centroid and Profile)
Gas temperature	350 $^{\circ}$ C
Drying gas flow	13 L/min
Nebulizer gas	60 psi
Sheath gas temperature	350 $^{\circ}$ C
Sheath gas flow	12 L/min
Capillary voltage	3500V
Nozzle voltage	2000V
Fragmentor	200 V
Skimmer	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
Mass Range	400 – 3200 m/z
Acquisition Rate	10 spectra/sec

RapidFire 方法



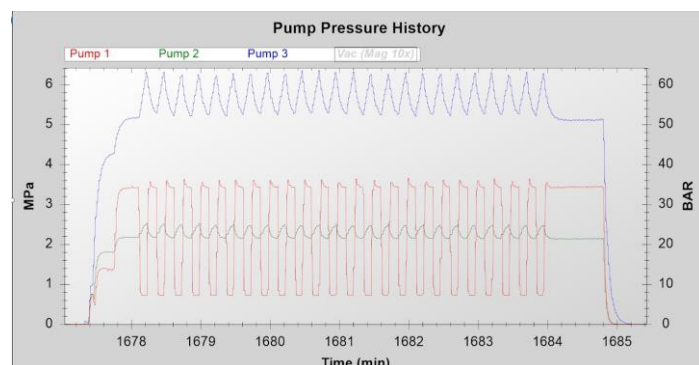
RapidFire Conditions		
Cartridge	PLRP-S, 30 μ m 1000A, 4 μ l bed volume	
Cartridge Temperature	room temperature	
Injection volume	10 μ L	
Pump 1	Water + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP	1.2 ml/min
Pump 2	50% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP	0.6 ml/min
Pump 3	50% Methanol + 7.5 mM TEA + 200 mM HFIP	0.6 ml/min
State 1	Aspirate sample (sip sensor on)	600 msec
State 2	Load/wash (desalt)	6,000 msec
State 3	Extra wash	0 msec
State 4	Elute (inject)	6,000 msec
State 5	Reequilibrate	500 msec

6545LC/Q-TOF Conditions	
Ion Polarity	Dual AJS Negative
Data Storage	Both (Centroid and Profile)
Gas temperature	275 $^{\circ}$ C
Drying gas flow	11 L/min
Nebulizer gas	35 psi
Sheath gas temperature	325 $^{\circ}$ C
Sheath gas flow	11 L/min
Capillary voltage	3500V
Nozzle voltage	2000V
Fragmentor	200 V
Skimmer	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
Mass Range	400 – 3200 m/z
Acquisition Rate	4 spectra/sec

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。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。

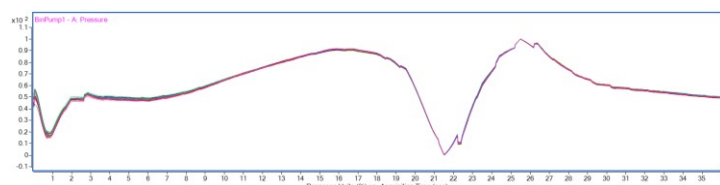
结果与讨论

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。左图通过一组 24 次重复进样的连续文件显示了所有 3 个 RapidFire 泵的压力。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。

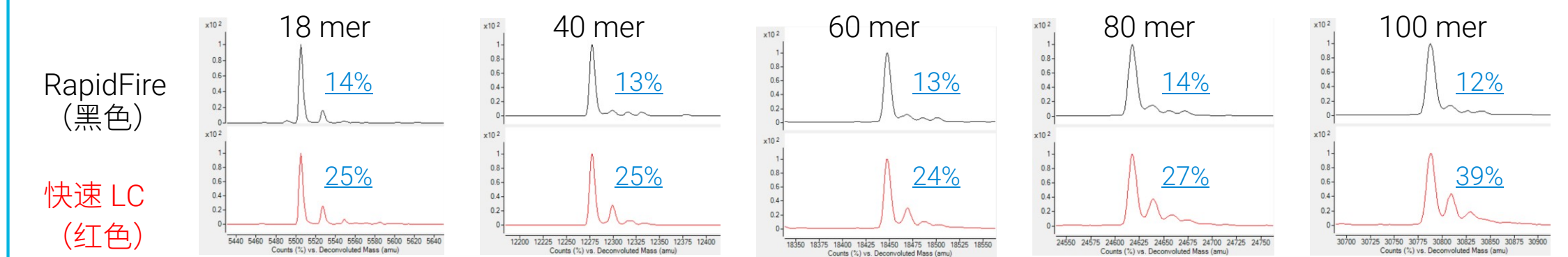
通量与重现性 — 快速 LC



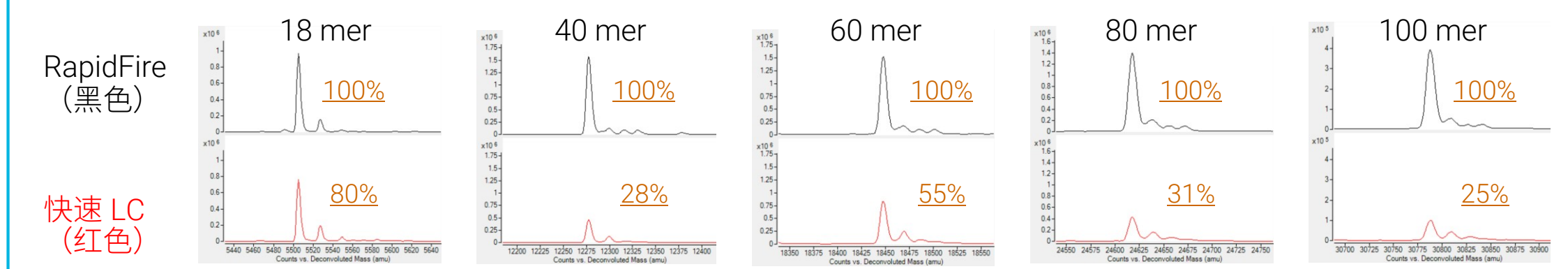
快速 LC 方法的通量取决于梯度程序（约 35 s，在下次样品吸取时间内进行了优化）和 MS 采集停止/开始的用时（约 5 s），每个样品用时 40 s。左图显示了 24 次进样的泵压力叠加迹线。这些迹线相互重叠，显示出良好的梯度重现性。

脱盐和信号强度

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。



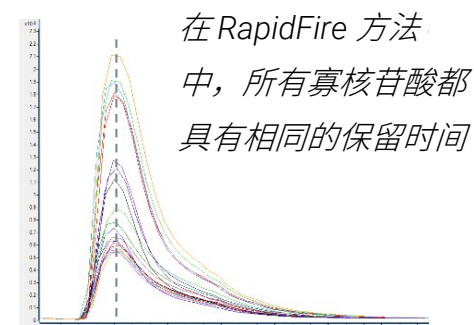
Y 轴比例同步。每种寡核苷酸长度的目标峰强度以棕色表示。



上方的图显示了使用 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。上图为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。下图显示的数据与上图相同，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棕色表示。尽管快速 LC 方法可实现分离（请参见下文），能够降低离子抑制从而增强信号，但快速 LC 的高流速（1.75 mL/min，RapidFire 为 0.6 mL/min）和较高的采集速率（10 谱图/秒，RapidFire 为 4 谱图/秒）以及较低的脱盐效率共同导致了较低的信号强度。

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，从而大大地减少分析物与小柱之间的相互作用。右图显示了所有 19 个样品的叠加总离子流色谱图 (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 A 显示了长度为 18–100 mer 的 19 种不同 DNA 和 RNA 样品的 TIC 叠加图。这些样品的保留时间在 7 s 窗口内变化。图 B 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。

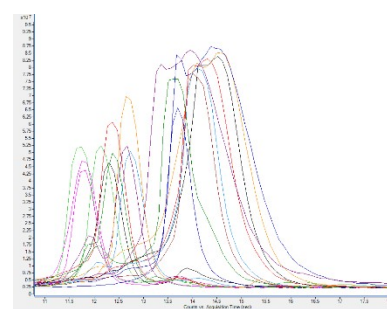


图 A. 快速 LC 方法的保留时间差异

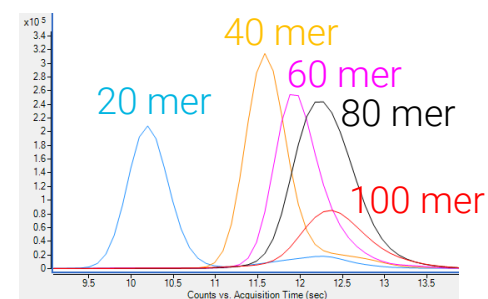


图 B. 寡核苷酸混合物的叠加 EIC

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 C 展示了 TIC，表明寡核苷酸产生的峰可以通过软件进行分别积分。图 D 为所得的解卷积谱图，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）。

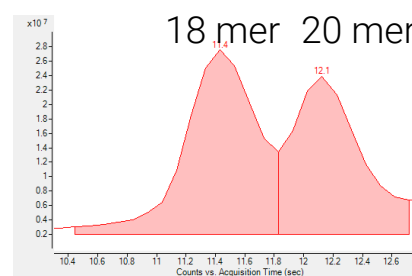


图 C. 快速 LC 分离 18 mer 和 20 mer 寡核苷酸

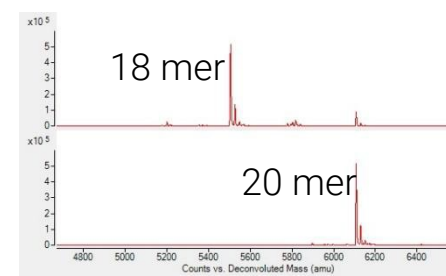
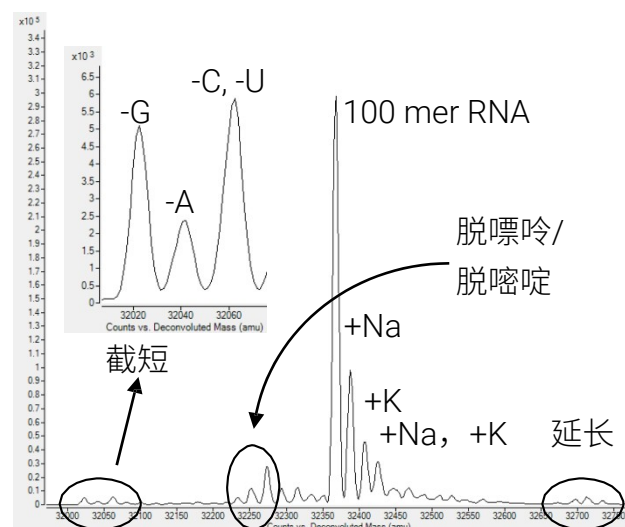


图 D. 解卷积谱图展示了寡核苷酸分离如何简化数据解析

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 向导 RNA。左图表明，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）。

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 1 到 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