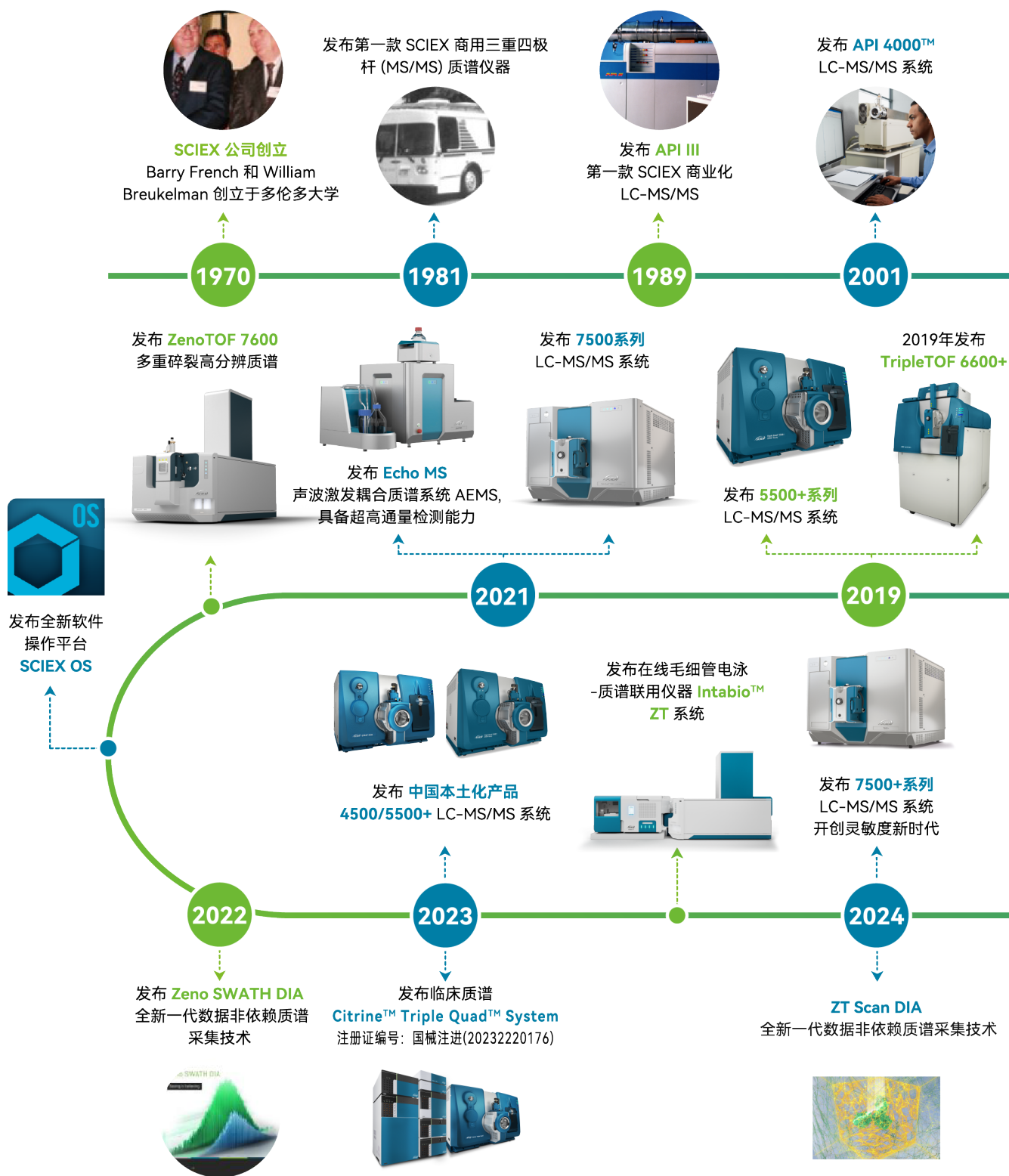
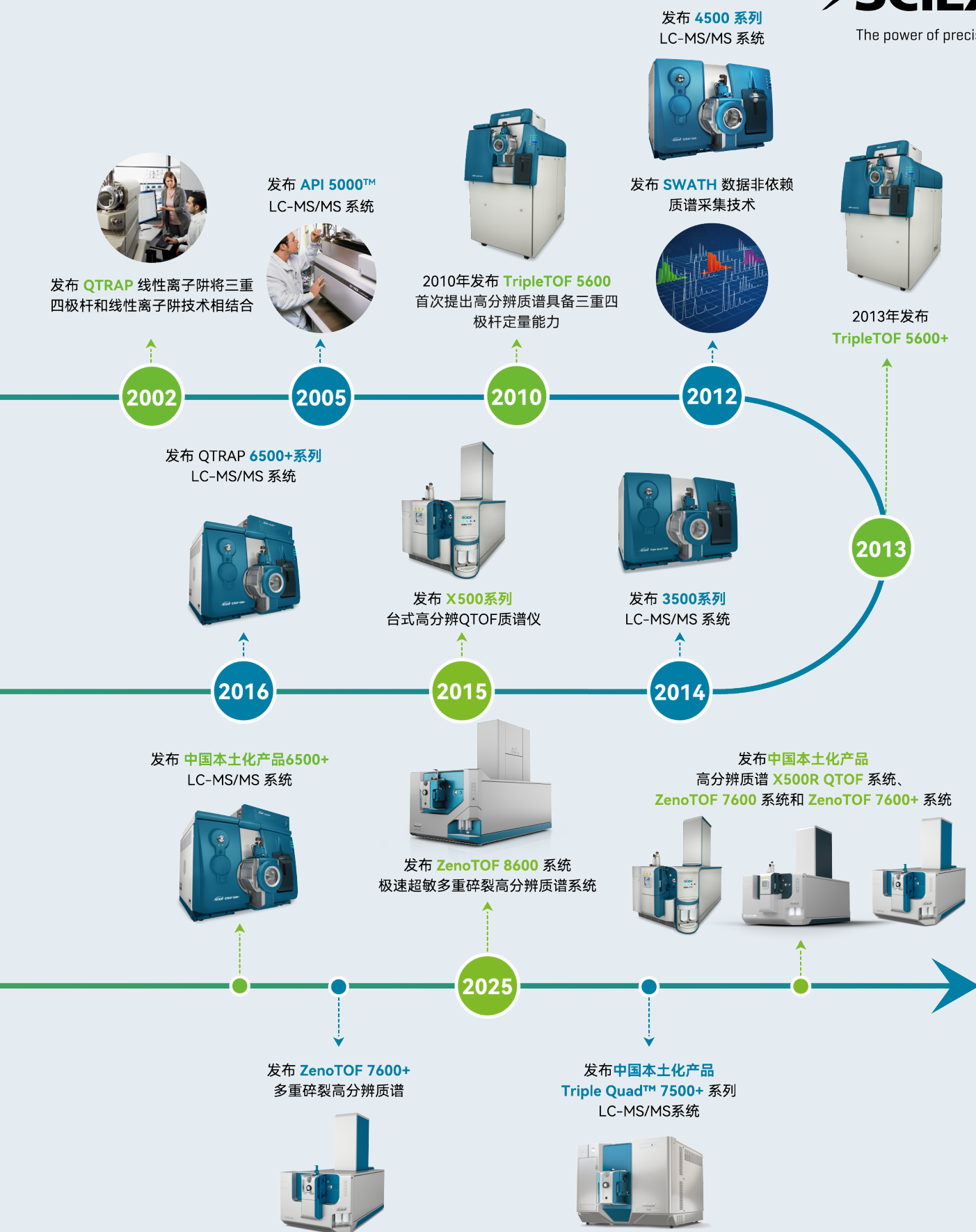


寡核苷酸药物应用文集



超过 50 年的创新历程





引言

近年来，反义寡核苷酸、siRNA、修饰核酸及核酸偶联药物迎来高速产业化发展，凭借独特的基因沉默与靶向调控机制，成为攻克罕见病、难治性肿瘤及代谢性疾病的核心创新药物品类。相较于传统小分子药物，寡核苷酸药物具有极性大、序列相似性高、化学修饰丰富的结构特点，在合成工艺、纯化制备及储存过程中易产生截短序列、修饰不完全异构体、脱碱基产物、氧化杂质及降解片段；同时核酸药物在生物体内存在酶解代谢与复杂基质干扰，对药物**杂质深度表征、结构确证、纯度定性及超低痕量精准定量**提出了远超传统药物的分析要求。常规紫外检测、普通液相色谱、杂交凝胶电泳等技术分辨率有限、特异性不足、结构解析能力缺失，无法满足创新药 CMC 质量研究、杂质谱定性归属、方法学验证及临床前 ADME 申报的合规要求。

毛细管电泳（CE）、高分辨质谱（HRMS）与三重四极杆质谱（QqQ-MS）共同构成了当前寡核苷酸药物分析的完整技术体系，分别承担高效分离、精细结构表征与高灵敏靶向定量的核心作用。毛细管电泳基于核酸分子荷质比与流体尺寸差异实现超高柱效分离，具备优异的单碱基分辨能力，无固定相吸附干扰，在原料药纯度分析、有关物质轮廓筛查、制剂完整性与稳定性评价中具备不可替代的优势，是寡核苷酸药物**分离与纯度质控**的核心平台。

在结构表征层面，**高分辨质谱（HRMS）**凭借超高质量精度、高分辨率及多级碎裂扫描能力，成为寡核苷酸未知杂质解析与完整结构确证的金标准技术。HRMS 可精准测定核酸药物精确分子量，区分质量数差异极小的修饰同分异构体，解析碱基修饰位点、骨架断裂模式及未知降解杂质结构，能够系统完成主成分序列确证、工艺杂质定性、降解途径归属，解决了传统分析手段“只能看纯度、无法判结构”的技术瓶颈，是核酸药物杂质研究与工艺溯源的关键工具。

在定量应用层面，**三重四极杆质谱（QqQ-MS）**依托 MRM 多反应监测模式，具备极高的灵敏度、特异性与抗基质干扰能力，适配血浆、组织、细胞样本中微量寡核苷酸药物及代谢产物的痕量定量，线性范围宽、定量准确度优异，可稳定支撑核酸药物体内吸收、分布、代谢、排泄的系统药代研究，满足临床前与临床生物样本大批量精准定量需求，完美弥补了高分辨质谱在低浓度精准靶向定量上的不足。

CE 高效分离、HRMS 深度定性表征、QqQ 高灵敏靶向定量三者优势互补、体系闭环，全面覆盖寡核苷酸药物研发、工艺优化、质量放行、杂质研究、稳定性考察、体内药代定量的全链条应用场景，完全契合国内外药典及药品审评机构对核酸创新药质量控制的技术规范。

本文集系统聚焦寡核苷酸药物分析核心技术应用，集中收录毛细管电泳纯度分离技术、高分辨质谱精细结构表征技术、三重四极杆质谱靶向定量技术等各类修饰核酸原料药、制剂及生物样本中的实操案例与标准化方法，汇总仪器参数优化、基质效应控制、杂质结构解析、全套方法学验证及药代定量策略等前沿成果。旨在构建完整的核酸药物分析技术参考体系，为从事核酸药物研发、质量分析、工艺优化与药品申报的行业人员提供权威、落地的技术指导，推动国内寡核苷酸药物分析技术标准化、质控体系规范化，助力创新核酸药物高质量研发与产业化落地。

内容提要

1 SCIEX Triple Quad™ 7500 系统定量分析血浆中寡核苷酸	6
2 SCIEX Triple Quad™ 系统定量分析大鼠血浆中的 siRNA 药物 Inclisiran	9
3 本土化 SCIEX Triple Quad™ 6500+ 系统定量血浆中的寡核苷酸	12
4 SCIEX ZenoTOF™ 7600 系统建立大鼠血浆中 siRNA 的定量方法	16
5 基于 SCIEX ZenoTOF® 7600 系统进行寡核苷酸药物 Trecovirsen 的代谢产物鉴定	20
6 利用 SCIEX ZenoTOF® 7600 系统进行寡核苷酸药物 Fomiviren 的代谢产物鉴定	24
7 使用高分辨 X500B QTOF 质谱系统在亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 下对寡核苷酸进行表征	28
8 X500B QTOF 系统用于寡核苷酸 Inclisiran 反义链的表征	32
9 SCIEX Echo™ MS 高通量筛选技术用于寡核苷酸分析	37
10 高通量 BioPhase™ 8800 系统：用于不同片段长度寡核苷酸纯度分析	41
11 毛细管凝胶电泳法对单链寡核苷酸的纯度分析	44
12 毛细管凝胶电泳法对 SgRNA 的纯度分析	47

SCIEX Triple Quad™ 7500系统定量分析血浆中寡核苷酸

Quantitative Analysis of oligonucleotides in Plasma by SCIEX Triple Quad™ 7500 System

陈俊苗, 司丹丹, 龙志敏

Junmiao Chen, Dandan Si, Zhimin Long

SCIEX应用技术中心, 中国

SCIEX, China

关键词: SCIEX Triple Quad™ 7500 system, oligonucleotides, Quantitative analysis

前言

寡核苷酸常用来作为探针确定DNA或RNA的结构, 用于基因芯片、电泳等过程中。寡核苷酸疗法和基因疗法随着其效力的提高和递送挑战的解决而迅速受到关注。目前在研的寡核苷酸药物种类很多, 包括反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO)、小干扰核糖核酸 (small interfering RNA, siRNA)、微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 等。其中ASO这种类型的寡核苷酸因其高特异性和达到以前不可治疗目标的能力而变得越来越重要, 为了支持ASO疗法的发展, 需要对寡核苷酸进行高灵敏度和稳定的定量分析。使用荧光检测的方式可以实现比较低的检测限, 但是该方法的线性动态范围有限, 这种检测方式通常无法区分寡核苷酸和其代谢物及相关杂质。LC-MS/MS可以提供优异的选择性、良好的灵敏度和在单个测定中分析多个寡核苷酸的能力^[1]。

本方法采用固相萃取 (SPE) 方式进行前处理, 通过SCIEX Triple Quad™ 7500系统对大鼠血浆中寡核苷酸进行直接定量, 定量限 (LOQ) 为20 pg/mL, 特点如下:

1. 使用含OptiFlow Pro离子源的Triple Quad™ 7500系统, 能够实现快速分析、操作简单的同时获得检测灵敏度高的LC-MS/MS方法。

2. 大鼠血浆中基质中的检测灵敏度高, 可达到pg/mL级别, 较宽的线性范围以及良好的定量重现性。
3. SCIEX OS软件为数据采集、处理和管理提供了一个用户友好的界面和一个单一的合规平台, 从而提高了数据采集和数据处理效率。

实验方法

1. 样品及试剂信息: 待测寡核苷酸P-Thio序列为C-T-C-T-C-G-C-A-C-C-A-T-C-T-C-T-C-T-C-T-C-T共含有25个碱基, 分子量为7390。离子对试剂1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP, ≥ 99.8%) 和diisopropylethylamine (DIEA, ≥ 99.5%) 以及Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 购自sigma公司。

2. 样品制备: 寡核苷酸标准品粉末使用PH 8.0的10 mM Tris-HCl 溶液 (含1mM EDTA) 进行溶解得标准品浓溶液, 再依次稀释出不同浓度的标品溶液。取2 μl标品溶液加入到198 μl大鼠血浆中得大鼠血浆样品。大鼠血浆样品采用SPE方法进行前处理详细流程见表1, Clarity OTX SPE固相萃取板及配套试剂购自Phenomenex (货号: 8E-S103-EGA)。

RUO-MKT-02-15474-ZH-A

表1. 样品制备流程

步骤	溶剂
样品预处理	血浆200 µl+200 µl裂解液
活化	1mL × 2次; 100%甲醇
平衡	1mL × 2次; SPE自带的平衡液或50mM醋酸铵pH 5.5
上样	400 µl; 3-5秒一滴
淋洗	1mL × 3次; SPE自带的淋洗液或50mM醋酸铵pH5.5, 50%乙腈水
洗脱	500 µL × 2; 100mM pH9.5 碳酸氢铵 : 乙腈 : THF (2 : 1 : 1)
吹干	N ² , 40°C; 收集完洗脱液氮气吹干
复溶	150 µL, Tris-HCl 溶液pH8

3. 液相条件

液相: LC 40AD液相系统

色谱柱: Phenomenex Kinetex EVO C18
(50 × 2.1 mm, 2.6 µm)

流动相: A: 水 (含0.7% HIFP, 0.15%DIEA)
B: 乙腈 (含0.7% HIFP, 0.15%DIEA)

流速: 0.3 ml/min

柱温: 40°C

洗针液: 甲醇:乙腈:水:异丙醇, 1:1:1:1

梯度洗脱, 洗脱程序如表1:

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	95	5
3	70	30
5	0	100
5.9	0	100
6	95	5
8	95	5

4. 质谱条件

SCIEX Triple Quad™ 7500系统

数据采集方法: MRM (多反应监测)

离子源: ESI源

离子源参数:

IS电压: 3000 V 气帘气 CUR: 40 psi

碰撞气 CAD: 14 雾化气 GS1: 30 psi

辅助气 GS2: 80 psi 源温度 TEM: 450 °C

多反应监测离子通道如表2:

表2. 寡核苷酸MRM离子对信息

化合物	母离子 Q1 (m/z)	子离子 Q3 (m/z)	碰撞能量 CE (V)	碰撞池出口 电压CXP (V)
Oligo-1	738.0	303.1	-40	-15
Oligo-2	670.9	288.1	-35	-15

实验结果

灵敏度和线性

本实验采用固相萃取 (SPE) 方式进行大鼠血浆前处理, 96孔板模式简化流程提高通量。通过 SCIEX Triple Quad™ 7500系统对大鼠血浆中的寡核苷酸进行直接定量, 进样10 µL定量下限 (LOQ) 可达20 pg/mL (图2), 且空白中无干扰, 方法选择性好, 灵敏度高。寡核苷酸的回归方程和线性范围见图3, 该寡核苷酸在20~20000 pg/mL的浓度范围内线性关系良好。

重现性和准确性

为了考察仪器的重现性及准确性, 分别将处理好的2个低浓度点样品20 pg/mL和50 pg/mL进行重现性考察。在两个浓度下的精密度 (RSD) 分别为6.67%和2.87%, 准确度均在85-115%之内。

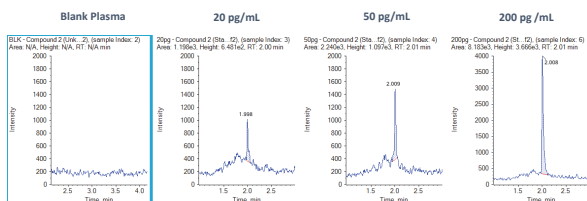


图1. 寡核苷酸P-Thio 的离子对（670.9/288.1）在空白血浆、20 pg/mL、50 pg/mL和200 pg/mL浓度时大鼠血浆基质中峰图信息。

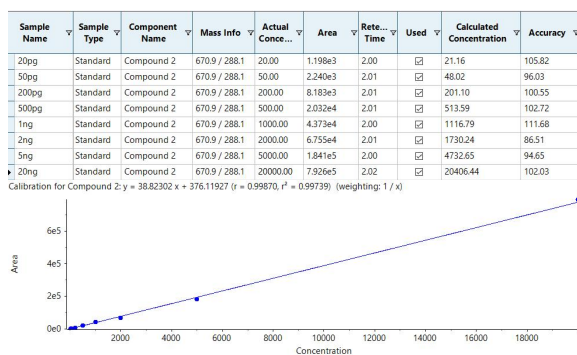


图2. 寡核苷酸P-Thio 的离子对（670.9/288.1）的线性方程和线性图谱，线性范围20~20000 pg/mL，线性相关系数 $r=0.999$

结论

本方案采用固相萃取方法进行血浆样品前处理，通过 SCIEX Triple Quad™ 7500系统对大鼠血浆中完整的寡核苷酸进行直接定量。该LC-MS/MS检测方法灵敏度高，特异性好，空白血浆无干扰且线性范围较宽。该方法定量限（LOQ）可达到20 pg/mL，在20~20000 pg/mL的浓度范围内线性良好，且具有较好的重现性和准确度（RSD < 10%）。整个方法具有操作简单，可快速分析的优点，具有较高的分析通量，可为血浆基质中寡核苷酸的定量提供参考。

参考文献

1. Achieving best in class sensitivity for antisense oligonucleotides in plasma using trap-and-elute microflow LC. RUO-MKT-02-13206-A.

SCIEX Triple Quad™ 系统定量分析大鼠血浆中的siRNA药物 Inclisiran

Quantification of Inclisiran in rat plasma using the SCIEX Triple Quad™ System

冷向阳, 钟晨春, 龙志敏, 刘冰洁

Xiangyang Leng, Chenchun Zhong, Zhimin Long, Bingjie Liu

SCIEX应用支持中心, 中国

Key words: SCIEX Triple Quad™ System; siRNA ; Inclisiran; Quantitative analysis; Plasma; MRM; Oligo nucleotides.

引言

siRNA (small interfering RNA, 小干扰RNA) 是一种长度约20-25个碱基的双链RNA分子, 通过RNA干扰 (RNAi) 机制特异性沉默靶基因的表达, siRNA进入细胞后, 与RNA诱导沉默复合体 (RISC) 结合。siRNA双链解旋, 其中引导链引导RISC识别互补的靶mRNA并切断靶mRNA, 阻断特定基因翻译, 抑制基因表达。Inclisiran (商品名: 乐可) 于2020年上市, 是全球首款靶向PCSK9蛋白的siRNA药物, 主要用于治疗成人原发性高胆固醇血症或混合型血脂异常。其核心机制是通过RNA干扰技术特异性沉默PCSK9 mRNA的表达, 从而降低低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平, 减少心血管疾病风险

本文建立了使用SCIEX Triple Quad™系统对大鼠血浆中siRNA药物Inclisiran的定量分析的方法, 采用固相萃取的前处理方式, 方法专属性强、灵敏度高, 可以很好的满足Inclisiran在血浆生物基质样本中的定量检测需求。

本实验方法特点:

1. 使用三重四极杆质谱 (SCIEX Triple Quad™系统) 测定Inclisiran, 反义链和正义链的定量下限LLOQ分别为0.5 ng/mL和0.2 ng/mL, 灵敏度高, 同时能实现较宽的线性范围和良好的重现性。
2. 前处理采用Clarity OTX™ 萃取试剂盒进行固相萃取, 能够有效的实现对血浆样品的净化, 前处理方法简单、方便。

仪器设备

Exion LC™ AD 系统 + SCIEX Triple Quad™系统



RUO-MKT-02-35199-ZH-A

实验方法

1. 样品信息和试剂

Inclisiran 标准品（正义链SS分子式： $C_{292}H_{416}F_2N_{75}O_{182}P_{21}S_2$ ，分子量：8636.9；反义链AS分子式： $C_{237}H_{291}F_{10}N_{101}O_{134}P_{22}S_4$ ，分子量：7694.2）；Clarity OTX™ 萃取试剂盒购于Phenomenex，包含96孔板、裂解缓冲液、平衡缓冲液、淋洗缓冲液和洗脱缓冲液。

2. 样品制备

Inclisiran标准品使用pH 8.0的10 mM Tris-HCl 溶液（含1 mM EDTA）进行溶解和稀释。

取100 μ L大鼠血浆样本，其中加入标准品配置成0.2 ~ 500 ng/mL系列样品，作为标准曲线。血浆样品SPE处理流程如表1。

表1. 大鼠血浆SPE处理流程

步骤	溶剂
样品预处理	血浆100 μ L+100 μ L裂解液+200 μ L 50 mM醋酸铵
活化	1 mL $\times$ 2；100%甲醇
平衡	1 mL $\times$ 2；平衡液或用50 mM醋酸铵，pH 5.5
上样	400 μ L；3-5秒一滴
淋洗	1 mL $\times$ 3；淋洗液或用50 mM醋酸铵pH 5.5, 50%乙腈
洗脱	500 μ L $\times$ 2；100 mM pH 9.5 碳酸氢铵；乙腈（8:2）
吹干	N ₂ ，30℃吹干
复溶	100 μ L, pH 8.0的10 mM Tris-HCl 溶液（含1 mM EDTA）

3. 液相方法

色谱柱：Premier BEH C18 1.7 μ m, 100 $\times$ 2.1 mm

流动相：A相：水（含100 mM 六氟异丙醇，15 mM N,N-二异丙基乙胺）

B相：乙腈（含100 mM 六氟异丙醇，15 mM N,N-二异丙基乙胺）

流速：0.4 mL/min

柱温：65℃；

流动相梯度：

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	90	10
0.50	90	10
3.00	60	40
4.00	10	90
4.50	10	90
4.60	90	10
6.00	90	10

4. 质谱方法

离子源：ESI源，负离子模式

离子源参数：

电喷雾电压IS: -4500 V 气帘气 CUR: 35 psi

雾化气 GS1: 55 psi 辅助加热气GS2: 55 psi

碰撞气 CAD: 12 源温度 TEM: 400℃

表2. Inclisiran的质谱参数

化合物名称	Q1 Mass	Q3 Mass	DP	CE	EP	CXP
AS-Inclisiran	768.8	358.1	-60	-42	-10	-15
SS-Inclisiran	863.1	430.1	-60	-30	-10	-15

实验结果

1. **灵敏度和重复性**：本实验中采用Clarity OTX™ 萃取试剂盒对大鼠血浆样品进行处理，能够有效的实现对样品的净化，方法定量下限（LOQ）分别为AS链0.5 ng/mL，SS链0.2 ng/mL，空白中无干扰，方法选择性好，灵敏度高；定量下限样品连续重复进样6针，RSD%<3.57%，重复性良好。

2. **线性范围**：在大鼠血浆中Inclisiran的AS链和SS链在线性范围0.5-500ng/mL和0.2-500 ng/mL内线性关系良好，相关系数均大于0.997，标曲各点准确度均在91.7%-109.4%之间。

RUO-MKT-02-35199-ZH-A

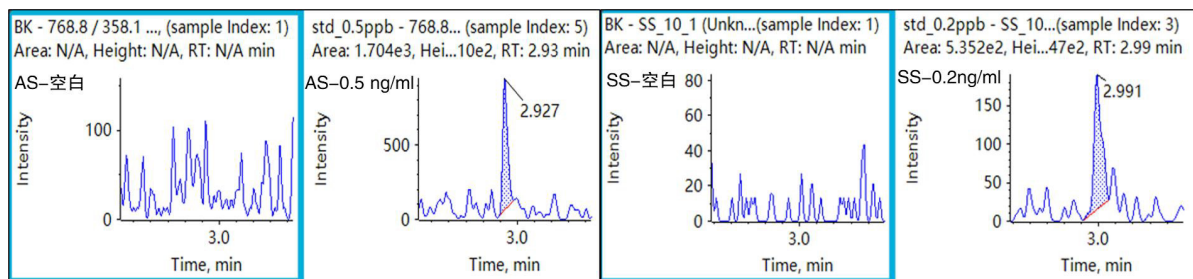


图1. Inclisiran在空白血浆样品和LOQ的典型色谱图

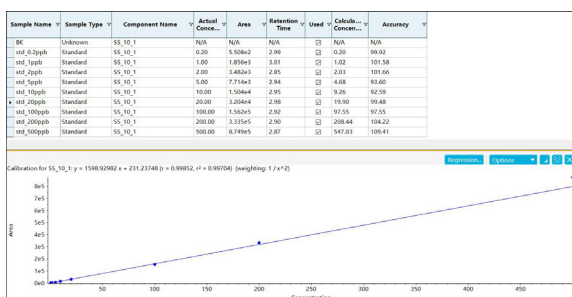


图2. 大鼠血浆中Inclisiran的反义链标准曲线图

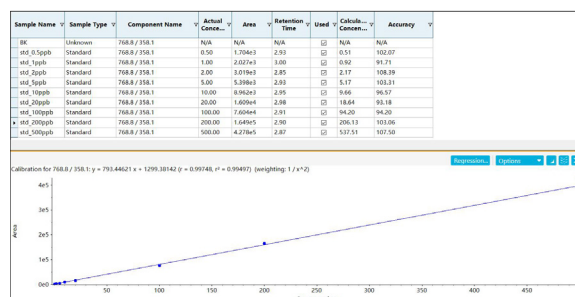


图3. 大鼠血浆中Inclisiran的正义链标准曲线图

3. 提取回收率和基质效应结果: 采用固相萃取法对大鼠血浆进行处理, 考察Inclisiran在低、高浓度下的提取回收率和基质效应。结果见表3。Inclisiran的反义链和正义链在5 ng/mL和50 ng/mL浓度下的提取回收率为70.0% - 74.9%, 基质效应为72.4% - 79.7%。

表3. 大鼠血浆中不同浓度下的提取回收率和基质效应

样品浓度 (ng/mL)	提取后样品峰面积	未经提取样品峰面积	同浓度标准溶液峰面积	提取回收率	基质效应
AS_5	5398	7197	9347	74.9%	76.9%
SS_5	7621	10733	14123	71.0%	75.9%
AS_50	36275	51823	71582	70.0%	72.4%
SS_50	77872	106772	133878	72.9%	79.7%

总结

本文使用固相萃取方式对大鼠血浆进行前处理, 利用SCIEX Triple Quad™ 系统对大鼠血浆中Inclisiran进行定量分析。同时对反义链和正义链定量, 定量下限分别为0.5 ng/mL和0.2 ng/mL, 在线性范围0.5-500 ng/mL和0.2-500 ng/mL内线性关系良好, 在不同浓度下的提取回收率大于70%, 基质效应大于72%, 可以满足目标Inclisiran的检测需求。同时也为其他寡核苷酸药物的检测分析提供方法参考。

本土化SCIEX Triple Quad™ 6500+系统定量血浆中的寡核苷酸

Quantitation of Oligonucleotide in Plasma Using SCIEX Triple Quad™ 6500+ system

吕小磊，罗继，陈泓序，郭立海
Lv Xiaolei, Luo Ji, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心，中国
SCIEX, China

Key words: SCIEX Triple Quad™ 6500+ system, Oligonucleotide, Quantitation

引言

寡核苷酸（Oligonucleotide）是由少量核苷酸单元通过磷酸二酯键连接而成的短链核酸分子，长度通常在几十个核苷酸之间。常见的寡核苷酸包括反义寡核苷酸（Antisense Oligonucleotides, ASOs），小干扰RNA（small interference RNA, siRNA），microRNA和核酸适配体（aptamer）等。寡核苷酸药物（Oligonucleotide Drugs）是一类以寡核苷酸为基础的治疗药物，主要用于调节基因表达或干扰与疾病相关的RNA分子的功能。它们通过与目标RNA分子结合，从而影响其翻译或降解，广泛应用于基因治疗、癌症治疗、遗传性疾病、感染性疾病等多个领域。与传统的小分子药物相比，寡核苷酸药物可以从源头进行疾病干预，特异性高，副作用较少，具有可设计性。寡核苷酸药物是一个快速发展的领域，有望为许多难治性疾病提供新的治疗手段，全球上市的核酸药物数量也逐年递增。而对生物样品中的寡核苷酸进行高灵敏度的准确定量是新型药物研发的迫切需求，LC-MS/MS检测作为一种快速、高选择性、高灵敏度的检测方法，可以为寡核苷酸定量分析提供巨大的帮助。

6500+系统是SCIEX高端三重四极杆/QTRAP质谱产品，在复杂基质中提供卓越的分析灵敏度。它专为更具挑战性

的检测设计，具备优异的可靠性和稳健性。作为全球生命科学分析技术的创新者，SCIEX在2024年10月30日宣布在中国本土化生产SCIEX Triple Quad™ 6500+系统和QTRAP 6500+系统，这标志着SCIEX本土化战略的又一个里程碑。本方法使用本土化SCIEX Triple Quad™ 6500+系统，结合固相萃取（SPE）方法进行样品前处理，对大鼠血浆中的寡核苷酸进行定量，定量限（LLOQ）为0.05ng/mL，该方法特点如下：

1. 本土化SCIEX Triple Quad™ 6500+系统，操作简单，能够快速建立MRM方法进行高灵敏度的准确定量分析。
2. 采用SPE方法，能够有效去除大鼠血浆基质中的干扰，检测灵敏度高，有较宽的线性范围和良好的定量重现性。
3. 使用SCIEX OS软件进行数据处理，快速简单，满足合规要求。



RUO-MKT-02-34044-ZH-A

实验方法

1. 样品信息

样品为单链寡核苷酸，有25个碱基组成，分子量7390

2. 样品制备

寡核苷酸标准品使用pH 8.0的10 mM Tris-HCl 溶液（含1mM EDTA）溶解，配制成储备溶液，再依次稀释出不同浓度的标品溶液。取2 μ L标品溶液加入到98 μ L大鼠血浆中得到大鼠血浆基质样品，然后采用SPE方法进行前处理，详细流程见表1，Clarity OTX SPE固相萃取96孔板及配套试剂购自Phenomenex（货号：8E-S103-CGA）。

表1. 样品制备流程

步骤	试剂
样品预处理	100 μ L血浆样品+100 μ L裂解缓冲液，震荡混匀
活化小柱	1 mL $\times$ 2次；甲醇，
平衡小柱	1 mL $\times$ 2次；50mM醋酸铵，pH 5.5
上样	200 μ L预处理样品；3-5s一滴
淋洗	1 mL $\times$ 3次；50 mM醋酸铵(pH 5.5):乙腈=1:1
洗脱	500 μ L $\times$ 2次；100 mM碳酸氢铵(pH 9.5) : 乙腈 : 四氢呋喃 = 5 : 4 : 1
吹干	氮气，40 $^{\circ}$ C
复溶	100 μ L；10 mM Tris-HCl 溶液（含1 mM EDTA），pH 8.0

3. 色谱方法

使用SCIEX ExionLC™ AE系统，色谱柱为Phenomenex Gemini NX-C18, 3 μ m ,C18 100 $\text{\AA}$,150 $\times$ 2.1 mm。流动相中加入离子对试剂1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol(HFIP, $\geq$ 99.8%)和diisopropylethylamine (DIEA, $\geq$ 99.5%)，购自sigma公司, A相：水，0.7% HFIP, 0.15%DIEA； B相：乙腈，0.7% HFIP, 0.15%DIEA。柱温：40 $^{\circ}$ C，进样体积20 μ L，分离梯度见表2。

表2. 液相梯度

Time [min]	Flow [mL/min]	B.Conc [%]
0.0	0.3	5.0
3.0	0.3	30.0
5.0	0.3	90.0
7.0	0.3	90.0
7.1	0.3	5.0
10.0	0.35	5.0

4. 质谱方法

本土化SCIEX Triple Quad™ 6500+

数据采集方法：多反应监测(MRM)

源气参数如下：

负离子模式，

喷雾气GS1: 55 psi 辅助加热气：GS2: 55 psi

气帘气CUR: 35 psi 离子源温度TEM: 450 $^{\circ}$ C

离子源电压IS: -4500 V 碰撞气CAD: 7 psi

MRM离子对信息见表3。

表3. MRM离子对信息

化合物	母离子 (Q1)	子离子 (Q3)	驻留时间 (dwell time, ms)	去簇电压 (DP)	碰撞能量 (CE)
1	614.9	288.1	180	-35	-30
2	614.9	303.1	180	-35	-34

实验结果

定量灵敏度和线性

本实验采用SPE方法对大鼠血浆样品进行前处理，经飞诺美Clarity OTX 96孔固相萃取板净化，使用本土化SCIEX Triple Quad™ 6500+系统进行数据采集和定量分析，定量下限（LLOQ）可达0.05 ng/mL（图1），空白血浆样品中无干扰，有很好的选择性和定量灵敏度。在0.05~100 ng/mL的范围内线性良好， $r^2>0.996$ （图2），准确度均在85%~115%之间。

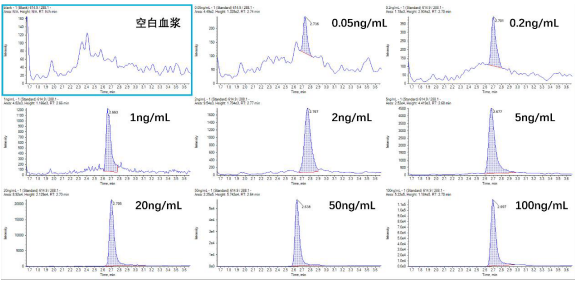


图1. 腺苷在空白血浆中以及基质中各个浓度点的提取离子流色谱图

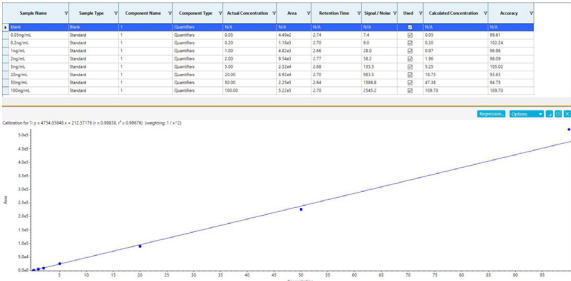


图2. 腺苷定量标准曲线的线性方程图

重现性

将经过SPE处理的低浓度（0.2 ng/mL）和高浓度（50 ng/mL）样品分别连续进样3针，具有很好的重现性，两个浓度点的精密度（RSD）分别为3.59%和2.15%（图3）。

回收率

以空白血浆经SPE处理后的复溶液作为空白基质，加入腺苷标准品，配成2 ng/mL的浓度，与同样浓度的经SPE处理的血浆标品的峰面积进行比较，计算出回收率为83.4%（图4）。

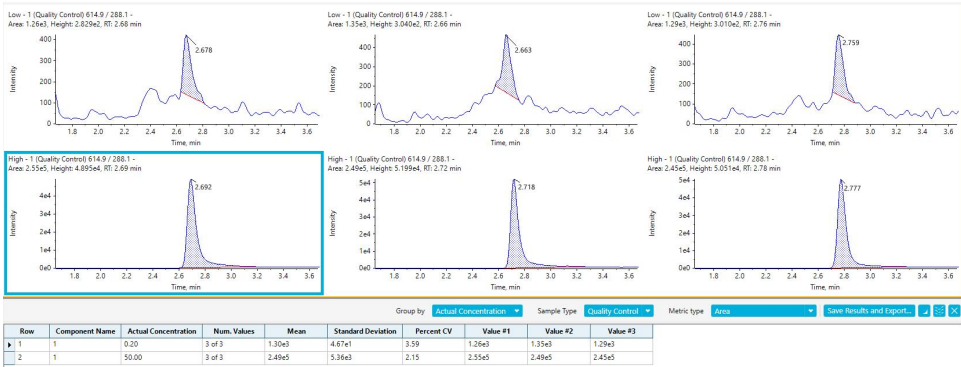


图3. 低浓度点和高浓度点峰面积的重现性

RUO-MKT-02-34044-ZH-A

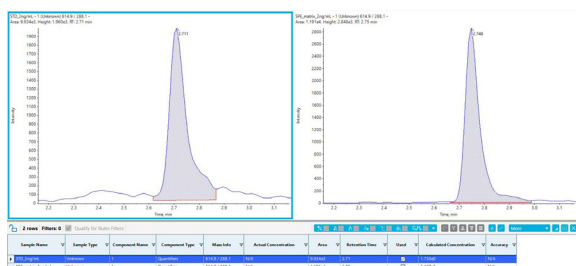


图4. 提取回收率（左图为经SPE处理的血浆标本，右图为空白基质SPE处理后加标）

总结

本实验采用固相萃取（SPE）方法进行样品前处理，使用本土化SCIEX Triple Quad™ 6500+系统对大鼠血浆中的寡核苷酸进行MRM定量。该方法定量限（LLOQ）可到0.05 ng/mL，灵敏度高，选择性好，空白血浆样品中无干扰，在0.05~100 ng/mL的范围内线性关系良好，并且具有很好的准确度和重现性，低浓度点和高浓度点的精密度（RSD）分别为3.59%和2.15%，提取回收率可达83.4%。整个流程操作快速简单，可以为血浆中寡核苷酸定量提供参考。

参考文献

1. Quantitative Analysis of oligonucleotides in Plasma by SCIEX Triple Quad™ 7500 System. RUO-MKT-02-15474-ZH-A.
2. Achieving best in class sensitivity for antisense oligonucleotides in plasma using trap-and-elute microflow LC. RUO-MKT-02-13206-A.

SCIEX ZenoTOF™ 7600 系统建立大鼠血浆中siRNA的定量方法

Quantitation of siRNA in Rat Plasma Using the SCIEX ZenoTOF™ 7600 System

侯朋艺, 司丹丹, 龙志敏, 郭立海

Pengyi Hou, Dandan Si, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX应用支持中心, 中国

Keywords: SCIEX ZenoTOF™ 7600 System, siRNA, Quantitative Analysis

引言

寡核苷酸是脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 或核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA), 一般是由15 ~ 50个核苷酸组成^[1]。天然的寡核苷酸在体内很容易被降解, 特异性低, 而人工合成的寡核苷酸作为新一代基因药物, 可以直接对基因表达进行调控, 从而起到对疾病的治疗作用。寡核苷酸药物主要包括反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO)、小分子干扰核糖核酸 (small interfering RNA, siRNA)、核酶、脱氧核酶、反基因、转录因子诱导和核酸适配体等。寡核苷酸可通过核糖核酸干扰技术、核糖核酸酶介导的靶标降解、剪接调控、非编码RNA抑制、基因激活和程序化基因编辑等一系列过程来调控基因表达。其中 ASO 和 siRNA 是最常用的基因调控工具, 应用较为广泛, 已被开发为基因治疗药物^[2, 3]。

液相色谱-质谱 (LC-MS) 联用技术将具有高分离能力的液相色谱与高灵敏度和选择性的质谱相结合, 无论是在寡核苷酸类药物的生物样品定量分析方面, 还是在代谢产物定性方面, LC-MS技术都具有准确、快速、选择性和灵敏度高等特点。

本方法采用苯酚-二氯甲烷萃取的前处理方法, 使用SCIEX ZenoTOF™ 7600 高分辨质谱系统对大鼠血浆中的

siRNA 进行直接定量, 定量下限 (LLOQ) 为665 pg/ml, 该方法特点如下:

1. SCIEX ZenoTOF™ 7600 高分辨质谱系统, 操作简单, 可采用高分辨率和高灵敏度的MRM^{HR}方法用于目标物定量分析;
2. 采用液-液萃取的方式, 能够有效地对样品中的蛋白进行净化, 前处理提取回收率 > 35%; 基质效应满足方法学验证要求;
3. 方法检测灵敏度高 (LLOQ: 665 pg/ml), 较宽的线性范围 (665 pg/ml ~ 1.33 µg/ml) 以及良好的定量重现性 (RSD% < 8%)。

仪器设备

SCIEX ZenoTOF™ 7600 系统

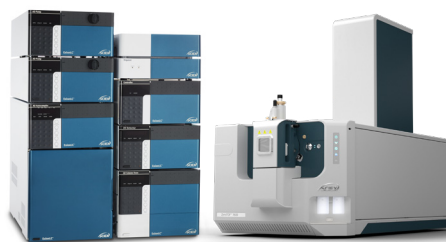


图1. SCIEX ZenoTOF™ 7600 系统

RUO-MKT-02-15330-ZH-A

实验方法

1. 样品和试剂

合成的siRNA标准品由客户提供（序列保密），长度为：正义链21个碱基，反义链21个碱基。内标 (IS) 为合成的RNA长度25个碱基。

六氟异丙醇 (HFIP)、二异丙基乙胺 (DIPEA)、苯酚和二氯甲烷购于 Sigma Aldrich。

2. 样品制备

对照品：用1.25 ml 10 mM Tris-HCl & 1 mM EDTA (pH 8) 混合溶液溶解为1 μM (约13.3 μg/ml) 的储备液备用；血浆样品：100 μl 血浆中加入200 μl 苯酚，涡旋30 s 后，加入400 μl 水，涡旋30 s 后，15000 rpm 离心10 min，取上清，加入400 μl 二氯甲烷，涡旋30 s 后，15000 rpm 离心10 min，取上清，氮气吹干，100 μl 10 mM Tris-HCl & 1 mM EDTA (pH 8) 混合溶液复溶。

3. 液相条件

液相：ExionLC™ AD系统

色谱柱：Phenomenex Kinetex EVO C18 (50 × 2.1 mm, 2.6 μm)

流动相：A: 水 (含有15 mM DIPEA 和 50 mM HFIP)

B: 乙腈 (含有15 mM DIPEA 和 50 mM HFIP)

流速：0.3 ml/min

柱温：70℃

进样体积：20 μl

梯度洗脱，洗脱程序如表1。

4. 质谱条件

SCIEX ZenoTOF™ 7600 系统

数据采集方法：高分辨多反应监测 (MRM^{HR})

采集模式：负离子

离子源参数：

喷雾电压 (ISV): -4500 V 气帘气 (CUR): 35 psi

碰撞气 (CAD): 8 雾化气 (GS1): 55 psi

辅助气 (GS2): 55 psi 辅助气加热温度 (TEM): 500℃

质谱采集参数如表2。

表1. 液相梯度条件

Time (min)	A Conc (%)	B Conc (%)
0	95	5
0.5	95	5
5	88	12
5.1	5	95
6	5	95
6.1	95	5
9	95	5

表2. 质谱采集参数

Value	
TOF MS Scan	
扫描范围 Mass Scan Range (m/z)	400-1500
去簇电压Delustering Potential (V)	-80
碰撞能量 Collision Energy (V)	-10
累积时间 Accumulation Time (ms)	50
MRM ^{HR} Scan	
siRNA-11 Charge State-MRM Transition	600.5→134.05
IS-11 Charge State-MRM Transition	670.9→303.1
去簇电压 Delustering Potential (V)	-80
碰撞能量 Collision Energy (V)	siRNA: -60 V, IS: -36 V
Zeno Pulsing	True

实验结果

1. MRM Transition的选择

采用信息依赖性扫描 (IDA) 方式，对665 ng/ml的标准品进行数据采集，同时获得高分辨一级和二级质谱信息，

一级质谱图表明, m/z 600.5261和 m/z 605.7065两个离子响应较高, 解卷积计算结果提示, 上述两个离子分别为带11个电荷的 siRNA 两条链的母离子。二级质谱图表明, 低质量端碎片响应较高, 经过MRM^{HR}进一步验证, 最终选取 m/z 134.05作为定量离子。

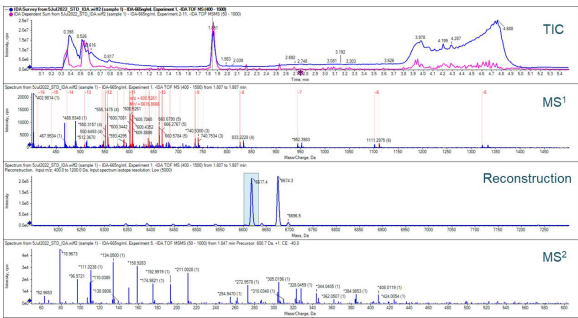


图2. siRNA 标准品一级和二级质谱图

2. siRNA 标准品定量结果

考察了 siRNA 标准品检测最低定量下限 (LLOQ)、线性范围和重现性。通过SCIEXZenoTOF™ 7600 系统对siRNA 纯品进行直接定量, 定量限 (LLOQ) 为266 pg/ml, siRNA 标准品在266 pg/ml ~ 266 ng/ml 的浓度范围内线性良好, $R^2 > 0.99$ (标准曲线如图3)。665 pg/ml 浓度标准品溶液连续重复进样6针, 考察定量重现性和稳定性。如图4所示, 连续进样6针重现性良好, RSD% 为3.88%。

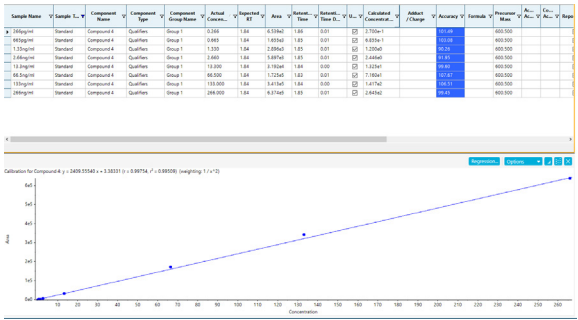


图3. siRNA 标准品线性关系图

RUO-MKT-02-15330-ZH-A

3. 血浆中 siRNA 定量结果

本实验采用苯酚-二氯甲烷对血浆中的 siRNA 进行提取, 对血浆中的蛋白进行有效去除后, 用 SCIEX ZenoTOF™ 7600 系统进行样品采集和定量分析, 大鼠血浆中 siRNA 定量下限 (LLOQ) 为665 pg/ml, siRNA在665 pg/ml ~ 1.33 μ g/ml 的浓度范围内线性关系良好, $R^2 > 0.99$ (标准曲线如图5)。1.33 ng/ml 浓度的血浆样品连续重复进样6针, 考察大鼠血浆样品中 siRNA 重现性。如图6所示, 连续进样6针重现性较好, RSD% 为7.74%。

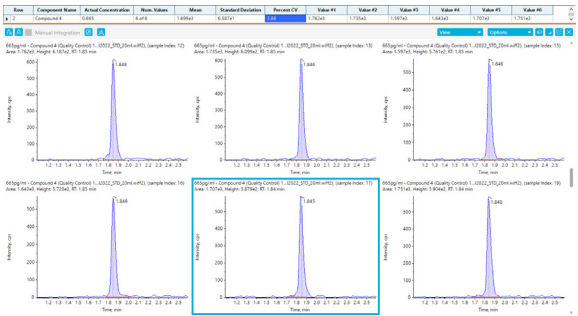


图4. siRNA 标准品浓度为665 pg/ml 连续进样6针的提取离子色谱图

Sample Name	Sample ID	Component Name	Component Type	Component Group Name	Actual Concentration	Expected Concentration	Area	Area R ²	Retention Time	Signal (Ratio)	Calculated Concentration	Accuracy (%)
665 pg/ml	Standard	Compound 4	Quaternary	Group 1	0.67	2.82	4.17042	0.998	2.82	0.00	7.282e-1	108.16
1.33 ng/ml	Standard	Compound 4	Quaternary	Group 1	1.33	2.82	8.60742	0.997	2.82	0.01	43.30	111.96
2.66 ng/ml	Standard	Compound 4	Quaternary	Group 1	2.66	2.82	1.58443	0.999	2.82	0.07	77.81	114.60
13.3 ng/ml	Standard	Compound 4	Quaternary	Group 1	13.30	2.82	6.88843	0.999	2.82	0.01	123.25	117.94
66.5 ng/ml	Standard	Compound 4	Quaternary	Group 1	66.50	2.82	4.10044	0.999	2.82	0.02	148.70	121.77
133 ng/ml	Standard	Compound 4	Quaternary	Group 1	133.00	2.82	8.32844	1.000	2.82	0.01	171.88	125.72
266 ng/ml	Standard	Compound 4	Quaternary	Group 1	266.00	2.82	1.51845	0.999	2.82	0.01	112.23	129.62
665 ng/ml	Standard	Compound 4	Quaternary	Group 1	665.00	2.82	4.80545	0.999	2.82	0.04	278.37	134.78
1.33 μ g/ml	Standard	Compound 4	Quaternary	Group 1	1330.00	2.82	8.80445	0.999	2.82	0.01	165.53	138.73

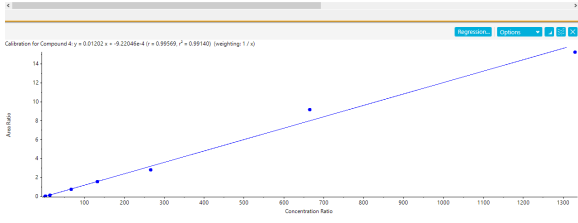


图5. 血浆中 siRNA 线性关系图

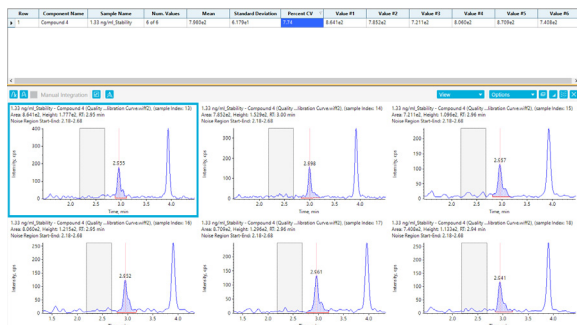


图6. 血浆中 siRNA 浓度为1.33 ng/ml 连续进样6针的提取离子流色谱图

4. 提取回收率和基质效应结果

本实验采用液-液萃取的方法对大鼠血浆中的 siRNA 进行前处理，考察了在不同浓度下的提取回收率和基质效应。如表3所示，siRNA 在1.33 ng/ml 和66.5 ng/ml 浓度下的提取回收率 > 35%，基质效应在96% ~ 106%之间。

表3. 大鼠血浆中 siRNA 在不同浓度下的提取回收率和基质效应

样品浓度 (ng/ml)	经过提取 后的样品 峰面积	空白基质 加标的峰 面积	同浓度标 准品的峰 面积	提取回收 率	基质效应
1.33	8.166e2	2.215e3	2.296e3	36.87%	96.47%
66.5	2.915e4	7.019e4	7.392e4	39.43%	105.31%

结论

本实验采用苯酚-二氯甲烷萃取的方法对大鼠血浆中的 siRNA 进行提取，通过 SCIEX ZenoTOF™ 7600 高分辨质谱系统的MRM^{HR} 采集方式进行目标物定量。该方法定量限 (LLOQ) 为665 pg/ml；在浓度665 pg/ml ~ 1.33 μg/ml范围内线性关系良好；重现性结果表明，RSD% < 8%；提取回收率 > 35%；基质效应在96% ~ 106%之间，上述结果为血浆基质中 siRNA 的定性和定量提供参考。

参考文献

1. Singh Y, Murat P and Defrancq E. Recent developments in oligonucleotide conjugation [J]. Chemical Society Reviews, 2010, 39: 2054-2070.
2. Matsui M, Corey D R. Non-coding RNAs as drug targets [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16 (3):167-169.
3. 杨洪淼, 范慧红. 反相离子对色谱法对寡核苷酸药物分析的进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35 (7): 161-164.

基于SCIEX ZenoTOF® 7600系统进行寡核苷酸药物Trecovirsen的代谢产物鉴定

Metabolites Identification of Oligonucleotide Drug Trecovirsen Using SCIEX ZenoTOF® 7600 System

侯朋艺, 陈俊苗, 司丹丹, 龙志敏, 郭立海

Pengyi Hou, Junmiao Chen, Dandan Si, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX Application Support Center, China

Key words: SCIEX ZenoTOF® 7600, Oligonucleotide, Metabolite Identification

前言

寡核苷酸 (Oligonucleotide), 由人工合成小于100 nt (nucleotides) 的修饰核糖核苷酸 (RNA) 或脱氧核糖核苷酸 (DNA) 单链或双链组成, 主要通过Watson-Crick碱基配对原则作用于靶基因, 可经过多种机制作用于基因表达。近年来, 反义寡核苷酸 (Antisense oligonucleotide, ASO) 药物的研发速度明显加快。ASO是合成的单链反义寡核苷酸, 对于某些疾病的治疗具有巨大的潜力。它们具有完全独特的吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 特征, 且与小分子化学药物存在实质性差异, 了解它们的ADME特征对于开发疗效和安全性更优的ASO新药至关重要。

在已有报道^[1]的文献中表明, ASO分子量高, 亲水性强, 因此不容易被CYP450酶代谢。ASO主要被血液和靶器官中的核酸内切酶和核酸外切酶降解代谢, 大多首先被核酸内切酶代谢, 将寡核苷酸裂解成片段, 然后在3'和5'末端进行核酸外切酶水解。

Trecovirsen (GEM91) 是一种靶向 HIV gag 基因的反义寡核苷酸, 用于探索HIV的复制机制和潜在的治疗方法。

它是一种具有25 nt的反义硫代磷酸酯寡核苷酸, 其序列为 d (P-thio) (C-T-C-T-C-G-C-A-C-C-A-T-C-T-C-T-C-T-C-T-C-T)-DNA, 分子式为 $C_{237}H_{310}N_{72}O_{131}P_{24}S_{24}$ 。

本文采用大鼠血浆和肝脏组织进行寡核苷酸药物Trecovirsen体外孵育, 基于SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨质谱系统进行数据采集, 并利用SCIEX Molecule Profiler™软件对Trecovirsen的代谢产物进行定位和结构鉴定。

SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨质谱系统进行寡核苷酸代谢产物分析的优势:

1. SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨质谱系统具有高达133 Hz的扫描速度, 只需一针进样, 即可获得丰富的二级质谱图;
2. SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨质谱系统含有可用于离子富集的Zeno阱, 从而提升低含量代谢物的二级谱图质量, 为谱图解析奠定了良好基础;
3. SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨系统强大的抗污染能力, 可有效抵抗流动相中添加的离子对试剂对质谱仪的影响;
4. SCIEX Molecule Profiler™软件内置于SCIEX OS软件中, 可用于常规小分子、寡核苷酸和多肽药物的代谢产物

MKT-32827-A

研究。在寡核苷酸代谢产物研究时，利用软件中含有的寡核苷酸代谢途径和可自定义的提峰方法，可以快速将目标代谢物进行定位并对序列进行解析。

实验方法

1. 样品制备

分别取大鼠血浆和肝脏匀浆液100 μL，加入Trecovirsen储备液使药物在样品中的终浓度为200 μg/mL，于37℃孵育72 h。

2. 样品前处理

肝脏匀浆液采用固相萃取法和液液萃取法相结合的方式进行提取。肝脏样品100 μL加入100 μL裂解液，涡旋混匀后，加入200 μL的50 mM醋酸铵-水溶液 (pH 5.5)；将Phenomenex Clarity OTX SPE板用100%甲醇溶液进行活化，1 mL×2次；用50 mM醋酸-水溶液 (pH 5.5) 进行平衡，1 mL×2次；将400 μL样品加入至SPE板中，控制流速约为3~5 s/滴；用50%乙腈-水 (含50 mM 醋酸铵，pH 5.5) 溶液进行淋洗，1 mL×2次；用100 mM 碳酸氢铵-水 (pH 9.5): 乙腈: 四氢呋喃混合溶液 (2:1:1) 进行洗脱，400 μL×2次；洗脱液在氮气流 (40℃) 下吹干；Tris-HCl 溶液 (pH 8) 100 μL复溶后，加入100 μL水饱和苯酚溶液，涡旋30 s，15000 rpm/min离心10 min，取上清液，加入100 μL二氯甲烷溶液，涡旋30 s，15000 rpm/min离心10 min，取上清液，直接进样分析。

血浆采用液液萃取法进行提取。血浆样品100 μL加入200 μL水饱和苯酚溶液，涡旋30 s后，加入400 μL水，涡旋30 s后，15000 rpm/min离心10 min，取上清液，加入400 μL二氯甲烷溶液，涡旋30 s，15000 rpm/min离心10 min，取上清液，氮气流 (40℃) 下吹干，100 μL Tris-HCl 溶液 (pH 8) 复溶，直接进样分析。

3. 液相条件

液相：SCIEX ExionLC AE高压液相系统

色谱柱：Phenomenex Kinetex EVO C18 (50×2.1 mm, 2.6 μm)

流动相：A: 水 (含15 mM DIEA和100 mM HFIP)

B: 乙腈 (含15 mM DIEA和100 mM HFIP)

流速：0.3 mL/min

柱温：60℃

梯度洗脱，洗脱条件见表1。

表1. 液相洗脱条件

Time (min)	A (%)	B (%)
0	98	2
2	98	2
10	70	30
11	5	95
13	5	95
13.1	98	2
15	98	2

4. 质谱条件

SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨质谱仪，质谱条件见表2。

表2. 质谱条件

电离模式	电喷雾电离负离子模式	喷雾电压	-4500 V
加热气温度	550℃	雾化气	55 psi
加热气	55 psi	碰撞气	7
气帘气	35 psi		
一级质谱扫描范围	m/z 400~2000	一级质谱累积时间	0.25 s
去簇电压	-80 V		
二级质谱扫描范围	m/z 50~2000	二级质谱累积时间	0.05 s
碰撞能量	-40 V ± 20 V		

MKT-32827-A

5. 数据采集和处理

采用SCIEX OS 3.3软件进行数据采集，SCIEX Molecule Profiler™ 1.3软件用于寡核苷酸药物杂质的定位和结构解析。

实验结果

使用SCIEX Molecule Profiler™软件进行Trecovirsen的结构搭建。软件中含有352个用于寡核苷酸结构搭建的修饰列表，同时支持自建新的结构修饰类型，见图1。通过软件中自带的用于寡核苷酸代谢的生物转化途径，并设置用于寻找代谢物的提峰原则，如一级质荷比偏差、同位素偏差、最小峰强度、不同电荷价态、共有二级碎片等信息，对代谢物进行定位，最终在孵育72 h的血浆样品中共找到7个代谢物（见图2），在肝脏样品中共找到16个代谢物（见图3）。

7 Groups of 9 Potential Metabolite Peaks							
Group ID	Name	Formula	Neutral Mass	Charge	R.T. (min)	Peak Area	Count
1	G1	5'(n-1)-3'(n-2)	C133H171N3O57P13	4306.42	From -7 To -6	5.42	2.44E+06
2	G2	5'(n-1)	C228H288N6O12P23	7455.66	From -7 To -7	5.42	2.42E+06
3	G3	3'(n-1)	C227H287N6O12P23	7455.66	From -11 To -11	5.40	1.53E+06
4	G4	3'(n-2)	C218H286N6O12P23	7145.67	From -6 To -7	5.38	6.44E+05
5	G5	5'(n-16)	C58H114N22O46P58	2742.29	From -3 To -4	7.46	1.03E+05
6	G6	5'(n-15)	C59H115N23O46P59	3047.31	From -4 To -4	7.49	5.04E+04
7	G7	5'(n-18)	C66H122N23O52P66	2127.25	From -4 To -4	4.55	2.19E+04

图2. 孵育72 h的血浆样品代谢物列表

16 Groups of 22 Potential Metabolite Peaks							
Group ID	Name	Formula	Neutral Mass	Charge	R.T. (min)	Peak Area	Count
1	G1	5'(n-1)	C227H287N6O12P23	7455.66	From -7 To -12	5.37	7.56E+06
2	G2	3'(n-2)	C218H286N6O12P23	7145.66	From -9 To -9	5.37	2.10E+06
3	G3	5'(n-14)	C110H138N27O68P103	3367.55	From -6 To -6	5.07	3.07E+05
4	G4	3'(n-15)	C94H112N20O59P59	3066.34	From -3 To -5	4.92	2.84E+05
5	G5	5'(n-18)	C57H108N20O46P55	1822.22	From -3 To -3	4.26	1.97E+05
6	G6	5'(n-15)	C59H110N20O46P56	3047.31	From -6 To -6	4.99	1.94E+05
7	G7	5'(n-16)	C58H111N20O46P56	2781.31	From -3 To -5	4.87	2.15E+05
8	G8	5'(n-18)	C57H108N20O46P55	1787.21	From -3 To -3	4.29	1.15E+05
9	G9	5'(n-17)	C78H119N20O43P57	2422.28	From -3 To -4	4.84	1.85E+05
10	G10	3'(n-4)	C180H238N57O88P183	5895.55	From -3 To -5	5.28	1.67E+05
11	G11	5'(n-18)	C67H139N37O88P68	2117.24	From -4 To -4	4.73	7.80E+04
12	G12	3'(n-8)	C181H219N36O88P183	5295.51	From -3 To -3	5.23	7.19E+04
13	G13	5'(n-20)	C47H108N30O59P44	1477.19	From -3 To -3	2.64	5.85E+04
14	G14	5'(n-13)-3'(n-5)	C66H130N30O79P58	2182.24	From -4 To -4	4.63	5.47E+04
15	G15	3'(n-4)	C180H238N57O88P183	6595.61	From -4 To -4	5.30	5.09E+04
16	G16	5'(n-1)-3'(n-19)	C48H130N31O59P44	1517.20	From -3 To -3	3.00	8.80E+03

图3. 孵育72 h的肝脏样品代谢物列表

SCIEX Molecule Profiler™软件中代谢物结果列表界面见图4。在结果中可展示代谢途径列表、软件自动预测的代谢物碱基序列、代谢物提取离子流图、一级质谱图和二级质谱图。



图4. SCIEX Molecule Profiler™软件中代谢物结果列表界面

SCIEX Molecule Profiler™软件除了可以展示代谢物基本信息以外，在结果阐释界面，通过设置碎片类型、允许断裂的化学键个数、二级谱图质量偏差等信息，可对目标代谢物的二级碎片进行归属，并自动计算序列覆盖度。图5展示的是代谢物3' (n-15)，从图中可知，序列覆盖度为100%，从而可对代谢物结构进行准确推导。

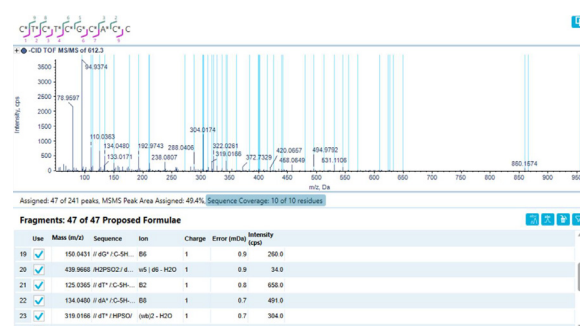
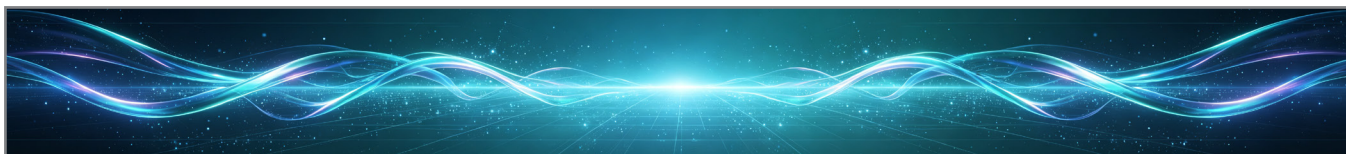


图5. SCIEX Molecule Profiler™软件中代谢物结果阐释界面

MKT-32827-A



结论

本文使用SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨质谱系统并结合SCIEX Molecule Profiler™软件建立了寡核苷酸药物Trecovirsen在血浆和肝脏中体外代谢产物分析方法。SCIEX ZenoTOF® 7600快速的二级扫描速度以及Zeno阱的二级碎片富集能力，有助于全面获得目标物的二级谱图并提升低含量代谢物二级谱图质量。SCIEX Molecule Profiler™软件可对代谢物进行精准定位并对序列进行准确解析。在经过72 h孵育的血浆和肝脏样品中，分别发现了7个和16个代谢产物，为生物基质中ASO的体外代谢提供参考。

参考文献

- [1] Julia M Migliorati, Sunna Liu, Anna Liu, et al. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of US Food and Drug Administration-Approved Antisense Oligonucleotide Drugs [J]. Drug Metab Dispos, 2022, 50 (6): 887-897.



利用SCIEX ZenoTOF® 7600系统进行寡核苷酸药物Fomiviren的代谢产物鉴定

Metabolites Identification of the Oligo Drug Fomiviren Using SCIEX ZenoTOF® 7600 System

陈俊苗, 司丹丹, 龙志敏, 郭立海

Junmiao Chen, Dandan Si, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

Key word: SCIEX ZenoTOF® 7600, Metabolites Identification, Oligonucleotide, Molecule Profiler

引言

寡核苷酸 (Oligonucleotide) 常用来作为探针确定DNA或RNA的结构, 用于基因芯片、电泳等过程中。目前, 寡核苷酸疗法随着其效力的提高和递送挑战的解决显示出巨大的潜力, 在研的寡核苷酸药物种类很多, 包括反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO)、小干扰核糖核酸 (small interfering RNA, siRNA)、微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 等。其中ASO这种类型的寡核苷酸因其高特异性和达到以前不可治疗目标的能力而变得越来越重要。

药物代谢产物分析是新药研发流程中重要的一环, 是决定药物能否上市的关键因素之一, 而采用LC-MS技术进行寡核苷酸类药物分析中也存在诸多难点, 如其分子量较大易产生多电荷、金属加合离子干扰、色谱柱不保留及基质前处理复杂等也给寡核苷酸类药物代谢产物分析带来较大难度。另外, 如果没有相关的数据处理软件, 从大量的血浆或组织样本产生的背景离子中识别并准确鉴定到潜在寡核苷酸的代谢物也是特别困难的。

本方法采用SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨系统对小鼠肝脏组织体外孵育方式进行处理的反义寡核苷酸药物Fomiviren进行代谢产物分析。采用SCIEX Molecule Profiler™软件进行数据处理, 对Fomiviren相关的肝脏组织代谢物进行了准确鉴定。

ZenoTOF® 7600系统进行寡核苷酸代谢产物分析的优势:

1. SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨系统具有灵敏度高和扫描速度快的特点, 一次进样采集到更全面的一级和二级谱图信息。
2. SCIEX ZenoTOF® 7600高分辨系统含有Zeno™ trap离子阱集功能, 在进行数据采集时可提高低丰度代谢物的二级灵敏度, 得到更高质量的二级谱图用于寡核苷酸序列覆盖度分析。
3. OS软件进行数据采集, 软件自带数据采集方法模版, 操作简单。寡核苷酸等带多电荷化合物可自动筛选多电荷母离子进行二级谱图采集, 二级采集效率更高。
4. Molecule Profiler™软件进行代谢物分析, 数据处理流程简单高效, 该软件可对寡核苷酸药物相关代谢物的碱基序列进行预测并通过二级谱图比对给出序列覆盖度信息。

MKT-32389-A

实验方法

样品制备

取匀浆后的肝组织100 μL，加入Fomiviren储备液使药物终浓度为200 μg/mL，于37℃孵育72小时。空白样本在肝组织孵育72小时后再加入Fomiviren储备液。Fomiviren是一种反义21-mer硫代磷酸寡核苷酸，其21个碱基的序列为5′GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCG3′。

表1. 样品制备流程

步骤	试剂
样品预处理	肝组织100 μl+100 μl裂解液混匀，加入200 μl 50 mM醋酸铵溶液
活化	1 mL × 2次；100%甲醇
平衡	1 mL × 2次；SPE自带的平衡液或50 Mm醋酸铵 pH5.5
上样	400 μl；3-5秒一滴
淋洗	1 mL × 2次；SPE自带的淋洗液或50 mM醋酸铵 pH5.5, 50%乙腈水
洗脱	400 μL × 2；100 mM pH9.5 碳酸氢铵：乙腈：THF（2:1:1）
吹干	N ₂ ，40℃；收集完洗脱液氮气吹干
复溶	100 μL，Tris-HCl 溶液pH8
液液萃取	复溶后加入100 μL饱和苯酚，涡旋30 s
液液萃取	加入100 μL二氯甲烷，涡旋30 s，离心取上清

样品前处理

肝组织样本先进行SPE处理后，再进行LLE液液萃取。前处理详细流程见表1，Clarity OTX SPE固相萃取板及配套试剂购自Phenomenex（货号：8E-S103-EGA）。

液相条件：

液相：ExionLC AE液相系统
色谱柱：Phenomenex Kinetex EVO C18 (50 × 2.1 mm, 2.6 μm)

流动相：A：水（含0.7% HIFP，0.15% DIEA）
B：乙腈（含0.7% HIFP，0.15% DIEA）

流速：0.3 ml/min

柱温：60℃

梯度洗脱，洗脱程序如表1：

表1. 液相洗脱梯度

时间（min）	A%	B%
0	98	2
2	98	2
10	70	30
11	5	95
13	5	95
13.1	98	2
15	98	2

质谱条件：

SCIEX ZenoTOF™ 7600高分辨系统
电离模式：电喷雾（ESI）负离子模式
扫描方式：信息依赖采集（IDA）+动态背景扣除（DBS）
气帘气CUR: 35psi 源温度 Tem：550℃
雾化气Gas1: 55psi 辅助气Gas2: 55psi
质谱扫描参数：如表2

表2. 质谱参数

μ	参数值
一级扫描范围	400-2000 Da
一级累积时间	0.25 s
二级扫描范围	50-2000 Da
二级累积时间	0.05 s
去簇电压（DP）	-80 V
碰撞能量（CID）	-40 V
碰撞能量范围（CID）	± 20
Zeno阱	ON

MKT-32389-A

数据处理：SCIEX OS 3.3软件进行数据采集，Molecule Profiler 1.3软件用于寡核苷酸代谢产物分析及序列预测。该软件可对MS/MS谱中的寡核苷酸相关断键位置产生的a,w,b,x,c,y等碎片进行标注，同时自动计算连续碎片的序列覆盖。

实验结果

使用Molecule Profiler软件进行数据处理，考虑到寡核苷酸的碱基序列、母药自身断键的个数以及83种可能的寡核苷酸代谢列表，软件自动识别不同电荷状态的潜在代谢物。软件中包含352种核酸修饰库，比如Fomiviren中的硫代修饰碱基均包含在核酸修饰库中，无需再手动添加，另

外核酸修饰库也支持手动编辑和添加新的修饰类型。图1展示了Molecule Profiler软件结果查看界面，软件发现的潜在代谢物列表也可按电荷状态进行分组，用TOF MS的数据来进行不同代谢物相对含量的对比，如图2。

据文献报道，寡核苷酸的体内代谢不像小分子那样依赖肝脏中的P450酶，其代谢主要依赖于血浆或组织中的核酸外切酶以及细胞中的核酸内切酶。本次实验结果显示，在肝脏组织体外孵育样本中Fomiviren最主要的代谢物为经核酸外切酶水解后产生的3'端去掉一个碱基后的产物，按峰面积比值计算该代谢物占全部代谢物含量的50%左右（图2）。图3展示了3'（n-1）代谢物的鉴定结果，图中可看出代谢物相应二级谱图信息丰富，软件自动进行了序列覆盖度的计算，并给出各碎片所对应的碎裂类型。3'（n-1）代谢物的20个碱基均能通过二级碎片信息进行确认，二级谱图对寡核苷酸的序列覆盖度可达100%。

除了3'端丢掉一个碱基的代谢物之外，还鉴定到3'（n-2）、3'（n-3）、3'（n-4）、3'（n-8）等多个3'端水解依次丢掉碱基的代谢物。另外也有少量5'端丢掉碱基的代谢物，如5'（n-14），以及两端均有碱基水解掉的5'（n-14）-3'（n-5）代谢物等，图4展示了部分代谢物的序列覆盖信息。本次实验共从72小时孵育的肝脏组织中鉴定到12个Fomiviren相关的代谢物，所有代谢物的TOF MS质量精度

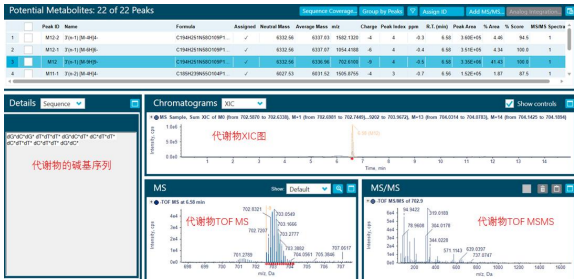


图1. Molecule Profiler软件中的结果查看界面

12 Groups of 22 Potential Metabolite Peaks										Sequence Coverage	Ungroup	Assign ID	Add MS/MS
Group ID	Name	Formula	Neutral Mass	Charge	ppm	R.T. (min)	Peak Area	% Area	% Score	Count			
1	G1 3'(n-1)	C194H251N58O109P19S19	6332.56	From -4 To -9	-0.5	6.58	4.06E+06	50.22	100.0	3			
2	G2 3'(n-4)	C165H214N48O93P16S16	5362.48	From -3 To -9	0.2	6.45	2.27E+06	28.05	100.0	5			
3	G3 3'(n-3)	C175H227N50O99P17S17	5682.49	From -3 To -5	-2.2	6.53	5.12E+05	6.33	99.6	3			
4	G4 3'(n-8)	C126H163N39O70P12S12	4097.39	From -7 To -7	0.8	6.12	1.76E+05	2.17	91.7	1			
5	G5 5'(n-14)	C68H88N22O37P6S6	2182.24	From -3 To -4	-0.5	4.96	2.86E+05	3.54	100.0	2			
6	G6 3'(n-2)	C185H239N55O104P18S18	6027.53	From -4 To -5	-0.7	6.56	2.51E+05	3.11	87.5	2			
7	G7 5'(n-1) - 3'(n-5)	C145H189N41O82P14S14	4697.44	From -7 To -7	2.4	6.33	1.15E+05	1.42	99.0	1			
8	G8 5'(n-9) - 3'(n-1)	C106H139N29O60P10S10	3407.33	From -6 To -6	-0.4	6.01	1.09E+05	1.34	83.4	1			
9	G9 3'(n-11)	C97H125N32O53P9S9	3152.32	From -5 To -5	-0.1	5.55	1.07E+05	1.33	100.0	1			
10	G10 3'(n-13)	C78H100N27O42P7S7	2527.27	From -3 To -3	0.6	5.09	9.99E+04	1.24	80.0	1			
11	G11 5'(n-14) - 3'(n-1)	C58H76N17O32P5S5	1837.21	From -3 To -3	-1.8	4.67	6.30E+04	0.78	100.0	1			
12	G12 5'(n-11) - 3'(n-1)	C87H114N24O49P8S8	2782.28	From -5 To -5	0.0	5.48	3.86E+04	0.48	100.0	1			

图2. Fomiviren的代谢物分组后信息，由于寡核苷酸存在多种电荷价态，22个潜在代谢物峰对应了13个相关代谢物，表格中峰面积为多个价态的加和。

MKT-32389-A

均小于5 ppm，且都采集到相应的二级谱图信息，经Zeno™ trap离子阱富集作用，代谢物的二级谱图质量更好，碎片信息丰富。所有12个代谢物也都进行了序列覆盖度分析，其中5个代谢物的碱基序列覆盖度可达100%。

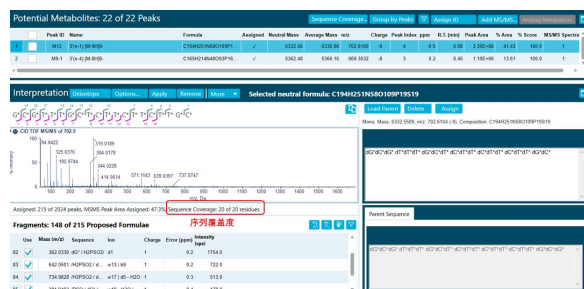


图3. Fomiviren的主要代谢物3' (n-1) 的二级谱图及序列覆盖度信息，图中可看出代谢物3' (n-1) 的20个碱基均能通过二级谱图覆盖到，序列覆盖度可达100%。

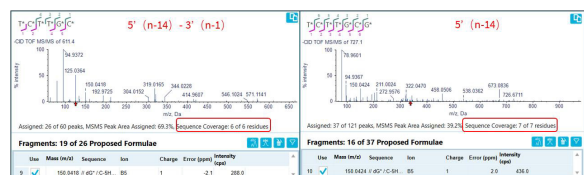


图4. Fomiviren 5'端丢掉碱基产生的代谢物相关覆盖度及二级谱图信息。

总结

本文使用SCIEX ZenoTOF® 7600系统和Molecule Profiler软件建立了寡核苷酸药物Fomiviren的体外代谢产物快速分析方法。ZenoTOF® 7600高分辨系统中的Zeno™ trap离子阱集功能可进行二级碎片离子的富集从而得到高灵敏度的二级谱图，高质量的二级谱图可带来更高的序列覆盖度信息进而用于寡核苷酸代谢物中碱基序列的准确鉴定。Molecule Profiler软件可用于多种类型药物的代谢产物鉴定分析，包含小分子化药、多肽类药物、ADC及寡核苷酸等，软件可从大量基质背景中快速提取代谢物的一级和二级质谱峰并自动进行结构式或氨基酸、碱基序列的预测分析。

参考文献

- [1]. LC-TOF-MS methods to quantify siRNAs and major metabolite in plasma, urine and tissues. Lakshmi Ramanathan, Helen Shen. Bioanalysis (2019) 11(21).

使用高分辨X500B QTOF质谱系统在亲水相互作用液相色谱 (HILIC)下对寡核苷酸进行表征

Characterization of oligonucleotide using X500B QTOF System with HILIC chromatography

王珊, 胡龙龙, 罗继, 陈泓序, 郭立海
Wang Shan, Hu Longlong, Luo Ji, Chen Hongxu, Guo Lihai
SCIEX应用支持中心, 中国
SCIEX, China

Key words: X500B QTOF系统, 寡核苷酸表征分析, 亲水相互作用液相色谱, Molecule Profiler

近年来, 核酸药物因其在基因治疗中的潜在作用而引起广泛关注, 具有高度特异性及基因靶点丰富、疗效持久等优点。随着核酸药物的药代/毒代动力学与药效学研究的发展, 核酸药物在新药开发, 临床治疗药物监测的需求不断增高, 核酸药物的生物分析方法取得突飞猛进的发展。LC-MS方法集高灵敏度、高选择性于一体, 已成为研究核酸药物及其代谢物的强有力分析工具之一。

在寡核苷酸的表征分析中, 使用反相离子对色谱法 (IP-RP) 分离寡核苷酸后进行质谱检测是一种广受认可的质谱分析方法, 该方法通常需要离子对试剂来增加保留性, 但长期使用可能会导致离子对试剂在液相色谱系统中残留, 造成液相色谱系统污染。近年来, 亲水相互作用色谱 (HILIC) 也开始用于寡核苷酸的表征分析, 相较于反相离子对色谱法, 使用HILIC色谱法分离寡核苷酸, 无需添加离子对试剂, 具有流动相配制简单, 成本低等优势, 且对液相色谱系统的污染较少, 具有更好的稳定性。基于此, 本文提出了一种基于HILIC色谱法与X500B QTOF系统相结合的分析方法, 并整合SCIEX Molecule Profiler软件的强大分析能力, 高效的实现了对寡核苷酸样品的表征分析。

样本序列信息:

寡核苷酸测试品	ggaagcgggtgacccgaagt
---------	----------------------

色谱方法:

使用SCIEX ExionLC™ AC液相系统, 使用waters BEH Amide 150 × 2.1mm, 1.7 μm色谱柱进行分析。A相: 水, 1mM甲酸铵, 0.01% NH₄OH; B相: 乙腈。柱温: 40℃; 进样量: 5 μL; 分离梯度: 见表1。

表1. 寡核苷酸分析方法的液相梯度

Time(min)	Flow(mL/min)	B.Conc(%)
0.50	0.45	80
5.00	0.45	50
6.50	0.45	50
10.00	0.45	80

质谱方法:

使用SCIEX X500B QTOF系统在负离子模式下对样品进行采集。喷雾气: 55 psi, 辅助加热气: 55 psi, 气帘气: 35 psi, 离子源温度: 550℃, 离子源电压: -4500 V, 碰撞气: 7 psi, 去簇电压: -80 V。IDA TOF MS, 扫描

RUO-MKT-02-15829

范围400-2000，采集时间0.25 s，Time bins to sum设置为8。IDA TOF MS/MS，扫描范围50-2000，采集时间0.05 s，Time bins to sum设置为4。

数据处理：

采用Bio tool kit和Molecule Profiler软件对寡核苷酸进行完整分子量及二级表征分析。

数据结果：

1. HILIC色谱法原始谱图浏览：

对寡核苷酸样品进行亲水相互作用色谱法（HILIC）分离后进入质谱检测，使用TOF MS模式进行分析，提取响应强度最高的离子的XIC图，如图1所示。

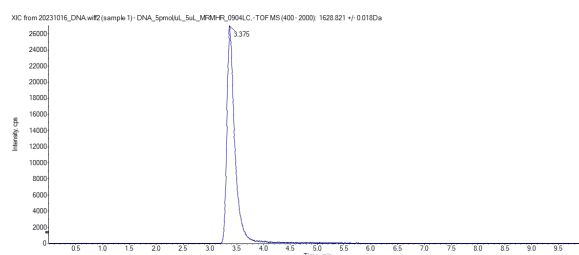


图1. HILIC色谱的XIC图

进一步在SCIEX OS软件上提取一级质谱图，得到寡核苷酸样品的一级质谱图。HILIC色谱法离子化效果较好，所有荷电价态的离子都能被检测到，且电荷分布趋势与反相离子对色谱法类似，各荷电价态的离子分布较为均匀，无明显的电荷抑制（图2A）。对于X500B QTOF系统检测的寡核苷酸样品的一级质谱图的每一簇峰，能够做到很好的基线分离，从原始质谱图的层面保障了数据结果的准确（图2B）。对一级质谱图进行解卷积处理，解卷积之后，得到寡核苷酸链的峰及不同离子的加和峰，进一步确认寡核苷酸的分子量为6519.9（图2C）。

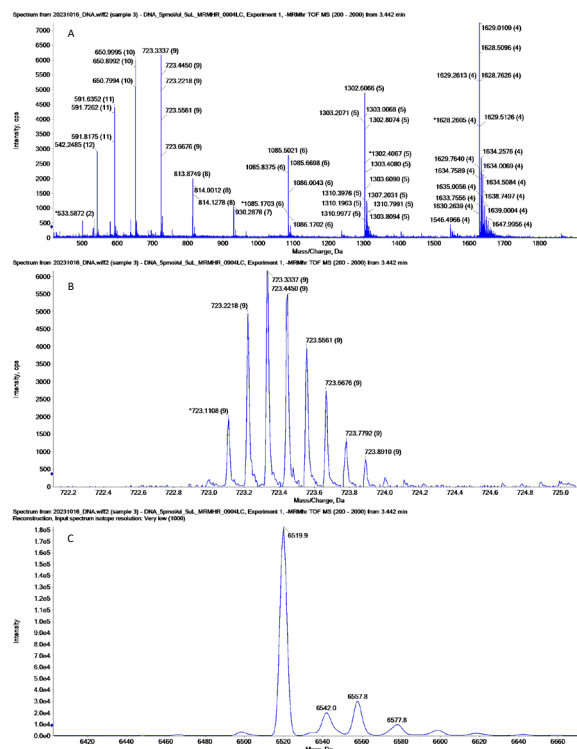


图2. 寡核苷酸样品的一级质谱图以及解卷积之后的完整分子量分布图

2.使用SCIEX Molecule Profiler对寡核苷酸样品杂质进行分析：

为了对寡核苷酸样品及其杂质进行分析，使用SCIEX Molecule Profiler软件对实验数据进行进一步处理。SCIEX Molecule Profiler是一款内置于SCIEX OS软件内的用于核苷酸分析的软件，其与OS共同使用，能够在同一台系统中完成质谱方法编辑、质谱数据采集、数据浏览以及寡核苷酸结果分析、报告出具。在Molecule Profiler软件中上传原始数据并输入核苷酸的理论序列，选择寡核苷酸的修饰类型，再设定合适的保留时间，明确谱图的搜索范围，开始对寡核苷酸及其杂质进行表征分析（图3）。

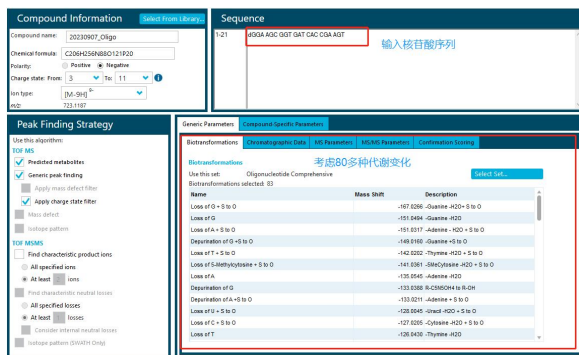


图3. Molecule Profiler方法编辑界面

2.1 基于TOF MS数据对寡核苷酸及其杂质进行鉴定和相对定量

在Molecule Profiler上选择特定的参数进行数据处理，使得寡核苷酸及其杂质能够被准确鉴定：将研究区间设置为最多允许2个键断裂，核苷酸的最小长度为5，同时允许搜索末端n-1和末端n+1的杂质（图4A），m/z的误差设置为20ppm，响应强度的最低值为50cps（图4B）。TOF-MS数据显示，寡核苷酸及其潜在杂质可以呈现不同的荷电状态（图4C），图4D显示了X500B QTOF系统获得的代谢物5'-(n-4)-4电荷态的放大图，可以看到X500B QTOF系统的高分辨率允许对每个荷电状态的同位素进行基线分离，对于5'-(n-4)-4电荷态，单同位素的质量精度为2.3 ppm，显示了较好的质量精度。

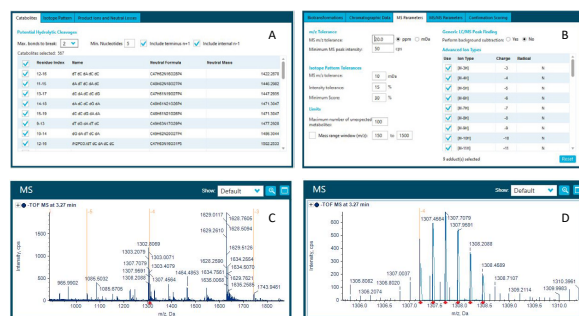


图4. 基于TOF-MS数据的潜在杂质鉴定

接下来，继续使用Molecule Profiler软件对寡核苷酸及其潜在杂质进行相对定量。在Molecule Profiler中，所有鉴定的荷电状态可以通过自动计算主要成分和各个潜在杂质的峰面积百分比进行分组。峰面积百分比是各个鉴定到的分析物的所有荷电状态的TOF-MS峰面积总和占有所有被发现分析物总峰面积的百分数。表2总结了利用Molecule Profiler软件对寡核苷酸及其杂质的相对定量结果，通过Molecule Profiler生成的寡核苷酸及其杂质的相对定量信息，能够快速准确的了解到寡核苷酸及其潜在杂质的含量情况。

表2. 寡核苷酸及其杂质的相对定量结果

Metabolite	Neutral Mass	%Area
Parent	6517.06	79.67
5'-(n-4)	5232.85	4.24
5'-(n-1)	6188.02	2.99
5'-(n-6)	4614.76	2.73
5'-(n-3)	5545.91	2.12
5'-(n-4)+5'H ₂ PO ₃	5312.82	2.01
5'-(n-2)	5858.97	1.67
5'-(n-5)	4903.81	1.59
5'-(n-3)+5'H ₂ PO ₃	5625.88	1.19
5'-(n-5)+5'H ₂ PO ₃	4983.77	1.03
3'-(n-1)	6213.01	0.76

2.2 基于TOF MS/MS数据对寡核苷酸及其杂质进行结构确认

为了进一步对寡核苷酸及其杂质的结构进行表征，使用X500B的MRM^{HR}采集模式进行靶向分析，获得MS/MS数据，并使用Molecule Profiler软件生成序列覆盖图。Molecule Profiler软件在碎片离子匹配时会考虑核苷酸在质谱中碎裂的产生的所有种类的碎片（a,b,c,d,w,x,y,wb-H₂O等类型），也可以自定义显示出特定种类的碎片。利用Molecule Profiler匹配寡核苷酸中的主成分的二级谱图，结果显示该寡核苷酸链中所有的核苷酸均被覆盖，表明寡核

苷酸样品与理论序列完全匹配（图5）。同理，对寡核苷酸杂质5'(n-4)也进行二级谱图匹配，观察到序列覆盖率为100%，进一步反映了Molecule Profiler软件鉴定的准确性。

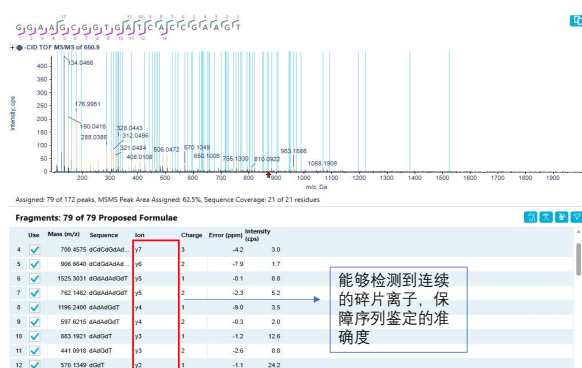


图5. Molecule Profiler对于寡核苷酸主成分的二级谱图匹配结果

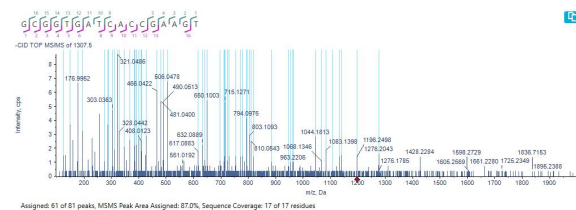


图6. Molecule Profiler对于寡核苷酸杂质5'(n-4)的二级谱图匹配结果

总结：

1. 本文提出了一种基于HILIC色谱分离寡核苷酸的方法，该方法具备较好的分离效率，且不添加离子对试剂，对液相色谱系统的污染较小，可以作为反相离子对色谱分离寡核苷酸的补充方法。
2. 通过X500B QTOF系统进行样品采集，提供了TOF-MS及TOF MS/MS优异的数据质量和质量精度，保证了数据结果的可靠性。
3. 使用SCIEX Molecule Profiler软件，能够快速准确的完成寡核苷酸及其杂质的定性和相对定量。
4. 进一步利用Molecule Profiler软件的二级谱图匹配功能，能够快速的对寡核苷酸的二级谱图进行匹配，可确保寡核苷酸及其杂质的准确鉴定。

X500B QTOF系统用于寡核苷酸Inclisiran反义链的表征

Characterization of the Antisense Strand of Inclisiran Employing the X500B QTOF System

胡龙龙, 罗继, 陈泓序, 刘冰洁

Hu Longlong, Luo Ji, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

Key words: SCIEX X500B QTOF, Inclisiran反义链, Molecule Profiler, 3'(n-1)产物

前言

Inclisiran是一种合成的小干扰RNA (siRNA) 药物, 通过RNA干扰机制靶向降解肝细胞中PCSK9 (前蛋白转化酶枯草溶菌素9) 的mRNA, 从而显著降低低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平¹。其分子结构由一条反义链 (antisense strand) 和一条正义链 (sense strand) 组成, 两条链均经过化学修饰以增强稳定性和靶向性。以Inclisiran反义链为例, 由23个核苷酸组成, 其序列中包含了多个2'-O-甲基、硫代磷酸酯和氟代等修饰, 这些修饰可抵抗核酸酶降解, 延长半衰期, 并促进反义链与RNA诱导沉默复合体 (RISC) 的结合²。

为确保Inclisiran的序列准确性、修饰完整性及工艺杂质控制, 需采用高分辨率、高灵敏度的质谱技术对其进行系统表征。本文提出一种基于SCIEX X500B QTOF系统结合Molecule Profiler软件的分析方法, 凭借其卓越的性能, 成功实现了Inclisiran反义链的序列确证、修饰表征及杂质分析等工作, 为寡核苷酸药物的表征提供了完美的解决方案。

样本信息:

Inclisiran反义链序列:

Am-sp-(2'-deoxy-2'-fluoro)C-sp-Am-(2'-deoxy-2'-fluoro)A-(2'-deoxy-2'-fluoro)A-(2'-deoxy-2'-fluoro)A-Gm-(2'-deoxy-2'-fluoro)C-Am-(2'-deoxy-2'-fluoro)AAm-(2'-deoxy-2'-fluoro)A-Cm-(2'-deoxy-2'-fluoro)A-Gm-(2'-deoxy-2'-fluoro)G-Um-(2'-deoxy-2'-fluoro)C-Um-Am-Gm-sp-Am-sp-Am

分子式: $C_{237}H_{291}F_{10}N_{101}O_{134}P_{22}S_4$

其中:

其中 "s" 表示硫代磷酸酯 (phosphorothioate, PS) 修饰, 增强核酸酶抗性并改善药代动力学性质;

"f" 表示2'-氟 (2'-F) 修饰, 提高RNA-RNA杂交稳定性;

"m" 表示 -2'-O-甲基 (2'-OMe) 修饰, 减少免疫刺激并降低脱靶效应。

色谱方法

使用ExionLC液相系统, 色谱柱为: ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18 Column, 130Å, 1.7 μm, 2.1 × 100 mm。流动相A: H₂O (10 mM DIPEA+100 mM HFIP); 流动相B: ACN (10 mM DIPEA+100 mM HFIP)。流速为0.3 mL/min, 柱温: 45°C, 进样量: 5 μL; 分离梯度: 见表1。

RUO-MKT-02-36297-ZH-A

表1.液相梯度

Time [min]	Flow [mL/min]	B.Conc [%]
0.00	0.3	2.0
0.50	0.3	2.0
11.00	0.3	20.0
15.00	0.3	80.0
17.00	0.3	80.0
17.10	0.3	2.0
20.00	0.3	2.0

质谱方法

使用SCIEX X500B QTOF系统采集数据：
IDA采集负离子模式，源气参数如下：喷雾气：55psi，气帘气：35 psi，离子源温度：550℃，离子源电压：-4500 V，去簇电压：-80V。采集模式：TOF MS，扫描范围500-2000, 累积时间0.25s；TOF MSMS，扫描范围50-2000，累积时间0.065s。

实验结果

Inclisiran反义链分子量确认

使用SCIEX X500B QTOF系统IDA模式采集样品，TIC图显示样品在8.5-9.5 min之间出峰，TOF MS图显示样本的一级MS电荷数从4价态到11价态，呈现多电荷分布。其中，-8价态（m/z：960.7665）、-9价态（m/z：853.9031）和-10价态（m/z：768.4120）为样本主要的带电形式。进一步对TOF MS图谱进行解卷积分析，得到主峰的分子量为7698Da，确定为Inclisiran反义链的主峰。解卷积结果还识别到7681Da、6961Da及7338Da等片段峰，推测为样本中的杂质峰，（图1）。

Molecule profiler软件样本建库

SCIEX Molecule Profiler (MP)软件是一款集成于SCIEX OS质谱软件平台的高性能数据分析工具，专为复杂分子的结构解析与杂质分析设计。因此，本文使用MP软件进行Inclisiran反义链样本的序列确证及杂质分析。首先，选择MP软件Compound Library模块，输入Inclisiran反义链的序列，上传质谱IDA采集数据完成建库。其次，进入

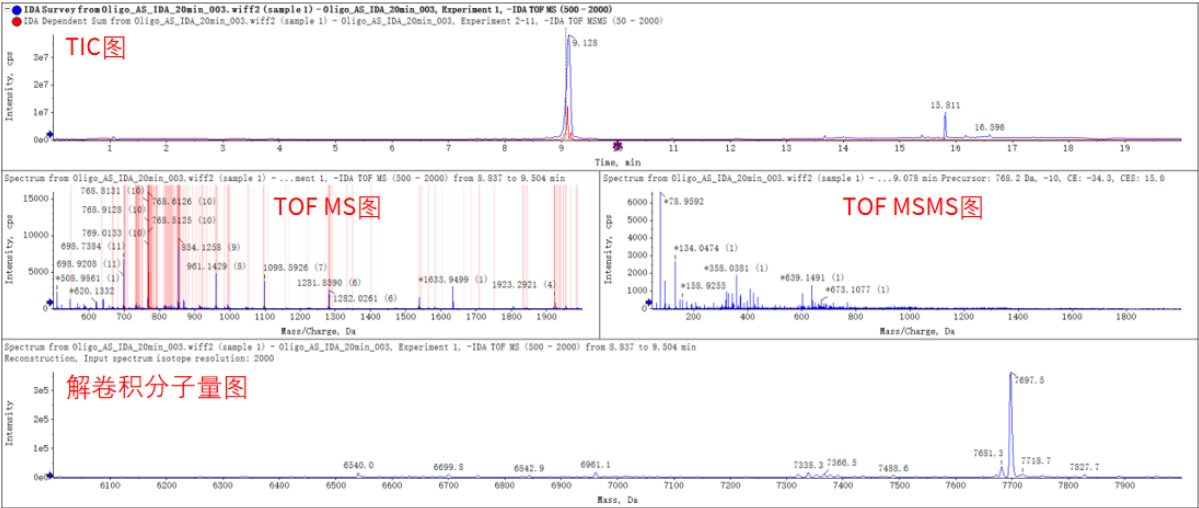
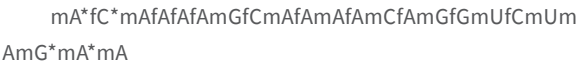


图1. Inclisiran反义链样本质谱采集图谱

Processing Parameters模块，设置搜库参数，包括MS和MSMS的Parameters，Biotransformations及色谱参数等，完成搜库方法建立。最后，在Batch中Load待分析样本，选择搜库方法，提交序列后进行数据分析（图2）。

Molecule profiler软件确证样本序列

首先，需要确认MP软件的定义方式，对于寡核苷酸样本，其5'端通常没有游离磷酸基团，比如Inclisiran反义链：



其上第一个核苷酸mA*的5'C上没有游离磷酸，它的磷酸基团其实是作用于3'C上与第二个核苷酸fC*相连的磷酸二酯键，因此mA*的硫代磷酸酯修饰也是作用于该磷酸基团上的。此定义方式应用于寡核苷酸类样本，其序列的设计与MP软件的定义方式一致（图3）。

MP软件建库

数据处理参数设置

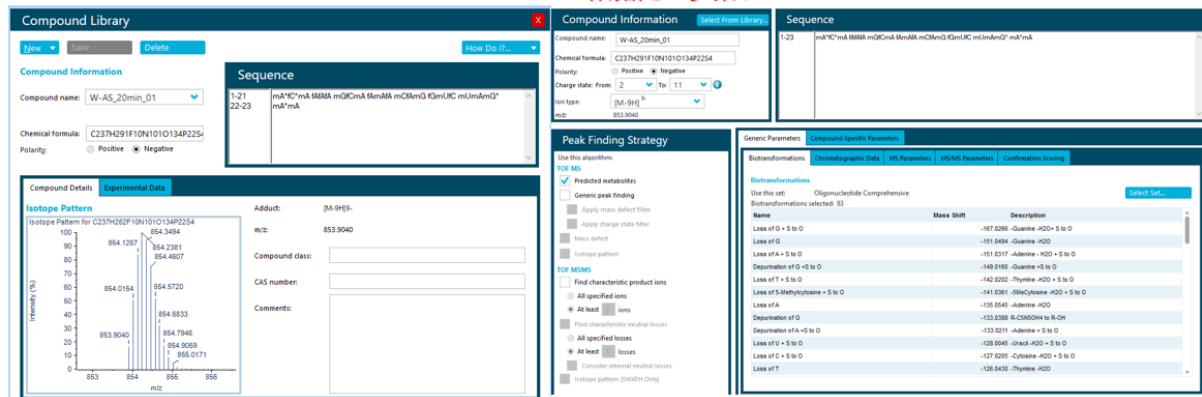


图2. SCIEX Molecule Profiler软件核酸分析方法建立

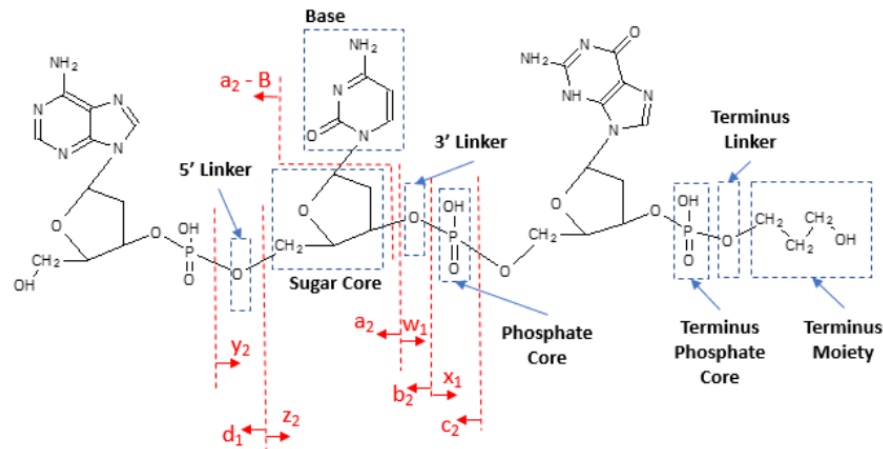


图3. Oligonucleotide样本序列定义规则及质谱裂解原理

RUO-MKT-02-36297-ZH-A

利用MP软件的鉴定结果，完成对Inclisiran反义链样本的序列确证。软件显示Parent组分为样本的主成分，其平均分子量和m/z信息与解卷积结果一致。将序列与parent组分二级MSMS进行匹配，结果显示序列覆盖率达到100%，其中d、w和y等离子的匹配信息如图4，证实了该样本主要成分与理论序列符合。

Inclisiran反义链样本杂质鉴定

完成Inclisiran反义链样本的序列确证后，继续对样本中杂质进行分析。MP软件鉴定杂质峰7681.80Da，与母药分子量相差16Da，鉴定为母药的Desulfurization产物，即硫代磷酸酯被氧化为磷酸二酯键。根据二级MSMS中的d、w等特征离子信息，确定序列中mA*、fC*和mG*等核苷酸

为发生Desulfurization修饰的位点。杂质峰7338.61Da，分子量与母药相差359Da，鉴定为母药的3'端mA丢失造成的，即3'(n-1)产物（图5），序列为：

mA*fC*mAfAfAmGfCmAfAmAfAmCfAmGfGmUfCmUmAmG*mA*

此外，MP软件还鉴定到杂质峰7015.18Da为母药的5'(n-2)产物，杂质峰6672.20Da为母药的5'(n-3)产物以及杂质峰6961.18Da为母药的3'(n-2)的环化产物等。利用MP软件对样本主要杂质进行相对定量分析，母药纯度为75.1%，母药的Desulfurization产物为最主要杂质成分，占比7.1%，其他杂质的相对含量见表2。

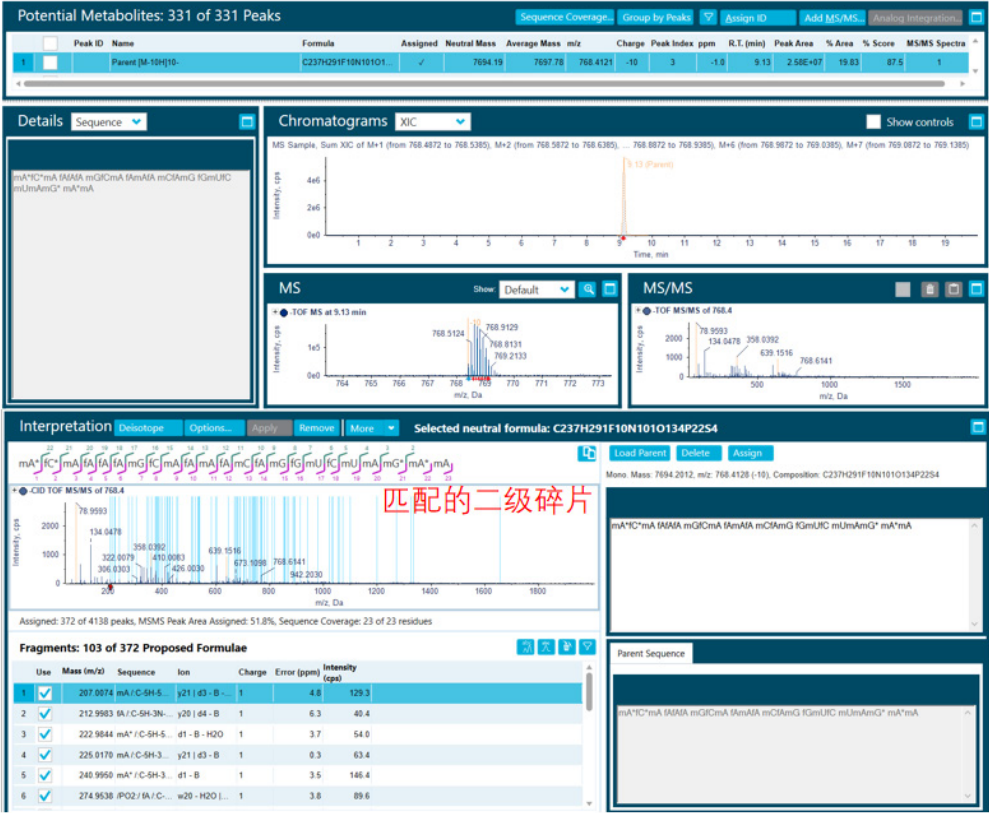


图4. Inclisiran反义链样本序列确证

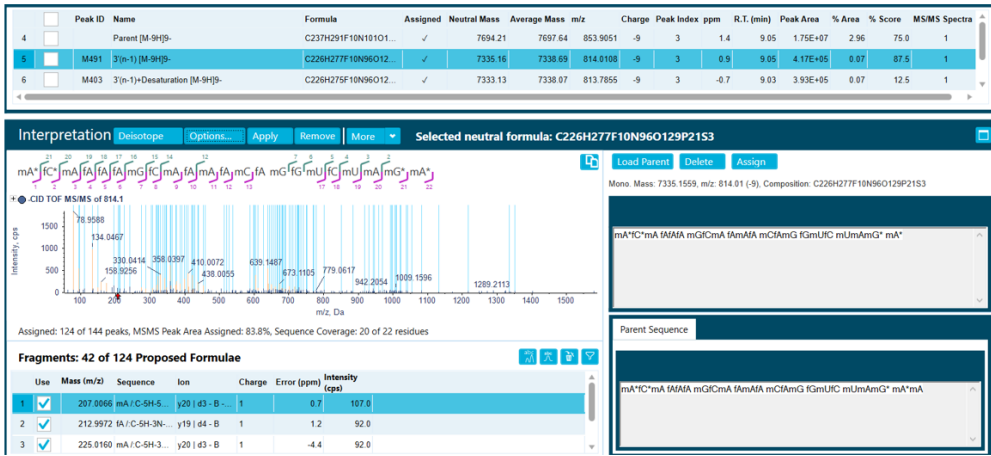


图5. 3' (n-1)产物序列匹配结果

总结

寡核苷酸（如siRNA、ASO、mRNA等）的化学修饰和结构复杂性给序列分析带来诸多挑战。高分辨质谱凭借其高灵敏度、高分辨率及优秀的碎裂能力，已成为克服寡核苷酸分析难点的核心工具，持续推动核酸药物的研发与质量控制。本文利用SCIEX X500B QTOF系统进行寡核苷酸样品采集，实现了高质量数据的获取，结合自动化软件Molecule Profiler，快速完成Inclisiran反义链的序列确证、精准识别了相关工艺杂质（如短链寡核苷酸3'(n-1)产物）和降解产物（如氧化、水解变体），并完成对杂质的相对定量。

参考文献

1. Zhang Y, et al. Inclisiran: a new generation of lipid-lowering siRNA therapeutic. Front Pharmacol. 2023 Oct 13; 14:1260921.
2. Constantine E Kosmas, et al. Inclisiran for the Treatment of Cardiovascular Disease: A Short Review on the Emerging Data and Therapeutic Potential. Ther Clin Risk Manag. 2020 Oct 28; 16:1031-1037.



SCIEX Echo™ MS高通量筛选技术用于寡核苷酸分析

High-Throughput Screening for Oligonucleotide Detection by SCIEX Echo MS

陈俊苗¹, 司丹丹¹, 龙志敏¹, 胡玲玲², 张志丹²

Junmiao Chen¹, Dandan Si¹, Zhimin Long¹, Lingling Hu², Zhidan Zhang²

¹ SCIEX应用技术中心, 中国

² 中国科学院天津工业生物技术研究所低碳制造工程生物学重点实验室

关键词: Echo MS, oligonucleotides, terminal deoxynucleotide transferase (TdT), HTS

前言

寡核苷酸既是生物研究的基础, 也是药物治疗研究的目标。虽然它们可以存在于自然化合物中, 但合成分子也被用作治疗剂或聚合酶链反应中。目前, 寡核苷酸药物疗法显示出巨大的潜力, 正在不断探索合成和修饰寡核苷酸在各种疾病治疗中的应用。寡核苷酸的高通量分析对基因组学研究、高通量筛选和临床诊断具有特殊意义。在合成生物学领域, 高通量寡核苷酸测定是必不可少的, 对于DNA合成和确保合成质量至关重要。在药物开发和生物工程领域, 需要高通量寡核苷酸分析技术来筛选和分析大量潜在的药物分子或基因。

质谱技术的应用特别是串联质谱 (MS/MS) 已逐渐促进了寡核苷酸的分析。质谱 (MS) 和液相色谱 (LC) 的结合提供了选择性分离, 并能够从复杂混合物中精确确定和定量确定目标寡核苷酸, 基于这些优势LC-MS现在已成为低通量方式下寡核苷酸的主要分析手段。基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 质谱也是一种高通量的大分子分析技术。然而, MALDI-MS依赖于不可或缺的基质来辅助分析

物的电离。由于样品-基质共晶的形态异质性, MALDI-MS受到了较高等度的限制。最近, ADE-OPI-MS (又称为Echo MS) 技术已经成为一种高通量的大规模筛选方法, 它通过使用声波能量以无接触的方式迅速将样品引入MS, 取代了液相分离的部分, 这个特点有助于防止残留。对于单个样品的分析时间范围为1到3秒, 最小样品体积为2.5纳升。它可以分析384或1536个样品, 大大减少了样品浪费; 与MALDI-MS相比, 它的数据重现性更好。寡核苷酸由于其多重电荷和质谱中额外的金属加合离子而表现出复杂的质谱行为。这种复杂性对于建立分析方法构成了挑战。

SCIEX Echo MS系统检测寡核苷酸的优势:

1. 以1秒每个样品的速度分析样品, 真正实现寡核苷酸的高通量分析。
2. 样本最小进样体积仅2.5 nL, 减少样本的浪费。
3. 样品流动相简单, 无需添加寡核苷酸常用的离子对试剂。
4. 非接触式的进样方式在快速分析样品的同时确保无残留影响。

MKT-32388-A

5. Echo MS技术与PAGE（聚丙烯酰胺凝胶电泳）方法比效率提高了60倍，而与LCMS相比则提高了200倍的分析效率。

仪器设备：

SCIEX Echo™ MS系统



实验方法：

Echo MS方法：使用100%甲醇作为载体液，流速380 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。每个样本激发体积为5 nL。样本采用含5 mM的EDTA溶液进行稀释。质谱方法采用多重反应监测（MRM）负离子模式，离子源温度为300 $^{\circ}\text{C}$ ，喷雾电压为-4,500 V，GS1为90 psi，GS2为70 psi，气帘气为25 psi，碰撞气为9 psi。每种代谢物的去簇电压（DP）和碰撞能量（CE）分别为-50 V和-55 V。CCA-ONH₂的最佳MRM离子对为638/79；CCA的最佳MRM离子对为597/79。使用SCIEX OS软件进行数据采集和数据处理。

试剂和材料：N,N-二异丙基乙胺（DIEA）购自上海麦克林生化技术有限公司。色谱级1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇（HFIP），甲酸（FA）和氟化铵（NH₄F）购自Sigma-Aldrich。色谱级甲醇（MeOH）和乙腈（ACN）购自费希尔科学（中国）有限公司。去离子水（H₂O）由Millipore Milli-Q Plus系统制备。

TdT突变体文库的生成：ZaTdT-R335LK337G质粒作为骨架模板用于突变。使用基因引物在每个位点生成突变体文库。通过PCR基于Quick-Change方法随机选择位点进行

组合突变。PCR反应使用PrimeStar DNA聚合酶（TaKaRa，中国）在以下条件下进行：反应在98 $^{\circ}\text{C}$ 下开始5分钟，然后在95 $^{\circ}\text{C}$ 下进行30个循环，每个循环包括20秒，58 $^{\circ}\text{C}$ 下进行20秒，72 $^{\circ}\text{C}$ 下进行2.5分钟，最后在72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸5分钟。然后将突变池连接到pET28b载体中，并转化到大肠杆菌BL21（DE3）宿主细胞中进行质粒表达。培养在含有50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的2YT培养基中的96孔板中，以37 $^{\circ}\text{C}$ 培养直到光密度在600 nm处达到约1。然后使用50%甘油收集突变体文库，并在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。

结果与讨论

寡核苷酸在质谱中的分析特点：

本研究对TdT突变体（ZaTdT-R335LK337G）的催化活性进行了更深入的分析。结果表明，该变体在将3'-ONH₂-dATP合并到以16种不同二核苷酸结尾的起始链中的效率较低。另外，将3'-ONH₂-dATP合并到以脱氧核糖胸腺嘧啶核苷酸结尾的起始链中的活性最低。鉴于3'-ONH₂-dATP合并到起始链CC（5'-TAATACGACTCACTCC-3'）的能力有限，我们根据反应轮廓优化了基于Echo MS的高通量质谱筛选方法。

使用电喷雾电离质谱在负离子模式下研究了起始链CC和产物链CCA-ONH₂的质谱行为。最初观察到带电荷从4到9的寡核苷酸峰（图1b），在每种带电情况下，观察到不同的离子加合物（例如，Na⁺，K⁺和NH₄⁺的加入），形成广泛的离子加合物峰簇。例如，在带有8个电荷的CC中，观察到各种离子加合物，包括[M + Na - 9H]⁻，[M + K - 9H]⁻，[M + 2Na - 10H]⁻，[M + 3NH₄ - 11H]⁻，[M + Na + K - 10H]⁻，[M + 2K - 10H]⁻和[M + 4Na - 12H]⁻（图1c）。在CCA-ONH₂中观察到类似的加合物形式，但相对丰度不同（图1d）。不同离子加合物的存在导致灵敏度降低了约1个数量级。此外，与每个离子加合物相关的同位素峰簇进一步降低了灵敏度约一个数量级。总体而言，寡核苷酸的质谱行为非常复杂。不同的带电荷数、复杂的离子加合物峰和同位素峰簇的存在共同导致了3-4个数量级的灵敏度降低，对质谱分析构成了重大挑战。

MKT-32388-A

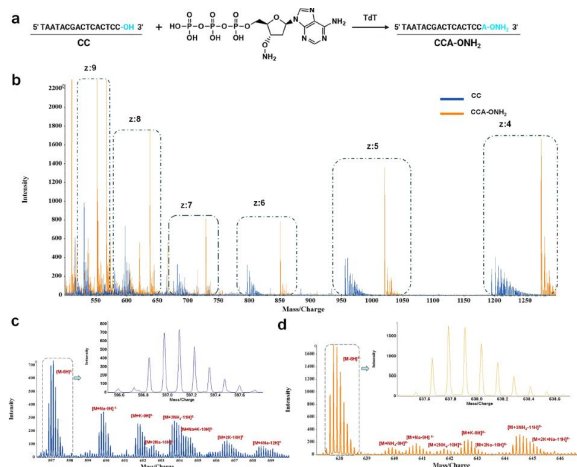
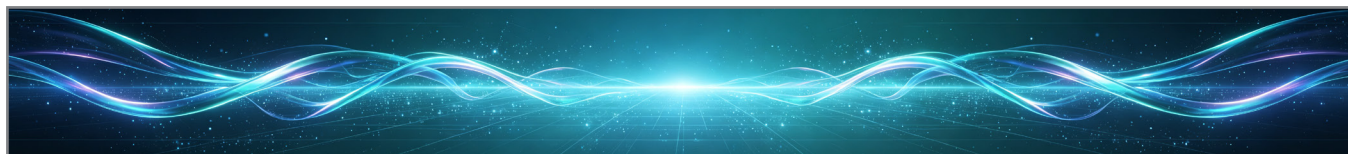


图1. 寡核苷酸的质谱峰。 (a) 通过TdT催化将3'-ONH₂-dATP嵌入CC的示意图。(b) CC和CCA-ONH₂在质谱中的质荷比图，Z是电荷数。虚线处显示了CC和CCA-ONH₂在不同电荷下的峰值。(c) CC带8个电荷的丰度最高。(d) CCA-ONH₂同样是8个电荷丰度最高。

Echo MS方法的优化:

在离子加合物峰簇中，[M - nH]ⁿ峰显示出最高的强度，并被选为前体离子候选物。因此，我们优化了具有不同电荷的[M - nH]ⁿ峰。图2a, b显示，具有m/z 597的[M - 8H]⁸显示出最高的强度，并成为最佳的前体离子，而m/z 79被确定为最佳的产物离子。最终，最佳的MRM离子对被确定为597 → 79。同样，CCA-ONH₂的最佳MRM离子对被优化为638 → 79。之后优化了Echo MS中特别关注的载体液和延迟时间，这两个主要因素会影响峰形和灵敏度。载体液体系主要优化了100%甲醇（MeOH）和70%乙腈（ACN）/30%水（v/v），另外也优化了这两种体系中分别添加氟化铵（NH₄F），甲酸（FA）和乙二胺四乙酸（EDTA）对灵敏度的影响。

甲醇作为载体液可得到没有拖尾也比较光滑的色谱峰，同时保持了较高的信噪比。在载体液中引入NH₄F，甲酸（FA）和乙二胺四乙酸（EDTA）后，NH₄F的表现优于其他两种。通过测试三种不同浓度（0.5 mM，1 mM和2 mM）的NH₄F与不同载体液的变化确定了NH₄F的最佳用

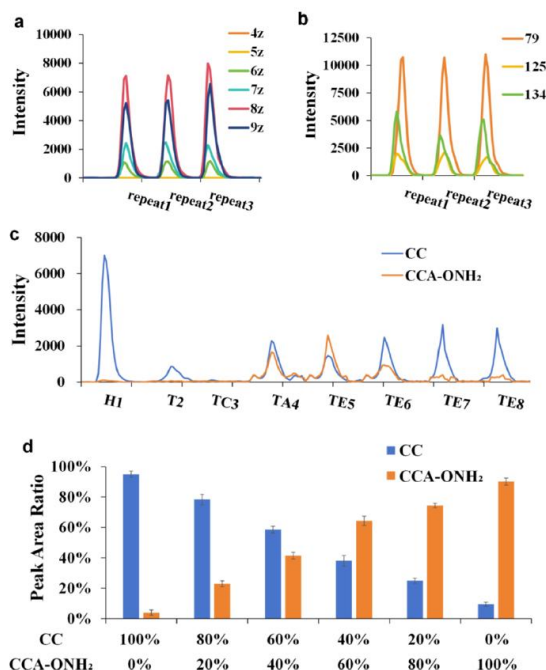


图2. Echo MS方法的优化。 (a) MRM模型的前体离子参数优化。研究Echo MS中不同电荷的CC的峰响应：4z: 1195.2 m/z; 5z: 965 m/z; 6z: 796.5 m/z; 7z: 682.4 m/z; 8z: 597 m/z; 9z: 530.5 m/z。 (b) MRM模式下不同碎片离子的质谱强度优化。 (c) 在不同溶剂中观察到5 μM CC的质谱峰：H1: H₂O, T2: Tris, TC3: Tris and CoCl₂, TA4: Tris and CoCl₂ with 3' -ONH₂-dATP, TE5: TA4 + 1 mM EDTA, TE6: TA4 + 3 mM EDTA, TE7: TA4 + 5 mM EDTA, and TE8: TA4 + 8 mM EDTA。 (d) 图表显示了CC和CCA-ONH₂在不同比例(1:0, 1:4, 3:2, 4:1, 0:1)混合时的百分比，水平轴上对应的总峰比例。

量。结果显示，具有不同NH₄F浓度的载体液与纯甲醇相比并没有产生更高的强度。因此，只选择了纯甲醇作为最终的载体液。额外的延迟时间是指两个连续样品之间的暂停时间，可调节以实现更好的基线分离。测试了一系列载体液流速以在灵敏度和峰形之间取得平衡，最终选择了380 μL/min的纯甲醇用于所有后续实验。结果显示，额外的1到4秒延迟时间提供了足够的基线分离，我们选择了2秒以实现最佳基线分离。基线分离时间与系统默认时间1秒结合，导致对384个样品的总分析时间为20.2分钟。平均每个样品只需3秒。这种方法比改良的尿素PAGE方法高效约60

倍，后者需要100分钟来分析32个样品，平均速率为187.5秒/样品。它比使用LC-MS方法高效约200倍，后者可以在10分钟内分析一个样品，平均速率为600秒/样品。

在使用Echo MS对TdT酶反应的检测中发现了显著的干扰，为了确定这种干扰的来源，对反应中的每个溶剂成分进行了独立测试。结果发现，干扰主要来自高浓度的磷酸盐缓冲溶液（PBS），干扰的主要原因是PBS中的磷酸盐基团可能会产生m/z 79，该离子对应于CC和CCA-ONH₂的产物离子。将缓冲液替换为Tris可以显著减少干扰，Tris反应溶液中含无机盐成分存在基质效应，经过10倍稀释后，这种基质效应问题得到解决。此外，酶反应体系中含有1 mM的CoCl₂，这是一种已知会在电喷雾离子源中引起显著离子抑制的金属离子，为了减轻Co²⁺引起的离子抑制，测试了N,N-二异丙基乙胺（DIEA）、1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇（HFIP）和EDTA对金属离子螯合的效果。结果表明，EDTA可以有效螯合金属离子。通过测试四种不同浓度（1、3、5和8 mM）的EDTA来优化EDTA的用量，其中5 mM到8 mM的EDTA是合适的。实验过程中我们发现，在酶反应后添加修饰基团的CCA-ONH₂中，大约有10%的CC干扰峰。这使我们怀疑CCA-ONH₂中的CC干扰主要来自CCA-ONH₂本身固有的CC链。然而，这种现象不会影响TdT高通量筛选的相对定量结果。总的来说，Echo MS分析结果与PAGE所示的范围非常吻合，也证实了其适用于TdT活性的高通量筛选。

TdT突变体的高通量筛选：

基于质谱的高通量工作流程被开发用于TdT的定向进化（图3a），包括突变体库构建，菌株培养，蛋白表达和纯化，蛋白功能表征，样品转移到384孔板，使用Echo MS高通量质谱分析。整个工作流程通过集成离心机，孵育器，自动工作站和其他相关仪器进行自动化。根据ZaTdT-R335L-K337G蛋白的DNA聚合酶结构区域，随机选择了30个残基位点，并将其分为10组进行高通量筛选（图3b）。根据高通量筛选的结果，阳性对照转化率（CR%，产生的CCA-ONH₂含量与剩余CC含量的比率）的平均值为31%，只有3%的库菌株超过了这个比率，这些菌株用于下一步的确认。

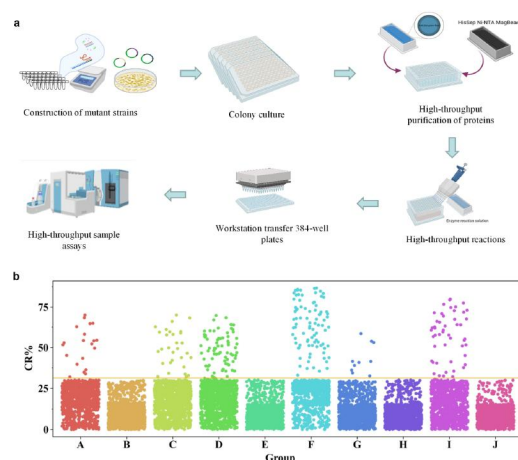


图3. TdT突变体的高通量筛选。(a) TdT的高通量筛选工作流程。(b) TdT的高通量筛选位点区域和高通量质谱分析结果中CCA-ONH₂峰面积与CC峰面积的比值。

结论

本研究建立了一种高通量的Echo MS分析方法（每个样品3秒），用于筛选TdT突变库。它可以有效区分单个碱基的插入效率。经过两轮筛选后，突变体ZaTdT-R335L-A193T-G337H-H478G的催化活性比阳性对照高出约2.5-4倍。ZaTdT-R335L-A193T-G337H-H478G为进一步工程改造提供了起点，为开发能够高效结合可逆阻断核苷酸的TdT铺平了道路。这一进展在从头合成基因的新兴领域中具有特殊意义。此外，Echo MS分析技术在DNA编码库筛选、寡核苷酸类似物疫苗研究、基因合成等多个领域具有巨大潜力。预计这种先进的分析工具将在不久的将来促进医学和生物科学的加速发展。

参考文献

- [1] High-Throughput Screening for Oligonucleotide Detection by ADEOPI-MS. Lingling Hu, Zhidan Zhang. Analytical Chemistry. 2024. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c02110>.



高通量BioPhase™ 8800系统：用于不同片段长度寡核苷酸纯度分析

High throughput BioPhase™ 8800 system: used for purity analysis of oligonucleotides with different fragment lengths

唐红梅, 张晓霞, 陈泓序, 罗继, 刘冰洁

Hongmei Tang, Xiaoxia Zhang, Hongxu Chen, Ji Luo, Bingjie Liu

SCIEX, 中国

SCIEX, China

Key words: BioPhase™ 8800, oligonucleotides, CGE, Chemical Synthesis

1. 引言

寡核苷酸在生命科学领域有广泛应用, 如作为核酸载体用于蛋白表达以及药物递送、用于构建纳米结构用于生物传感、作为探针用于基因检测等。目前合成技术得到的寡核苷酸中会存在杂质即错误序列, 其中难以除去的杂质是 (n-1) 缺失序列 (与完整长度为 n 的寡核苷酸相比仅相差一个核苷酸), 从而导致产物纯化比较困难。基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则中提到核酸类载体一般应分析错误序列、不完整序列、降解片段等的残留水平, 因此需要对其纯度进行分析。目前合成DNA片段可以通过高通量芯片合成仪一次可以得到多条不同片段长度的单链DNA, 因此需要高通量的分析仪器应用于寡核苷酸的纯度分析。BioPhase™ 8800多通道毛细管电泳系统搭配毛细管凝胶法基于核酸片段大小的差异进行分离, 具有分辨率高、可实现单核苷酸差异的分离以及定量准确等优势; 同时BioPhase™ 8800多通道毛细管电泳系统采用了八通道分离毛细管, 大大缩短了方法开发和优化的时间, 能够有效加快DNA样品分析检测进程。

本文以不同片段长度的寡核苷酸为例, 在BioPhase™ 8800多通道系统上采用毛细管凝胶电泳方法搭配SCIEX成熟稳定的凝胶电泳分析试剂盒对样品进行纯度分析。本文通过BioPhase™ 8800多通道系统可以在一次实验中实现不同浓度的样品进行条件优化, 得到最佳上样浓度条件。同时也展示了在一次实验中得到8个不同片段的纯度结果, 满足多个样品同时检测的需求。

2. 试剂及方法

2.1 试剂及样品

SDS-MW试剂盒中使用的试剂: SDS Gel buffer (SCIEX, A30341)、pH 9.0样品缓冲液、0.1 M盐酸溶液、0.1 M氢氧化钠溶液、50 μm内径的熔融石英毛细管(SCIEX, 338451), 总长为30.2 cm。

样品: 不同片段长度的寡核苷酸由某核酸片段生产企业提供, 浓度均在5 μM, S1-S9片段给长度分别为22 nt, 23 nt, 24 nt, 33 nt, 38 nt, 39 nt, 48 nt, 72 nt, 145 nt, 其中S5-S9样品具有染料修饰。

2.2 样品及前处理

制备不同浓度样本溶液: 将样品置于1.5 mL离心管

MKT-34552-A

中，加入超纯水将核酸样品稀释至0.1 μM，准确移取100 μL稀释的样品溶液加入到装有样品管的CE专用试剂瓶中，作为待测溶液。

2.3 仪器及方法设置

CE-SDS方法实验条件：采用BioPhase™ 8800多通道毛细管电泳分析系统，UV检测器，采集频率：4 Hz，采集波长260 nm；毛细管卡盒：50 μm × 30 cm BioPhase 8800 熔融石英毛细管卡盒(PN 5080121)；毛细管温度：25 °C；样品室温度：15 °C；进样条件：-5 kV，20 s；分离条件：-10 kV，40 min。

毛细管针间冲洗和胶填充：0.1 mol/L氢氧化钠溶液在70 psi压力下冲洗3 min，然后用0.1 mol/L盐酸溶液在70 psi压力下冲洗1 min，再用去离子水在70 psi压力下冲洗1 min，最后用SDS凝胶分离缓冲液在70 psi压力下冲洗10 min。

3 结果与分析

3.1 实验方法开发

毛细管的温控对样品分离结果很重要，一般情况下温度升高出峰变快，峰型更尖锐，温度降低迁移时间变慢，相应的分离度有所改善；本文以片段差异较小的S1和S3混合样品的分离进行考察，其它实验条件固定，仅改变毛细管的温度；实验结果表明，毛细管温度为25 °C时，混合样品中的两个片段峰分离度更好，可以实现基线分离，因此，选择25 °C作为混合样品的最终毛细管温度；其毛细管凝胶电泳分离结果如下图1所示。

3.2 不同片段长度寡核苷酸纯度分析结果展示

确认最终实验条件后，将片段长度分别为22-145 nt的9个单链DNA样品分别放置在BioPhase™ 8800系统的不同通道中进行分析，一次实验即可得到不同片段长度样品的纯度结果，具体分离结果如下图2所示；S5、S6、S7、S8、S9样品均存在染料修饰，S5、S7和S9的荧光修饰表现出峰型宽钝情况，不同的染料修饰峰型宽钝程度不一样，可能是染料修饰对样品的构象有一定影响导致；而S6和S8样品

的染料修饰则对样品迁移时间有一定的影响，导致样品出峰时间不完全按照片段长度大小。其中S1、S2、S3片段长度仅相差一个核苷酸，从分离谱图可以看出这三个样品可以基线分离。S1-S9样品纯度分别为92.43%、89.77%、93.42%、97.78%、93.84%、91.91%、99.04%、95.27%、91.07%，结果表明毛细管凝胶电泳方法适用于不同片段寡核苷酸的分离。

3.3 BioPhase™ 8800多通道分析系统毛细管凝胶电泳方法重复性考察

在BioPhase™ 8800系统的A-H通道中放置是同样体积的S7样品，同时对8个通道的样品同时连续进样6次，考察单次进样中8通道间的一致性，以及单通道内连续进样6次的重复性；实验结果表明单次进样8通道间表现出良好

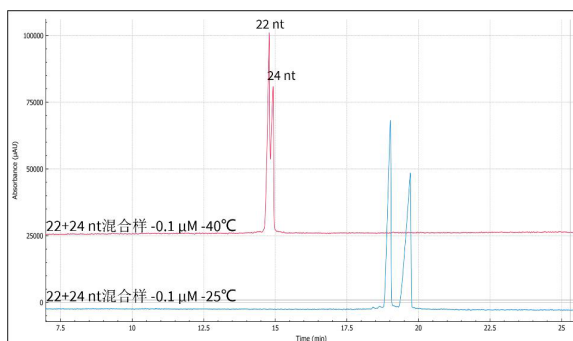


图1. S1和S3混合样品温度条件优化的结果

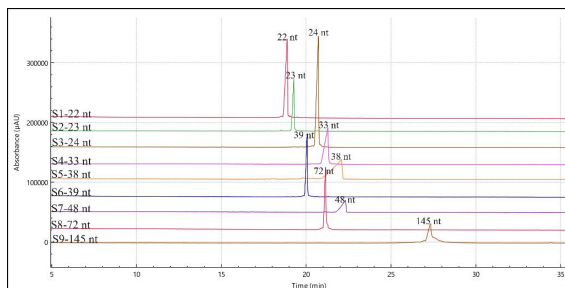


图2. 不同片段寡核苷酸样品分离结果

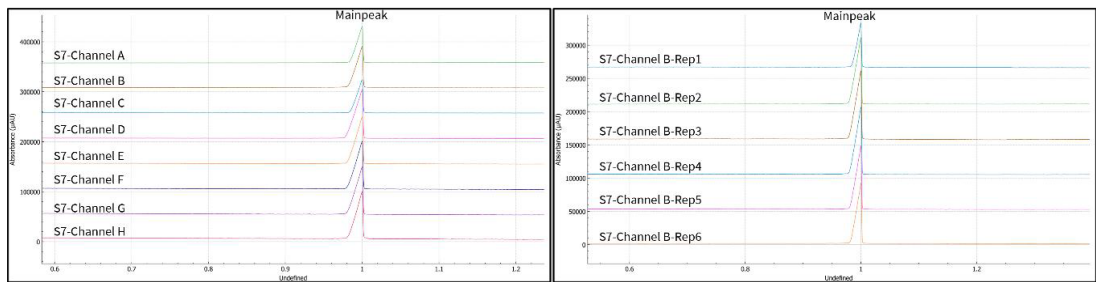


图3. S7样品在不同通道间以及同一通道内分离结果

表1. S7样品在A-H不同通道重复性结果

编号	迁移时间 (min)	校准峰面积百分比 %
Channel A	17.01	98.83
Channel B	16.98	98.78
Channel C	16.97	99.26
Channel D	17.05	98.94
Channel E	17.07	98.88
Channel F	17.02	98.95
Channel G	17.16	99.27
Channel H	17.05	99.31
RSD	0.36	0.22

表2. S7样品在B通道6针重复性结果

编号	迁移时间 (min)	校准峰面积百分比 %
Rep-1	16.98	98.81
Rep-2	16.94	98.82
Rep-3	16.88	98.58
Rep-4	16.88	98.82
Rep-5	16.89	98.97
Rep-6	16.89	98.67
RSD	0.24	0.14

的一致性，电泳图见图3a，统计结果见表1，主峰的迁移时间的RSD值< 1.0%，并且校正峰面积百分比的RSD值也< 1.0%；单通道6针进样重复性好，电泳图见图3b，统计结果见表2，主峰的迁移时间的RSD值< 1.0%，并且校正峰面积百分比的RSD值也< 1.0%。实验结果证明：BioPhase™ 8800系统不同通道之间以及单通道连续6针进样重复性良好。

4. 结论

毛细管凝胶电泳法是依据核酸片段大小的差异进行分离，广泛应用于核酸的纯度分析。本文在BioPhase™ 8800多通道系统中采用毛细管凝胶电泳法搭配SCIEX成熟稳定的SDS-MW分子量分析试剂盒，可有效应用于寡核苷酸纯度分析，主要表现出如下优点：

- 1. BioPhase™ 8800多通道系统可以一次实验同时运行8个样品，大大节约了样本分析检测时间，显著提高检测通量和分析效率；
- 2. 毛细管凝胶电泳法适用性广，可以分离不同片段长度的寡核苷酸，分离度高。
- 3. 实验结果重复性好，同一样品8个通道间以及单个通道内一致性高，迁移时间及校正峰面积百分比的RSD值均小于1%，表明毛细管凝胶电泳方法重复性好。

毛细管凝胶电泳法对单链寡核苷酸的纯度分析

Purity analysis of oligonucleotides by capillary gel electrophoresis

唐红梅, 王文涛, 陈泓序, 罗继, 郭立海

Hongmei Tang, Wentao Wang, Hongxu Chen, Ji Luo, Lihai Guo

SCIEX, 中国

SCIEX, China

Keywords: CGE, Oligonucleotides, Primer

1. 引言

寡核苷酸是一类由人工合成的若干个短链核苷酸的总称, 它可作为DNA合成的引物 (Primer)、基因探针 (Probe) 等, 在现代分子生物学研究中具有广泛的应用。此外, 随着生物技术的不断发展, 寡核苷酸也可作为一种新型的治疗药物, 通过作用于信使 RNA (mRNA) 来调控疾病基因转录翻译, 可以达到传统药物无法替代的效果, 尤其是对遗传疾病、肿瘤、代谢类疾病及罕见病等非常有优势, 被认为是继抗体药物及细胞免疫疗法之后的下一代新型药物。目前在研的寡核苷酸药物种类很多, 包括反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO)、小干扰核糖核酸 (small interfering RNA, siRNA)、微小核糖核酸 (microRNA, miRNA)、核酸适配体 (aptamer) 等。其中ASO是一种单链寡核苷酸, 是常用的基因调控工具之一, 已被开发为基因治疗药物。目前寡核苷酸药物几乎都是采用化学方法合成, 用高效液相色谱分离纯化, 该方法获得的寡核苷酸容易被杂质和截短的错误序列 (又叫失败序列) 所污染, 其中难以除去的杂质是大量 (n-1) 缺失序列 (与完整长度为 n 的寡核苷酸相比仅相差一个核苷酸), 从而导致产物纯化十分困难。因此, 迫切需要开发一种可实现单核苷酸差异分离的方法, 用于单链寡核苷酸以及引物的纯度分析。

本文以两条片段长度相差1 nt的寡核苷酸引物 (33 nt 和34 nt) 为例, 基于SCIEX成熟稳定的单链DNA分析试剂盒

(ssDNA 100-R), 利用毛细管凝胶电泳方法对其进行了分离。该方法基于核酸片段大小进行分离, 分辨率高, 可实现单核苷酸差异的分离; 定量准确, 可用于单链寡核苷酸的纯度测定。

2. 试剂及方法

2.1 试剂及样品

试剂: 本实验采用ssDNA 100-R试剂盒 (SCIEX, 477480), 其中包含DNA涂层毛细管 (SCIEX, 477477), 总长为65 cm, 内径100 μ m; ssDNA 100-R Gel凝胶粉末 (SCIEX, 77621)、Tris-Borate Buffer (SCIEX, 338481)、7 M Urea (SCIEX, 338481)、pd(A) 40-60 Test Mix (SCIEX, 477626)、磁子 (Sigma-Aldrich)、0.45 μ m滤膜 (Sigma-Aldrich)、去离子水 (Millipore)。

样品: 两条合成的寡核苷酸引物混合物, 浓度分别为388 μ M, 片段长度分别为33 nt和34 nt。

2.2 样品及前处理

制备Tris-Borate-Urea Buffer溶液: 先用甲醇清洗磁子, 并用去离子水将磁子冲洗干净; 将135 mL的去离子水添加到含有Tris-Borate干粉的试剂瓶中, 使用磁子在800 rpm下搅拌溶液20至30 min, 确保硼酸完全溶解。缓慢将干燥的7 M尿素添加到Tri-硼酸盐缓冲液中, 同时继续搅拌溶液; 在室温下搅拌溶液2 h, 直至尿素完全溶解且缓冲液澄清; 将Tris-Borate-Urea缓冲液储存在2-8 $^{\circ}$ C条件下, 保质期为30天;

RUO-MKT-02-14994-ZH-A

制备ssDNA 100-R Gel Buffer溶液：向冻干的凝胶粉末中加入5.0 mL经0.45 μm滤膜过滤后的Tris-Borate-Urea缓冲液；用干净且干燥的磁子在800 rpm下搅拌溶液4-6 h，直到凝胶完全溶解；将凝胶缓冲液储存在2-8 °C条件下，保质期为30天。

制备寡核苷酸样本溶液：将样品置于1.5 mL离心管中，加入无酶水稀释至终浓度为77.6 μM；准确移取20 μL稀释后的样品溶液加入到PA 800 Plus 纳升样品管中，用于后续检测；

2.3 仪器及方法设置

采用SCIEX PA 800 Plus药物分析系统，匹配紫外检测器，采集频率：4 Hz，检测波长为：254 nm；窗口狭缝：100 × 200 μm；DNA涂层毛细管，100 μm内径，20/30.2 cm (有效长度/总长度)；进样条件：-3 kV, 4 s；分离电压：-9.0 kV, 40 min；毛细管温度：30 °C；样品室温度：15 °C。毛细管活化方法、凝胶填充方法、分离方法、关机方法设置如下图；

Initial Conditions UV Detector Initial Conditions Time Program									
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments		
1	Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI-F1	BO-F1	forward	ddH ₂ O Rinse		
2	Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI-C1	BO-C1	forward	TBE Urea Buffer Rinse		
3	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI-D	BO-D1	forward	ssDNA Gel Fill		
4	Separate - Voltage	3.0 kV	5.00 min	BI-B1	BO-B1	0.17 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis between Buffer Vials		
5	Separate - Voltage	9.0 kV	10.00 min	BI-B1	BO-B1	0.17 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis between Buffer Vials		
6	End								
7									

图1. 毛细管活化方法时间程序表

Initial Conditions UV Detector Initial Conditions Time Program									
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments		
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI-D1	BO-D1	forward, In / Out vial inc 5	ssDNA Gel Fill		
2	Separate - Voltage	9.0 kV	10.00 min	BI-B1	BO-B1	0.17 Min ramp, reverse polarity, I	Pre-electrophoresis between Buffer vials		
4	End								

图2. 凝胶填充方法时间程序表

Initial Conditions UV Detector Initial Conditions Time Program									
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments		
1	Val		0.00 min	BI-A1	BO-A1	In / Out vial inc 5	ddH ₂ O Dip		
2	Inject - Voltage	5.0 kV	4.0 sec	SI-A1	BO-B1	Overide, reverse polarity	Sample injection		
3	Val		0.00 min	BI-A1	BO-A1	In / Out vial inc 5	ddH ₂ O Dip		
4	Separate - Voltage	9.0 kV	45.00 min	BI-E1	BO-E1	0.17 Min ramp, reverse polarity, b	Separation Between Buffer Vials		
6	Autoczero								
7	End								

图3. 分离方法时间程序表

Initial Conditions UV Detector Initial Conditions Time Program									
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments		
1	Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI-C1	BO-C1	forward	TBE Urea Buffer Rinse		
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI-D1	BO-D1	forward	ssDNA Gel Fill		
3	Separate - Voltage	9.0 kV	10.00 min	BI-B1	BO-B1	5.00 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis between Buffer vials		
4	Lamp - Off						Lamp Off		
5									

图4. 关机方法时间程序表

缓冲液的入口盘及出口盘顺序摆放如下图5所示：

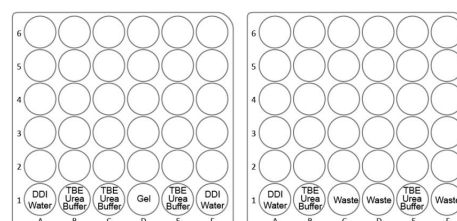


图5. 左侧的缓冲剂入口托盘 (BI) 和右侧的缓冲剂出口托盘 (BO)

每个试剂的体积如下：

- 去离子水：1.5 mL 去离子水。
- TBE 尿素缓冲剂：1.5 mL Tris-硼酸盐-尿素缓冲剂
- 凝胶：
 - 对于五次或更少的运行：200 μL ssDNA 100-R Gel。
 - 对于六次或更多次连续运行：1.5 mL ssDNA 100-R Gel。
- 废液：1 mL 去离子水

3. 结果与分析

3.1 毛细管凝胶电泳法分离结果

样品为两条等浓度的寡核苷酸引物，长度分别为33 nt 和34 nt；其毛细管凝胶电泳分离结果如下图；

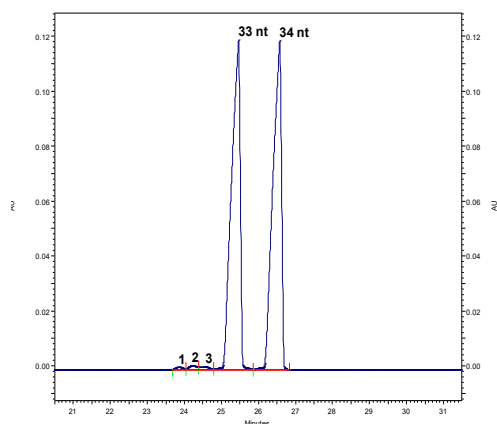


图6. 两条寡核苷酸引物的毛细管凝胶电泳分离谱图

表1. 两条寡核苷酸引物的毛细管凝胶电泳分离结果

PK#	峰名	迁移时间(min)	校正峰面积 %	分离度
1	杂质1	23.86	0.38	0.00
2	杂质2	24.21	0.59	0.89
3	杂质3	24.57	0.50	0.65
4	33 nt	25.46	50.76	1.50
5	34 nt	26.57	47.77	2.28

毛细管凝胶电泳法依据核酸片段大小进行分析，其中峰4和5分别对应33 nt和34 nt的两条等浓度的寡核苷酸引物，并且峰响应值一致；峰1-3是该样品中的杂质峰。如表1所示，毛细管凝胶电泳法可实现对单核苷酸差异的寡核苷酸引物实现基线分离，分离度为2.28。

3.2 重复性考察

为了进一步评估毛细管凝胶电泳方法的稳定性，对该样品进行3次重复进样，结果如表2。33 nt和34 nt两条引物迁移时间的RSD值分别为1.17%和1.14%；33 nt和34 nt两条引物校准峰面积%的RSD分别为1.14%和0.26%，结果表明该方法重复性良好。

表2. 33 nt和34 nt寡核苷酸毛细管凝胶电泳分析的重复性

	33 nt寡核苷酸		34 nt寡核苷酸	
	迁移时间 (min)	校准 峰面积%	迁移时间 (min)	校准 峰面积%
Rep-1	29.41	51.02	30.66	48.02
Rep-2	29.82	51.01	31.08	47.78
Rep-3	30.10	51.01	31.36	47.98
RSD	1.17%	0.01%	1.14%	0.26%

4. 结论

毛细管凝胶电泳法是依据核酸片段大小的差异进行分离，广泛应用于核酸的纯度分析。本文采用SCIEX 成熟稳定的ssDNA 100-R单链寡核苷酸分析试剂盒，可有效应用于引物及寡核苷酸药物的质量控制。毛细管凝胶电泳法主要表现出如下优点：

- 1) 分离度高，可实现单碱基差异的寡核苷酸分析：33 nt和34 nt的寡核苷酸可实现基线分离，分离度可达2.28。
- 2) 分析速度快，30 min内可以完成分离。
- 3) 操作简单，无需标记，可以直接使用UV检测器。

毛细管凝胶电泳法对SgRNA的纯度分析

Purity analysis of SgRNA by capillary gel electrophoresis

唐红梅, 张晓霞, 陈泓序, 罗继, 郭立海

Hongmei Tang, Xiaoxia Zhang, Hongxu Chen, Ji Luo, Lihai Guo

SCIEX, 中国;

SCIEX, China;

Keywords: CGE, SgRNA, Purity

1. 引言

向导RNA (SgRNA, small guide RNA) 在RNA编辑过程中可以引导尿苷残基插入或缺失到质体中, 可以与pre-RNA配对, 属于小型非编码RNA。SgRNA在CRISPR-Cas9基因编辑系统中具有准确识别靶基因序列的作用, 其效果可影响编辑的效率、是否发生脱靶等。SgRNA的长度通常为60-80 nt, 长的可达100 nt左右; 常用的HPLC方法对片段较长的SgRNA分离度不够, 并且需要用到有机溶剂, 对环境有影响; 毛细管凝胶电泳法可以对片段长度为99 nt的SgRNA样品进行有效分离并对其纯度进行分析。

本文以100 nt, 99 nt, 97 nt, 95 nt和90 nt的RNA标准品为例, 考察了这些片段的分离情况, 并对99 nt的SgRNA样品进行了纯度分析。SCIEX单链DNA分析试剂盒 (ssDNA 100-R) 基于核酸片段大小进行分离, 可以将100 nt与99 nt片段长度的RNA标准品分离, 并且100 nt与97 nt、95 nt、90 nt RNA标准品的分离度大于1。因此对于长至100 nt左右的SgRNA样品, 可以实现其N+1和N-1的杂质分离及准确定量。

2. 试剂及样品

2.1 试剂

ssDNA 100-R试剂盒 (SCIEX, 477480), 包含DNA

涂层毛细管 (477477)、ssDNA 100-R Gel凝胶粉末 (47621)、Tris-Borate Buffer、7 M Urea、pd(A) 40-60 Test Mix (477626);

其它试剂: 去离子水(Millipore)。

2.2 样品及前处理方法

样品: 100 nt、99 nt、97 nt、95 nt、90 nt片段长度的RNA标准品和99 nt的SgRNA均由某药企提供; 样品初始浓度均为0.05 nmol/ μ L;

制备Tris-Borate-Urea Buffer溶液: 将135 mL的DDI水添加到含有Tris-Borate干粉的试剂瓶中, 使用磁子在800 rpm下搅拌溶液20至30 min, 确保硼酸完全溶解。缓慢将干燥的7 M尿素添加到Tri-硼酸盐缓冲液中, 同时继续搅拌溶液; 在室温下搅拌溶液2 h, 直至尿素完全溶解且缓冲液澄清;

制备ssDNA 100-R Gel Buffer溶液: 向冻干的凝胶粉末中加入5.0 mL经0.45 μ m滤膜过滤后的Tris-Borate-Urea缓冲液; 用干净且干燥的磁子在800 rpm下搅拌溶液4-6 h, 直到凝胶完全溶解;

制备样本溶液: 将样品置于1.5 mL离心管中, 加入无酶水稀释至终浓度为1 ng/ μ L; 准确移取20 μ L稀释后的样品溶液加入到NanoVial样品管中, 用于后续检测;

制备混合样本溶液: 将样品置于1.5 mL离心管中, 加入无酶水将混合物稀释至样品终浓度为0.5 ng/ μ L、标准品浓度为0.25 ng/ μ L; 准确移取20 μ L样品溶液加入到NanoVial样品管中, 用于后续检测;

RUO-MKT-02-15645-ZH-A

3. 仪器及方法

采用SCIEX PA 800 Plus药物分析系统，匹配紫外检测器，采集频率：4 Hz，检测波长为：254 nm；窗口狭缝：100 × 200 μm；DNA涂层毛细管，100 μm内径，20/30.2cm(有效长度/总长度)；进样条件：-5 kV，4 s；分离电压：-9.0 kV，45 min；毛细管温度：50 ℃；样品室温度：15 ℃。

毛细管平衡方法：分别用去离子水、TBE 尿素 Buffer 在20 psi气压下各冲洗毛细管2 min、然后在50 psi气压下填充ssDNA 100-R Gel 10 min；分别用3 kv、9 kv进行预分离，反向电极，时间分别为5 min，10 min；

凝胶填充方法：在50 psi气压下填充ssDNA 100-R Gel 10 min；用9 kv电压进行预分离，反向电极，时间10 min；

每隔5次分离，应使用凝胶填充法更换一次毛细管中的 ssDNA 100-R Gel。

4. 结果与分析

4.1 100 nt 与99 nt、97 nt、95 nt、90 nt的RNA标准品的分离结果

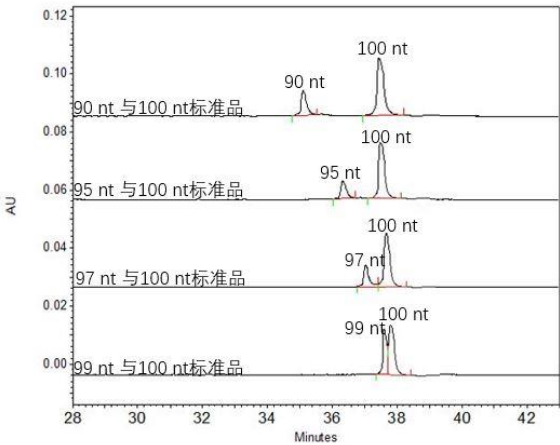


图1. 100 nt与99nt、97nt、95nt、90nt的RNA标准品的分离谱图。

考察100 nt 与99 nt、97 nt、95 nt、90 nt的RNA标准品的分离，分离结果如下图1。

毛细管凝胶电泳法依据核酸片段大小进行分析，100 nt与99 nt、97 nt、95 nt、90 nt的RNA标准品的分离度见表1；100 nt与99 nt片段长度的RNA标准品能够分离，分离度0.6，而100 nt 与97 nt、95 nt、90 nt RNA标准品的分离度均大于1。

表1. 100 nt与99 nt、97 nt、95 nt、90 nt的RNA标准品分离度结果

片段长度	分离度
100 nt与99 nt	0.6
100 nt与97 nt	1.9
100 nt与95 nt	3.2
100 nt与90 nt	6.0

4.2 99 nt 片段长度SgRNA样品的纯度分析

片段长度为99 nt 的SgRNA样品纯度分析结果如下图2。毛细管凝胶电泳法依据核酸片段大小进行分析，通过与100 nt片段长度标准品谱图出峰位置对比，确认99nt样品谱图中峰2是100 nt片段，因此99 nt片段长度 SgRNA样品的纯度为92.54%。

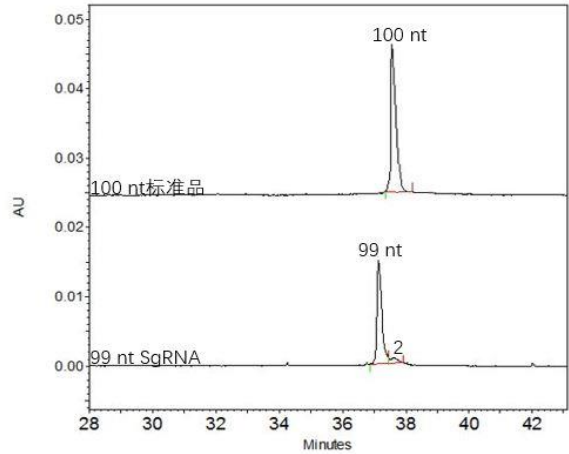
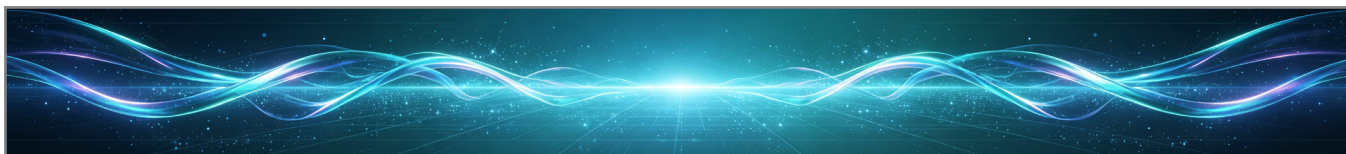


图2. 毛细管凝胶电泳法对99 nt 片段长度SgRNA纯度分析的电泳图

RUO-MKT-02-15645-ZH-A



5. 结论

本文采用SCIEX 成熟稳定的ssDNA 100-R单链寡核苷酸分析试剂盒，可以实现100 nt与99 nt、97 nt、95 nt、90 nt的RNA标准品的分离，其中100 nt 与97 nt、95 nt、90 nt RNA标准品的分离度均大于1；因此，对于100 nt左右的SgRNA样品，可以实现其N+1和N-1的杂质分离及准确定量。该方法可有效应用于SgRNA样品与其杂质的分离及纯度分析。

RUO-MKT-02-15645-ZH-A

SCIEX Now™支持网络

一站式满足您各种支持需求

产品和数据安全

合规性服务提升您的信心，帮助您保护数据安全，确保数据完整性，以及数据管理系统的溯源性。

新手上路

我们将帮助您在SCIEX Now 学习中心在线注册，邀请您在SCIEX Now 学习中心注册学习，并向您发送欢迎电子邮件。

实验室增强服务

SCIEX实验室增强服务计划，为您的实验室提供整体服务解决方案，以提高工作效率并减少系统停机时间。



SCIEX Now 学习中心

优质的内容，个性化的学习方式 - 使用全新的科学记忆方式设计的课程。

自我学习资源

我们的知识库和社区，将帮助您提升科学知识水平，并从SCIEX专家或者同行那里找到您所需要的答案。

全工作流程技术支持

只要您在实验过程中，遇到困难挑战，SCIEX 支持团队都会帮助您高效地解决问题，实现科学目标。

立即开始成功之路： sciex.com.cn/support

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2026 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-39117-A



SCIEX 中国

北京分公司
北京市昌平区生命科学园科学园路18号院
A座一层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488，400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502层
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017
官方微信：[SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)

