

使用SCIEX Triple Quad™ 6500+系统对血浆中的寡核苷酸进行定量分析

Quantitative Analysis 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

Keywords: SCIEX Triple Quad™ 6500+ system, Oligonucleotide, Quantitative Analysis

引言

寡核苷酸是一类短链核酸，通常由30以内的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸组成，常见的寡核苷酸包括反义寡核苷酸(ASOs)，小干扰RNA (small interference RNA, siRNA)，microRNA和核酸适配体 (aptamer) 等，可以通过碱基互补配对原则与DNA或者mRNA进行配对，调节基因和蛋白质的表达。与传统的小分子药物相比，利用寡核苷酸作为药物是一种全新的治疗方法，它可以从源头进行疾病干预，靶向性高。随着相关研究和技术的进步，核酸药物迎来快速的发展，全球上市的核酸药物数量逐年递增。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。

本方法在SCIEX Triple Quad™ 6500+系统上，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分析，定量限(LLOQ)为0.05 ng/mL，该方法特点如下：

1. 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，操作界面简单友好，满足合规要求。



实验方法

1. 样品信息

样品为25个碱基的单链寡核苷酸，分子量7390

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 1 mM EDTA) 进行溶解配成标准品储备溶液，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98 μL大鼠血浆中得大鼠血浆基质样品，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) 。

3. 色谱方法

使用SCIEX ExionLC™ AD系统，色谱柱为Phenomenex Gemini NX-C18, 3 μm, C18 100Å, 150 × 2.1 mm。流动相中加入

表1. 样品制备流程

步骤	试剂
样品预处理	100 μL血浆样品+100 μL裂解缓冲液，震荡混匀
活化小柱	1 mL × 2次；甲醇，
平衡小柱	1 mL × 2次；50 mM醋酸铵，pH 5.5
上样	200 μL预处理样品；3-5s一滴
淋洗	1 mL × 3次；50 mM醋酸铵(pH 5.5):乙腈=1:1
洗脱	500 μL × 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℃
复溶	100 μL；10 mM Tris-HCl 溶液（含1mM EDTA），pH 8.0

离子对试剂1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol(HFIP, ≥ 99.8%)和 diisopropylethylamine (DIEA, ≥ 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℃，进样体积20 μL，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

Triple Quad™ 6500+系统

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℃，

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Clarity OTX 96孔固相萃取板净化，使用SCIEX Triple Quad™ 6500+系统进行数据采集和定量分析，定量下限(LLOQ)可达0.05ng/mL (图1)，且空白样品中无干扰，有很好的选择性和灵敏度。在0.05~100 ng/mL的范围内线性关系良好， $r^2>0.99$ (图2)，准确度均在85%~115%之间。

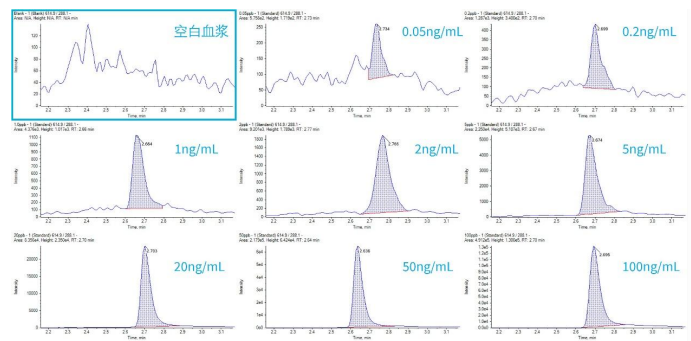


图1. 腺苷酸在空白血浆中以及基质中各个浓度点的提取离子流色谱图

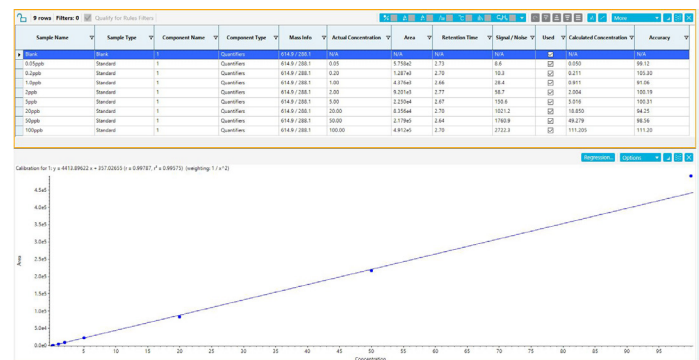


图2. 腺苷酸的线性方程图

重现性

将经过SPE处理的低浓度（0.2ng/mL）和高浓度（50ng/mL）分别连续进样3针，重现性很好，两个浓度点的精密性(RSD)分别为3.96%和2.46%（图3）。

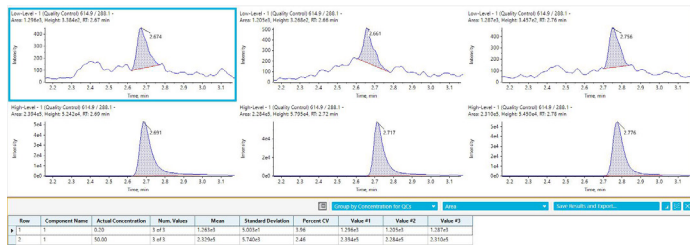


图3. 低浓度点和高浓度点峰面积的重现性

回收率

以空白血浆经SPE处理后的复溶液作为空白基质，加入寡核苷酸标准品，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80.2%（图4）。

总结

本实验采用固相萃取(SPE)方法进行血浆样品前处理，通过SCIEX Triple Quad™ 6500+系统进行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，RSD<4%，提取回收率可达80.2%。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。

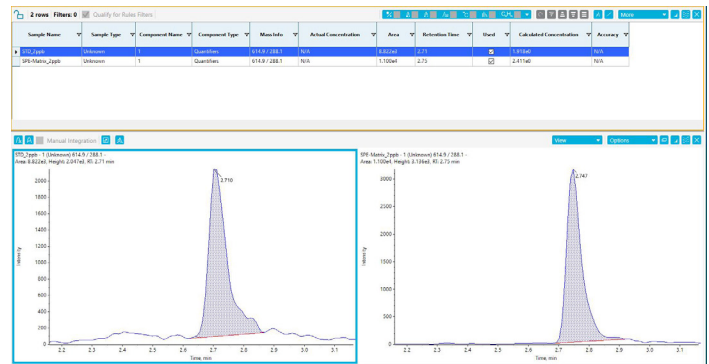


图4. 提取回收率（左图为经SPE处理的血浆样品，右图为空白基质SPE处理后加标）

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. 或在和美国/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-30298-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5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室
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