

SCIEX Triple Quad™ 系统定量分析大鼠肝组织中的siRNA

Quantification of siRNA in rat liver tissue using the SCIEX Triple Quad™ System

冷向阳, 钟晨春, 龙志敏, 郭立海

Xiangyang Leng, Chenchun Zhong, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX应用支持中心, 中国

Key words: SCIEX Triple Quad™ System、siRNA、Quantitative analysis

作为近些年来药物开发的热点之一, 寡核苷酸药物越来越受到人们的关注。寡核苷酸药物是由人工化学合成的寡核苷酸单链或双链组成的一类药物, 包括反义核酸 (ASO)、小干扰RNA (siRNA)、微小RNA (miRNA)、小激活RNA (saRNA)、核酸适配体 (aptamer)、核酶 (ribozyme) 等。其中ASO和siRNA类型的寡核苷酸药物应用广泛, 目前已逐渐应用于抗肿瘤、病毒治疗、免疫调节等诸多方面^[1]。

siRNA 是一种效率很高、特异性很强、药物不良反应发生率很低的靶向药物。siRNA 药物根据RNA 干扰机制, 从转录后水平进行基因沉默或激活治疗, 相比传统蛋白水平发挥作用的药物具有高特异性、高效性、长效性等明显优势, 针对siRNA 药物的研究一直没有停歇, 截至目前已经有许许多多的siRNA 药物进入临床研究^[2]。

本文建立了使用SCIEX Triple Quad™系统对大鼠肝组织中的siRNA定量分析的方法, 使用固相萃取的前处理方式, 方法专属性强、灵敏度高, 可以很好的满足目标siRNA的检测需求。

本实验方法特点:

1. 使用三重四极杆质谱 (SCIEX Triple Quad™系统) 测定目标 siRNA, 使用正义链进行定量, 具有良好的灵敏度 (正义链 LLOQ: 1ng/ml)、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



实验方法

1. 样品信息和试剂

合成的siRNA标准品由客户提供 (正义链分子量: 8014.6, 反义链: 6983.7); 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

siRNA标准品粉末使用PH 8.0的10 mM Tris-HCl 溶液 (含1mM EDTA) 进行溶解和稀释。

取100 μL大鼠肝脏匀浆样本, 其中加入标准品配置成1~1000 ng/mL系列样品, 作为标准曲线。组织样品SPE处理流程如表1。

表1. 大鼠肝组织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 50mM醋酸铵
活化	1mL*2; 100%甲醇
平衡	1mL*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*3; 淋洗液或用50 mM醋酸铵pH5.5, 50%乙腈
洗脱	500 mL*2; 100 mM pH9.5 碳酸氢铵:乙腈:THF (2:1:1)
吹干	N ₂ , 40°C
复溶	100 μ l, Tris-HCl pH8

3. 液相方法

色谱柱: : Kinetex EVO C18 2.6 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: 0.3 ml/min

柱温: 60°C;

流动相梯度:

Time(min)	A (%)	B (%)
0.00	90	10
1.00	90	10
4.50	85	15
4.60	2	98
5.50	2	98
5.60	90	10
7.00	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: 500°C

表2. siRNA的质谱参数

化合物名称	Q1 Mass	Q3 Mass	DP	CE	EP	CXP
siRNA_SS	889.4	430.1	-90	-36	-10	-15
IS_siRNA_SS_	863.0	430.2	-80	-31	-10	-15

实验结果

- 灵敏度和重复性:** 本实验中采用Clarity OTX™ 萃取试剂盒对大鼠肝组织样品进行处理, 能够有效的实现对样品的净化, 方法定量下限 (LOQ) 为1 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3针, RSD%<2%, 重复性良好。

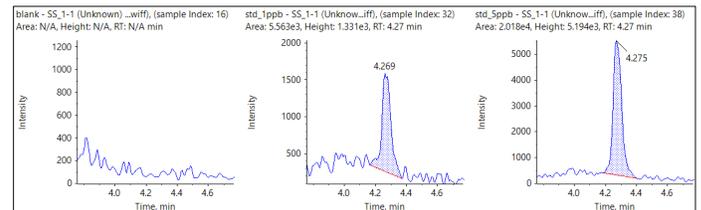


图1. 在空白肝组织样品、1ng/ml和5ng/ml siRNA色谱图

- 线性范围:** 在大鼠肝组织中该siRNA在线性范围1-1000ng/ml内线性关系良好, 相关系数大于0.998, 标曲各点准确度在91.0%-105.4%之间。

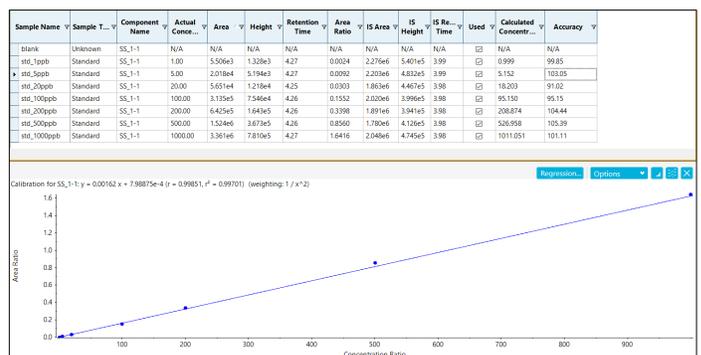


图2. 肝组织中siRNA标准曲线图

- 提取回收率和基质效应结果:** 采用固相萃取法对大鼠肝组织中进行处理, 考察了目标siRNA在低高浓度下的提取回收率和基质效应。结果见表3。siRNA在5 ng/ml和500 ng/ml浓度下的提取回收率 > 43%, 基质效应在92%~109%之间。

表3. 大鼠肝组织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
5	50458	101305	93284	49.81%	108.59%
500	4021170	9284969	10044430	43.31%	92.44%

总结

本文使用固相萃取方式对大鼠肝组织进行前处理, 利用SCI-EX Triple Quad™ 系统对肝组织中目标siRNA进行定量分析。本方对SS链进行定量分析, 方法定量下限为1ng/ml, 在线性范围1-1000ng/ml内线性关系良好, 在不同浓度下的提取回收率大于43%, 基质效应在92%~109%之间, 可以满足目标siRNA的检测需求。为其他siRNA的检测分析提供方法参考。

参考文献

- [1] 李娜, 方珍文, 王啸林等. 寡核苷酸药物定量分析方法的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(5): 992-996
- [2] 李莎莎, 孙云娟, 董立厚. siRNA药物研究进展及定量分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(18): 2926-2930

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. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15806-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](https://www.sciex.com.cn)