

DNA & RNA 寡聚核苷酸的准确分子质量测定

聂爱英

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

LTQ-Orbitrap Elite; 核酸药物; 分子质量测定

1. 前言

随着人们对核酸结构和功能的深入了解,特异性结合或者裂解致病基因的核酸药物也逐渐成为了药物研究的新热点,核酸药物的作用效率高、应用范围广,可以对传统药物进行补充,并且在前期的临床诊断中也可以起到重要的指示作用。核酸药物主要是指各种具有不同功能的寡聚核糖核苷酸 (RNA) 或者寡聚脱氧核糖核苷酸 (DNA), 主要作用于基因水平, 在信息流传递的上游阶段起作用, 效率比较高, 且通过结合或者裂解特异性的致病基因, 而对其它基因没有任何影响。在信息流的传递过程中, 信号逐级放大, 一个基因可以转录出多个 mRNA, 一个 mRNA 又可以翻译出多个蛋白质, 所以与作用于信息流最终产物-蛋白质相比, 核酸药物具有广泛的应用前景。目前的核酸药物可以与一些转录因子、凝血酶、人类免疫缺陷病毒、双链 DNA 的特殊部位等结合, 从而抑制 DNA 的复制或者蛋白、受体等的结合, 从而干扰和阻止病毒或者错误基因和蛋白的表达和放大, 因此在基因药物的研发和生产过程中, 建立和发展一种更有效、灵敏、快速和精确的寡聚核苷酸的结构和序列分析方法, 一直都是生物化学家、医药工作者和仪器分析公司的研究课题之一。

生物质谱的技术为寡聚核苷酸的分子质量和序列分析提供了新的途径。之前, 基质辅助激光解吸电离飞行质谱 (MALDI-TOF) 主要用于分子质量比较小的寡聚核苷酸分析, 受仪器的灵敏度, 分辨率, 碱金属离子加合峰的影响, 测试的精确度和可靠性都存在一定问题。另外, 基于常规的电喷雾离子阱 (Ion Trap) 质谱的检测, 同样受限于分辨率与质量精度, 也无法满足高精度、高分辨、高灵敏的寡聚核苷酸的检测分析。

LTQ-Orbitrap Elite 组合式质谱仪结合了最新的双压线性离子阱质谱仪和新型高场 Orbitrap™ 质量分析器, 可以提供高达 240,000 的分辨率 (FWHM)、高灵敏度、快速的扫描速度和更大的动态范围, 并且可以在同一台质谱上可以同时实现低分辨和高分辨扫描, 满足客户的不同需求。该系统可以为寡聚核苷酸的分子质量测定提供准确、快速、可靠的分析测试。

2. 实验部分

2.1 仪器和试剂

质谱仪器: LTQ-Orbitrap Elite (赛默飞世尔科技, 美国);

色谱仪器: Accela 液相色谱系统 (赛默飞世尔科技, 美国);

色谱柱: BioBasic 色谱柱 (C8, 2.1 × 50 mm, 5 μm, 300 Å) (赛默飞世尔科技, 美国);

试剂: 乙酸铵、二次去离子水, 色谱级甲醇。

2.2 仪器方法

色谱分析条件: 具体见表 1;

质谱分析条件: 具体见表 2;

2.3 数据分析方法

采用 ProMass 软件对原始质谱图进行去卷积处理, 得到完整的寡聚核苷酸的分子质量信息。

表 1. 寡聚核苷酸分子质量测定的色谱分析条件

流动相	A: 10 mM 乙酸铵溶液; B: 90% 甲醇 + 10% 10 mM 乙酸铵溶液	
流速	300 μ L/min	
柱温	35 $^{\circ}$ C	
色谱梯度	时间/min	B相浓度/%
	0	0
	1.0	5
	2	40
	2.5	90
	3.0	90
	3.5	0
	5.0	0

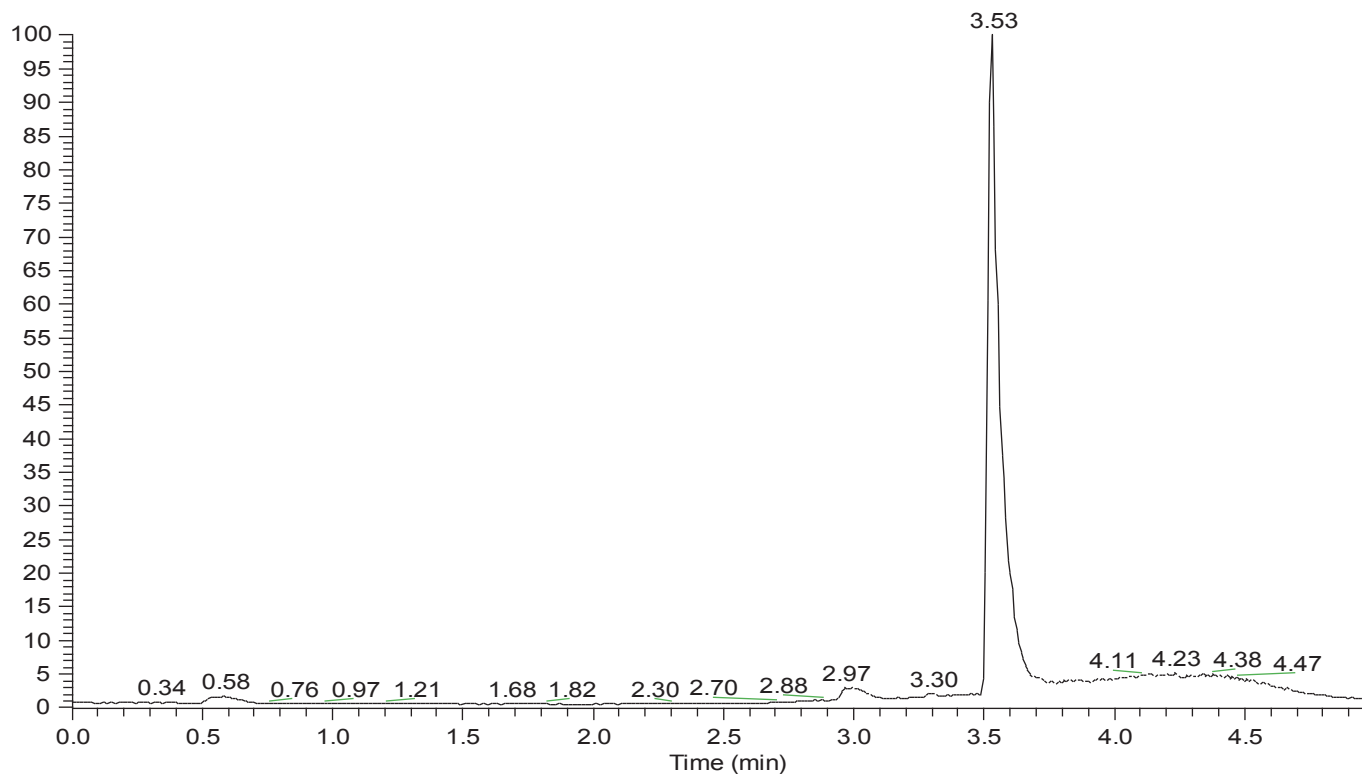
表2寡聚核苷酸分子质量测定的质谱分析条件

喷雾电压	-3.8 kV
毛细管加热温度	275 $^{\circ}$ C
S-lens	60 %;
鞘气流速	30 (arb)
辅助气流速	10 (arb)
质量扫描范围	m/z 500-2000
分辨率	15,000、 30,000、 60,000、 120,000、 240,000 (m/z 400)

3. 结果与讨论

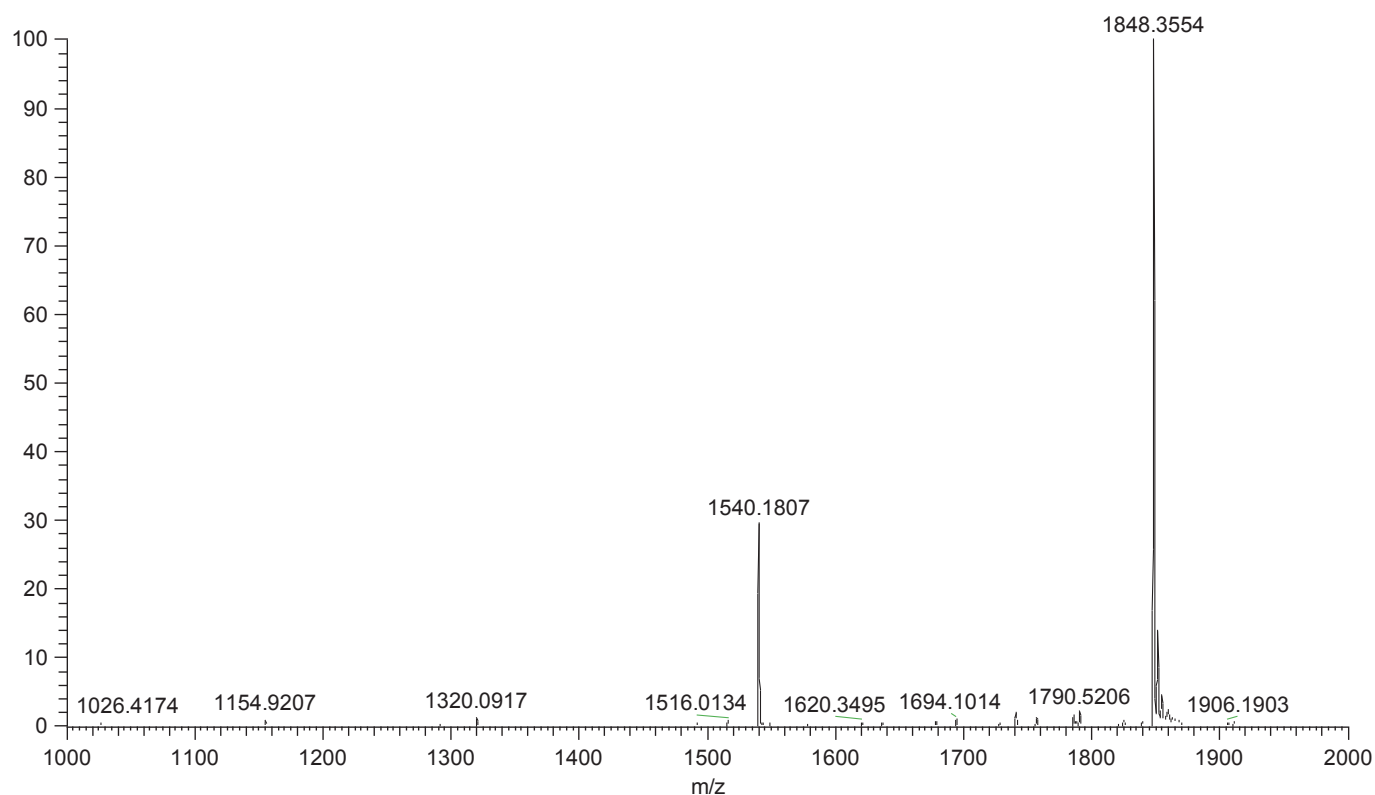
3.1 低分辨 LTQ 质量检测器测定寡聚核苷酸的分子质量

3.1.1 原始色谱质谱图



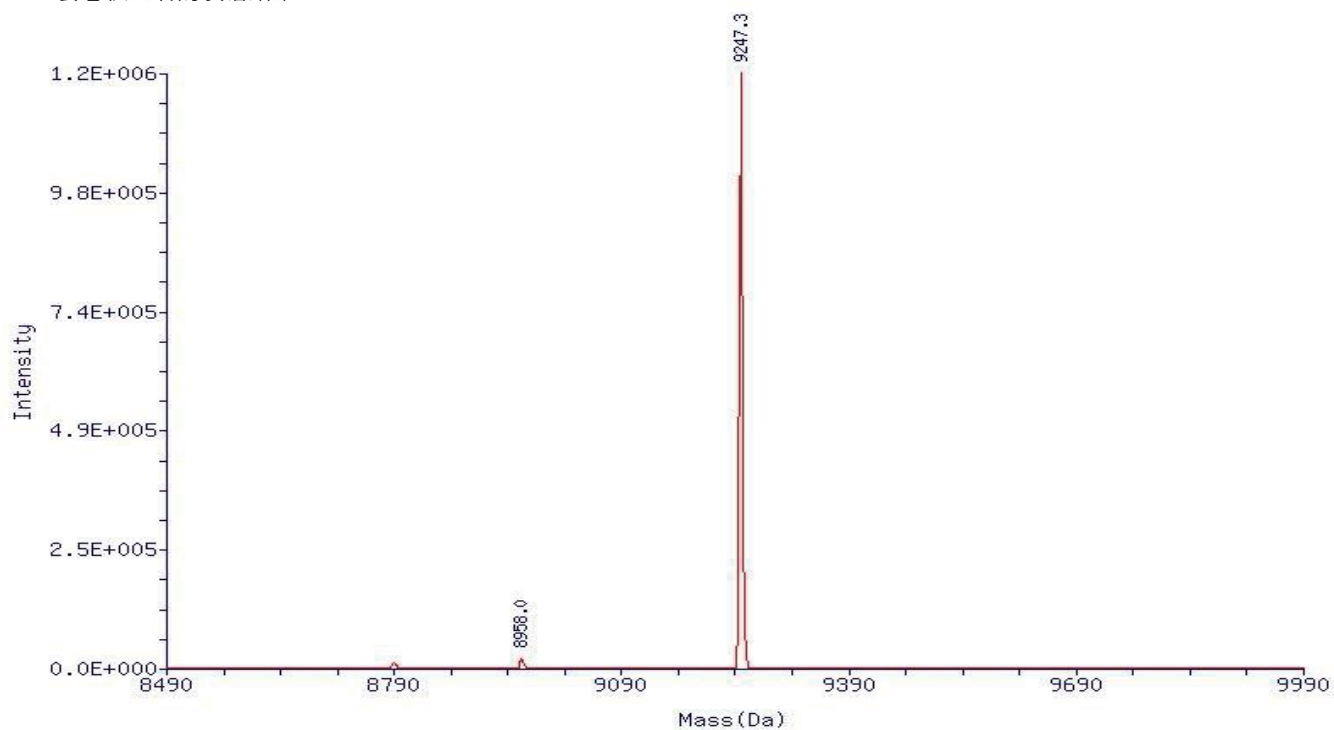
采用 5 min 的梯度分析，离子阱采集数据，寡聚核酸主要在 3.53 min 出峰。

3.1.2 原始质谱图

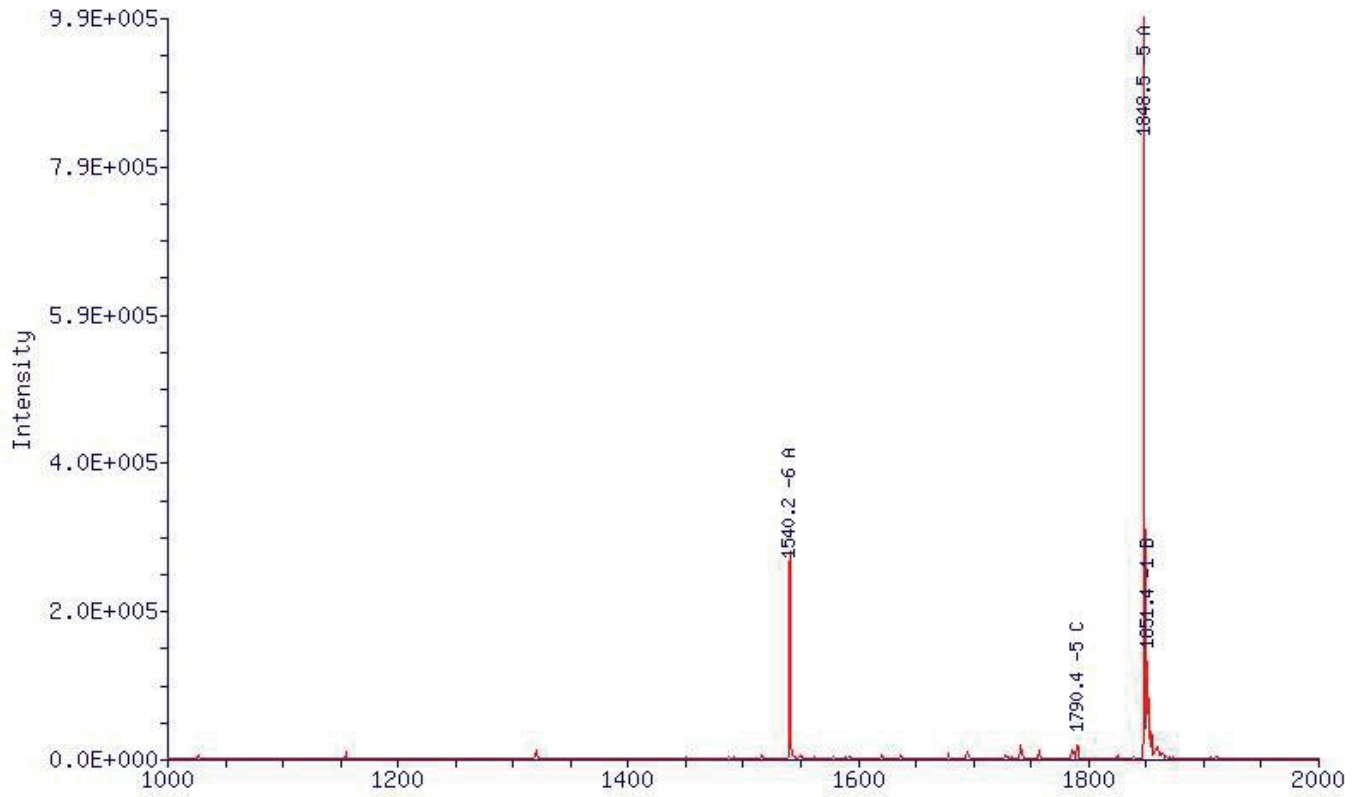


将上图中 3.53 min 附件的寡聚核苷酸谱图信号平均后，得到该寡聚核苷酸的平均质谱图，由于 LTQ 的分辨率有限，无法将电荷直接分辨出来，因此需要通过软件进行去卷积处理，从而得到该寡聚核苷酸的分子质量。

3.1.3 去卷积之后的质谱结果



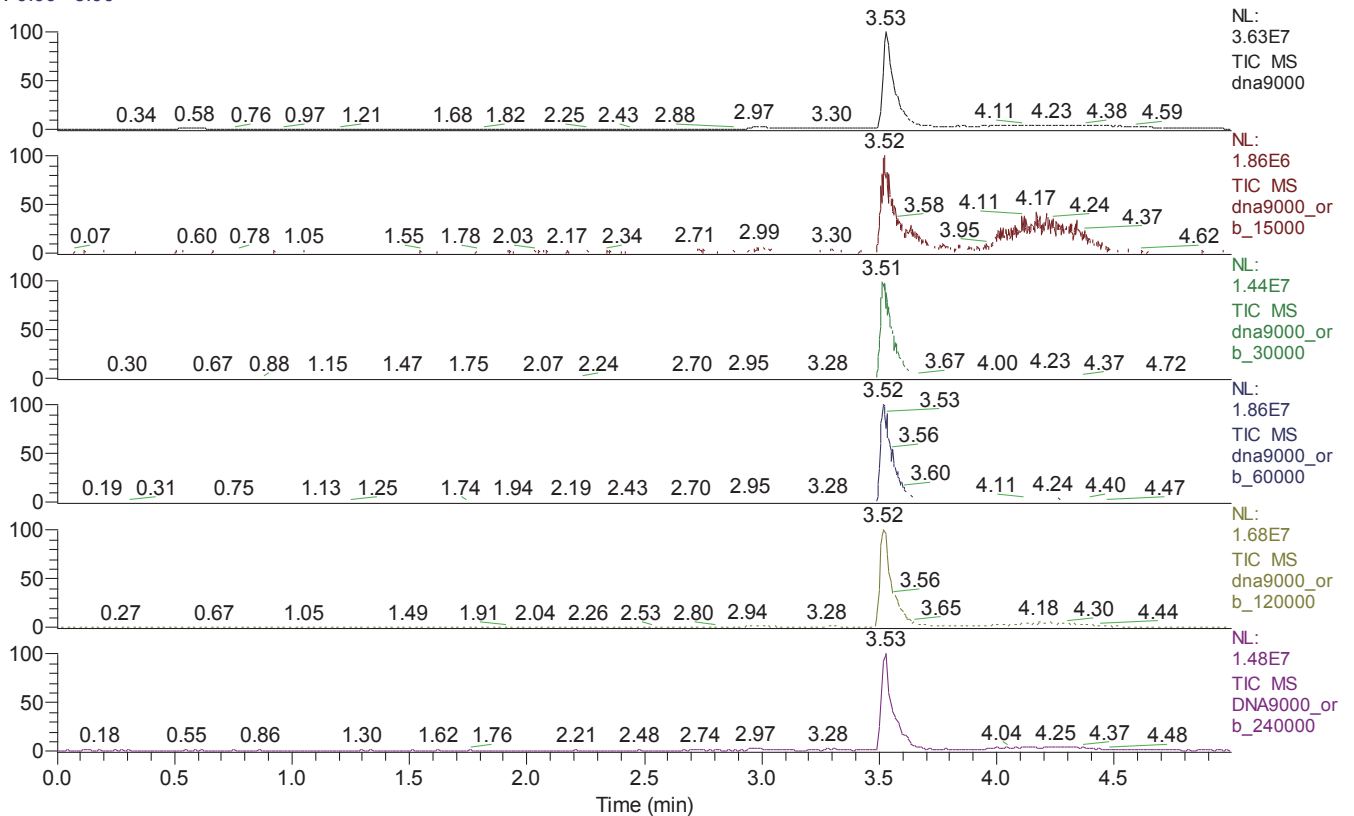
通过 ProMass 软件去卷积之后的平均分子质量为 9247.3，与理论的平均分子质量完全一致，并且 ProMass 软件对原始质谱图中质谱峰的电荷进行了归属，如下所示，质荷比为 1540.2 的质谱峰对应的电荷为 -6 价，质荷比为 1848.5 的质谱峰对应的电荷为 -5 价。



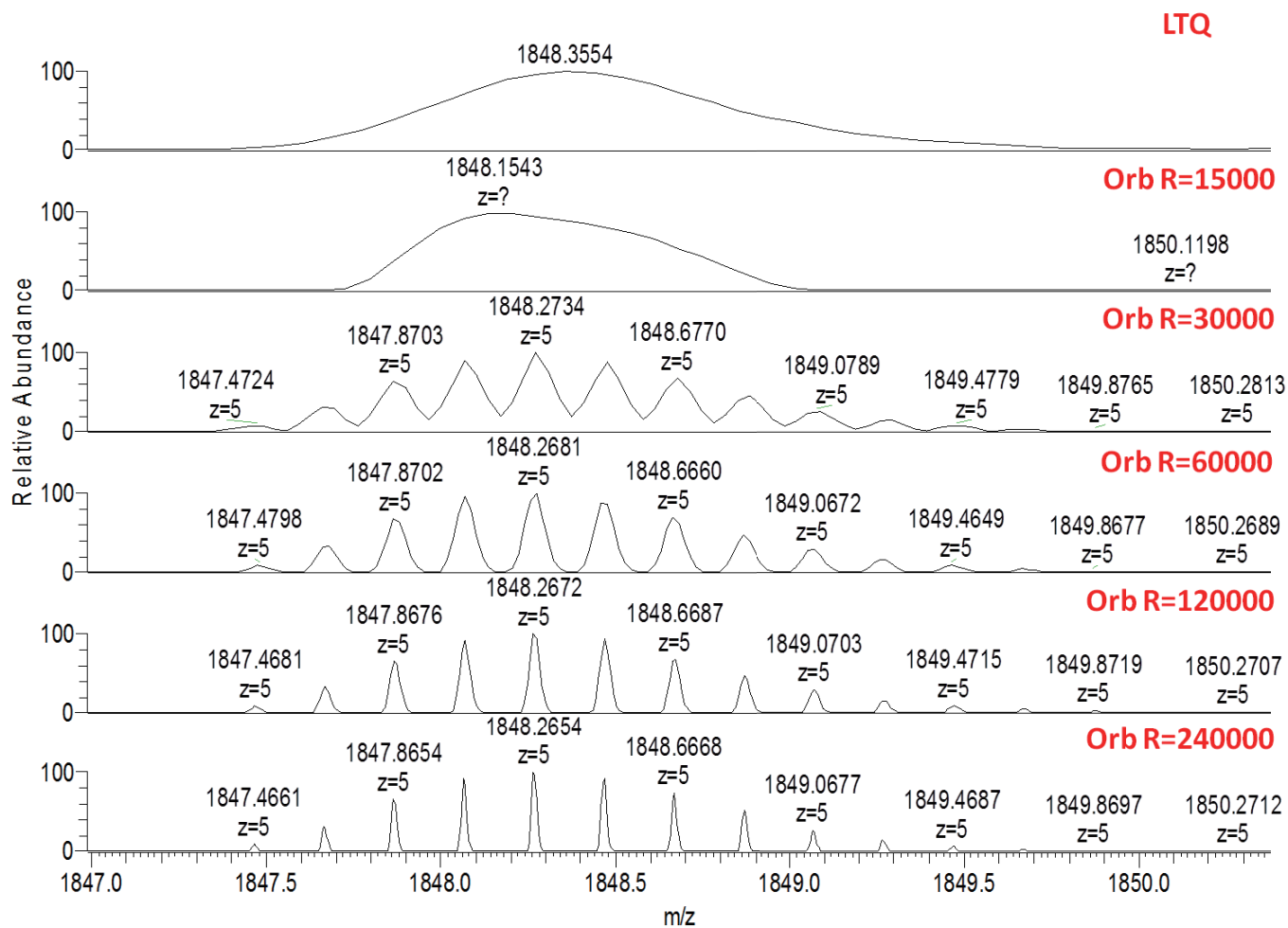
3.2 高分辨 Orbitrap 质量分析器测定寡聚核苷酸的分子质量

3.2.1 原始色谱质谱图

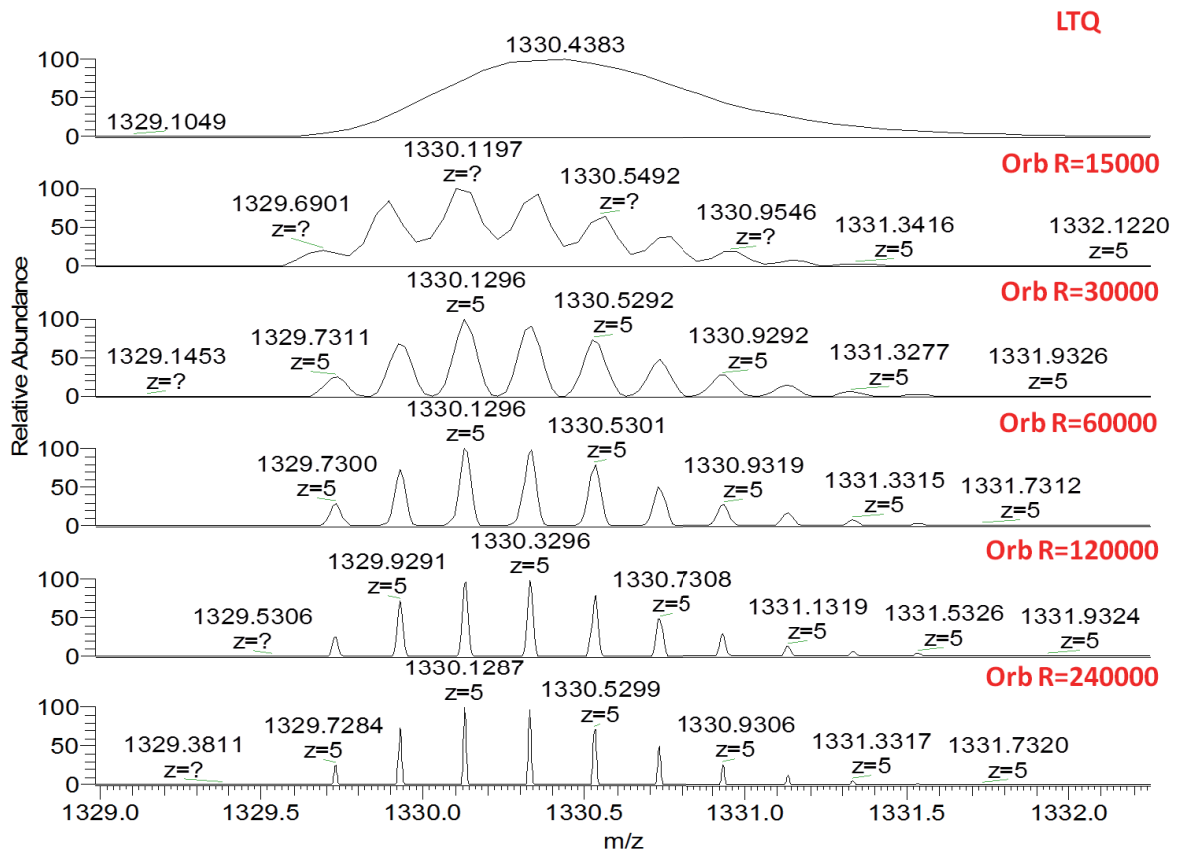
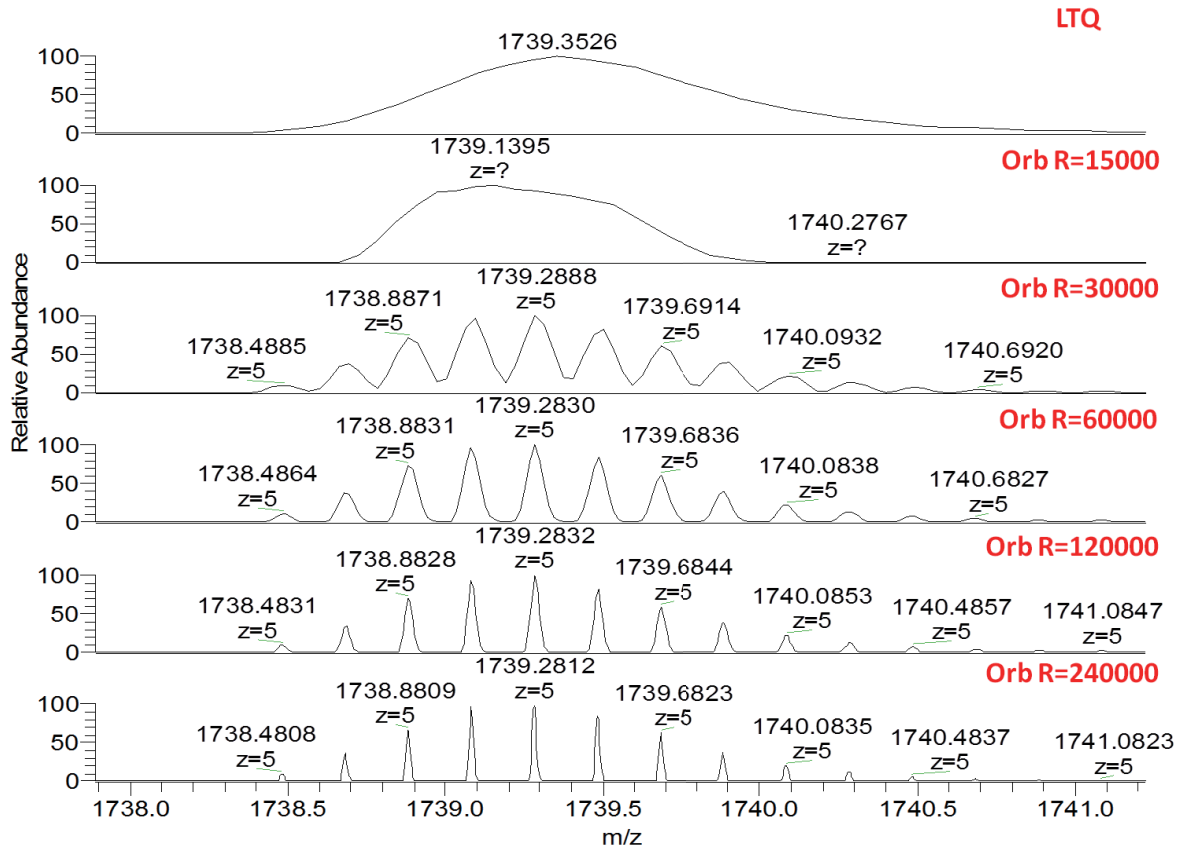
RT: 0.00 - 5.00



与低分辨的实验相比，在保持上样量和色谱条件不变的前提下，仅仅改变质谱采集的分辨率，可以看到寡聚核苷酸的色谱保留时间不变，基本在 3.52 min 出峰，不过随着质谱检测器分辨率的提高，原始质谱图发生了显著的变化，如下所示，当使用线性离子阱 LTQ 作为质量检测器时，只检测到一个大包峰，无法分辨电荷；当使用 Orbitrap 作为质量检测器，分辨率 R 设置为 15000 时，同样也只检测到一个大包峰，电荷仍然无法分辨；当使用 Orbitrap 作为质量检测器，分辨率 R 设置为 30,000 时，可以观察到一些同位素峰，电荷可以实现分辨；当使用 Orbitrap 作为质量检测器，分辨率 R 设置为 60,000 时，可以观察到稍微好一些的同位素峰，但无法完全分离，电荷同样可以实现分辨；当使用 Orbitrap 作为质量检测器，分辨率 R 设置为 120,000 时，同位素峰可以实现完全分离，电荷同样也可以实现分辨；当使用 Orbitrap 作为质量检测器，分辨率 R 设置为 240,000 时，同位素峰可以实现完全分离，并且峰形更加尖锐，电荷同样也可以实现分辨，由此我们可以准确的计算得到寡聚核苷酸的单同位素质量和平均质量，最后的实验结果与理论预测的分子质量保持完全一致。



同样，我们对几个不同分子质量的寡聚核苷酸进行了不同分辨率的质谱测试，结果如下所示：



从上面的质谱图中，可以看到，随着质谱分辨率的提高，寡聚核苷酸的同位素峰可以实现完全分离，并且峰宽更窄，电荷也可以实现完全分辨，并且无需软件辅助，就可以直接计算得到寡聚核苷酸的单同位素质量和平均分子质量，使得寡聚核苷酸的分析测试更加快速和直接。

4. 结论

本文通过 LTQ-Orbitrap Elite 质谱建立了寡聚核酸药物分子质量分析的色谱质谱在线方法，可以在核酸药物的研发分析和实时生产检测中，更加有效、灵敏、快速和精确的测定寡聚核苷酸的分子质量。实验结果表明 LTQ-Orbitrap Elite 组合式质谱仪，凭借其超高的分辨率，超快的扫描速度，超高的质量精度、超低的灵敏度和超大的动态范围，极大地完善和推动了基因药物的鉴定分析。



Orbitrap 组
学俱乐部



赛默飞小分子质
谱应用技术群

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

www.thermofisher.com

全国服务热线：800 810 5118
400 650 5118（支持手机用户）

Thermo
SCIENTIFIC

A Thermo Fisher Scientific Brand