

开发一种新颖的集成式LC-MS工作流程以高分辨率监测和表征寡核苷酸

Henry Shion, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍了一种使用高分辨率质谱对寡核苷酸进行鉴定、杂质分析和MS/MS表征的集成式LC-MS工作流程。

完整工作流程由一套与ACQUITY UPLC可变波长紫外(TUV)检测器联用的ACQUITY UPLC H-Class Bio系统和Xevo G2-XS QToF质谱仪构成。使用Waters MassLynx质谱软件进行系统控制和MS数据采集。

使用MassLynx内的MS/MS谱图对siRNA样品进行全阶梯测序，证明寡核苷酸的高分辨率表征。

优势

- 优化RP-UPLC流动相组成，可更好地分离寡核苷酸并降低MS谱图中的盐加合物强度
- 集成了MassLynx软件的ProMass HR具有全新的高分辨率、高通量数据处理能力
- 使用Xevo G2-XS QToF MS系统增强MS/MS碎裂，对寡核苷酸样品进行全阶梯测序

简介

一种能够进行结构表征、分子量确认以及杂质分析和分布研究（例如失败序列和其他与生产相关的杂质）的方法对于开发治疗性寡核苷酸非常重要。这些分析通常使用液相色谱结合紫外(UV)和质谱(MS)检测进行——紫外吸收用于定量，MS检测用于结构表征、质量数确认和杂质监测。事实证明，Waters Xevo G2-XS QToF质谱仪能通过完整分子量分析、亚基分析、肽图分析和游离寡糖分析等分析程序表征生物药，是一种高效的工具¹⁻⁴。

在本研究中，我们介绍了一种使用高分辨率质谱对寡核苷酸进行鉴定、杂质分析和MS/MS表征的集成式LC-MS工作流程。完整工作流程由一套与ACQUITY UPLC可变波长紫外(TUV)检测器联用的ACQUITY UPLC H-Class Bio系统和Xevo G2-XS QToF质谱仪构成。使用Waters MassLynx质谱软件进行系统控制和MS数据采集。使用一体型ProMass HR（Novatia，宾夕法尼亚州纽敦）完成自动质谱去卷积、数据分析和报告。使用MassLynx内的MS/MS谱图对siRNA样品进行全阶梯测序，证明寡核苷酸的高分辨率表征。



图1.从左到右：*MassPREP*寡核苷酸标准品、沃特世寡核苷酸分离技术色谱柱、ACQUITY UPLC H-Class Bio系统和 Xevo G2-XS QToF质谱仪。

实验

试剂、溶剂和样品前处理

三乙胺（纯度99.5%）和1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇（纯度99.8%，LC-MS级）购自Sigma Aldrich。质谱级溶剂（UHPLC级）购自Fisher Scientific。流动相缓冲液在实验开始前现配。MassPREP寡核苷酸标准品购自沃特世（部件号：186004135），制成不同浓度(0.004~5 pmol/ μ L)。siRNA上链5'-rUrCrGrUrCrArArGrCrGrArUrUrArCrArArGrGrTT-3'和互补下链5'-TTTrCrCrUrUrGrUrArArUrCrGrCrUrUrGrArCrGrA-3'购自Integrated DNA Technologies（艾奥瓦州科尔维尔），制成浓度为5 pmol/ μ L的水溶液。进样体积因具体实验而异。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC H-Class Bio
检测器：	配备钛流通池的ACQUITY UPLC TUV，吸收波长： ： 260 nm
色谱柱：	Waters BEH C ₁₈ 寡核苷酸分析专用柱, 1.7 μ m, 2.1 mm x 50 mm
柱温：	60 °C
样品温度：	6 °C
流动相A：	15 mM TEA，400 mM HFIP水溶液，pH 8.0
流动相B：	15 mM TEA，400 mM HFIP的甲醇溶液

流动相使用重量法配制。

质谱条件

质谱系统：	Xevo G2-XS Qtof
质量数范围数据：	400-3000 Da

模式:	ESI负离子分辨率
锥孔电压:	MS为80 V, MS/MS为120 V
毛细管电压:	2.0 kV
电离源补偿:	80 V
离子源温度:	125 °C
脱溶剂气温度:	500 °C
脱溶剂气流速:	800 L/h
实时质量校正标样:	Glu血纤维蛋白肽B, 100 fmol/μL, 溶于含0.1%甲酸的50-50水-乙腈中
数据采集和处理信息学软件	带有MaxEnt1和MaxEnt3的MassLynx v4.1 SCN 9.25 ProMass HR ProMass Bridge 1.1

Waters OST标准品 (包含5个polyT寡核苷酸的混合物, 15-35 nt)					
时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	%C	%D
初始	0.20	80.50	19.5	0.0	0.0
15.00	0.20	72.00	28.0	0.0	0.0
16.00	0.20	50.00	50.0	0.0	0.0
17.00	0.20	80.50	19.5	0.0	0.0
21.00	0.20	80.50	19.5	0.0	0.0

梯度表1.

ssRNA样品					
时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	%C	%D
初始	0.20	87.0	13.0	0.0	0.0
10.00	0.20	77.0	23.0	0.0	0.0
10.10	0.20	50.0	50.0	0.0	0.0
11.10	0.20	50.0	50.0	0.0	0.0
11.20	0.20	87.0	13.0	0.0	0.0
16.00	0.20	87.0	13.0	0.0	0.0

梯度表2.

结果与讨论

本节将回顾使用上述高分辨率LC-MS寡核苷酸分析工作流程生成的实验结果；展示系统在质量精度、盐加合物减少和MS检测灵敏度方面的基本性能；讨论高分辨率MS用于寡核苷酸筛查和杂质分析的适用性，以及通过MS/MS

阶梯测序进行高分辨率表征的能力。

图2显示polyT寡核苷酸及其截断序列实现了出色分离（使用Waters OST色谱柱和BEH C₁₈填料）。如最近的研究所述，LC-MS级试剂（如TEA和HFIP）和流动相溶剂（如乙腈和水）可确保实现理想的液相色谱峰分离效果^{5,6}。LC-MS级试剂和溶剂在生成高质量MS谱图方面也发挥着重要作用。MS谱图示例见图3，显示了25 nt polyT的多电荷物质分布/电荷峰簇，在M³⁻峰的放大图中，形成的钠加合物最少(<5%)且同位素峰分辨率优异。

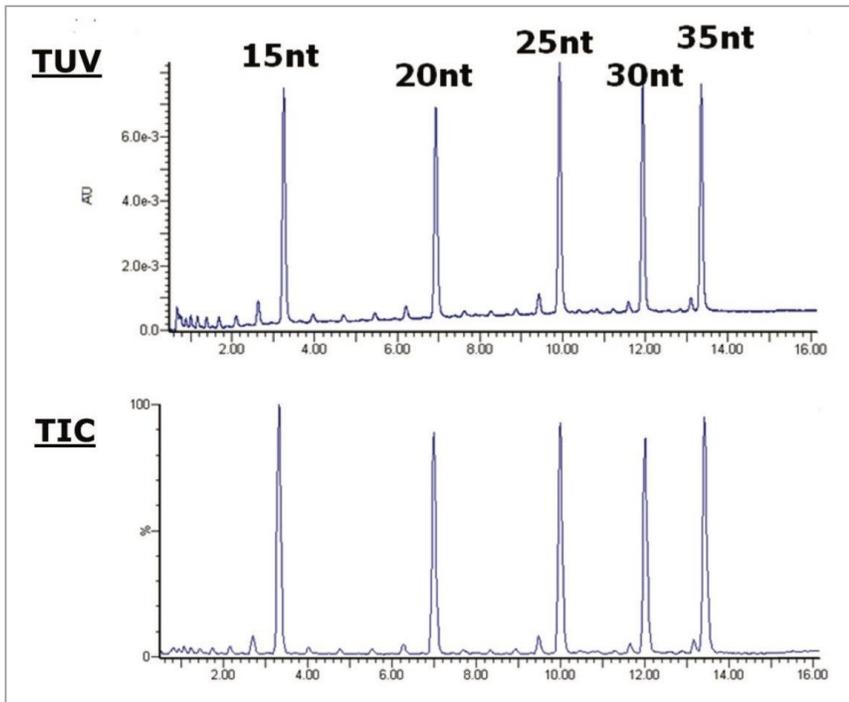


图2. Waters MassPREP寡核苷酸分离技术标准品（包含五个15~35 nt的polyT寡核苷酸混合物）的在线正交检测TUV和TIC色谱图，还显示了预期的合成相关杂质。

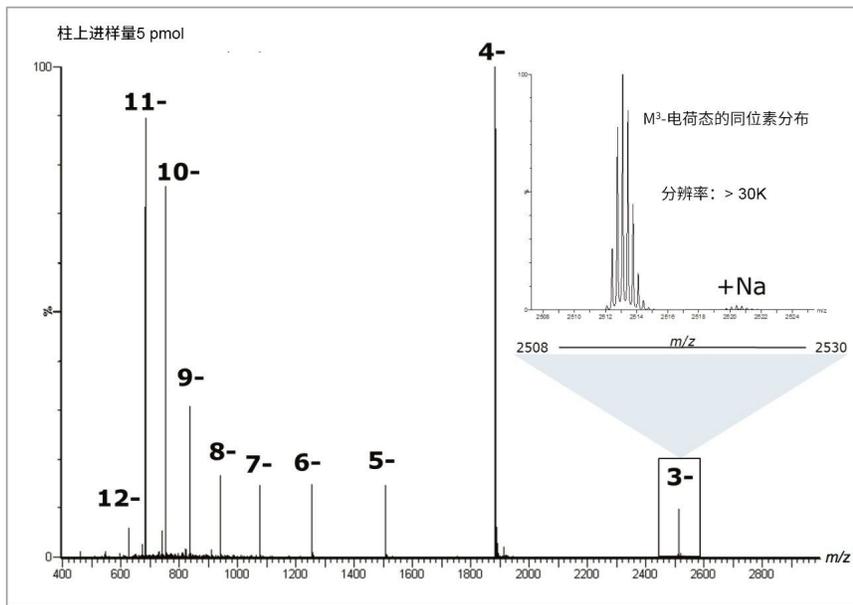


图3. MassPREP OST标准品中25 nt polyT寡核苷酸的ESI组合原始谱图。

使用ProMass HR*可以自动处理MassLynx采集的数据，获得每个样品中包含的去卷积精确单同位素质量数。表1汇总了ProMass HR处理报告，显示了MassPREP OST标准品中包含的五种polyT寡核苷酸的单同位素质量精度。所有五种polyT寡核苷酸的平均质量精度约为1.25 ppm。

使用MassPrep OST标准品测得LC-MS系统的检测限(LOD)为20 fmol柱上载样量，如图4所示。通过对比TUV和TIC色谱图可以看出，LOD受光学/TUV信号的限制，而不受Xevo G2-XS QToF MS仪器的限制。

使用MassLynx结合ProMass HR，可以在合成寡核苷酸的高分辨率筛查和杂质分析中自动采集、处理和分析数据，提高生产率。图5中的MassLynx样品列表显示了该自动化过程应该包含的字段。

*ProMass HR可处理高分辨率MS数据，例如飞行时间(Tof)系统生成的数据；也可以处理低分辨率MS数据，例如四极杆系统生成的数据。ProMass只能处理低分辨率MS数据。

MassPREP OST 标准品	预期质量数	实测质量数	质量精度 (ppm)
15 nt	4498.7348	4498.7300	-1.07
20 nt	6018.9650	6018.9730	1.33
25 nt	7539.1952	7539.1990	0.50
30 nt	9059.4254	9059.4210	-0.49
35 nt	10579.6560	10579.6260	-2.79
		平均值	1.24

表1. MassPREP OST标准品（包含五个polyT寡核苷酸的混合物）的单同位素质质量精度汇总表。

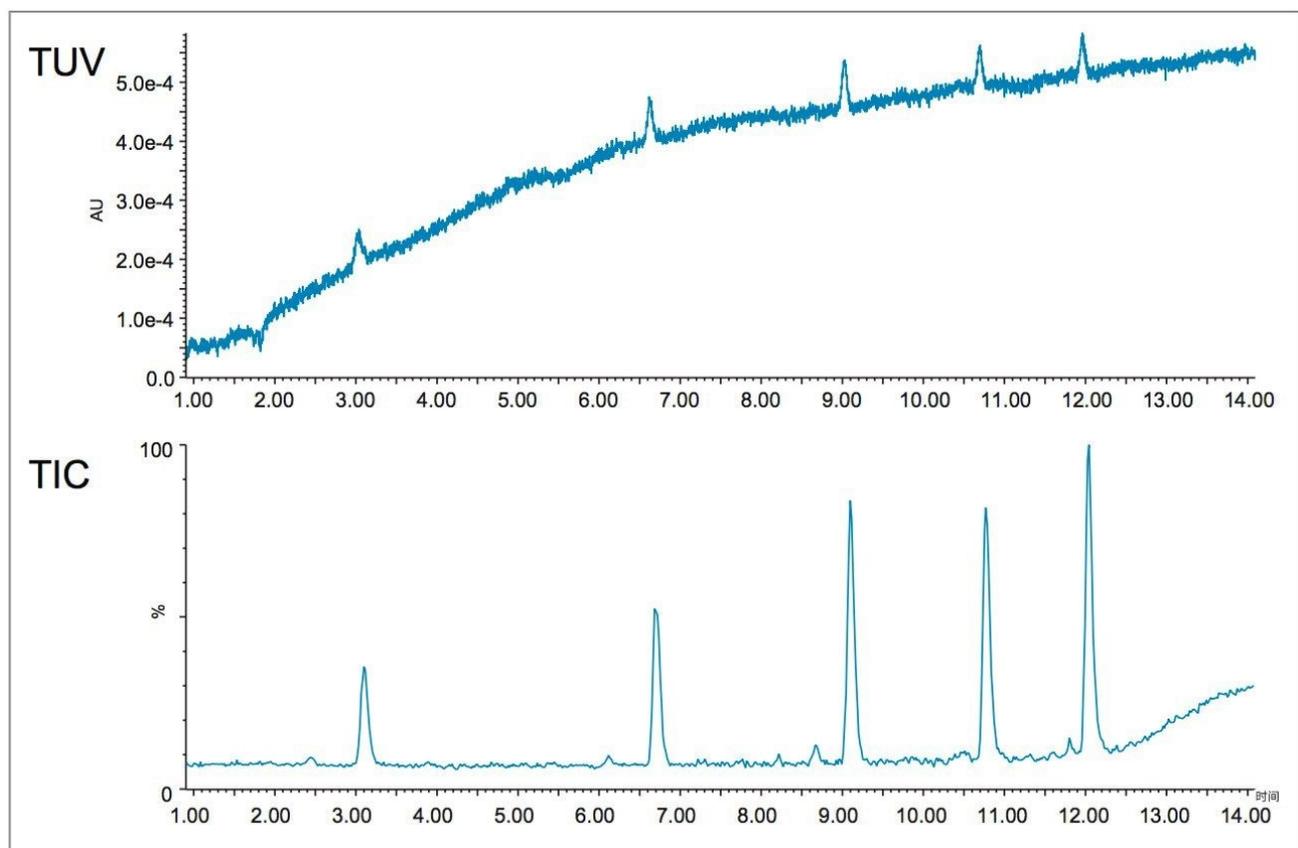


图4.进样20 fmol MassPREP OST标准品（包含五个polyT寡核苷酸的混合物）的TUV（顶部）和TIC（底部）色谱图。

Spectrum	Chromatogram	Map	DriftScope	Edit	Samples	
File Name	Vial	Process	Parameter File	Sequence	Target Info	ZNova Params
1	20160108_HYS_Oligo_206	1.A.1	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
2	20160108_HYS_Oligo_207	1.A.2	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
3	20160108_HYS_Oligo_208	1.A.3	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
4	20160108_HYS_Oligo_209	1.A.4	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
5	20160108_HYS_Oligo_210	1.A.5	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
6	20160108_HYS_Oligo_211	1.A.6	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
7	20160108_HYS_Oligo_212	1.A.7	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
8	20160107_HYS_Oligo_201	1.A.8	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
9	20160108_HYS_Oligo_213	1.B.1	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
10	20160108_HYS_Oligo_214	1.B.2	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
11	20160108_HYS_Oligo_215	1.B.3	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
12	20160108_HYS_Oligo_216	1.B.4	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
13	20160108_HYS_Oligo_217	1.B.5	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
14	20160108_HYS_Oligo_218	1.B.6	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
15	20160107_HYS_Oligo_202	1.B.7	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
16	20160107_HYS_Oligo_203	1.B.8	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
17	20160108_HYS_Oligo_219	1.C.1	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
18	20160108_HYS_Oligo_220	1.C.2	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
19	20160108_HYS_Oligo_221	1.C.3	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params
20	20160108_HYS_Oligo_222	1.C.4	C:\Program Files (x86)\ProMass Bridge 1.1\lib/process_kernel.exe	C:\Program Files\Waters\Pro_... \OligoHRBatch_HYS1.mpl	UUCGUCUAAGCGAUUACAAGGTT	sequence=oligo, ladder=5 C:\Program File_... \20160114_HYS_001.params

图5. MassLynx样品列表显示了自动化数据采集、处理和分析过程所需的字段。包括存储数据的特定样品文件名、指定的进样瓶、过程和参数文件位置、目标分子的序列、分子类型及基本信息，以及定义ProMass HR参数的ZNova文件。

图6显示了其中一个目标ssRNA的TUV色谱图，序列为5'-UCGUCAAGCGAUUACAAGGTT-3'，带有双胸腺嘧啶突出端（上链）。色谱图显示该目标ssRNA与它的单碱基缺失(N-1)和单碱基插入(N+1)形式实现了良好分离。

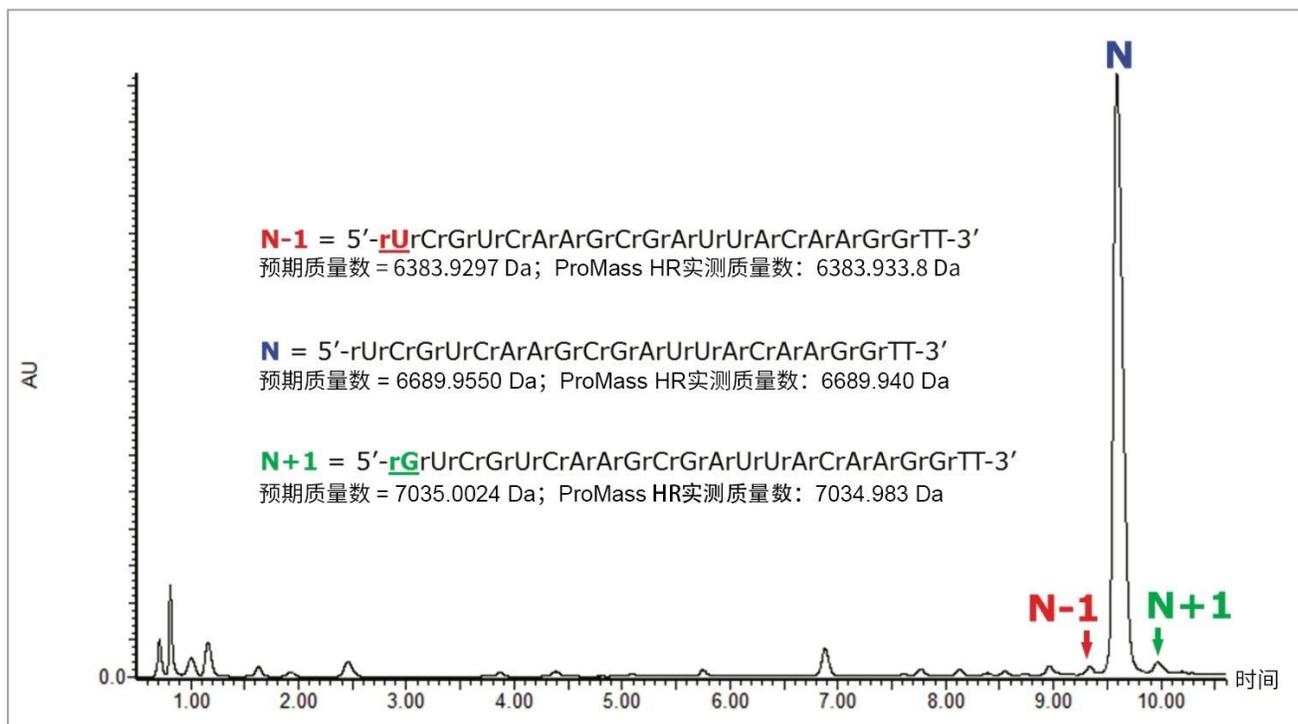


图6.带有双胸腺嘧啶突出端 (siRNA上链) 的ssRNA序列5'-UCGUCAAGCGAUUACAAGGTT-3'的TUV色谱图, 显示目标序列与单碱基缺失(N-1)和单碱基插入(N+1)形式实现了良好分离; LC梯度为流动相B在10分钟内由13%升高至23%。

图7中报告了48个样品 (包括八个空白样品) 的批量筛查和分析结果。图中显示了一个以颜色编码的LC样品盘: 包含目标寡核苷酸 (上链) 的样品标记为绿色; 包含不同寡核苷酸 (下链) 的样品标记为红色; 不包含寡核苷酸的样品标记为白色。孔板中的每个孔位都是一个超链接, 通过它可以轻松查看每个样品的详细实验结果, 例如: ESI原始谱图、色谱保留时间、预期质量数和实测质量数之间的差异 (用质量精度表示, 单位为ppm)、目标寡核苷酸的相对峰面积百分比, 以及相关杂质 (自动鉴定后, 会添加标记)。

例如, 图7下方的表格中准确鉴定并标记了目标ssRNA (上链)、其尿嘧啶缺失(N-1)和鸟嘌呤插入(N+1)杂质, 三者的质量精度分别为0.5 ppm、2.2 ppm和2.8 ppm, 保留时间分别为9.08、9.28和9.73分钟。此外, 根据此数据计算出纯度的估计值为84.26%。颜色编码的HTML报告界面使结果评估变得更容易。

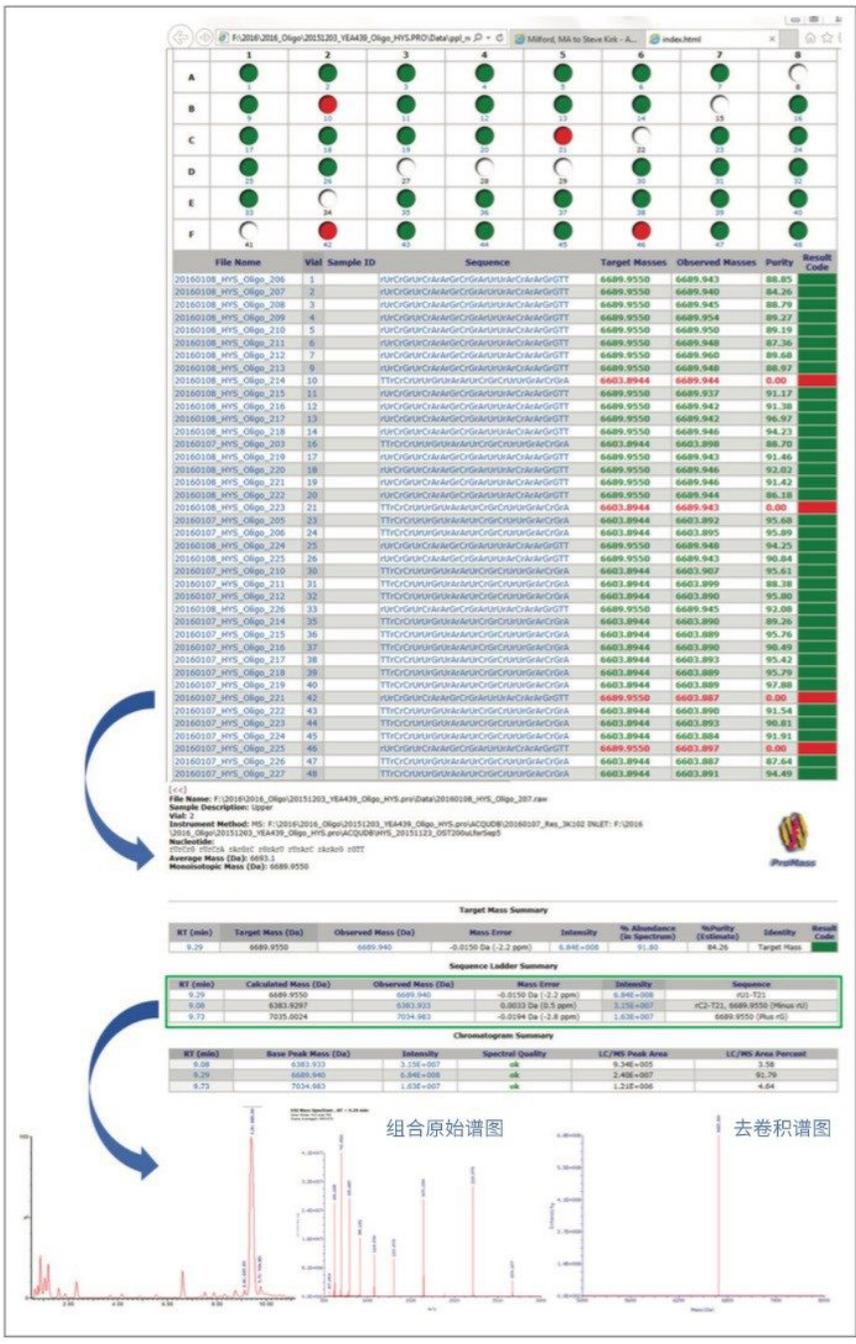


图7.上图高度概括了使用ProMass HR和MassLynx批量处理的实验结果。图中还展示了通过内嵌的HTML超链接连续深入挖掘单个样品的结果。

为了测试LC-MS系统对寡核苷酸序列确认的适用性，我们使用siRNA上链开展了靶向LC-MS/MS实验。图8上图为

21 nt ssRNA样品的MS全扫描谱图，下图为去卷积MS/MS谱图。选择单个电荷态（本例中为M4-）作为母离子，然后在Xevo G2-XS QToF碰撞室中碎裂，碰撞能量(CE)为35 V。接下来使用MaxEnt3对MS/MS谱图进行去卷积。使用Excel文件中组成的公式，根据寡核苷酸序列生成预测的碎片离子列表，然后手动匹配去卷积谱图与预测的碎片离子列表。通过在去卷积MS/MS谱图中找到大部分预测离子，可以确定寡核苷酸的序列。对于21 nt样品的siRNA上链及互补下链（数据未显示），所有C和Y离子均成功匹配，实现了样品的全阶梯测序。

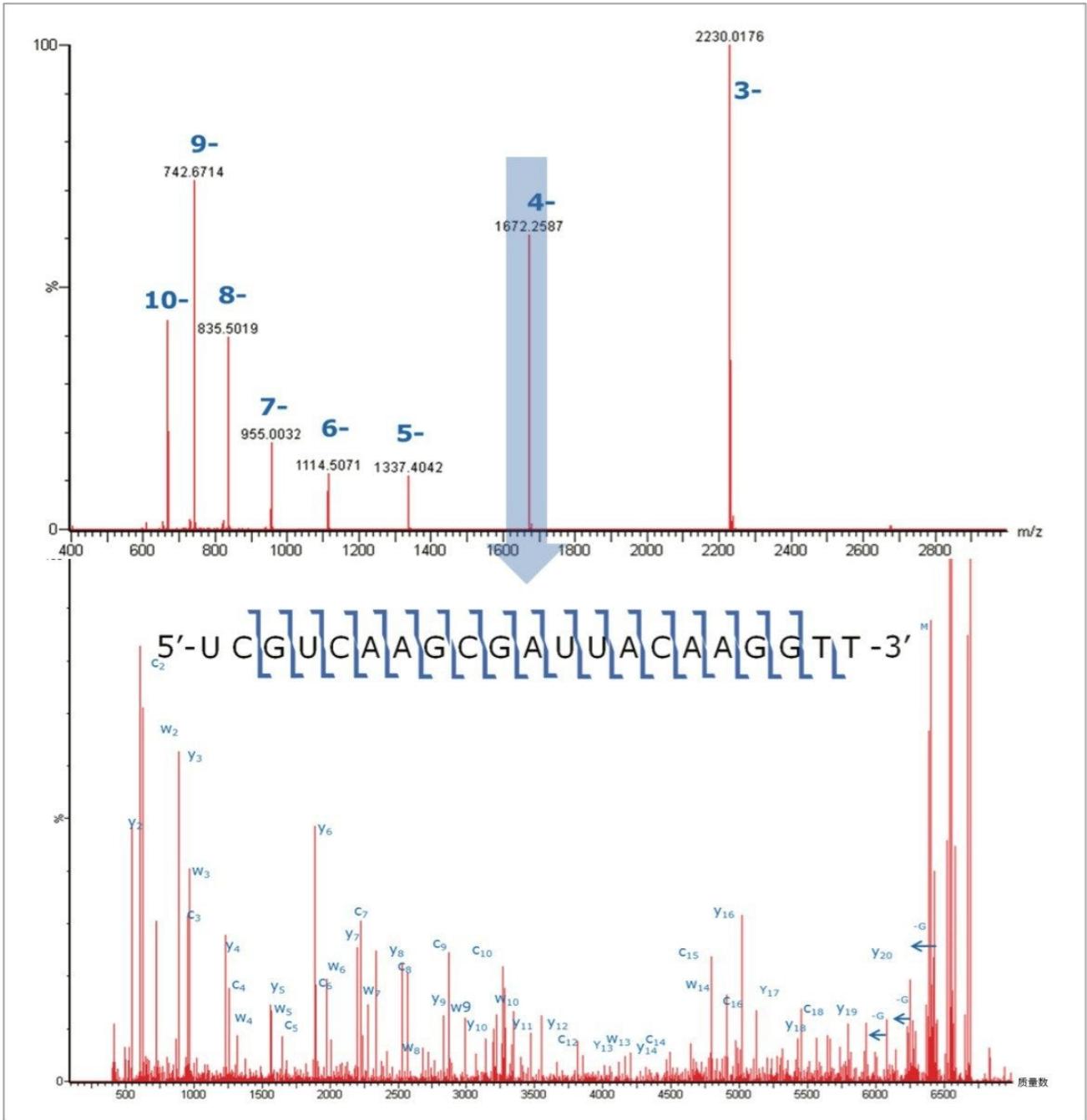


图8.5'-UCGUCAAGCGAUUACAAGGTT-3'的ssRNA序列实现了LC-MS/MS全阶梯序列确认。实验以M4-峰为母离子。碎片离子峰匹配是使用简单的Excel文件计算与理论质量数匹配完成的。使用MaxEnt3对电荷进行去卷积和去同位素。

结论

我们为寡核苷酸的高分辨率质谱表征和筛查开发出一种全新的集成式LC-MS工作流程。为确保实现理想的LC分离和MS检测结果，即，获得最高的质量分辨率和最低的盐加合物峰（MS谱图中的强度小于5%），建议使用LC-MS级TEA、HFIP和水。本实验所用系统表现出优异的灵敏度，使用MassPREP寡核苷酸标准品（包含五个polyT寡核苷酸的混合物）获得的LOD为20 fmol柱上载样量。本研究证明，ProMass HR与MassLynx一体集成，能够对高分辨率LC-MS数据进行自动去卷积，并能使用Xevo G2-XS QToF MS仪器对寡核苷酸样品进行自动化靶向鉴定和杂质分析。

工作流程中的LC部分使寡核苷酸与它的截断(N-1)和插入(N+1)序列实现了出色且高度可重现的分离，MS数据优异的质量证实了分离和检测工作流程的稳定性。ProMass HR可生成基于交互式HTML的颜色编码汇总报告，便于回顾高通量实验结果以及浏览/深入挖掘特定样品数据，包括色谱图、组合原始谱图、去卷积谱图、杂质分析等。本研究还使用Xevo G2-XS QToF MS仪器开展了LC-MS/MS实验，证明该系统能够完成21 nt ssRNA寡核苷酸的全阶梯MS-MS序列确认。

参考资料

1. Routine LC-MS Analysis of Intact Antibodies.Waters Application Note.2015.(P/N 720005557EN)
2. High Sensitivity Intact Mass Analysis of Antibodies (IgG1) Using ionKey/MS.Waters Application Note.2015.(P/N 720005378EN)
3. A Streamlined Data Dependent Acquisition (DDA) Peptide Mapping Workflow for Characterizing Therapeutic Proteins Using the Biopharmaceutical Platform Solution with UNIFI.Waters Application Note.2015.(P/N 720005399EN)
4. Biopharmaceutical Platform Solution with UNIFI: A Holistic Workflow for Acquiring, Processing, and Reporting Fluorescent-Labeled Glycans.Waters Application Note.2016.(P/N 720004619EN)
5. Adding Mass Detection to Synthetic Oligonucleotide Analyses with the ACQUITY QDa Detector.Waters Application Note.2016.(P/N 720005632EN)

6. High-throughput Screening of Oligonucleotides for Identity and Purity Assessment Using the ACQUITY QDa Detector and ProMass for MassLynx. Waters Application Note. 2016. (P/N 720005681EN)

特色产品

Xevo G2-XS QToF质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

ACQUITY UPLC H-Class Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外(TUV)检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

MassLynx质谱软件 <<https://www.waters.com/513662>>

可在线购买

MassPREP OST标准品 <<https://www.waters.com/186004135>>

ACQUITY UPLC BEH C18寡核苷酸分析专用柱, 130Å, 1.7 μm, 2.1 mm X 50 mm <
<https://www.waters.com/186003949>>

720005821ZH, 2016年11月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号