

从肝组织中高效回收寡核苷酸

Kim Van Tran, Mary Trudeau, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

摘要

本应用简报提供了从组织样品中提取治疗性寡核苷酸进行定量分析的相关指导，并展示了从肝组织中高效回收寡核苷酸的效果。

实验

下图（图1）总结了我们在内部使用OligoWorks SPE微孔板试剂盒进行溶剂辅助组织匀浆和寡核苷酸萃取的工作流程和方案。请注意，匀浆组织的质量(mg)与匀浆混合物（包括RapiZyme蛋白酶K酶解试剂、缓冲液和溶剂）总体积(mL)之间的比率为1:10。

1 基于磁珠的匀浆

组织(g)/RapiZyme酶解模块试剂的比例为1:10

100 mg组织

+30 μL 寡核苷酸混标

+220 μL 100 mM Tris HCl pH 7

+ 300 μL 乙腈或甲醇

+100 μL 0.5 M TCEP HCl

+100 μL 6M GuHCl

+250 μL RapiZyme™ 蛋白酶K

使用Precellys组织匀浆器进行磁珠碎裂 (90 s, 6400 rpm)

1. <https://www.berlin-corp.com/5-tissue-homogenizer>

2. BioRender.com.

2 RapiZyme™ 蛋白酶K 酶解

2 h, 55 °C, 600 rpm

4. <https://www.eppendorf.com/us-en/eShop-Products/Temperature-Control-and-Mixing-Instruments/Eppendorf-ThermoMixer-C-p-PFp19703>

3 样品澄清

在冷藏条件下微量离心30 min, ≥ 9,400 RCF (10,000 RPM)²

处理酶解/匀浆的组织上清液

3. <https://www.eppendorf.com/us-en/eShop-Products/Centrifugation/Microcentrifuges>

4 OligoWorks SPE (WAX) SPE微孔板

上样: 200 μL, 1:1

匀浆/酶解的组织上清液(100 μL), 用50 mM NH₄OAc pH 5.5缓冲液(100 μL)稀释

清洗1: 200 μL 50 mM NH₄OAc, pH 5.5 缓冲液

清洗2: 200 μL 30% 甲醇

洗脱: 2 × 25 μL OligoWorks SPE洗脱液

稀释: 1:1水稀释剂用于洗脱液 (可选)

LC-MS分析: 最多30 μL, 直接进样至 DIPEA IP-RPLC

图1.寡核苷酸组织萃取工作流程和方案，使用溶剂辅助组织匀浆，然后使用RapiZyme蛋白酶K酶解模块和OligoWorks SPE微孔板（2 mg/孔）进行酶解。

注：文中所提到的设备为本实验室在用设备，但用户也可以使用具有相同性能的替代设备。

LC-MS分析

LC-MS分析

UPLC	ACQUITY™ Premier BSM系统FTN
MPA	1% HFIP (六氟异丙醇) + 0.1% DIPEA (N,N-二异丙基胺) H ₂ O (水)
MPB	0.75% HFIP, 0.0375% DIPEA和65%乙腈(ACN)
色谱柱吸附剂	ACQUITY Premier C ₁₈ 寡核苷酸分析专用柱, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm
柱温	50 °C
样品温度	10 °C
进样体积	5-15 μL
清洗溶剂	90/10水/MeOH
清洗溶剂	25:25:25水:MeOH:ACN:IPA
MS	Xevo® TQ Absolute
毛细管电压(kV)	2.0
脱溶剂气温度	500 °C
脱溶剂气流速	1000 L/h
锥孔气流速	150 L/h

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.6	95	5	6
3.25	0.6	77	23	6
3.75	0.6	10	90	6
4.1	0.6	10	90	6
4.25	0.6	95	5	6



结果与讨论

使用OligoWorks™ SPE微孔板试剂盒，
通过溶剂辅助组织匀浆和酶解获得高回收率的寡核苷酸组织

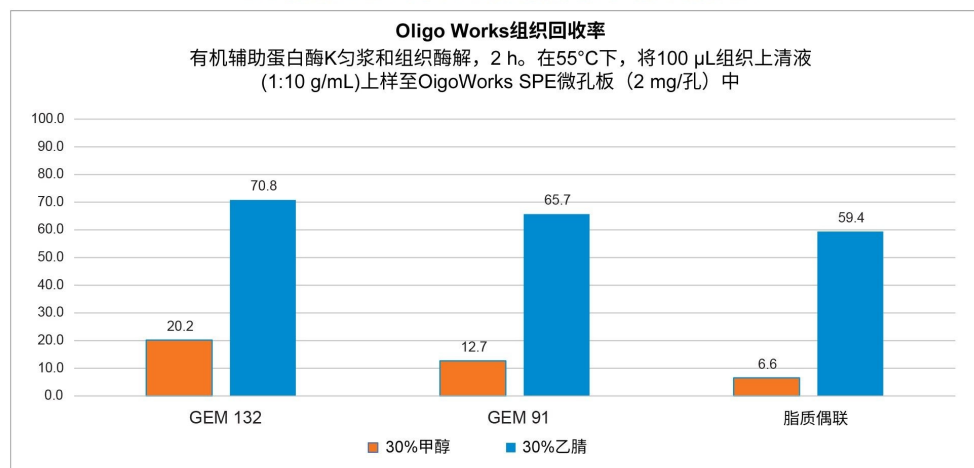


图2. OligoWorks SPE微孔板的性能展示，使用0.05 g组织/0.5 mL蛋白酶K酶解模块试剂 (匀浆并在55 °C，600 rpm下酶解2 h)，并使用OligoWorks SPE微孔板试剂盒 (包含OligoWorks RapiZyme蛋白酶K酶解模块和OligoWorks SPE微孔板，2 mg/孔) 纯化100 μL组织上清液，寡核苷酸回收率> 70%。

订购信息

说明	P/N
OligoWorks SPE微孔板试剂盒	186010614
ACQUITY Premier C ₁₈ 130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm寡核苷酸分析专用柱	186009484
采用MaxPeak技术的QuanRecovery™样品板，700 μL	186009184
聚丙烯盖垫 (圆孔)，96孔	186009452

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo TQ Absolute三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

720008270ZH, 2018年4月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号