

## 开发基于试剂盒的标准化方法用于从生物基质中选择性且可重现地进行治疗性寡核苷酸的样品前处理和萃取

---

Margot Lee, Nikunj Tanna, Mary Trudeau

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

---

### 摘要

寡核苷酸生物分析的样品前处理工作流程往往耗时、复杂，并且需要大量的方法开发才能达到足够高的萃取效率和重现性。分析允许的误差余地很小，而每个样品的生物学性质和目前正在开发的寡核苷酸治疗药物的多样性可能会导致不同日期之间、用户之间和实验室之间的潜在差异性较高。在寡核苷酸的定量分析工作中，普遍面临萃取效率不高及数据重现性不佳的问题，而专业技术的匮乏加剧了这一问题，因此，迫切需要一种标准化的试剂盒方法来制备和萃取寡核苷酸生物分析样品。

### 优势

- 使用OligoWorks WAX SPE微孔板试剂盒解决方案，为寡核苷酸生物分析样品前处理提供一种标准化、精简的方法
  - 采用经预先检测、QC验证，且具有批次可溯源性的试剂，简化样品制备过程
  - 经过优化的方案，可大幅缩短样品前处理和方法开发的时间
  - 基于灵活且可扩展的试剂盒方法，可实现始终如一的高寡核苷酸回收率；可在不同生物基质和起始样品体积
-

(12.5~300  $\mu$ L)条件下，实现高于80%的寡核苷酸回收率

- 性能稳定且可重现，血浆寡核苷酸回收率的RSD  $\leq$  15%
- 直接用于LC-MS样品分析，进样体积可达30  $\mu$ L，无需挥干或复溶样品

---

## 简介

寡核苷酸疗法代表了一类不断发展的疗法，因其能够直接针对疾病的基因转录和翻译层面，而具有巨大的治疗前景，因此，人们越来越需要使用LC-MS技术来进行生物分析定量，以支持这类疗法的进一步开发。在生物分析测定中，样品前处理是导致结果差异的主要原因之一，尤其是在处理寡核苷酸时，目前该领域使用多种样品前处理技术，方案步骤繁多，寡核苷酸萃取效率不一，增加了误差和分析性能的差异性。尽管通过分析方法优化可以降低误差并提高重现性，但在严格的监管要求和确保有效定量所需的可重现性条件下，从客户到客户，或从一个实验室到另一个实验室（例如从发起方到合同研究组织(CRO)）的方法转移过程可能颇具挑战。所有这些都凸显了市场对于更简单、更标准化和精简样品前处理工作流程的迫切需求，该工作流程可以轻松部署到具有不同科研能力的实验室，保障寡核苷酸的高效回收率并减少实验差异性。

本研究使用OligoWorks SPE微孔板试剂盒（P/N: [186010614 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/186010614-oligoworks-spe-microplate-kit.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/186010614-oligoworks-spe-microplate-kit.html)），使用该试剂盒随附的方案和提供的试剂，简化并优化了血浆和尿液生物基质中多种治疗性寡核苷酸的生物分析样品前处理流程。评估的关键性能属性包括：蛋白酶K酶解样品预处理破坏寡核苷酸-蛋白质结合的速度和效率、标准化方案的灵活性和可扩展性、12.5~300  $\mu$ L样品体积范围内的线性MS响应、萃取样品直接LC-MS分析的兼容性（无需挥干和复溶样品），当然，还包括多种寡核苷酸的高萃取效率和高重现性。

---

## 实验

为开发和评估OligoWorks SPE试剂盒，研究中使用购自BIOIVT（纽约韦斯特伯里）的大鼠血浆或尿液制备几种寡核苷酸。下面列出了这些寡核苷酸。

1. MassPREP寡核苷酸标准品，其中包含寡核苷酸脱氧胸苷核苷酸(dT)混合物，含有等量的15个(MWT 4499)、20个(MWT 6020)、25个(MWT 7541)、30个(MWT 9062)和35个核苷酸(MWT) 10584)

2. 基因表达调节剂91 (GEM91), 一种25 mer硫代磷酸化反义寡核苷酸(MWT 7771), 由Nitto Denko Avecia (美国马萨诸塞州米尔福德) 合成
3. GEM 132, 一种带有2'甲氧基帽的20 mer硫代磷酸化反义寡核苷酸(MWT 6600), 由Nitto Denko Avecia (美国马萨诸塞州米尔福德) 合成
4. N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)偶联siRNA寡核苷酸(MWT 8590)和单链DNA (ssDNA), 20 mer寡核苷酸(MWT 6122), 由Alnylam Pharmaceuticals (马萨诸塞州剑桥) 慷慨提供
5. 带5'棕榈酸酯修饰、硫代磷酸化骨架和末端甲氧基乙基修饰的16 mer反义寡核苷酸脂质偶联物(MWT 5726), Biosearch Technologies (丹麦吕斯楚普)

每种评估的寡核苷酸在血浆和/或尿液中的浓度介于0.1–10 µg/mL和/或0.01~1 pmol/µL之间。OligoWorks SPE试剂盒开发和评估的起始样品体积为12.5~300 µL, 使用OligoWorks SPE微孔板试剂盒时, 理想起始体积为100 µL。

## 样品预处理和SPE萃取

制备四份寡核苷酸生物样品等分试样, 加入Eppendorf 1 mL深孔板 ([Eppendorf深孔板 - Eppendorf US <https://www.eppendorf.com/us-en/eShop-Products/Laboratory-Consumables/Plates/Eppendorf-Deepwell-Plates-p-PF-55960>](https://www.eppendorf.com/us-en/eShop-Products/Laboratory-Consumables/Plates/Eppendorf-Deepwell-Plates-p-PF-55960)) 中, 使用OligoWorks SPE微孔板试剂盒中包含的RapiZyme蛋白酶K模块, 按OligoWorks SPE Kit Care and Use Manual (《OligoWorks SPE试剂盒维护和使用手册》, [720008066 <https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135127508>](https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135127508)) 中的说明进行酶解。方案如图1所示。所用试剂体积针对起始生物样品体积100 µL进行了优化 (注: 对于12.5~300 µL起始样品体积的推荐试剂体积。可参见OligoWorks SPE Kit Care and Use Manual (《OligoWorks SPE试剂盒维护和使用手册》))。在开发OligoWorks SPE试剂盒随附的方案期间, 研究人员发现, 在SPE微孔板上样品之前, 将RapiZyme蛋白酶K酶解后的样品用水1:1稀释, 可使某些寡核苷酸 (MassPREP OST和GalNAc) 的回收率达到最高)。这种酶解后的1:1稀释处理降低了样品中的总胍浓度, 胍可能会竞争阴离子交换(AX)结合位点并限制寡核苷酸的结合能力, 因此采用这种稀释法方法可以提高某些寡核苷酸的回收率。

## OligoWorks样品前处理和SPE 萃取方案

### RapiZyme蛋白酶K酶解样品预处理

#### 样品预处理

100  $\mu$ L 生物样品, 20  $\mu$ L GuHCl (变性) + 10  $\mu$ L TCEP  
(还原) + 50  $\mu$ L RapiZyme蛋白酶K (酶解)

在55 °C、600 rpm下温育60分钟

### OligoWorks SPE微孔板 (2 mg/孔)

#### 上样

全部经过预处理蛋白酶K酶解后的寡核苷酸样品  
(约180  $\mu$ L)

#### 清洗

清洗1: 1  $\times$  200  $\mu$ L, 50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 5.5  
清洗2: 1  $\times$  200  $\mu$ L, 30%甲醇

#### 洗脱

2  $\times$  25  $\mu$ L OligoWorks洗脱液, 用50  $\mu$ L水稀释  
(可选)

图1. OligoWorks生物分析样品前处理微孔板试剂盒方案 (P/N : 186010614) 图示, 针对100  $\mu$ L起始血浆/血清样品进行了优化。

## OligoWorks SPE清洗试剂 (不包含在OligoWorks SPE试剂盒中)

称取3.84 g乙酸铵, 定容至1 L, 调节pH至5.5, 制得50 mM乙酸铵缓冲液(pH 5.5)作为OligoWorks SPE清洗试剂1。将300 mL甲醇加入700 mL水中, 制得30%甲醇/70%水溶液, 作为OligoWorks SPE清洗试剂2。

## LC-MS分析

寡核苷酸分析采用离子对反相超高效液相色谱(UPLC)分离, 然后在串联/三重四极杆质谱仪上使用多重反应监测(MRM)进行质谱(MS)检测。使用ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> 1.7  $\mu$ m色谱柱 (P/N: [186009452 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009452-acquity-premier-beh-c18-column-](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009452-acquity-premier-beh-c18-column-)

17--m-21-x-50-mm-1-pk.html> )，采用OligoWorks SPE Kit Care & Use Manual (《OligoWorks SPE试剂盒维护和使用手册》) 中提供的推荐梯度和MS条件，分析时间为5分钟。每种寡核苷酸的MRM MS通道如表1所示。

寡核苷酸	母离子 ( <i>m/z</i> )	碎片离子 ( <i>m/z</i> )
OST 15T	642.0	303.0
OST 30T	646.4	303.0
OST 20T	668.1	303.0
OST 25T	684.7	303.0
OST 35T	704.6	303.0
GEM132	732.8	94.9
GEM132	824.5	95.0
GALNAC	779.6	227.2
GEM91	863.1	95.0
脂质偶联	1431.8	1536.3

表1.OligoWorks试剂盒开发中评估的每种寡核苷酸的MS MRM通道。

## 结果与讨论

过去十年来，寡核苷酸类治疗药物的研发受到极大的关注，因此，迫切需要通过生物基质中准确且可重现的LC-MS定量分析来支持寡核苷酸的研发。然而，开发高灵敏度分析方法仍然充满挑战，因为样品前处理和萃取选择和选项繁多，在所需时间、复杂性和分析性能方面各不相同。在本应用中，我们使用OligoWorks SPE微孔板试剂盒来简化并优化寡核苷酸生物分析的样品前处理过程。

### OligoWorks SPE试剂盒随附方案的开发与优化

在OligoWorks试剂盒的开发过程中，我们评估了化学性质各异的各种寡核苷酸（列于实验部分），目的是尽可能提高寡核苷酸在不同模式和生物基质中的回收率，从而得出了OligoWorks SPE试剂盒随附的方案。优化的重点领域集中在样品预处理和SPE方案。生物基质的常见样品预处理方法是通过裂解或使用变性缓冲液。在我们看来，这

类方法的萃取效率有限，需要对单个寡核苷酸样品的预处理进行优化。此外，这些含有裂解缓冲液的样品的下游SPE萃取，需要额外的大体积清洗步骤，以有效去除样品中含有的缓冲液和清洁剂，才能进行LC-MS分析。同时，由于存在载样量限制，使用裂解缓冲液会将起始血浆样品的上样体积限制为 $\leq 25 \mu\text{L}$ 。从本质上讲，样品中的盐和离子型清洁剂会与寡核苷酸竞争阴离子交换保留，导致寡核苷酸在上样时有所损失（穿过），进而导致SPE回收率降低。因此，我们的方法主要使用蛋白酶K样品酶解预处理策略，因为它可以更均匀地破坏寡核苷酸-蛋白质结合，并且不含清洁剂，消除了需要进行大量SPE清洗和起始样品体积小( $\leq 25 \mu\text{L}$ )的问题。蛋白酶K酶解样品预处理优化的重点是：1.特定酶解试剂及其各自的浓度，2.酶解时间，和3.完全破坏寡核苷酸-蛋白质结合的最大酶解效率（寡核苷酸最大回收率）所需的温度。图2的A-D图突出显示了酶解100  $\mu\text{L}$ 含有各种寡核苷酸的初始血浆样品，然后进行LC-MS分析后的评估。图2A展示了使用胍作为变性剂以及还原剂三(2-羧乙基)膦酸(TCEP)时，GEM91、GEM 132、GalNAc和脂质偶联寡核苷酸获得的最佳寡核苷酸回收率（在55 °C下酶解1小时），回收率高于87%。虽然二巯基苏糖醇(DTT)具有相似的性能，但TCEP由于其在液体和室温下具有稳定性而被选择。图2B显示，加入双倍量的蛋白酶K溶液(20 mg/mL)并在65 °C下酶解15分钟后，GEM91、GEM132和GalNAc寡核苷酸回收率提高了约15%。这分别对应25  $\mu\text{L}$  vs. 50  $\mu\text{L}$ 蛋白酶K试剂的添加量。实验评估选择了45 °C、50 °C、55 °C和65 °C作为蛋白酶K的酶解温度（这些是常规报道使用的温度），GEM91、GEM132、GalNAc和脂质偶联寡核苷酸理想的酶解温度（最佳寡核苷酸回收率）确定为55 °C，如图2C中所示。实验评估了65 °C的酶解温度为，尝试缩短酶解时间（数据未显示）。65 °C的温度可提供较高的寡核苷酸回收率，同时还提供了较高的批间和批内重现性。最后，1小时的酶解时间为筛选的各种寡核苷酸提供了回收率和重现性之间的理想平衡。图2D中突出显示了GEM91、GEM132、GalNAc和脂质偶联寡核苷酸的回收率。

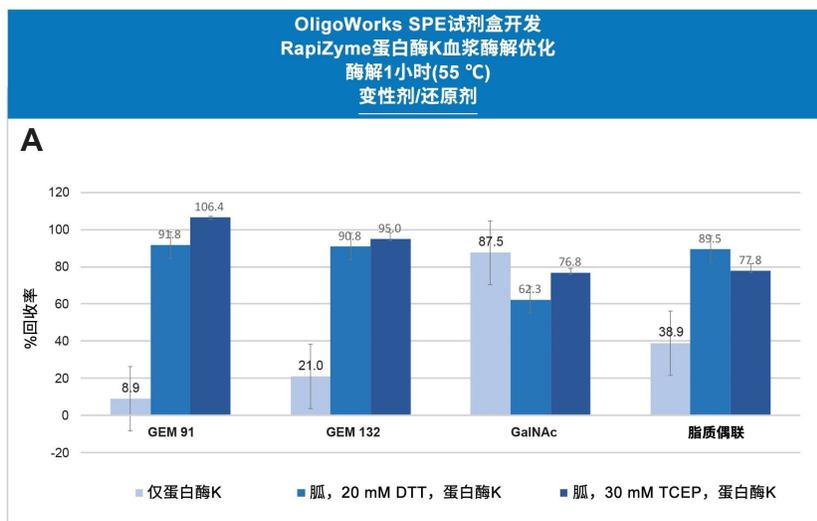


图2. RapiZyme蛋白酶K酶解样品预处理优化：变性剂/还原剂试剂(A)、蛋白酶K的酶浓度(B)、酶解温度(C)和酶解时间(D)。

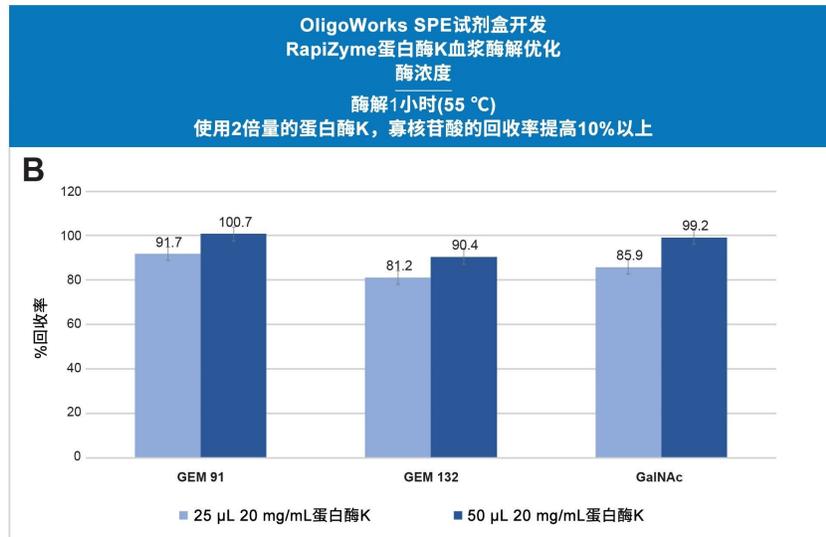


图2. RapiZyme蛋白酶K酶解样品预处理优化：变性剂/还原剂试剂(A)、蛋白酶K的酶浓度(B)、酶解温度(C)和酶解时间(D)。

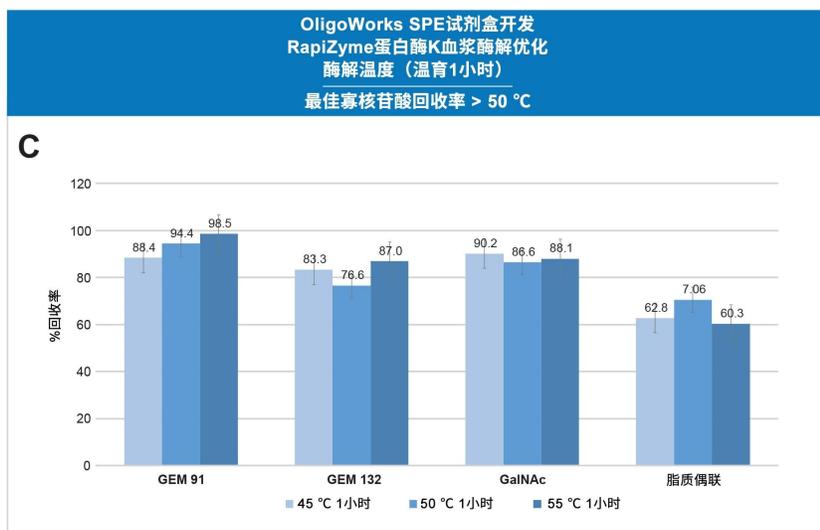


图2. RapiZyme蛋白酶K酶解样品预处理优化: 变性剂/还原剂试剂(A)、蛋白酶K的酶浓度(B)、酶解温度(C)和酶解时间(D)。

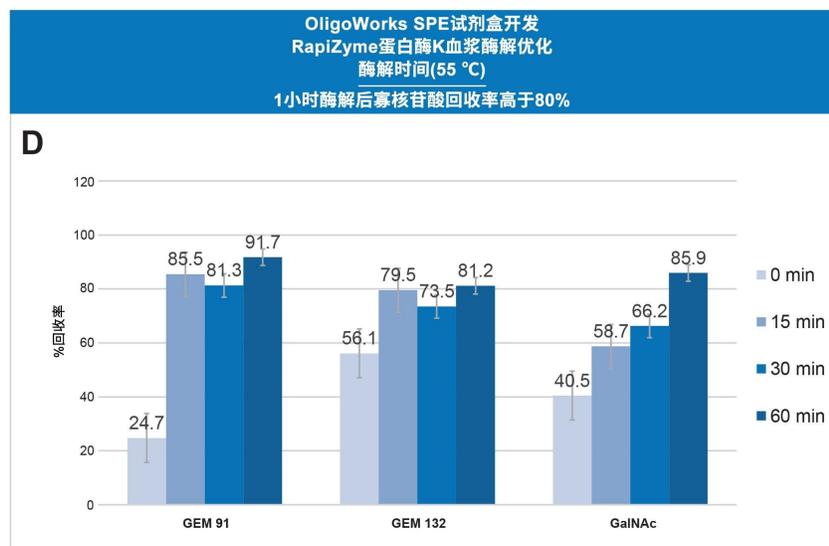


图2. RapiZyme蛋白酶K酶解样品预处理优化: 变性剂/还原剂试剂(A)、蛋白酶K的酶浓度(B)、酶解温度(C)和酶解时间(D)。

## 微孔板WAX SPE方案优化

在完成蛋白酶K酶解预处理优化之后，研究工作集中于在不同基质中制备的多种寡核苷酸实现最高的SPE回收率：1.纯（未酶解）（非基质）50 mM乙酸铵溶液(pH 5.5)，2.纯（非基质）酶解样品，3.血浆酶解基质样品和4.尿液酶解基质样品。研究中观察到在乙酸铵中制备的MassPREP OST dT和GalNAc的SPE回收率优于经过酶解的纯（非基质）样品、血浆和尿液基质样品。通过后续的研究和方案修改，在SPE上样之前使用1:1的水稀释蛋白酶K酶解样品，MassPREP OST dT和GalNAc寡核苷酸的SPE回收率得到了显著提高。这种1:1的样品稀释减少了来自酶解所用胍试剂和尿液基质中内源性盐的总盐浓度。这些盐限制了SPE吸附剂的离子交换容量，与寡核苷酸阴离子交换保留发生竞争，导致上样时SPE的回收率降低。当使用 $\mu$ Elution时，这种容量限制尤为明显，因为每个孔的吸附床载样量较低(2 mg)。在SPE上样品之前进行酶解样品的1:1稀释可以提升回收率，如图3所示。

洗脱液组分是其中一个较为关键的方面。在我们的大部分评估中，使用含50 mM TEA的50%甲醇溶液通常都能为各种寡核苷酸提供>70%的良好回收率。持续优化后发现，增加TEA浓度和添加 $\text{NH}_4\text{OH}$ 溶液可以让寡核苷酸回收率提高5%~10%。基于此原因，实验选择了含100 mM TEA的50% 甲醇溶液（含0.3%  $\text{NH}_4\text{OH}$ 组分，v:v）作为OligoWorks SPE的最终洗脱液。使用100  $\mu\text{L}$ 含GEM91、GEM132、GalNAc和脂质偶联寡核苷酸的尿液样品，在55  $^\circ\text{C}$ 下使用RapiZyme蛋白酶K模块温育1小时，然后进行优化洗脱，回收率结果如图3B所示。最后，我们对洗脱体积进行了评估，充分利用OligoWorks SPE微孔板形式的优势，即完全回收分析物所需的洗脱体积较低(25~50  $\mu\text{L}$ )，尽可能地减少了样品挥发和复溶的需要。这项洗脱研究采用1 $\times$ 和2 $\times$  SPE洗脱步骤，总洗脱体积为50  $\mu\text{L}$ 和100  $\mu\text{L}$ ，最终目标是尽可能减少完全洗脱寡核苷酸所需的样品洗脱体积，并尽可能提高LC-MS的分析灵敏度。评估结果如图3C所示。比较总体MS响应（归一化至1  $\times$  50  $\mu\text{L}$ 样品洗脱体积），50  $\mu\text{L}$ 洗脱样品的信号是100  $\mu\text{L}$ 洗脱体积的2倍，表明50  $\mu\text{L}$ 的洗脱体积足以充分萃取寡核苷酸。此外，2 $\times$ 洗脱策略提供了最佳回收率。这是符合预期的，因为SPE吸附剂装置中存在基本的滞留体积。OligoWorks SPE微孔板的滞留体积约为5~7  $\mu\text{L}$ 。该滞留体积中包含少量百分比的洗脱寡核苷酸。因此，第二次洗脱能够从吸附床中完全洗脱寡核苷酸，还可以减少样品差异性。

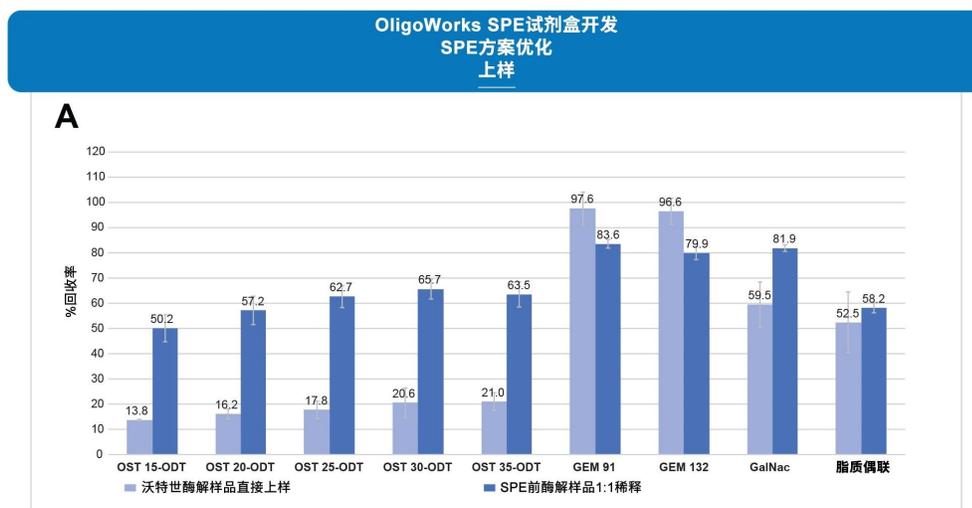


图3. *OligoWorks* SPE微孔板试剂盒优化了酶解样品上样量(A)、洗脱溶液(B)和洗脱体积(C)。



图3. *OligoWorks* SPE微孔板试剂盒优化了酶解样品上样量(A)、洗脱溶液(B)和洗脱体积(C)。

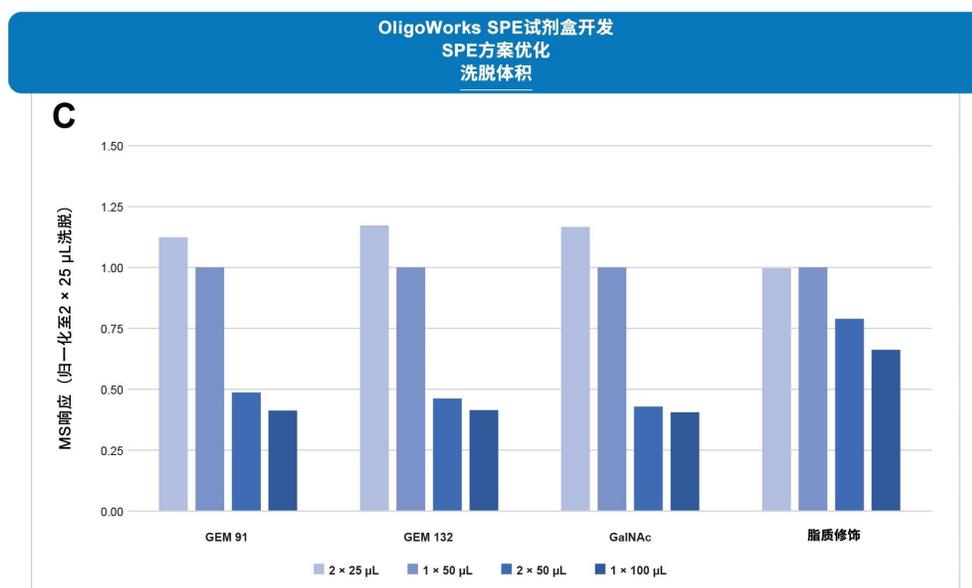


图3. OligoWorks SPE微孔板试剂盒优化了酶解样品上样量(A)、洗脱溶液(B)和洗脱体积(C)。

## OligoWorks SPE微孔板试剂盒性能

使用OligoWorks微孔板试剂盒以及优化方案对寡核苷酸生物分析的最终萃取性能（例如回收率、重现性和基质效应）进行验证，所用寡核苷酸从100 µL尿液和血浆中萃取而得（如前文所述）（评估原始峰面积计数，没有内标校正），随后进行LC-MS分析。图4和图5以及表2和表3突出显示了萃取性能，表现出较高的寡核苷酸回收率和批内重现性，相对标准偏差(RSD) ≤ 15%，并且基质效应(ME)较低。高寡核苷酸回收率的实现可以改善分析检测限，并有利于使用临床前研究和发现研究中常见的低样品体积。低基质效应通常是样品萃取物洁净度中确保分析特异性的指标，而批间/批内RSD值较高则表明总体分析检测的重现性和精密度较差。研究中除寡核苷酸批间性能外，还评估了两(2)名分析人员在不同日期，使用总共三(3)个批次的RapiZyme蛋白酶K酶解模块和六(6)个批次的OligoWorks WAX SPE吸附剂（96孔微孔板）的试剂盒间重现性。在此次评估中，样品的前处理如下：使用OligoWorks微孔板试剂盒和方案处理并萃取制得的100 µL寡核苷酸血浆样品，然后对所得的洗脱液进行LC-MS分析。图6突出显示了通过该评估获得的耐用且可重现的试剂盒内和试剂盒间寡核苷酸萃取性能；使用RapiZyme蛋白酶K酶解模块(A)和OligoWorks WAX SPE吸附剂(B)可实现高寡核苷酸回收率，批内RSD和批次重现性≤5%。此外，由两(2)名分析人员在两(2)天进行计算的寡核苷酸回收率比较，两者的差异在15%以内（表4）。

图7展示了OligoWorks SPE微孔板试剂盒使用不同血浆(A)和尿液(B)起始体积的灵活性。使用12.5~300 µL的起始

血浆体积和25~200  $\mu\text{L}$ 的尿液体积评估寡核苷酸响应的原始峰面积，可以看到，GEM91寡核苷酸的MS响应线性增加，表明使用微孔板SPE并没有超出容量。OligoWorks WAX SPE微孔板试剂盒及其无需清洁剂的工作流程的另一个优势在于，萃取样品可直接兼容MS，洗脱体积可低至25  $\mu\text{L}$ 。这样可以支持更高的样品浓度，同时省去了繁琐的挥干和复溶工作，并减少了复溶时因吸附和溶解作用可能导致的寡核苷酸损失。

图8的A图和B图分别突出显示了洗脱液与LC-MS的直接兼容性，GEM 91寡核苷酸的LC-MS响应呈线性，进样体积介于12.5~300  $\mu\text{L}$ 之间时无峰畸变。这项分析使用配备30  $\mu\text{L}$ 针和50  $\mu\text{L}$ 扩充定量环的ACQUITY Premier UPLC™系统进行。

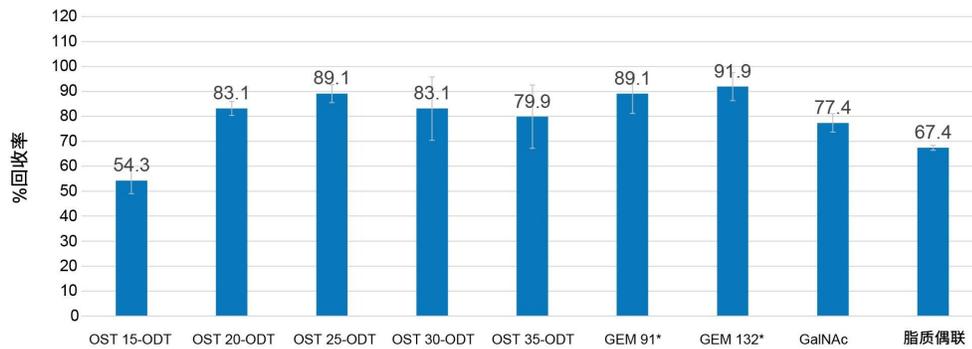


图4.对于多种寡核苷酸，OligoWorks SPE微孔板试剂盒的萃取性能（无内标校正）表现出高血浆\*回收率（55  $^{\circ}\text{C}$ 下酶解1小时）、低基质效应，且批内RSD  $\leq 15\%$ 。\*在SPE上样之前，将酶解血浆样品用水1:1稀释。1:1稀释大幅减少了MassPREP OST和GalNAc寡核苷酸在SPE上样时的寡核苷酸损失（穿过），确保了高SPE回收率。

OligoWorks SPE微孔板试剂盒性能 血浆回收率、基质效应和RSD									
寡核苷酸	OST 15-ODT*	OST 20-ODT*	OST 25-ODT*	OST 30-ODT*	OST 35-ODT*	GEM 91	GEM 132	GalNAc*	脂质偶联
血浆回收率	54.3	83.1	89.1	83.1	79.9	89.1	91.9	77.4	67.4
RSD	5.3	2.8	3.6	12.7	12.7	7.9	5.6	3.7	1.0
基质效应%	6.2	-3.5	-9.5	-10.3	7.5	6.0	-2.0	7.4	-27.3

表2.对于多种寡核苷酸，OligoWorks SPE微孔板试剂盒的萃取性能（无内标校正）表现出高血浆\*回收率（55 °C下酶解1小时）、低基质效应，且批内RSD ≤ 15%。\*在SPE上样之前，将酶解血浆样品用水1:1稀释。1:1稀释大幅减少了MassPREP OST和GalNAc寡核苷酸在SPE上样时的寡核苷酸损失（穿过），确保了高SPE回收率。

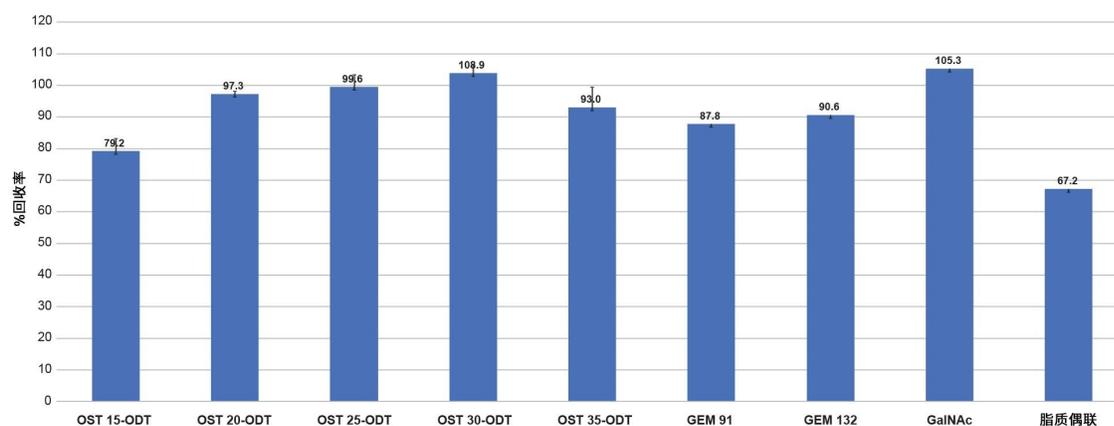


图5.对于多种寡核苷酸，OligoWorks SPE微孔板试剂盒的萃取性能（无内标校正）表现出高尿液\*回收率（55 °C下酶解1小时）、低基质效应，且批内RSD ≤ 15%。\*在SPE上样之前，将酶解尿液样品用水1:1稀释。这种1:1样品稀释可降低尿液基质中的总盐浓度，尽可能减少SPE上样的寡核苷酸损失（穿过），确保高SPE回收率。

OligoWorks SPE微孔板试剂盒性能 尿液回收率、基质效应和RSD									
寡核苷酸	OST 15-ODT	OST 20-ODT	OST 25-ODT	OST 30-ODT	OST 35-ODT	GEM 91*	GEM 132*	GalNAc	脂质偶联
尿液	79.2	97.3	99.6	103.9	93.0	87.8	90.6	105.3	67.2
RSD	11.5	7.4	9.8	10.1	5.8	3.6	6.2	10.6	10.4
基质效应%	4.2	5.2	8.4	-1.0	1.7	2.5	13.9	-11.1	-27.3

表3.对于多种寡核苷酸，OligoWorks SPE微孔板试剂盒的萃取性能（无内标校正）表现出高尿液\*回收率（55 °C下酶解1小时）、低基质效应，且批内RSD ≤ 15%。\*在SPE上样之前，将酶解尿液样品用水1:1稀释。这种1:1样品稀释可降低尿液基质中的总盐浓度，尽可能减少SPE上样的寡核苷酸损失（穿过），确保高SPE回收率。

**OligoWorks SPE微孔板试剂盒性能  
批间重现性OligoWorks RapiZyme蛋白酶K酶解模块  
批次间的血浆寡核苷酸回收率≤ 15% SD**

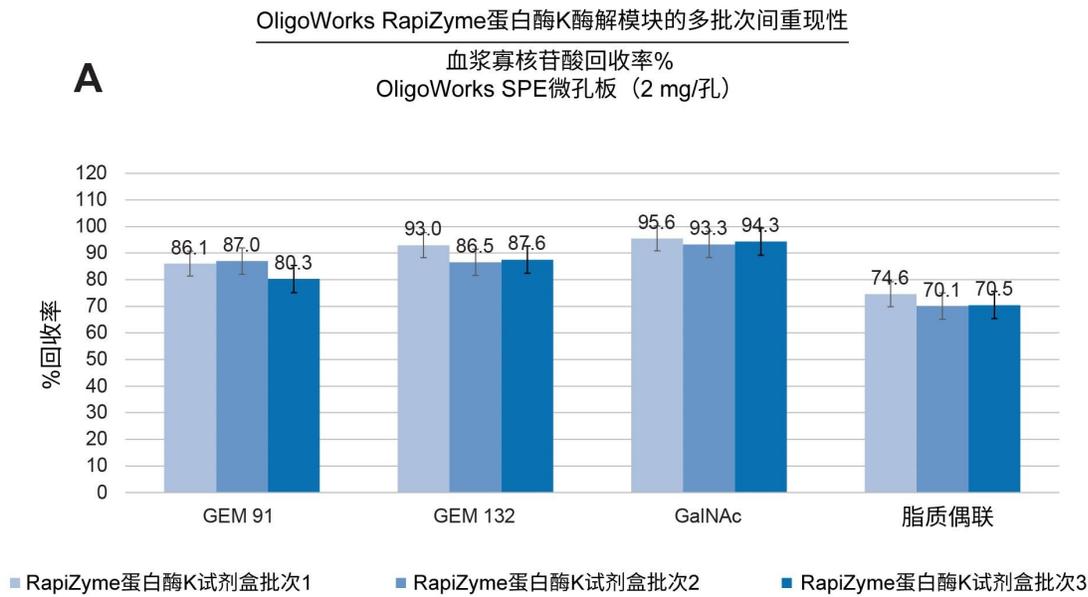


图6. OligoWorks试剂盒SPE微孔板试剂盒批间性能展示，使用提供的起始方案（在55 °C下酶解1小时）从100 μL起始血浆体积中萃取的多种寡核苷酸治疗药物具有较高的血浆回收率（无内标校正），且批间和批内RSD ≤ 15%。

3批RapiZyme蛋白酶K酶解模块(A)和6批OligoWorks WAX SPE吸附剂(B)（96孔微孔板）。

**OligoWorks SPE微孔板试剂盒性能，批间重现性 $\leq 15\%$  SD**  
**OligoWorks SPE WAX吸附剂**  
**批次间的血浆寡核苷酸回收率**

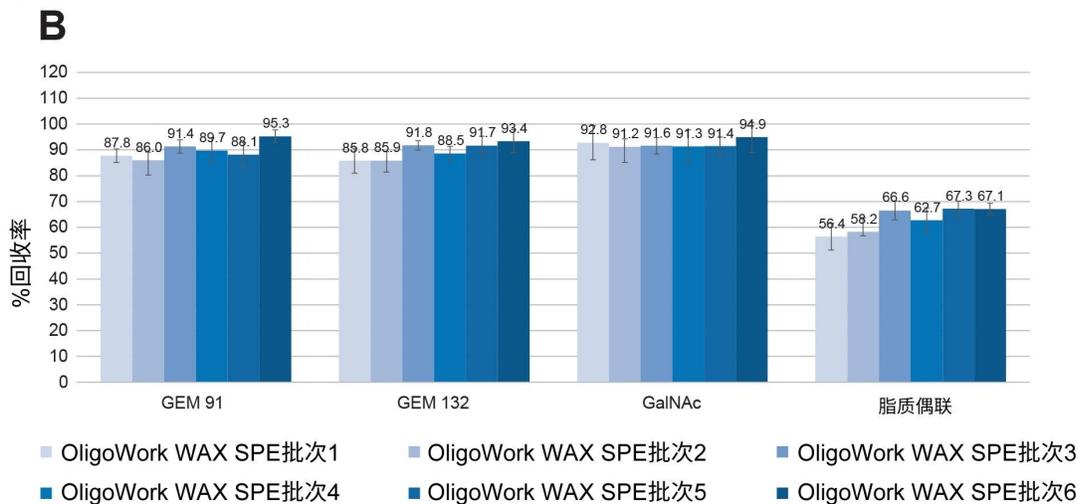


图6. *OligoWorks*试剂盒SPE微孔板试剂盒批间性能展示，使用提供的起始方案（在55 °C下酶解1小时）从100  $\mu$ L起始血浆体积中萃取的多种寡核苷酸治疗药物具有较高的血浆回收率（无内标校正），且批间和批内RSD $\leq 15\%$ 。

3批*RapiZyme*蛋白酶K酶解模块(A)和6批*OligoWorks WAX SPE*吸附剂(B)（96孔微孔板）。

OligoWorks SPE微孔板试剂盒性能 用户间和日间 不同用户和不同日期的血浆寡核苷酸回收率重现性差异 $\leq 15\%$									
OligoWorks用户间重现性：血浆回收率差异									
	OST 15-ODT	OST 20-ODT	OST 25-ODT	OST 30-ODT	OST 35-ODT	GEM 91*	GEM 132*	GalNAc	脂质偶联
用户间，第1天	1.7	0.1	6.5	-0.6	7.7	5.3	4.0	-0.2	12.6
用户间，第2天	3.0	7.4	13.6	-5.5	1.8	1.8	-0.2	-1.9	4.0
OligoWorks日间重现性：血浆回收率差异									
日间，用户1	1.6	-3.8	-0.3	-8.4	8.3	0.4	-5.2	-3.6	-15.3
日间，用户1	2.9	3.4	6.8	-13.3	2.3	-3.0	-9.4	-5.2	-23.9

表4. *OligoWorks*试剂盒的日间/用户间性能（无内标校正）展示，2位用户在2天采用标准起始方案（55 °C下酶解1小时）从血浆起始样品体积100  $\mu$ L中萃取寡核苷酸的回收率(N=4)差异  $\leq 15\%$ 。

**OligoWorks SPE微孔板试剂盒性能**  
寡核苷酸LC-MS响应展示了OligoWorks  $\mu$ Elution (2 mg) SPE板在处理不同起始体积的血浆(12.5-300  $\mu$ L)和尿液(25-200  $\mu$ L)样品时, 对于寡核苷酸回收率方面的有效性

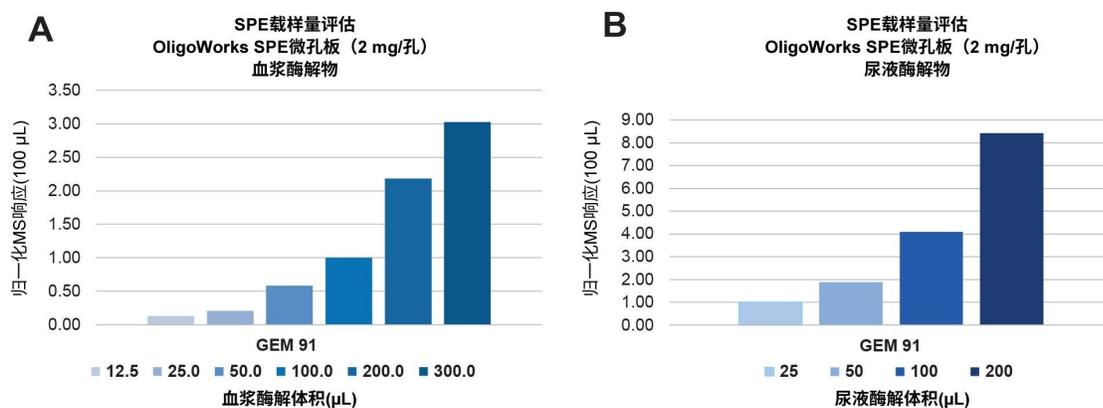


图7. *OligoWorks* WAX SPE微孔板试剂盒的灵活性展示, 使用*OligoWorks*方案 (55 °C下酶解1小时) 获得了GEM91寡核苷酸在12.5~300  $\mu$ L的血浆体积(A)和25~200  $\mu$ L尿液体积(B)范围内的线性LC-MS响应。

OligoWorks SPE微孔板试剂盒性能  
SPE洗脱液直接兼容LC-MS  
线性寡核苷酸MS响应1~30  $\mu\text{L}$

A

进行LC-MS分析之前，用水1:1稀释OligoWorks SPE洗脱液

**GEM 91**

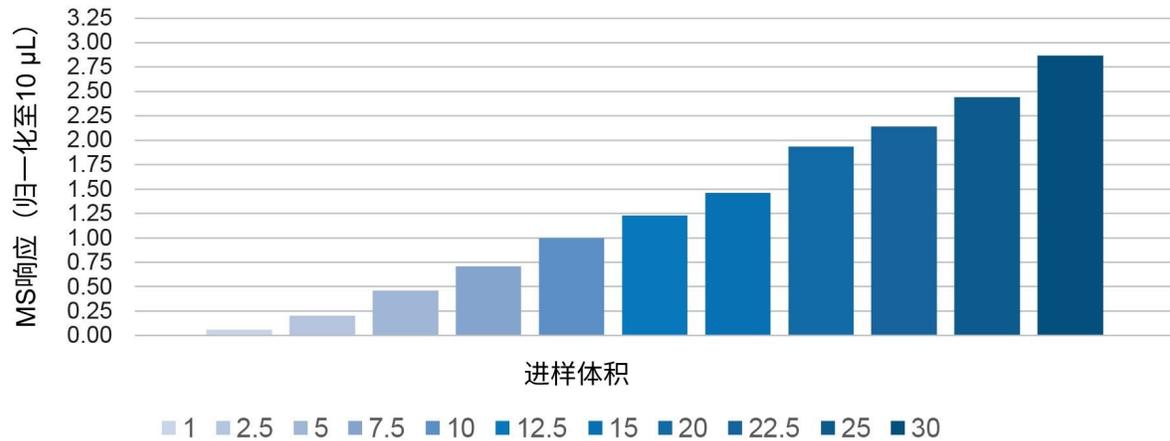


图8.洗脱液与LC-MS的直接兼容性展示，GEM 91寡核苷酸的LC-MS响应呈线性(A)，进样体积介于12.5~300  $\mu\text{L}$ 之间时无峰畸变(B)。这项分析使用配备30  $\mu\text{L}$ 针和50  $\mu\text{L}$ 扩充定量环的ACQUITY Premier UPLC™系统进行。

**OligoWorks SPE微孔板试剂盒性能**  
**SPE洗脱液直接兼容LC-MS**  
**线性寡核苷酸MS响应1~30  $\mu\text{L}$**

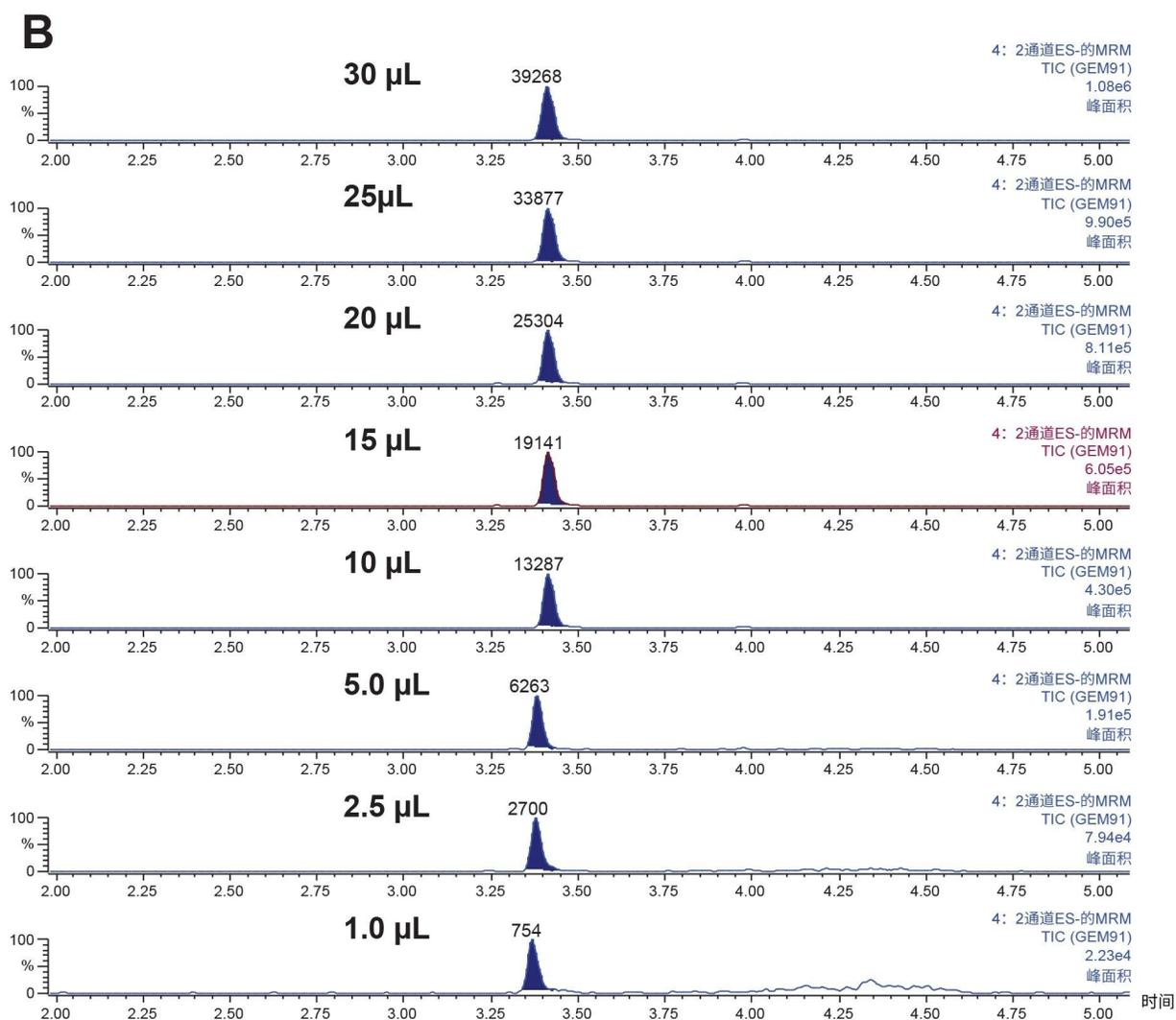


图8. 洗脱液与LC-MS的直接兼容性展示, *GEM 91*寡核苷酸的LC-MS响应呈线性(A), 进样体积介于12.5~300  $\mu\text{L}$ 之间时无峰畸变(B)。这项分析使用配备30  $\mu\text{L}$ 针和50  $\mu\text{L}$ 扩充定量环的ACQUITY Premier UPLC™系统进行。

---

## 结论

本应用纪要成功展示了OligoWorks SPE微孔板试剂盒的分析性能，血浆和尿液回收率非常高(>80%)，并表现出试剂盒间和试剂盒内、日间和用户间优异的重现性(RSD ≤ 15%)，适用于包括未修饰、高度修饰以及GalNAc和脂质偶联药物在内的多种寡核苷酸治疗药物。

---

## 参考资料

1. Nikunj Tanna, Mary E. Lame, Margot Lee.使用基于试剂盒的自动、标准化样品前处理工作流程进行治疗性寡核苷酸的生物分析定量，沃特世应用纪要，720008068ZH，2023年9月
2. OligoWorks SPE Kits and Components, Waters User Manual, [720008066 <https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135127508>](https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135127508) .

---

## 特色产品

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

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪  [<https://www.waters.com/134889751>](https://www.waters.com/134889751)

MassLynx MS软件  [<https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

720008086ZH，2023年9月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [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](#)