

使用BioAccord™ LC-MS系统和Vion IMS QToF质谱仪结合waters_connect™ CONFIRM Sequence应用程序对双链体 siRNA进行表征和测序

Rebecca Hirschberger, Michael Rühl, Jonathan Fox, Ying Qing Yu, Scott J. Berger

BioSpring, Waters Corporation

摘要

过去十年来，小分子干扰RNA (siRNA) 因其在基因治疗和癌症治疗中的创新应用，成为药物开发领域备受关注的一种物质。随着这一关注度的提高，对支持其开发、生产和批次放行的分析解决方案的需求也稳步增加。色谱分离联用质谱检测的分析方法经过不断发展已相当先进，其应用领域不再局限于产品和工艺开发，已发展为可部署到生产和质量控制实验室的可验证分析方法。

本文介绍了在在线色谱分离过程中，柱温在控制核酸双链体的相互作用方面所发挥的重要作用。通过调整柱温，可以保留双链体结构，或使双链体变性，得到单独的正义链和反义链。虽然这种补充方法通常用于协助分子鉴定和属性监测，但本文内容表明，它也有利于双链体序列确认。我们同时使用BioAccord LC-MS系统和Vion IMS QToF LC-MS系统对这些双链体结构进行了研究。

优势

- 非质谱专家也可以使用合规的自动化LC-MS工作流程开发质量控制方法
- 通过单次分析即可评估双链体纯度、完成双链体鉴定和双链体测序

- 使用合规的waters_connect信息学平台内的CONFIRM Sequence应用程序，对siRNA双链体快速、自动化解析复杂的串联质谱(MS/MS)和数据非依赖型MS^E（未选择特定母离子）质谱

简介

寡核苷酸药物已成为治疗各种遗传性和非遗传性疾病的重要工具¹⁻³。沉默RNA (siRNA)由能够特异性结合细胞mRNA并抑制其功能的双链体RNA分子组成，已成功运用于疾病治疗中⁴。

由于这类治疗药物需要精准靶向目标mRNA序列并避免次级位点效应，因此建立有效的质量控制程序对于确保产品质量、安全性和有效性至关重要。在siRNA进入临床试验阶段或用作药品之前，需要采用各种方法进行表征。应用的液相色谱技术包括离子对反相(IPRP)、离子交换(IEX)、体积排阻(SEC)和亲水作用(HILIC)^{5,6,7}。将这些技术与质谱联用已非常普遍，因为质谱分析可以洞察到共洗脱杂质，并且有助于分配这些产物变体⁸。配备碰撞诱导解离(CID)的高分辨率质谱被广泛用于确认这些分子的序列和定位修饰位点⁹。

本文介绍了一种常规LC-MS方法：采用离子反相色谱(IP-RP)结合数据非依赖型（未选择母离子）MS^E碎裂，对siRNA双链体进行检测和测序。该方法利用易于使用的BioAccord LC-HRMS系统，在waters_connect信息学软件平台下进行自动化数据处理，支持合规的数据采集、处理和报告。

BioAccord LC-MS系统（图1）于2019年推出，是一款体积小、性能稳定的平台，适用于常规生物制药分析，非质谱专家也能轻松上手。本研究使用的这套完全集成的BioAccord LC-MS系统包含一套ACQUITY™ UPLC™ Premier I-Class PLUS系统、一台可变波长紫外(TUV)光学检测器，以及一台ESI-TOF ACQUITY RDa™质谱检测器。完成测序后，使用Vion IMS-QToF MS仪器，将测序结果与靶向LC-MSMS分析结果相比较。

与常规（未修饰）寡核苷酸不同，siRNA分子的复杂性和稳定性使其难以通过LC-MS进行表征。通过控制和调整柱温，可诱导双链体构象异构体解离为正义链和反义链，从而提高MS响应并降低谱图复杂性。这种做法仅通过一次进样就能提高序列覆盖率、改善链鉴定和纯度评估。或者也可以通过降低柱温保持色谱柱上的双链体构象，从而在完整双链体水平进行鉴定并测定纯度。本研究评估了在单次分析中结合使用这两种方法对深入了解双链体siRNA分子的质量属性的能力。



图1.图中所示为BioAccord LC-MS系统，以及waters_connect信息学平台中内置的INTACT Mass和CONFIRM Sequence应用程序。

实验

样品描述

实验使用了双链体退火的两条RNA单链，序列如下：

实验表

名称	序列（从5'端到3'端）	质量数(Da)
正义链	G5A A77 AAG AG5 5A5 77A 599	6761.079
反义链	AUG GA5 AAC UCU UGG U5A C99	6656.921

5=2'Ome-rU 7=2'Ome-rC 9=dT

杂交：移取等摩尔量的单链，加热至75 °C，并在该温度下保持5 min。然后以1 °C/min的冷却速率将溶液冷却至37 °C。

分别以25 °C和60 °C的柱温测量单链和双链体。利用固定母离子 m/z 和固定碰撞能量的靶向MS/MS采集(Vion IMS QToF)，以及MS^E数据非依赖型碎裂采集（BioAccord系统），采集（串联）质谱图。

液相色谱条件

液相色谱系统：	Waters™ I-Class系统（与BioAccord系统中的Vion IMS QToF或RDa检测器联用）
检测：	UV 260 nm
样品瓶：	LCGC认证透明玻璃12 × 32 mm螺纹颈口全回收样品瓶，带瓶盖和预开口PTFE/硅胶隔垫（P/N：186000385C）
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH, 130 Å, C ₁₈ 寡核苷酸分析专用柱, 1.7 µm, 2.1 x 50 mm（P/N：186009484）
柱温：	25.0 °C和60.0 °C
样品温度：	6.0 °C
进样体积：	1 µL
流速：	0.300 mL/min
流动相A：	7 mM TEA，80 mM HFIP的水溶液
流动相B：	3.5 mM TEA，40 mM HFIP的50%甲醇溶液

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.300	95	5	初始
1.00	0.300	95	5	6
7.00	0.300	25	75	6
8.00	0.300	25	75	6
8.10	0.300	95	5	6
10.00	0.300	95	5	6

质谱条件

质谱系统：Waters BioAccord LC-MS

模式：包括碎片的全扫描

质量范围：低(50~2000 m/z)

极性：负

扫描速率：10 Hz

锥孔电压：40 V

碎裂锥孔电压：90~110 V

质谱系统：Waters Vion IMS QTof

模式：MS/MS

质量范围：50~2000 m/z

母离子：675.4 m/z ，正义链

	664.9 m/z, 反义链
扫描时间:	0.5 s
碰撞能量	正义链和反义链均为20 V

结果与讨论

为了更简单、更高效地鉴定双链体并评估其纯度、鉴定杂质并确认正义链和反义链的正确序列，我们尝试使用LC-MS/MS方法，通过单次分析对变性和非变性的双链体siRNA寡核苷酸进行测序。在全扫描MS^E数据非依赖型碎裂模式下，使用waters_connect信息学平台采集和处理BioAccord LC-MS数据。在waters_connect INTACT Mass应用程序中，使用TIC峰下的合并ESI-MS谱图进行自动质谱去卷积，获得完整寡核苷酸质量数测量值，以用于链鉴定、纯度评估和修饰定位。然后使用waters_connect CONFIRM Sequence应用程序进行寡核苷酸序列分析。最后，在靶向MS/MS模式下采集Vion IMS QTof数据，与BioAccord数据非依赖型采集(DIA)序列结果进行比较。

实验采用LC柱温为25 °C（双链体未变性）和60 °C（变性）的条件，使用BioAccord系统或Vion IMS QTof质谱检测器，通过单次分析运行评估双链寡核苷酸的各种参数，以展示这两种仪器的性能。

柱温为25 °C时，双链体siRNA分子能够保留在色谱柱上（见图2）。正义链和反义链各样品与双链体分子彼此之间均实现了色谱分离。虽然在LC分析过程中使用的适中温度可以使双链体分子保持完整结构，但在电喷雾电离时，由于使用了离子对试剂和低pH值，会导致该复合物变性。因此，双链体质谱图可以单链形式进行审查和表征（图3A）。

使用waters_connect INTACT Mass应用程序自动化处理数据，该应用程序支持TIC和UV峰检测、BayesSpray电荷去卷积、修饰，以及产品相关杂质分配和纯度计算等处理功能，可帮助科学家分析较短和较长的寡核苷酸，而不需要大量的用户干预（图3B和3C）。

INTACT Mass应用程序的结果（图3C）有助于分配5.13分钟处双链体色谱峰下共洗脱的去卷积物质。由于存在共洗脱，所有物质的LC-UV纯度报告为90%。INTACT Mass应用程序还通过将所有分配的共洗脱物质视为LC和MS相对响应(LCxMS)的产物，计算了MS纯度。对于主要和次要强度物质的所有去卷积鉴定结果，观察到较低的ppm (<10 ppm)质量误差。

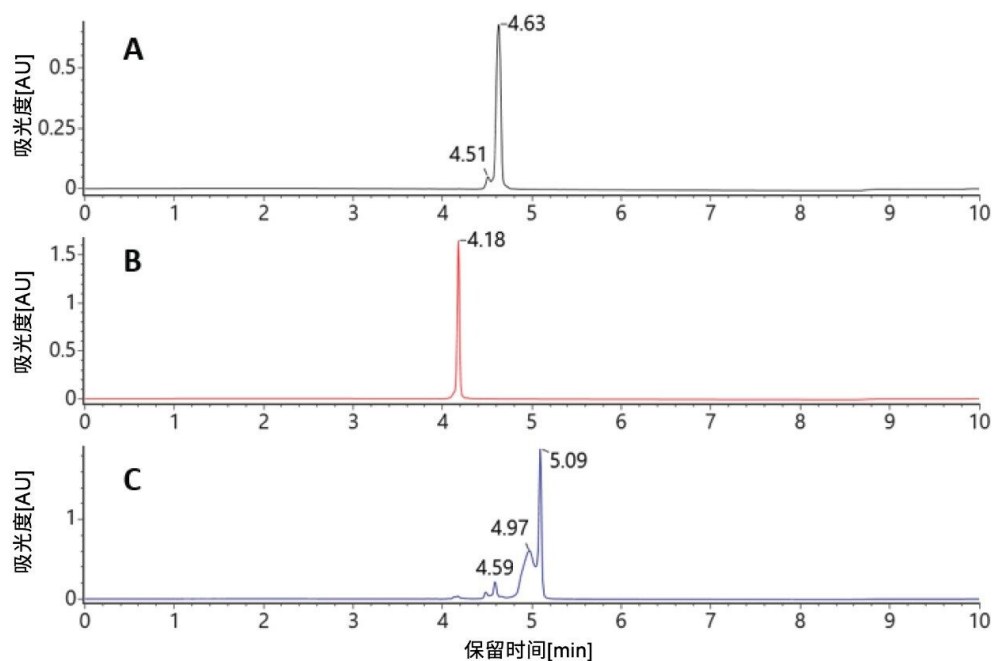


图2.柱温为25 °C时正义链(A)、反义链(B)和双链体*siRNA* (C)的LC-UV色谱图

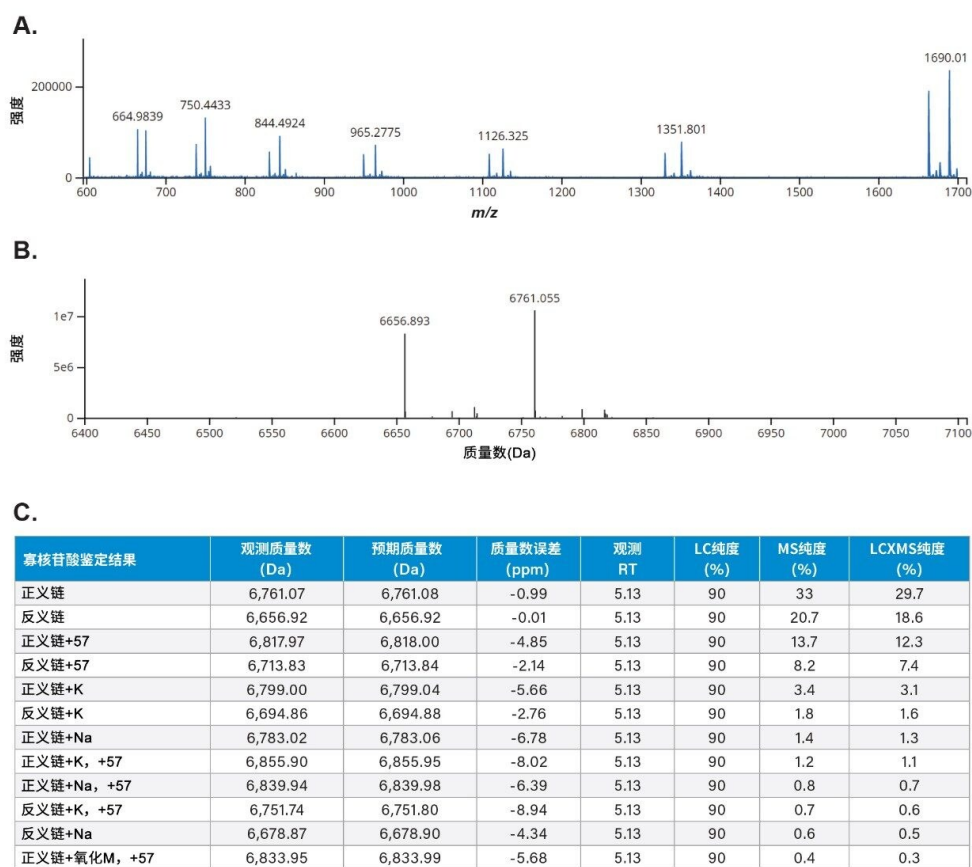


图3A.电喷雾电离过程中解离的双链体siRNA的负离子ESI原始谱图，显示了在LC保留时间5.09分钟处的双链体峰下洗脱的各正义链和反义链电荷态包络。

B. 在电喷雾电离过程中解离为正义链和反义链的双链体siRNA的waters_connect Intact Mass BayesSpray去卷积谱图。

C. waters_connect INTACT Mass应用程序对解离的双链体siRNA峰的数据处理结果。

在60 °C的高柱温下，两种纯寡核苷酸标准品再次实现了色谱基线分离。双链体分子在色谱柱上变性，产生两条单链并实现了色谱分离，其保留时间与各自的单标相匹配（图4）。

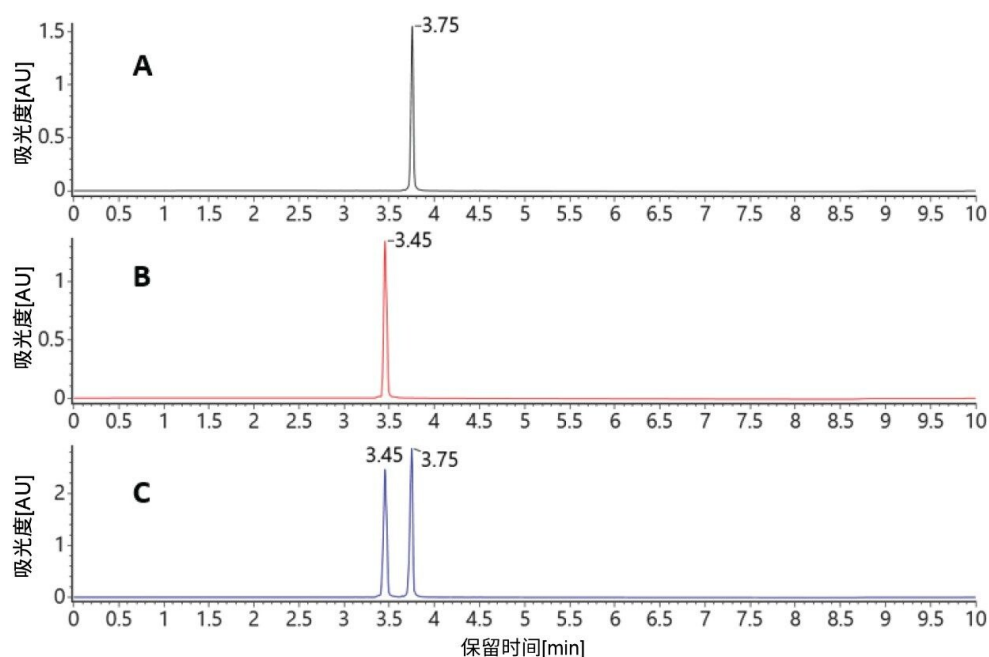


图4.柱温为60 °C时，双链体siRNA的UV色谱图，包含正义寡核苷酸标准品(A)、反义寡核苷酸标准品(B)和变性双链体siRNA寡核苷酸(C)的分离结果。

这两种结合质谱检测的方法（变性和非变性分离）都可用于确认双链体siRNA的鉴定结果，只需控制柱温和应用自动化数据处理方法即可。

利用INTACT Mass处理数据可快速确认鉴定结果，但需要其他信息学工具来辅助进行全序列确认。CONFIRM Sequence应用程序可利用相同的BioAccord MS^E包括碎片离子的全扫描采集模式数据，自动确认碎片离子数据与指定序列相对应。

本研究使用两种siRNA单链（非变性，共洗脱）的数据确认双链体序列，在高能量碎裂周期中使用100~120 V的电压梯度，两种链的序列覆盖率均达到90%。对于剩余约10%的未分配序列覆盖区域，我们开展了进一步研究，确定来自反义链碎片离子的嵌合谱图干扰为分配失败的原因（图5）。

1114.7 m/z 反义链w7碎片离子的MS^E碎片离子数据因存在同位素模式重叠（图5），使w7正义链碎片离子的自动分配变复杂，如两种共洗脱链的合并碎片离子嵌合双链体谱图所示。

本研究还使用Vion IMS-QToF MS系统对siRNA双链体单链进行了靶向MS/MS方法分析（从每条单链中单独选择特定电荷态进行碎裂），该方法对两条链的序列覆盖率均达到100%。这种靶向MS/MS方法可以使每条单链得到更清晰的碎片离子谱图，消除多种干扰，当双链体在较低柱温下无法实现色谱分离时，仍能获得全序列覆盖。

研究和实验在60 °C高柱温下进行，产生了变性色谱条件，导致双链体色谱分离为单链组分。由于单链在色谱柱上得到良好分离，获得了优异的峰形，因此其MS^E高能碎片离子模式彼此独立，避免了当双链体保留在色谱柱上时观察到的同位素物质重叠。

消除干扰后，现在使用BioAccord系统MS^E数据非依赖型方法，在60 °C柱温条件下，分配的序列覆盖率可以达到100%（图7）。因此，这种结合了变性/非变性的方法能够通过单次采集完成双链体纯度、双链体鉴定和单链鉴定的研究。序列信息可在QToF系统上通过串联MS/MS获得，也可以在BioAccord LC-MS系统上使用非靶标数据非依赖型方法获得。

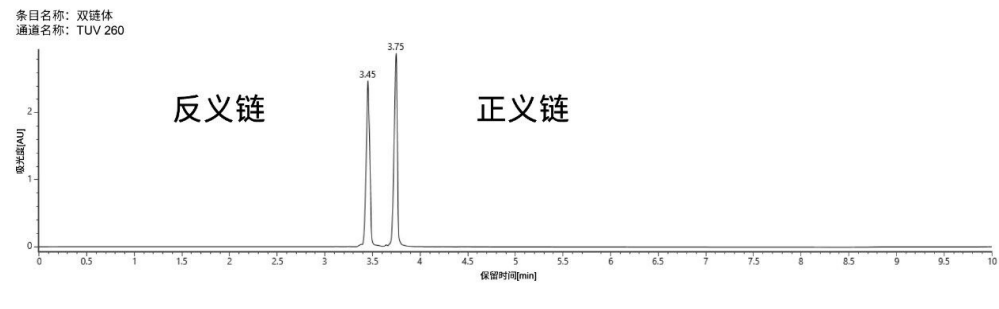


图6.柱温60 °C下双链体分离为反义链(A)和正义链(B)的UV色谱图

我们还额外开展了实验，以确保变性双链体siRNA和纯单链标准品的高能量MS^E谱图相当（图8）。

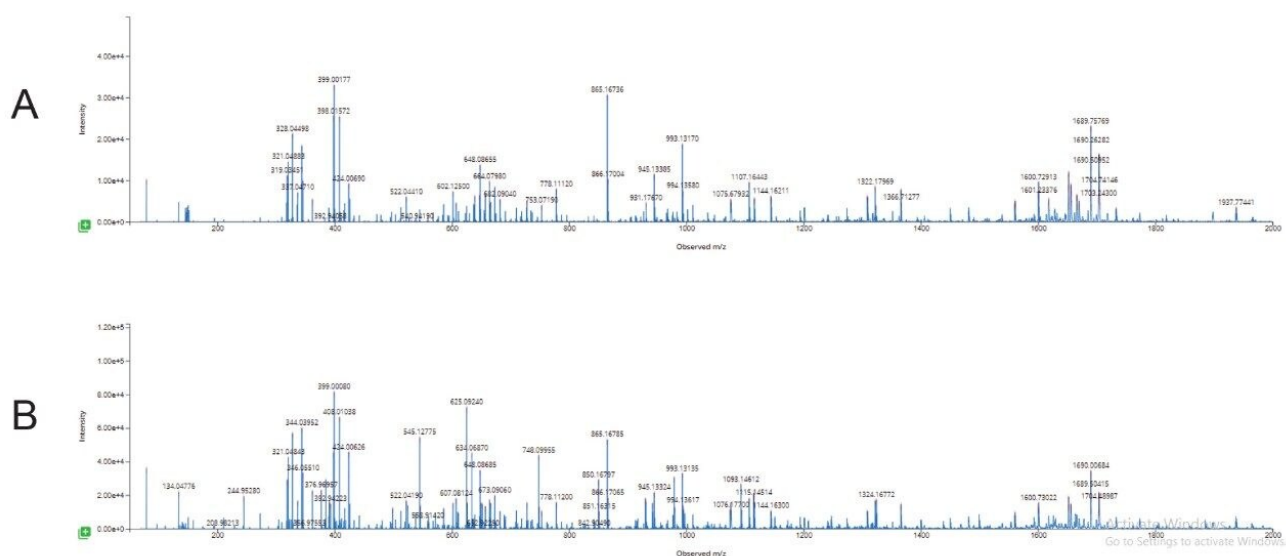


图8.纯正义链(A)和双链体变性正义链(B)的MS^F碎片离子谱图比较

结论

我们开发出变性（较高柱温）和非变性（较低柱温）LC-MS方法，可以使用TOF或QToF MS检测评估双链体siRNA分子的单链纯度、单链鉴定结果、双链体纯度和双链体鉴定结果。

这些方法利用了waters_connect INTACT Mass和CONFIRM Sequence应用程序，为基于完整质量数和碎片离子的测序分析提供自动化数据分析。

在BioAccord LC-MS系统上使用数据非依赖型MS碎裂方法对两条siRNA链进行完整测序，该方法得益于在变性LC分离中获得的色谱分离。

在Vion IMS-QToF系统上利用靶向MS/MS对两条siRNA链进行完整测序，该方法对在非变性LC分离中发生的寡核苷酸链共洗脱现象具有更强的耐受性。

本应用纪要探讨的工作流程显示了非变性和变性双链体siRNA分析之间的互补性，以及能够在开发环境中使用更复杂的QToF仪器，而BioAccord LC-MS系统更适合用于开发过程中的常规分析，或在受监管的生产和质控组织中用于可验证分析方法。

参考资料

1. Al Shaer D, Al Musaimi O, Albericio F, de la Torre BG. 2021 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(2):222. doi:10.3390/ph15020222 <<https://www.mdpi.com/1424-8247/15/2/222>>
2. Al Musaimi O, Al Shaer D, Albericio F, de la Torre BG. 2022 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals*. 2023;16(3):336. doi:10.3390/ph16030336 <<https://www.mdpi.com/1424-8247/16/3/336>>
3. Al Shaer D, Al Musaimi O, Albericio F, de la Torre BG. 2023 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024;17(2):243. doi:10.3390/ph17020243 <<https://www.mdpi.com/1424-8247/17/2/243>>
4. Rossi JJ, Rossi DJ. siRNA Drugs: Here to Stay. *Molecular Therapy*. 2021;29(2):431–432. doi:10.1016/j.ymthe.2021.01.015 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001621000150>>
5. Gilar M, Koshel BM, Birdsall RE. Ion-Pair Reversed-Phase and Hydrophilic Interaction Chromatography Methods for Analysis of Phosphorothioate Oligonucleotides. *Journal of Chromatography A*. 2023;1712:464475. doi:10.1016/j.chroma.2023.464475 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967323007008?via%3Dihub>>
6. Cook K, Thayer J. Advantages of Ion-Exchange Chromatography for Oligonucleotide Analysis. *Bioanalysis*. 2011;3(10):1109–1120. doi:10.4155/bio.11.66 <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4155/bio.11.66>>
7. Shimoyama A, Fujisaka A, Obika S. Evaluation of Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Phosphorothioate Oligonucleotides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;136:55–65. doi:10.1016/j.jpba.2016.12.036 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708516311256>>
8. Donegan M, Nguyen JM, Gilar M. Effect of Ion-Pairing Reagent Hydrophobicity on Liquid Chromatography and Mass Spectrometry Analysis of Oligonucleotides. *Journal of Chromatography A*. 2022;1666:462860. doi:10.1016/j.chroma.2022.462860 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967322000589>>

9. Abdullah AM, Sommers C, Hawes J, Rodriguez JD, Yang K. Tandem mass spectrometric sequence characterization of synthetic thymidine-rich oligonucleotides. *Journal of Mass Spectrometry* .2022;57(4):e4819. doi:10.1002/jms.4819 <
<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jms.4819>>
10. Catalin E. Doneanu, Ying Qing Yu, Joseph Fredette, William J. Warren, Weibin Chen. HILIC可用作在 BioAccord系统上进行寡核苷酸完整分子量确认的替代分离模式. 沃特世应用纪要. 720007395ZH. 2021年.

致谢

感谢BioSpring的Rebecca Hirschberger和Michael Rühl对本篇文章的贡献。

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-uplc-i-class-plus-system.html>>

BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/bioaccord-lc-ms-system.html>>

SELECT SERIES Cyclic IMS <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/select-series-cyclic-ims.html>>

waters_connect信息学平台 <https://www.waters.com/nextgen/global/products/informatics-and-software/waters_connect.html>

ACQUITY RDa检测器 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/acquity-rda-detector.html>>

ACQUITY UPLC和ACQUITY Premier可变波长紫外检测器 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-detectors/acquity-uplc-and-acquity-premier-tunable-uv-detectors.html>>

720008654ZH, 2024年12月



© 2025 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](#)