

赛默飞智能双柱交替在线高通量脱盐液质联用技术用于DNA引物分析

郑喆^a 王海燕^b 曹建明^a

^a赛默飞世尔科技（中国）有限公司，北京 100000

^b宝生物工程（大连）有限公司

关键词

在线脱盐，高通量，DNA引物，液质联用

摘要

本文基于赛默飞Vanquish Duo Flex 超高效液相色谱平台针对DNA引物样品建立了简单、快速的超高效液相色谱线性离子阱质谱仪（Vanquish Duo-LTQ XL）在线除盐分子量测定分析方法。本文系列方法对于后续深入开发Vanquish Duo与LTQ XL联用双柱交替高通量智能分析DNA引物样品具有指导意义。

1. 引言

核苷酸包括脱氧核糖核酸及核糖核酸，如用于基因扩增和基因诊断的PCR引物和反义核酸，介导基因沉默的小干扰RNA（small interfering RNA, siRNA）等，研究开发基因靶向药物可用于治疗病毒、肿瘤和遗传疾病。

DNA引物，是指在核苷酸聚合作用起始时，刺激合成的，一种具有特定核苷酸序列的大分子，与反应物以氢键形式连接，这样的分子称为DNA引物。DNA引物通常是人工合成的两段寡核苷酸序列，一个引物与靶区域一端的一条DNA模板链互补，另一个引物与靶区域另一端的另一条DNA模板链互补，其功能是作为核苷酸聚合作用的起始点，核酸聚合酶可由其3'端开始合成新的核酸链。体外人工设计的引物被广泛用于聚合酶链反应、测序和探针合成等。但合成的DNA引物含有各种杂质，需纯化精制，产物的鉴定和产品的质量控制至关重要。

液相和液质联用于DNA引物的高分辨分离和鉴定。DNA引物样品中存在的盐分会影响其离子化过程和造成峰强度降低，因此有必要进行质谱鉴定前的除盐处理。常规离线除盐方法耗时；可以利用在线除盐方式进行DNA引物的分离鉴定，以满足高通量的要求^[1]。

2. 实验部分

2.1 仪器

ThermoFisher Vanquish Duo Flex 与 LTQ XL 超高效液相色谱离子阱质谱联用系统包括：

泵：Dual Pump（P/N VF-P32-A）

自动进样器：Split Sampler FT（P/N VF-A10-A）

柱温箱：Column Compartment H（P/N VH-C10-A）

管线和阀：Vanquish Duo串联管线套件（P/N 6036.2020）

质谱仪：Thermo Scientific™ LTQ XL 质谱

软件：Chromeleon CDS 7.2 SII和Xcalibur™

色谱柱：DNAPac™ RP（P/N 088925）

2.2 化合物信息及试剂

合成的不同分子量的DNA引物含盐的样品来源于客户。

甲醇（质谱级，Fisher公司）

N，N-二异丙基乙胺(DIEA)（Sigma品牌）

六氟异丙醇苯胺（HFIPA）（Sigma品牌）

去离子水（18.2M Ω ）

2.3 色谱质谱条件和特殊软件参数设置

2.3.1 色谱条件

色谱柱：DNAPac™ RP (2.1×10 mm 4μm)

柱温：40℃

进样量：1 μL；

流动相：A：0.5% HFIPA和0.05% DIEA的水溶液
B：10%的A+90%甲醇溶液

表1. 右泵平衡泵梯度方法

时间	流速 (mL/min)	B%
0	0.75	100
0.50	0.75	100
0.51	0.75	0
1.00	0.75	0

表2. 左泵分析泵梯度方法

时间	流速 (mL/min)	B%
0.2	0.75	0
0.21	0.75	100
0.40	0.75	100
0.41	0.75	0
1.00	0.75	0

2.3.2 质谱条件

质谱阀位：0.00~0.55min到废液，0.55~1.00min进质谱

表3. 质谱条件

离子源参数	
Sheath Gas Flow Rate	40
Aux Gas Flow Rate	10
Sweep Gas Flow Rate	0.01
Spray Voltage	3.0kv
Capillary Temp	275
Capillary Voltage	-20
Tube Lens	-120
SID	45
Scan Mode	ITMS - c ESI
Full ms	210-2000

2.3.3 特殊软件参数设置

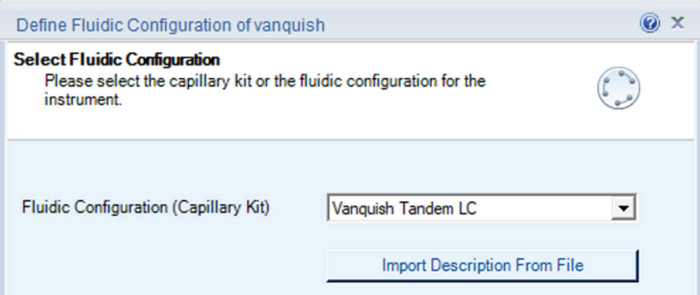


图1. 双柱交替分析与平衡智能流路功能软件设置

在液相方法脚本中插入如表4里的命令：

表4. 自定义阀切换脚本命令

时间	命令
0.19min	SamplerModule.Sampler.SwitchValve Position=Bypass

该进样阀切换命令，可以将进样针和样品环从当前流路中屏蔽出来，等待执行预进样命令。

在液相方法脚本中插入如表5里的命令：

表5. 自定义预进样脚本命令

时间	命令
0.32min	SamplerModule.Sampler. PrepareNextInjection

该命令，可以在当前方法结束之前，提前进行取样动作（甚至可包含进样前、后洗针动作），实验方法不占用任何取样洗针时间，缩短整个分析周期，提高样品分析通量。

在液相方法脚本中插入如表6里的命令：

表6. 自定义切换色谱柱命令

时间	命令
1.00min	ColumnComp.NextColumn

该命令，可以在当前方法结束之时，自动将分析流路中的色谱柱切换为另一根。

3. 实验过程与结果

3.1 双柱交替在线除盐过程描述^[1]

利用图2的Vanquish Duo双柱交替在线除盐流路图，可以加速目标化合物脱盐和分析以及色谱柱再平衡的过程。在线除盐和分析的整个过程主要分为两个部分：

（阀1-2位）样品通过左泵即分析泵上样至柱A，在表2梯度条件下，样品中的盐被快速去除，待测样品保留在柱A上，质谱流路至废液；0.55min后质谱流路至质量分析器，有机相将目标物洗脱进质谱分析。与此同时，右泵即平衡泵，正在用高有机相对柱B进行活化再生和高水相平衡，等待下一次使用柱B做分析。

（阀6-1位）样品通过左泵即分析泵上样至柱B，类似于阀1-2位时柱A的使用情况，对柱B上目标化合物进行脱盐和洗脱进入质谱分析，与此同时，右泵即平衡泵，正在用高有机相对柱A进行活化再生和高水相平衡，等待下一次使用柱A做分析。

总而言之，当柱A正在做脱盐和分析时，与此同时，柱B正在活化再生和平衡等待进样。然后双柱角色互换，如此循环往复。

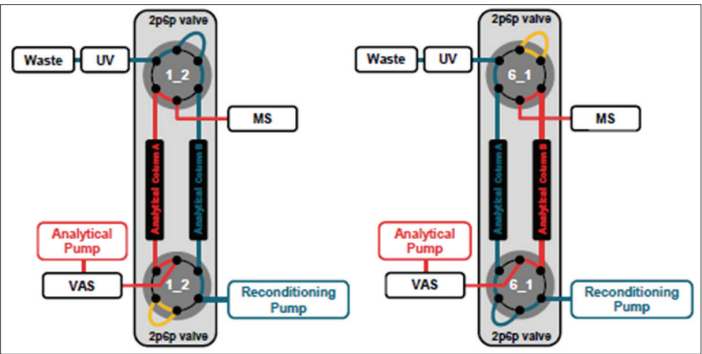


图2. 智能双柱交替流路连接示意图

3.2 Vanquish Duo Flex MS (LTQ XL) 双柱交替在线除盐进行DNA引物定性分析

图3-10所示，为DNA引物样品的8张质谱总离子流图。响应良好，测得质谱原始数据须保存为RAW 格式，通过Xcalibur软件Promass分析进行去卷积分析，得到相应的DNA引物样品分子量（图11-18）和去卷积后谱图（图19-26）。表7为DNA引物实测结果与理论数值对比。

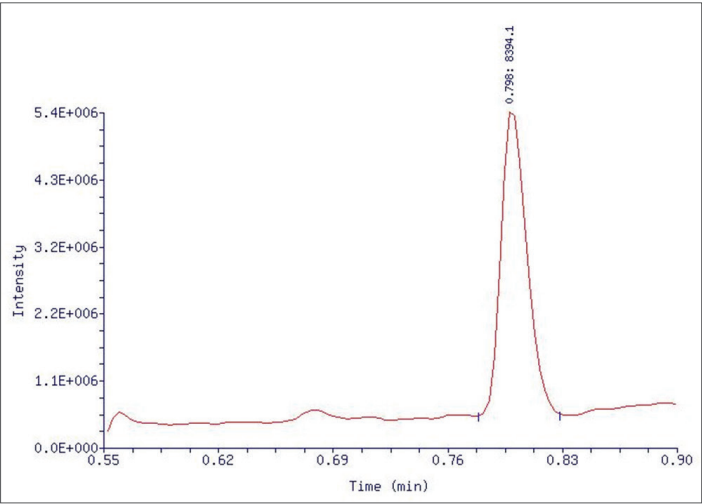


图3. XGAMC-5074~24的TIC总离子流图

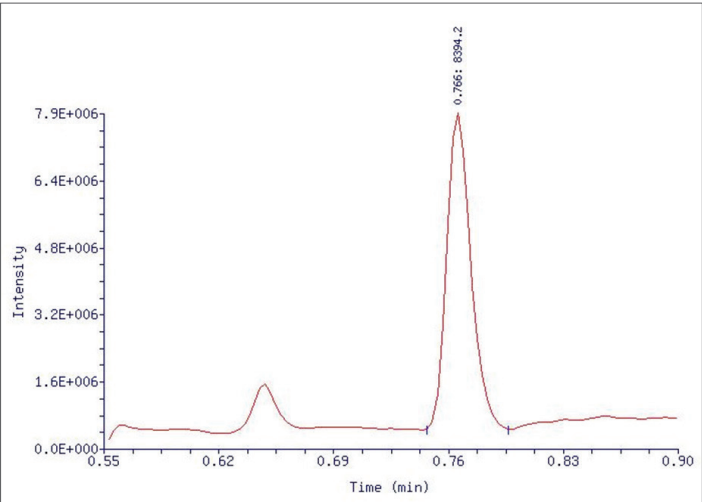


图4. XGAMC-5074~25的TIC总离子流图

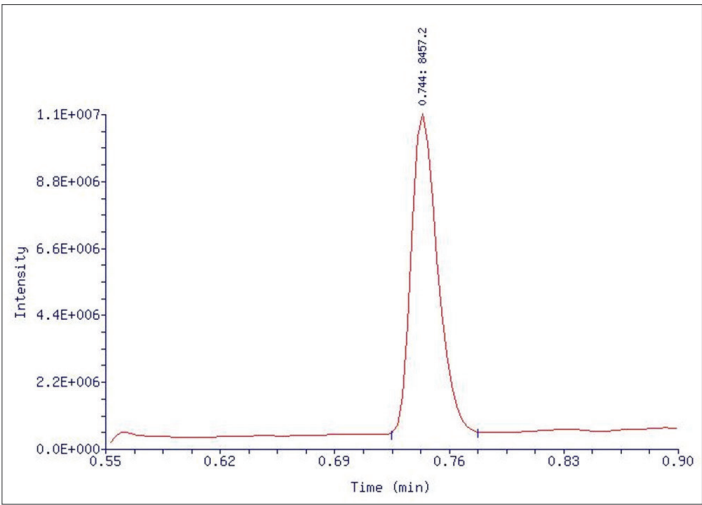


图5. CJMG274-01~Y的TIC总离子流图

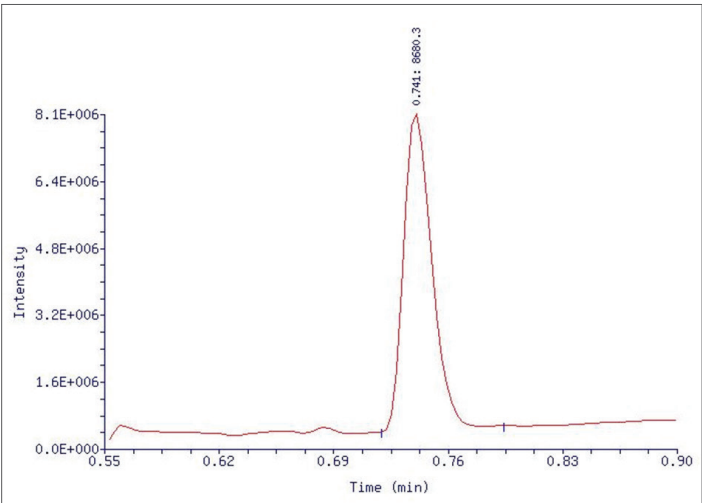


图6. XGAMC-5088~Y的TIC总离子流图

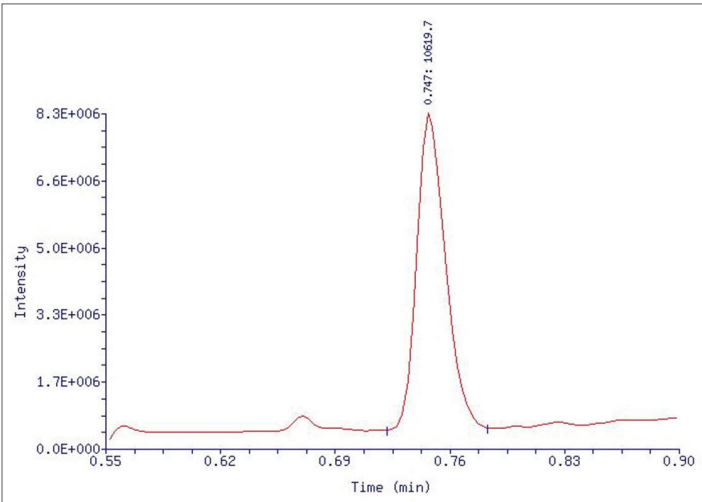


图7. KFMB-4075的TIC总离子流图

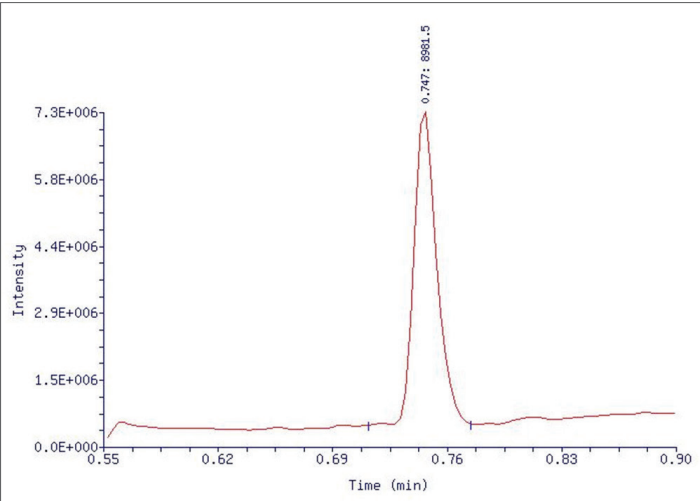


图8. XGAMC-5093Y1的TIC总离子流图

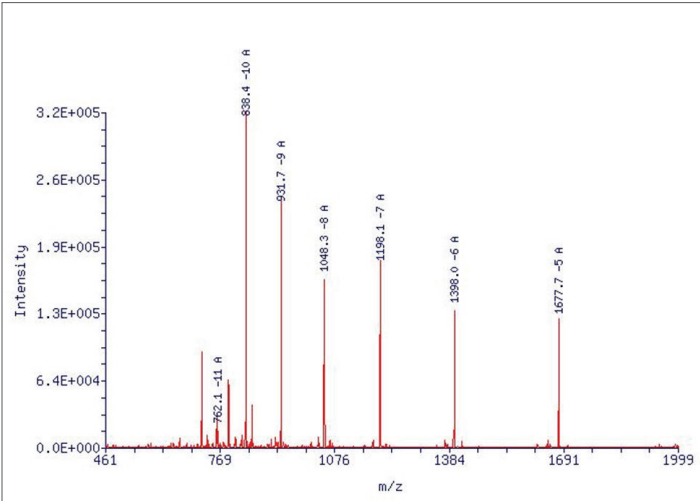


图11. XGAMC-5074~24的原始质谱图

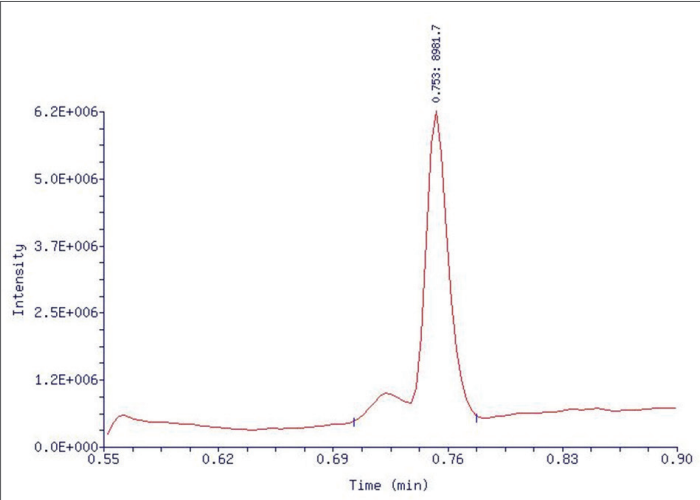


图9. XGAMC-5093Y2的TIC总离子流图

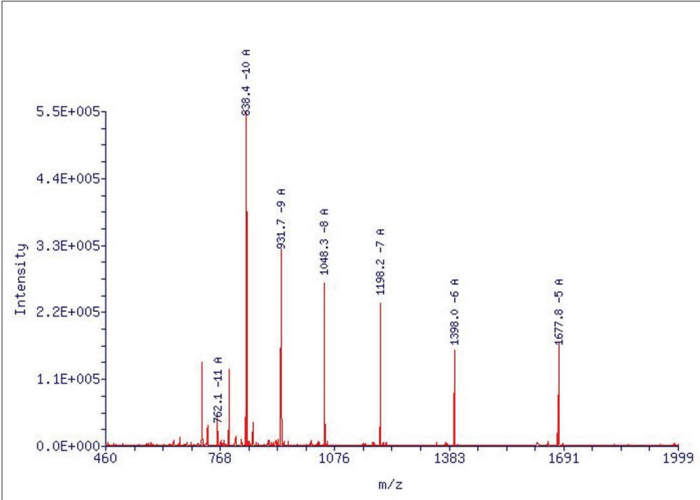


图12. XGAMC-5074~25的原始质谱图

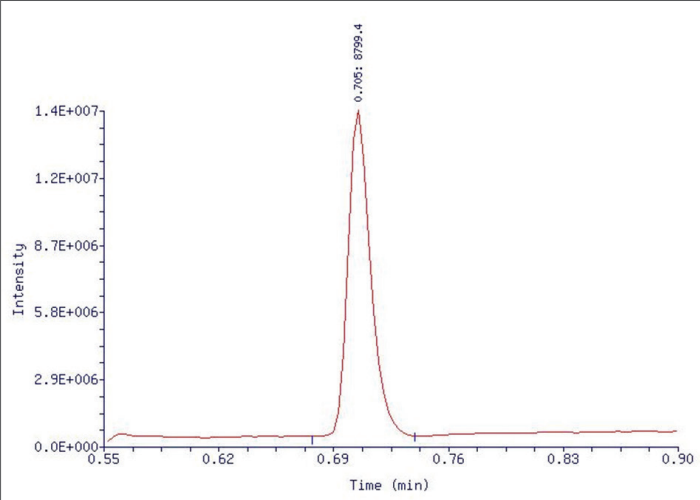


图10. CJMG316-01Y的TIC总离子流图

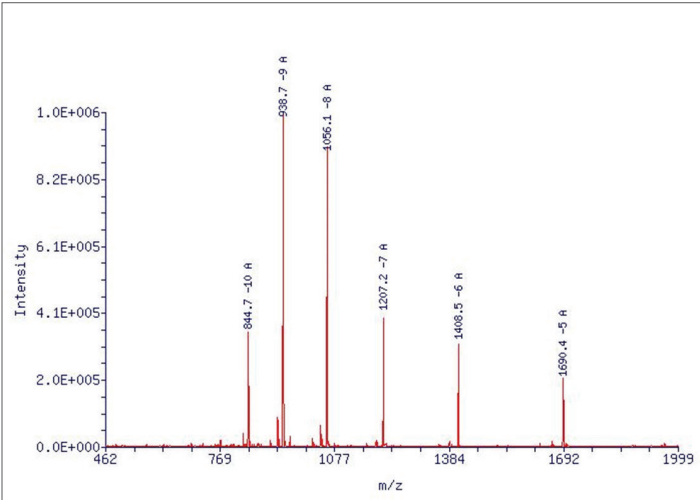


图13. CJMG274-01~Y的原始质谱图

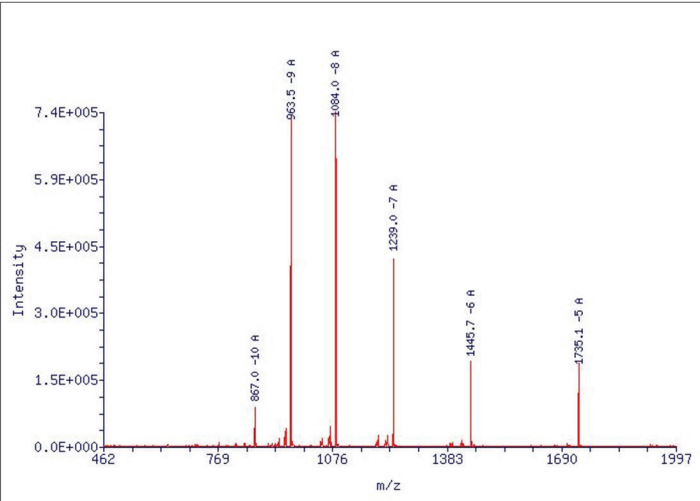


图14. XGAMC-5088~Y的原始质谱图

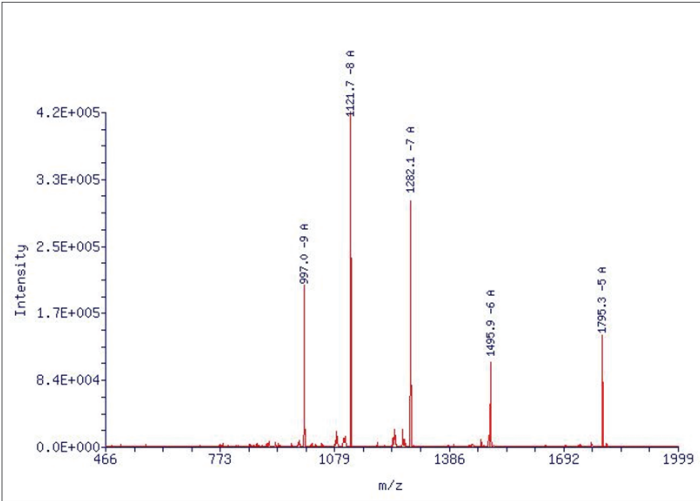


图17. XGAMC-5093Y2的原始质谱图

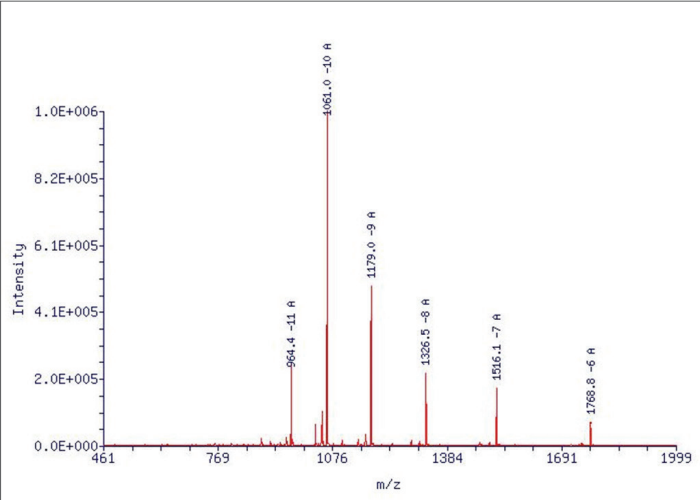


图15. KFMB-4075的原始质谱图

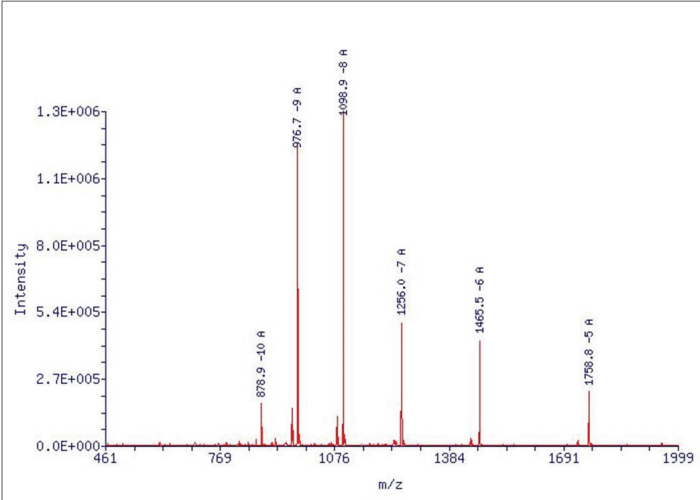


图18. CJMG316-01Y的原始质谱图

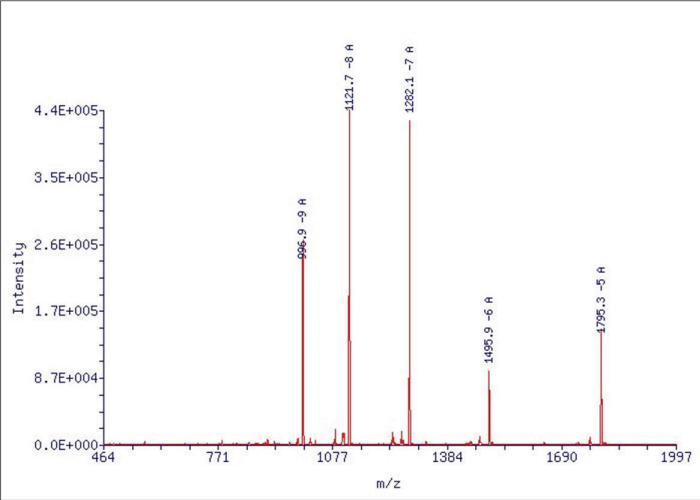


图16. XGAMC-5093Y1的原始质谱图

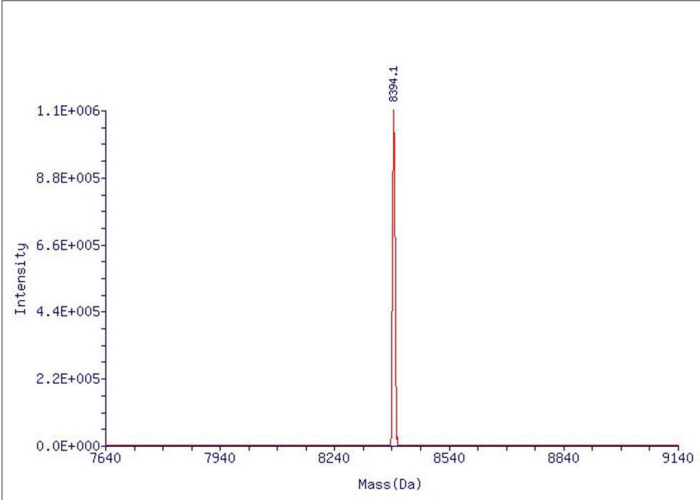


图19. XGAMC-5074~24的去卷积放大谱图

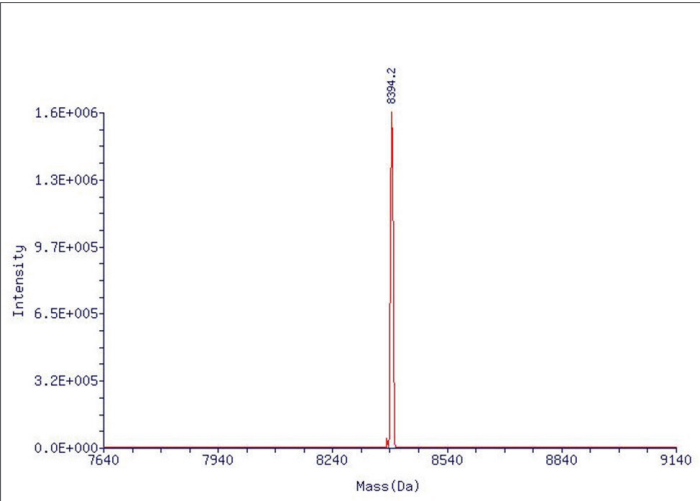


图20. XGAMC-5074~25的去卷积放大谱图

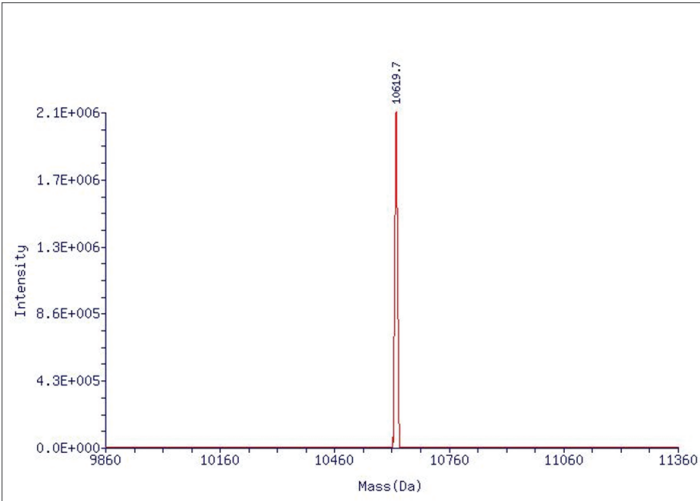


图23. KFMB-4075的去卷积放大谱图

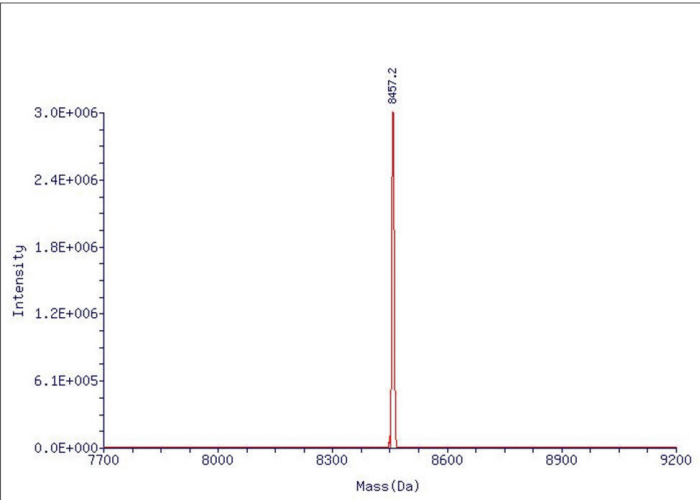


图21. CJMG274-01~Y的去卷积放大谱图

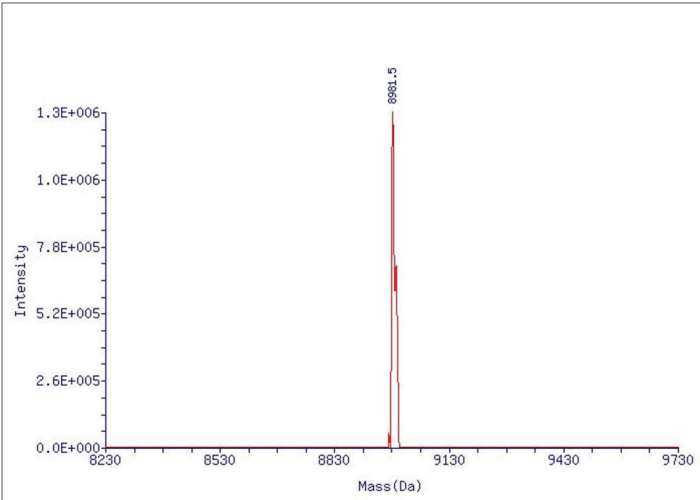


图24. XGAMC-5093Y1的去卷积放大谱图

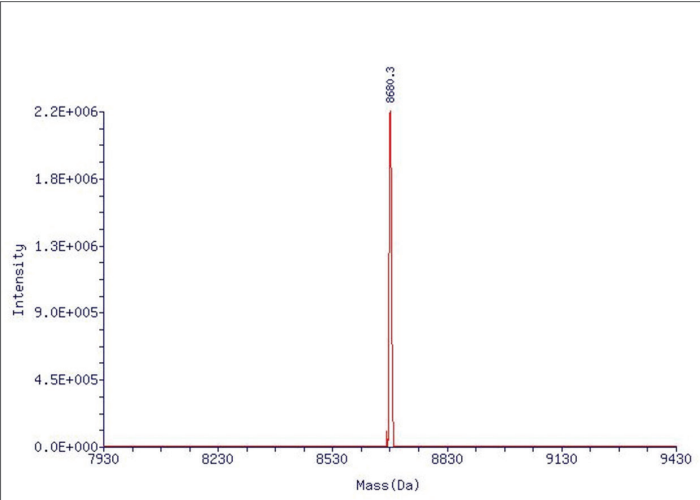


图22. XGAMC-5088~Y的去卷积放大谱图

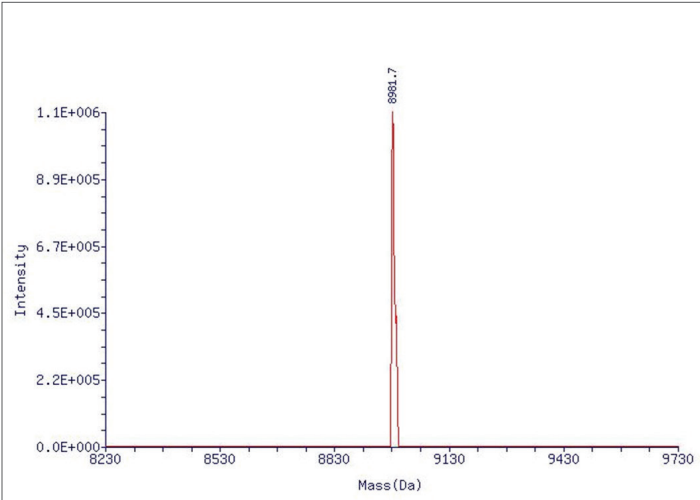


图25. XGAMC-5093Y2的去卷积放大谱图

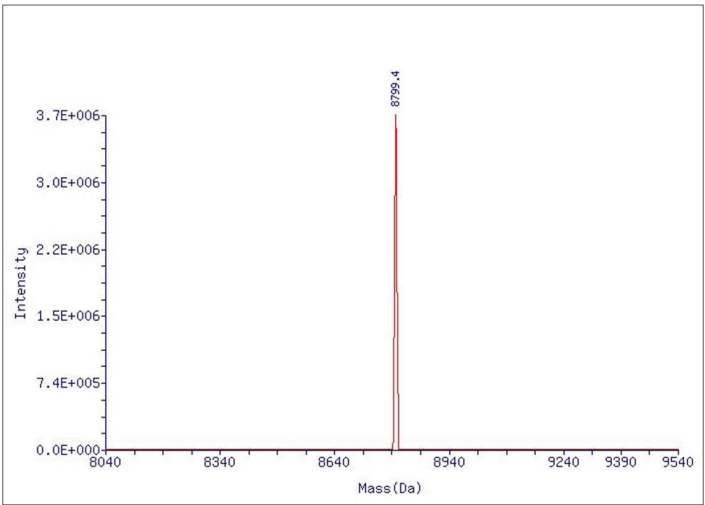


图26. CJMG316-01Y的去卷积放大谱图

#	TIC	名称	类型	位置	进样量	进样时间
1		XGAMC-5074~23	未知	G:A1	1.0000	2021/6/3 9:50:35 +08:00
2		XGAMC-5074~24	未知	G:A2	1.0000	2021/6/3 9:51:47 +08:00
3		XGAMC-5074~25	未知	G:A3	1.0000	2021/6/3 9:52:59 +08:00
4		CJMG274-01~Y	未知	G:A4	1.0000	2021/6/3 9:54:09 +08:00
5		XGAMC-5088~Y	未知	G:A5	1.0000	2021/6/3 9:55:19 +08:00
6		KFMB-4075	未知	G:A6	1.0000	2021/6/3 9:56:30 +08:00
7		XGAMC-5093Y1	未知	G:A7	1.0000	2021/6/3 9:57:40 +08:00
8		XGAMC-5093Y2	未知	G:A8	1.0000	2021/6/3 9:58:50 +08:00
9		CJMG316-01Y	未知	G:A9	1.0000	2021/6/3 10:00:00 +08:00
该序列只读						

图27. 进样间隔1min序列截图

表7. 理论分子量与实测分子量对比

Sample ID	Vial	RT (min)	Target Mass (Da)	Observed Mass (Da)	Delta Mass, Obs - Target (Da)	%Purity Estimate	Presumed Identity	Result Code	Target Mass Intensity
XGAMC-5074~24	2	0.798	8394.9	8394.1	-0.8	100	Target Mass	Green	1.11E+06
XGAMC-5074~25	3	0.766	8394.9	8394.2	-0.7	100	Target Mass		1.62E+06
CJMG274-01~Y	4	0.744	8456.8	8457.2	0.4	100	Target Mass		3.03E+06
XGAMC-5088~Y	5	0.741	8679.9	8680.3	0.4	100	Target Mass		2.25E+06
KFMB-4075	6	0.747	10619.7	10619.7	0.0	100	Target Mass		2.14E+06
XGAMC-5093Y1	7	0.747	8985.8	8981.5	-4.3	0	Not Found	Red	0
XGAMC-5093Y2	8	0.753	8985.8	8981.7	-4.1	0	Not Found		0
CJMG316-01Y	9	0.705	8799.1	8799.4	0.3	100	Target Mass	Green	3.71E+06

4. 讨论与结论

4.1 从图27序列中每一针进样时间间隔可知，该方法分析周期实为1min（含进样、取样前洗针、取样后洗针、脱盐、分析、采集质谱数据）。因受限于该DNAPac色谱柱压力上限，无法将流速进一步提升，同时低压梯度泵延迟体积较大，也限制了分析周期的进一步缩短。故若采用C18色谱柱作为脱盐柱，结合二元高压梯度泵，则分析周期可以进一步缩短。

4.2 本法无需单独为柱A和柱B分别建立方法，全程只有一个方法，真正实现智能双柱交替在线除盐。

4.3 从DNA引物去卷积后质谱图（图19-26）可见，8个化合物主峰周围都非常干净，无加钠加钾峰，说明脱盐效果非常理想，排除了样品中盐对质谱信号的干扰，达成脱盐目标。而且是双柱交替脱盐，说明每根色谱柱都能够很好的实现脱盐、分析、活化再生和平衡，确保分析的稳定性、可靠性。

4.4 从表7中DNA引物的较高质谱信号强度可知，低流速分析在节省试剂的同时，没有牺牲质谱的信号响应，故该法兼顾了低分析成本、高分析通量和高质谱信号响应。

4.5 从表7中DNA引物分子量理论与实测值比较可知，偏差在0~100ppm之间，化合物匹配失败的除外。

本文基于Vanquish Duo Flex与LTQ XL质谱联用平台，成功实现了智能双柱交替在线高通量脱盐用于DNA引物分析，对于后续深入开发该技术具有指导意义。

参考文献

1. 杨艳，程汉兴，刘晓达，金燕. 在线脱盐高通量液质联用分析寡核苷酸。AN_19044_HPLC



赛默飞
官方微信



赛默飞色谱
和质谱中国

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
S C I E N T I F I C