

# 使用SCIEX ZenoTOF™ 7600系统对寡聚核苷酸序列进行确认

## Validation of Oligonucleotide Sequence by SCIEX ZenoTOF™ 7600 System

吕小磊, 罗继, 郭立海  
Lv Xiaolei, Luo Ji, Guo Lihai  
SCIEX应用支持中心, 中国  
SCIEX, China

**Key words:** SCIEX ZenoTOF™ 7600, Oligonucleotide Sequence, Molecule Profiler

寡聚核苷酸 (Oligonucleotide, OGN), 通常指30以内核苷酸残基组成的多核苷酸分子。这类短核苷酸分子在核酸研究领域有着广泛的用途。是PCR反应的重要原料; 也常被用来作为探针用于基因芯片、荧光原位杂交等过程; 还可以抑制RNA片段, 阻止其翻译成为蛋白; 同时也能够作为引物实现核酸片段的定点诱变。在常见的OGN实验中, 为了提高实验效率, 往往会对OGN上的核苷酸加入多种不同的核苷酸修饰, 以达到防止OGN降解、启动转录、促进翻译等作用。因此, 对于OGN的序列及修饰确定是核酸研究领域必要的环节。

传统的测序仪能够很好的承担OGN中核苷酸序列的测定工作, 但是难以获得OGN中存在的核苷酸修饰, 以及mRNA中的加帽, 加尾等重要信息。质谱仪作为一种功能全面的分析检测仪器, 由于可以同时实现OGN中核苷酸序列的确认以及核苷酸修饰的鉴定, 在OGN检测领域中越来越受到人们的关注。

### 样本信息:

OGN测试品	正义链	GAGGAGgAcucCUCUGUCUUU
	反义链	AaAGAcAGAGGAGuCcUCCUCGA

长度为21个核苷酸的双链RNA, 其中大写字母表示2'-甲基化修饰, 小写字母表示2'-氟化修饰。



### 色谱方法:

使用SCIEX ExionLC™ AC液相系统, 使用飞诺美GENIMI 2.6 μm C18 100A, LC Column 50×3 mm色谱柱进行分析。A相: 水, 25 mM 六氟异丙醇 (HFIP), 50 mM 二异丙基乙胺 (DIPEA); B相: 90% 甲醇, 25 mM HFIP, 50 mM DIPEA。柱温: 60°C; 进样量: 5 μL; 分离梯度: 见表1。

表1. OGN分析方法的液相梯度

Time [min]	Flow [mL/min]	B.Conc [%]
0.50	0.3000	5.0
4.00	0.3000	50.0
4.50	0.3000	95.0
6.00	0.3000	95.0
6.10	0.3000	5.0
8.00	0.3000	5.0

## 质谱方法:

使用SCIEX ZenoTOF™ 7600系统对样品进行负离子模式的采集。

喷雾气: 55 psi,                    辅助加热气: 55 psi,  
气帘气: 35 psi,                    离子源温度: 600℃,  
离子源电压: -4500 V,            碰撞气: 7 psi,  
去簇电压: -100 V。

一级扫描, 扫描范围400-2000, 采集时间0.25 s。二级扫描, 扫描范围100-2000, 采集时间0.1 s。碰撞能量设置为-35 ± 5, Time bins to sum设置为8。

## 数据结果:

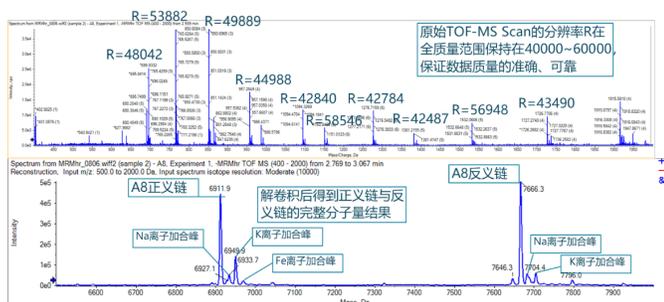


图1. OGN样品的一级质谱图以及解卷积之后的完整分子量分布图

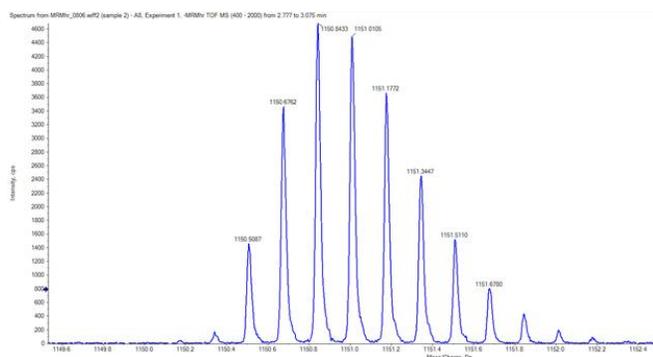


图2. SCIEX ZenoTOF™ 7600系统检测的OGN样品, 多同位素峰之间能够做到很好的基线分离

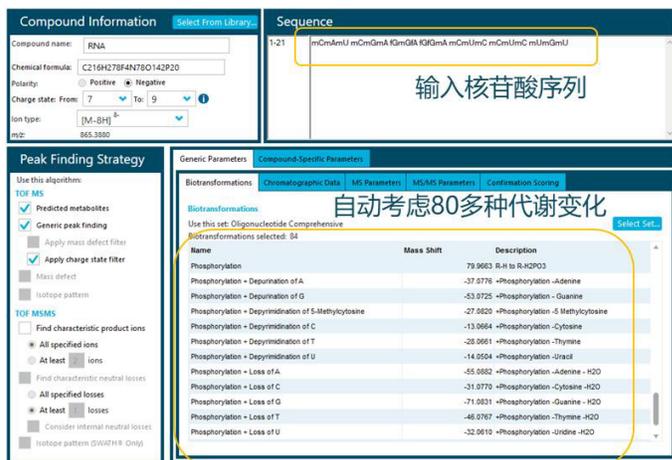
## 原始质谱图浏览:

OGN等大分子样品, 质荷比往往很大, 此时低质荷比 ( $m/z$ ) 区间的分辨率没有意义。真正有意义的是高 $m/z$ 区间的分辨率。SCIEX ZenoTOF™ 7600系统的分辨率与 $m/z$ 没有关联, 能够在全 $m/z$ 区间, 特别是大分子鉴定最为关键的 $m/z$  700-2000的区间内依然保持四万至六万的分辨率, 能够保证OGN等大分子样品的精准鉴定。解卷积之后, 能够得到看到OGN链的峰, 以及不同离子加和峰 (图1)。对于SCIEX ZenoTOF™ 7600系统检测的OGN样品的一级质谱图的每一簇峰, 也能够做到很好的基线分离。从原始质谱图的层面保障了数据结果的准确 (图2)。

## Molecule Profiler:

Molecule Profiler是SCIEX用于核苷酸分析的软件, 其内置于OS软件内, 与OS共同使用, 能够在同一台系统中完成质谱方法编辑、质谱数据采集、OGN数据浏览以及OGN结果分析、报告出具, 是一站式的数据采集和分析平台。

Molecule Profiler的方法编辑简单, 输入核苷酸序列, 按照实际情况选择是否要考虑核苷酸的代谢变化, 再确定合适的保留时间即可 (图3)。在输入核苷酸序列时, 可根据实际的修饰情况输入修饰类型。Molecule Profiler内置300多种核苷酸的类型和修饰, 同时支持自定义核苷酸修饰, 确保不同类型的核苷酸都能够被准确的鉴定到 (图4)。



Compound Information: Compound name: RNA, Chemical formula: C216H278F4N78O142P20, Polarity: Positive, Charge state: From 7 To 9, Ion type: [M-BH]<sup>-</sup>, m/z: 800.5880

Sequence: 1-21 mCmAmU mCmGmA KmGmA KIGmAmCmUmCm mCmUmCmUmUmGmU

输入核苷酸序列

Peak Finding Strategy: Use this algorithm: TOF MS, Predicted metabolites, Generic peak finding, Apply mass defect filter, Apply charge state filter, Mass defect, Isotope pattern, TOF MS/MS, Find characteristic product ions, All specified ions, At least ions, Find characteristic neutral losses, All specified losses, At least losses, Consider internal neutral losses, Isotope pattern (SWATH® Only)

Biotransformations: 自动考虑80多种代谢变化

Name	Mass Shift	Description
Phosphorylation	79.9663	R-H to R-H2PO3
Phosphorylation + Depurination of A	-37.0776	+Phosphorylation -Adenine
Phosphorylation + Depurination of G	-53.0725	+Phosphorylation -Guanine
Phosphorylation + Depurination of 5-Methylcytosine	-27.0620	+Phosphorylation -5-Methylcytosine
Phosphorylation + Depurination of C	-13.0664	+Phosphorylation -Cytosine
Phosphorylation + Depurination of T	-28.0681	+Phosphorylation -Thymine
Phosphorylation + Depurination of U	-14.0524	+Phosphorylation -Uracil
Phosphorylation + Loss of A	-55.0882	+Phosphorylation -Adenine -H2O
Phosphorylation + Loss of C	-31.0770	+Phosphorylation -Cytosine -H2O
Phosphorylation + Loss of G	-71.0831	+Phosphorylation -Guanine -H2O
Phosphorylation + Loss of T	-46.0767	+Phosphorylation -Thymine -H2O
Phosphorylation + Loss of U	-32.0610	+Phosphorylation -Uridine -H2O

图3. Molecule Profiler方法编辑界面

User Defined	Symbol	Type	Total Compositio	Mono. Mass	Name	Base	5' Linker	Sugar Core	3' Linker	Phosphate Core	Terminus Linker	Terminus Moiety
/AminoC6dC/	DNA	DNA	C18H28N5O7P	457.17264	Amino-Modifier C6 dC, Phosphate	C13H20N5O2	0	C5H7O	0	HPO2		
/AminoC6dG/	DNA*	DNA*	C18H26N7O5PS	459.14538	Amino-Modifier C6 dG, Phosphorothioate	C11H18N7O	0	C5H7O	0	HPSO		
/AminoC6dG/	DNA	DNA	C18H26N7O6P	443.16822	Amino-Modifier C6 dG, Phosphate	C11H18N7O	0	C5H7O	0	HPO2		
/AminoC6dT/	DNA*	DNA*	C18H27N4O7PS	474.13381	Amino-Modifier C6 dT, Phosphorothioate	C13H19N4O3	0	C5H7O	0	HPSO		
/AminoC6dT/	DNA	DNA	C18H27N4O8P	458.15665	Amino-Modifier C6 dT, Phosphate	C13H19N4O3	0	C5H7O	0	HPO2		
/aT(ada)/	Other Residue	Other Residue	C23H30N3O7PS	523.15421	Amino-LNA_Thymine-ada, Phosphorot...	C5H5N2O2	0	C18H24N02	0	HPSO		
/aT(ada)/	Other Residue	Other Residue	C23H30N3O8P	507.17705	Amino-LNA_Thymine-ada, Phosphate	C5H5N2O2	0	C18H24N02	0	HPO2		
/aT(gly)/	Other Residue	Other Residue	C13H17N4O7PS	404.05556	Amino-LNA_Thymine-gly, Phosphorot...	C5H5N2O2	0	C8H11N2O2	0	HPSO		
/aT(gly)/	Other Residue	Other Residue	C13H17N4O8P	388.0784	Amino-LNA_Thymine-gly, Phosphate	C5H5N2O2	0	C8H11N2O2	0	HPO2		
/aT(pyr)/	Other Residue	Other Residue	C28H24N3O6PS	561.11234	Amino-LNA_Thymine-pyr, Phosphorot...	C5H5N2O2	0	C23H18N0	0	HPSO		
/aT(pyr)/	Other Residue	Other Residue	C28H24N3O7P	545.13519	Amino-LNA_Thymine-pyr, Phosphate	C5H5N2O2	0	C23H18N0	0	HPO2		
/biotin/	Other Residue	Other Residue	C17H30N3O5PS2	451.13645	Biotin, Phosphorothioate	C17H29N3O2S	0	0	0	HPSO		
/biotin/	Other Residue	Other Residue	C17H30N3O6PS	435.15929	Biotin, Phosphate	C17H29N3O2S	0	0	0	HPO2		
/biotindT/	DNA*	DNA*	C28H41N6O9PS2	700.21141	Biotin-dT, Phosphorothioate	C23H33N6O5S	0	C5H7O	0	HPSO		
/biotindT/	DNA	DNA	C28H41N6O10PS	684.23425	Biotin-dT, Phosphate	C23H33N6O5S	0	C5H7O	0	HPO2		
/biotinTEG/	Other Residue	Other Residue	C22H40N3O9PS2	585.19436	BiotinTEG, Phosphorothioate	C22H39N3O6S	0	0	0	HPSO		
/biotinTEG/	Other Residue	Other Residue	C22H40N3O10PS	569.2172	BiotinTEG, Phosphate	C22H39N3O6S	0	0	0	HPO2		
/CarboxydT/	DNA*	DNA*	C12H13N2O8PS	376.01302	Carboxy-dT, Phosphorothioate	C7H5N2O4	0	C5H7O	0	HPSO		
/CarboxydT/	DNA	DNA	C12H13N2O9P	360.03587	Carboxy-dT, Phosphate	C7H5N2O4	0	C5H7O	0	HPO2		
/CholesterylTEG/	Other Residue	Other Residue	C40H70N09PS	771.45089	Cholesteryl-TEG, Phosphorothioate	C40H69N06	0	0	0	HPSO		
/CholesterylTEG/	Other Residue	Other Residue	C40H70N010P	755.47373	Cholesteryl-TEG, Phosphate	C40H69N06	0	0	0	HPO2		

图4. Molecule Profiler支持300多种核苷酸种类和核苷酸修饰，同时支持自定义核苷酸修饰

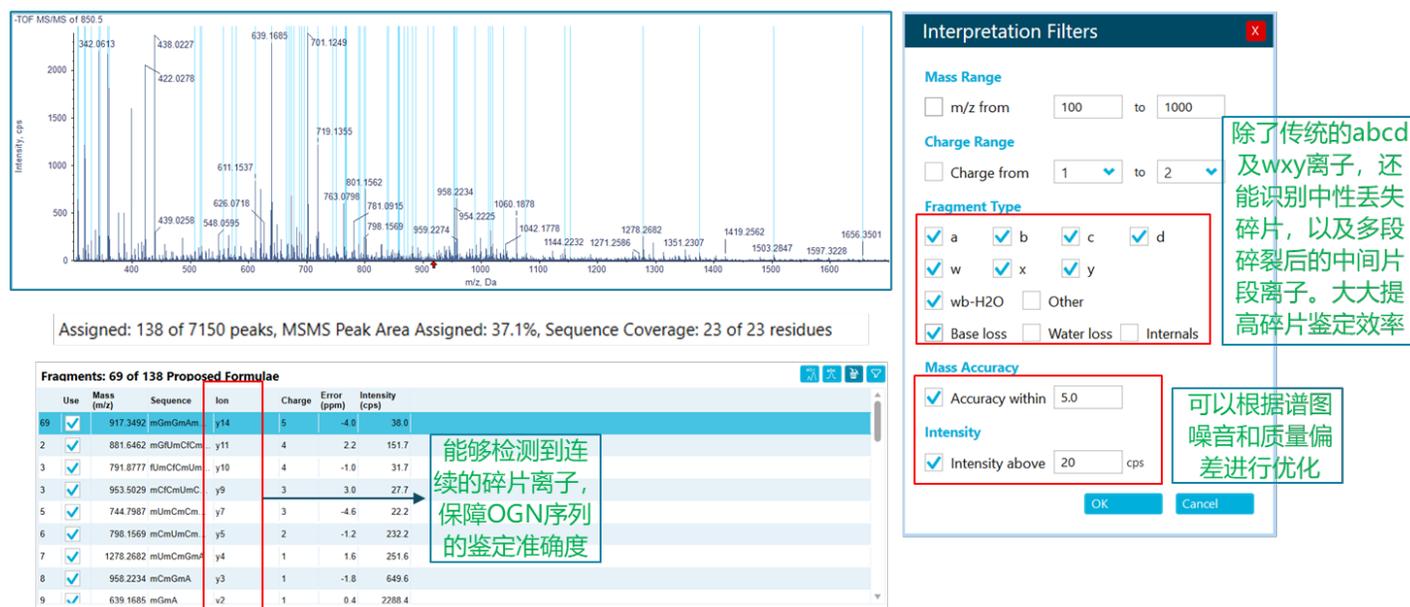


图5. Molecule Profiler对于核苷酸二级谱图的匹配结果

Molecule Profiler对于核苷酸二级谱图的匹配结果见图5。碎片离子匹配时会考虑核苷酸在质谱中碎裂的产生的所有种类的碎片 (a,b,c,d,w,x,y,wb-H<sub>2</sub>O,base lose等类型)，也可以自定义显示出特

定种类的碎片。通过Molecule Profiler的匹配，该OGN链中所有的核苷酸都被覆盖到，表明OGN序列的每一个核苷酸的位置都被准确确认。

## 总结

1. SCIEX ZenoTOF™ 7600系统进行样品采集，对OGN样品能够保持全质量范围（m/z 300至2000）分辨率在40000~60000，保证了数据的质量和准确。
2. 使用SCIEX OS软件平台进行方法编辑、仪器控制、数据浏览、OGN数据分析、报告出具，无需进行繁琐的数据转移和新软件学习。省时省力，简单高效。
3. Molecule Profiler可以考虑到300多种核苷酸的类型和核苷酸修饰，保证了解析的正确、准确、无遗漏。
4. Molecule Profiler的OGN二级谱图匹配功能，能够快速的对OGN的二级谱图进行匹配，且除了常规的a/w, b/y离子之外，会额外考虑到脱碱基、脱水、多级断裂产生中间片段等多种情况，确保很高的碎片离子匹配度以及OGN序列分析的覆盖度。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14051-ZH-A



### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话：010-5808-1388  
传真：010-5808-1390  
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-2419-7200  
传真：021-2419-7333  
官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州分公司  
广州市天河区珠江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510-0200  
传真：020-3876-0835  
官方微信：[SCIEX-China](#)