

# 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

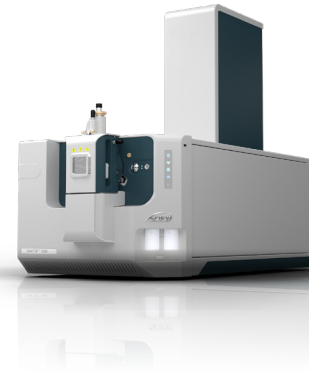
寡聚核苷酸 (Oligonucleotide, OGN), 通常指30以内核苷酸残基组成的多核苷酸分子。这类短核苷酸分子在核酸研究领域有着广泛的用途。是PCR反应的重要原料; 也常被用来作为探针用于基因芯片、荧光原位杂交等过程; 还可以抑制RNA片段, 阻止其翻译成为蛋白; 同时也能够作为引物实现核酸片段的定点诱变。在常见的OGN实验中, 为了提高实验效率, 往往会对OGN上的核苷酸加入多种不同的核苷酸修饰, 以达到防止OGN降解、启动转录、促进翻译等作用。因此, 对于OGN的序列及修饰确定是核酸研究领域必要的环节。

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:

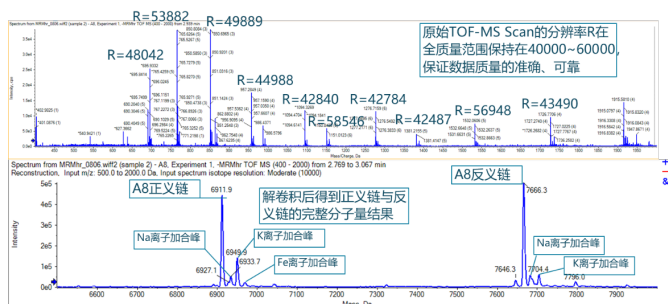


图1. OGN样品的一级质谱图以及解卷积之后的完整分子量分布图

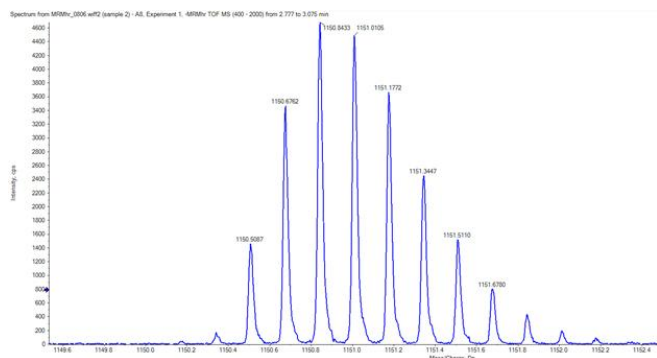


图2. SCIEX ZenoTOF™ 7600系统检测的OGN样品, 多同位素峰之间能够做到很好的基线分离

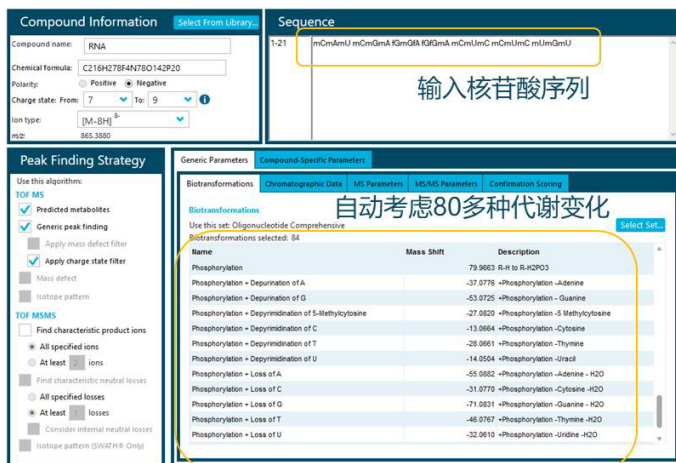
## 原始质谱图浏览:

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)

Generic Parameters: Compound-Specific Parameters, Biotransformations: Chromatographic Data, MS Parameters, MS/MS Parameters, Confirmation Scoring

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	C40H70NO9PS	771.45089	Cholesteryl-TEG, Phosphorothioate	C40H69NO6	0	0	0	HPSO		
/CholesterylTEG/	Other Residue	Other Residue	C40H70NO10P	755.47373	Cholesteryl-TEG, Phosphate	C40H69NO6	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

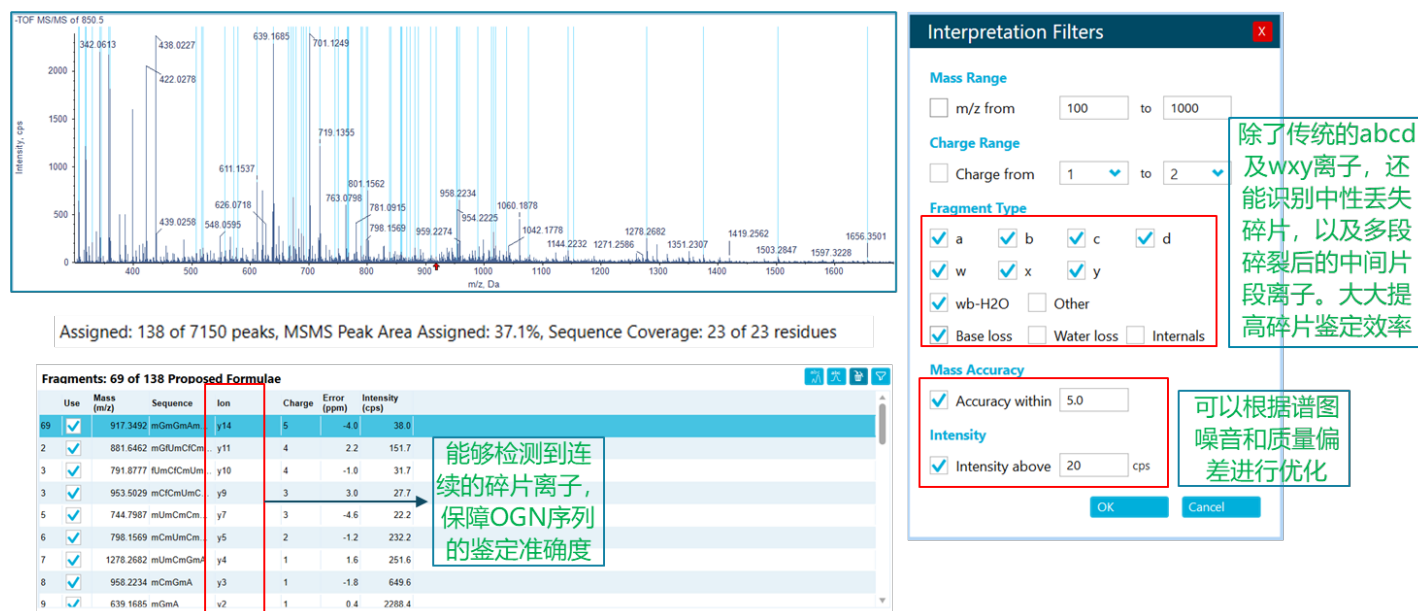


图5. Molecule Profiler对于核苷酸二级谱图的匹配结果

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](#)