

## 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

---

Nikunj Tanna, Mary Trudeau, Margot Lee

Waters Corporation

---

### 摘要

寡核苷酸治疗药物(ONT)能够在基因转录和翻译水平上有效解决疾病生物学问题，同时具有高靶向特异性和低毒性，是当今许多药物开发者的重点关注领域。随着此类治疗药物研发流程的不断扩展，对灵敏、准确且稳定的生物分析方法的需求也日益增长，以确保这类药物发现和开发的过程顺利进行。LC-MS检测和定量技术具有诸多优势（即药物适用性广泛、灵敏度高、选择性高，以及线性动态范围宽），是一项广泛应用于生物分析研究的技术。然而，要实现LC-MS生物分析的可重现性能可能颇具挑战。一般来说，这些分析方法差异性的最大来源是从生物体液中萃取药物及其代谢物所需的样品前处理过程，对于寡核苷酸的萃取尤其如此。液-液萃取(LLE)和固相萃取(SPE)是从生物体液中萃取ONT以进行LC-MS的定量的两种最广泛使用的技术。LLE是一种低通量、难以自动化的技术，需要技术娴熟、经验丰富的科学家在实验室内或跨组织开发、优化和实施这些方法。SPE是一种更易于自动化、通量更高的分析方法，但可能需要对每个步骤进行系统优化，才能达到所需的回收率、重现性和灵敏度。因此，业内迫切需要一种简单、广泛适用的ONT样品前处理工作流程，来减少方法开发需求，并为LC-MS生物分析结果提供更高的一致性和重现性。沃特世的OligoWorks™ SPE微孔板试剂盒（OligoWorks试剂盒）就是基于这一目的设计的。该试剂盒使用不含清洁剂的标准化试剂以及经过优化的稳定方案，适用于多种ONT，几乎不需要进行方法开发。每个试剂盒中都提供了易于自动化的试剂和SPE产品，可以在自动化液体处理器（如Andrew+™移液机器人）上轻松实现自动化样品前处理程序，进一步提升分析性能和生产力，并减少人为误差/差异性。

本研究使用OligoWorks试剂盒组件和标准方案（图1），通过Andrew+移液机器人自动化操作，成功从血浆中萃取了多种ONT，并实现了准确、稳定且可重现的生物分析性能，几乎不需要进行方法开发。

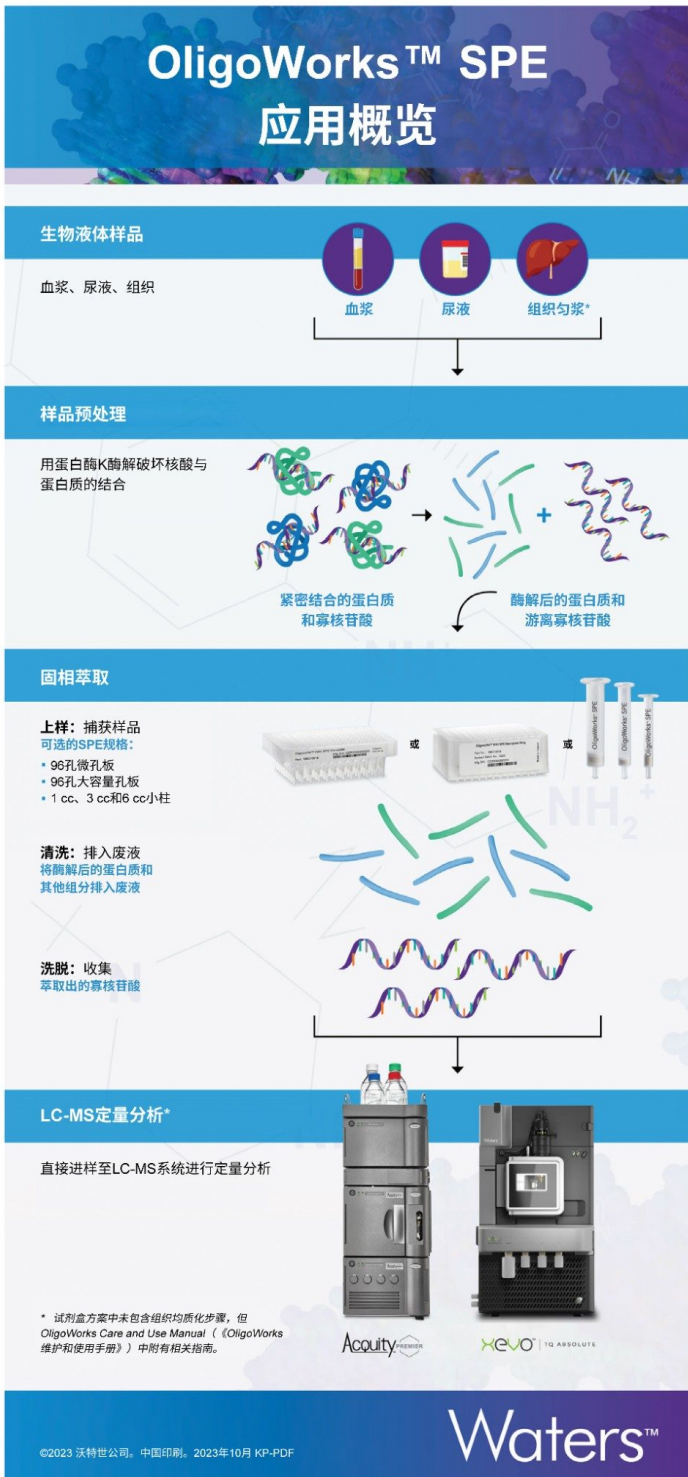


图1.寡核苷酸生物分析定量的样品前处理、萃取和LC-MS工作流程图示。

## 优势

- 基于试剂盒的标准化、无清洁剂解决方案，适用于从生物基质中萃取治疗性寡核苷酸并进行LC-MS定量分析，几乎不需要进行方法开发
- 在多种ONT中实现出色的回收率(>80%)以及低%CV (<15%)
- Andrew+移液机器人提供易于自动化的工作流程，借助Click & Execute OneLab™软件库方法，简化实施并提高分析性能
- 对血浆萃取样品中的多种治疗性寡核苷酸进行准确、灵敏且可重现的定量分析

---

## 简介

### 解决方案

OligoWorks试剂盒设计简便、标准化、灵活且易于自动化的样品前处理试剂盒，旨在对多种寡核苷酸进行准确、稳定的LC-MS生物分析定量。该试剂盒采用RapiZyme™蛋白酶K酶解模块进行高效的酶解样品预处理步骤，可有效破坏寡核苷酸-生物基质的蛋白结合，然后使用OligoWorks SPE产品进行选择纯化，其中包含混合模式阴离子交换SPE吸附剂，该吸附剂经过精心设计和QC验证，可确保寡核苷酸的性能。每个试剂盒都包含经过预先测定、批次可追溯、无清洁剂的试剂以及通用方案，可简化寡核苷酸样品前处理工作流程，不同经验水平的用户都能够轻松使用。

本研究的目的是展示OligoWorks微孔板试剂盒的使用，结合Andrew+移液机器人的自动化操作，从血浆中高效萃取和准确定量寡核苷酸。在本次评估中，分别使用了基因表达调节剂91 (GEM91)、25 mer硫代磷酸化反义寡核苷酸(MWT 7771)、GEM 132、带2'端甲氧基帽的20 mer硫代磷酸化反义寡核苷酸(MWT 6600)、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)偶联siRNA (MWT 8590)和20 mer单链DNA (ssDNA)寡核苷酸(MWT 6122)。

---

## 实验

### LC-MS色谱分离和实验条件

液相色谱系统:

带FTN的ACQUITY™ Premier UPLC系统

色谱柱:	ACQUITY Premier C <sub>18</sub> 寡核苷酸分析专用柱, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm, 1根/包 (P/N: 186009484)
柱温(°C):	55 °C
样品温度(°C):	10 °C
流动相A:	1% HFIP (六氟异丙醇)、0.1% DIPEA (N,N-二异丙基乙胺) 水溶液
流动相B:	0.75% HFIP (六氟异丙醇), 0.0375% DIPEA (N,N-二异丙基乙胺, 65%乙腈+35%水溶液)
清除溶剂:	25:25:25:25甲醇:乙腈:异丙醇:水溶液
进样体积(μL):	10 μL

## LC梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.600	95	5	6
3.25	0.600	77	23	6
3.75	0.600	10	90	6
4.10	0.600	10	90	6
4.25	0.600	95	5	6

## MS系统条件

MS系统:	Xevo™ TQ AbsoluteMS
电离模式:	ESI负离子模式
采集模式:	MRM
毛细管电压(kV):	3
脱溶剂气温度(°C):	600
脱溶剂气流速(L/h):	1000
锥孔气流速(L/h):	150
碰撞气体流速(L/h):	0.2
喷雾器压力(bar):	7

## MRM通道

MRM通道				
寡核苷酸	母离子 ( <i>m/z</i> )	子离子 ( <i>m/z</i> )	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
GEM91	646.6	95.0	40	30
GEM132	824.5	94.9	40	40
GalNAc	714.6	227.4	40	20
ss DNA (20 mer)	764.3	125.1	40	30

## 数据管理

仪器控制软件:	MassLynx™ (v4.2)
---------	------------------

定量软件： TargetLynx™ (v4.2)

自动化软件： OneLab (1.19.2)

## 化学品、试剂、材料和溶剂

GEM91和GEM132均购自Avecia Nitto Denko（美国马萨诸塞州），GalNAc偶联siRNA由Alnylam Pharmaceuticals（美国马萨诸塞州剑桥）友情馈赠。ssDNA 20 mer寡核苷酸购自沃特世公司（美国马萨诸塞州米尔福德）。

MS级甲醇、水、乙腈、异丙醇、六氟异丙醇(HFIP)、N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)和乙酸铵均购自Sigma Aldrich（美国密苏里州圣路易斯）。K<sub>2</sub> EDTA大鼠血浆购自BioIVT（美国纽约韦斯特伯里）。不含DNA/RNA酶的蒸馏水购自ThermoFisher Scientific（P/N: 10977015），用于寡核苷酸标准品的前处理和SPE样品洗脱液的稀释。

OligoWorks试剂盒（P/N: 186010614 <<https://prod1-author.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/186010614-oligoworks-spe-microplate-kit.html>>）购自沃特世公司（美国马萨诸塞州米尔福德）。

## 制备OligoWorks试剂盒清洗试剂

OligoWorks试剂盒SPE清洗液1：，称取3.84 g乙酸铵，加水定容至1 L，然后将pH调节至5.5，制得50 mM乙酸铵缓冲液(pH 5.5)。

OligoWorks试剂盒SPE清洗液2：将300 mL甲醇加入700 mL水中，制备30%甲醇/70%水溶液。

## 储备液、标准曲线和QC样品前处理

使用Eppendorf DNA LoBind™管（P/N: 022431021和022431005）将GEM91、GEM132、GalNAc偶联siRNA和ssDNA复溶于不含DNA/RNA酶的蒸馏水中，制备1 mg/mL的储备液。将1 mg/mL的储备液各10 μL加入已添加960 μL水的DNA LoBind管中，制得所有四种寡核苷酸的混合工作储备液，浓度均为10 μg/mL。使用Andrew+移液机器人血浆中制备标准曲线样品(0.25–1000 ng/mL)和QC样品（LQC-0.75 ng/mL、MQC-50 ng/mL和HQC-750 ng/mL）。

## 使用OligoWorks微孔板试剂盒进行样品预处理和SPE萃取

将制得的标准曲线样品和QC样品(100 μL)加入到Eppendorf 1 mL深孔板中，使用RapiZyme蛋白酶K酶解模块中提供的试剂和方案进行酶解，随后使用OligoWorks试剂盒SPE微孔板进行萃取，随后按照OligoWorks试剂盒和

OligoWorks care and use manual (《OligoWorks维护和使用手册》, [720008066](#) <  
<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135127508>>) 中提供的方案进行洗脱。方案如图2所示。  
(注: OligoWorks试剂盒中的蛋白酶K试剂量足够自动化处理一整板96个样品, 并有10%的过量。如果需要更高的过量, 可单独购买额外的RapiZyme蛋白酶K酶解模块 (P/N: [186010601](#) <  
<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186010601-rapizyme-proteinase-k-digestion-module.html>>)。)

## OligoWorks样品前处理方案

### RapiZyme蛋白酶K酶解样品预处理

#### 样品预处理

100  $\mu$ L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  $^{\circ}$ C、600 rpm下温育60分钟

### OligoWorks WAX 96孔 $\mu$ Elution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  $\text{NH}_4\text{OAC}$ , 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2. OligoWorks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。

## 自动化平台

利用Andrew+移液机器人, 从OneLab软件库中下载[简单的连续稀释制备方法](#) <



<https://onelab.andrewalliance.com/app/lab/GK6ovDkA/library/simple-serial-dilution-preparation-9jn2GGwa> 并进行修改，生成Waters QuanRecovery 700  $\mu\text{L}$  样品板中血浆样品的标准曲线和QC样品。从OneLab软件方法库中下载Click & Execute OligoWorks RapiZyme蛋白酶K酶解方法（图3A）和OligoWorks WAX SPE微孔板方法（图3B），对所有标准曲线和QC样品进行三次萃取。整个工作流程，从创建血浆标准曲线和QC样品，到使用OligoWorks微孔板试剂盒酶解和萃取寡核苷酸，均在配置了Heater-Shaker+和Extraction+互联装置的Andrew+移液机器人上实现了全自动化操作。

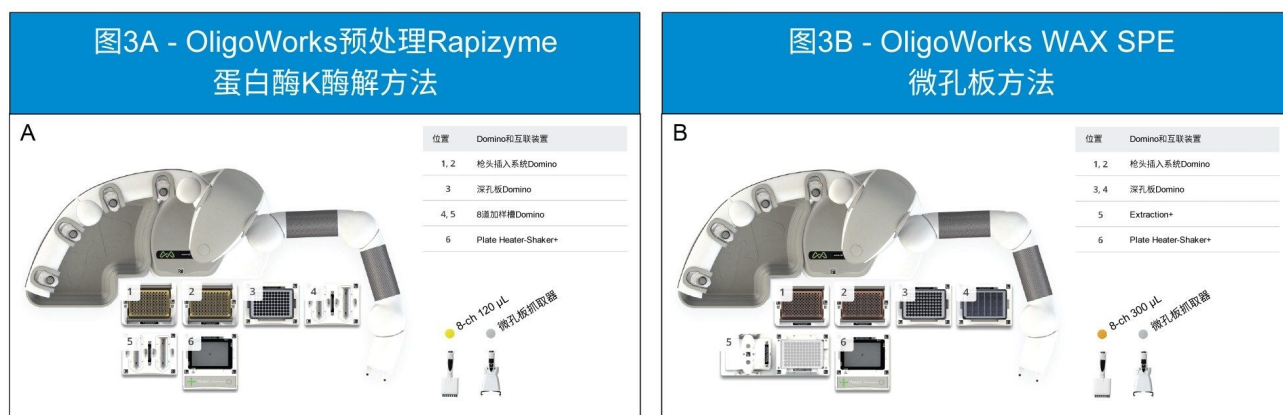


图3.使用蛋白酶K酶解方法(A)和OligoWorks WAX SPE 96孔微孔板(B)进行寡核苷酸样品预处理的Andrew+移液机器人代表性工作台布局。两种布局都展示了执行这些方法所需的所有Domino、互连设备以及移液器的适当放置位置。

## 结果与讨论

治疗性寡核苷酸已被证明是对于某些类型的遗传或翻译失调疾病非常有效的疗法。随着人们对这类治疗药物在各种临床病症中的应用的兴趣日益增厚，迫切需要开发简单、准确且稳定的分析技术来分析和定量这些分子。使用相对简单的样品前处理方案从复杂的生物基质中高效、可重现地萃取出这些分析物并获得高回收率，对于LC-MS定量分析至关重要。许多ADME/DMPK工作流程都实现了高度自动化，以提高效率和重现性。液-液萃取(LLE) - SPE常用于从生物基质中萃取寡核苷酸。LLE虽然有效，但速度慢、通量低，需要手动操作，难以实现自动化或扩展。其他市售SPE试剂盒在该工作流程中使用了清洗剂类试剂，在SPE过程中需要进行大量清洗以去除这些清洗剂，并且通常需要在进样至LC-MS系统之前将其挥干并复溶，确保SPE洗脱液的兼容性。这些步骤会增加时间，并且

由于吸附、溶解和潜在的降解，寡核苷酸可能会损失，增加分析的差异性。

相比之下，基于OligoWorks试剂盒的解决方案采用简单、无需清洗剂的工作流程，对生物体液中的多种ONT进行LC-MS定量分析，表现良好，几乎不需要进行方法开发，正如本研究所展示的，该方案容易实现自动化。使用RapiZyme蛋白酶K酶解模块进行样品预处理时，可有效破坏生物体液中寡核苷酸与蛋白的强结合，无需使用清洁剂，从而省去了LC-MS分析之前的大量清洗和干燥步骤。OligoWorks WAX SPE吸附剂专为选择性结合寡核苷酸而设计，可洗去样品中不需要的基质组分，获得纯净的SPE洗脱液，可以直接进样至LC-MS系统。如应用纪要720008086ZH中所述，OligoWorks解决方案针对各种寡核苷酸以及不同起始生物样品体积均表现出优异的性能，可提供高回收率和高重复性。适用于OligoWorks样品预处理和SPE的Click and Execute OneLab软件库方法能够快速部署和执行，同时具备可扩展性，可降低人为误差的风险，从而提高重现性并实现稳定的分析性能。使用OligoWorks试剂盒初始方案，在Andrew+上完全自动化操作，获得了优异的血浆寡核苷酸回收率(>96%)，手动和自动样品处理之间的回收率差异不到5%，如图4所示。

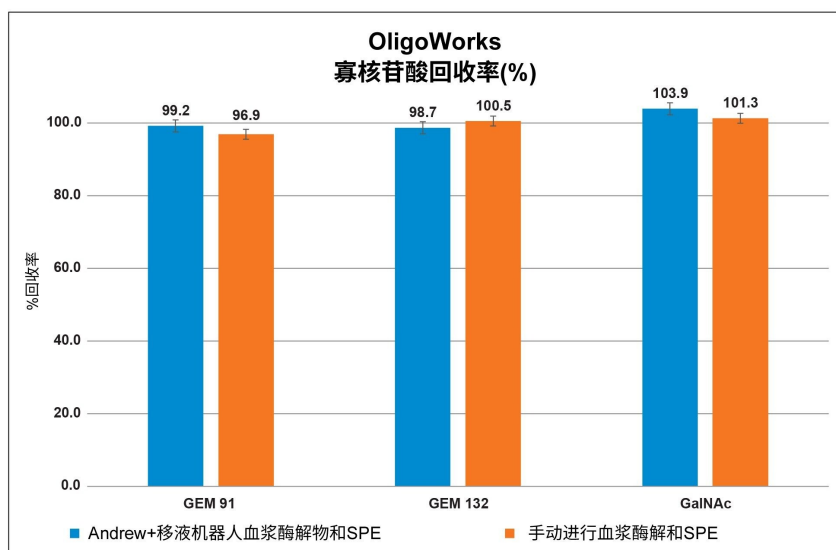


图4.使用OligoWorks试剂盒对GEM91、GEM132和GalNAc寡核苷酸进行样品前处理与萃取时，自动化操作（Andrew+移液机器人）与手动操作的性能相当，两者均实现了超过96%的高回收率，并且自动化处理与手动处理之间的差异小于5%，确保了OligoWorks自动化样品前处理与萃取方案的适用性。

本研究中使用的OligoWorks试剂盒无需进行方法开发，即可准确定量100 μL血浆样品中的四种寡核苷酸药物，无

需内标校正，定量性能优异。在Andrew+移液机器人上实现工作流程自动化后，GEM91、GEM132和GalNAc偶联siRNA的定量下限(LLOQ)为250 pg/mL，ssDNA 20 mer寡核苷酸的定量下限为0.50 ng/mL。标准曲线在0.25~1000 ng/mL (GEM91、GEM132和GalNAc-siRNA) 和0.5~1000 ng/mL (单链DNA) 范围内呈线性( $r^2 > 0.99$ )，所有三个重复测量点的%偏差和变异系数(CV) < 15%，均满足推荐的小分子生物分析方法验证标准 (如表1所示)。具体而言，GEM91、GEM 132、GalNAc和ss DNA在标准曲线上的准确度和CV范围分别为85.2%~119.2%和1.97%~13.87%。

三次重复萃取中所有QC水平的准确度和精密度也均在生物分析方法验证指南的±15%范围内。GEM91、GEM132、GalNAc偶联siRNA和ssDNA 20 mer寡核苷酸QC点的平均准确度介于92.30%~104.07%之间，平均CV介于2.82%~6.77%之间 (如表1所示)。QC点的峰面积响应在整个浓度范围内线性增加，如图5所示。

灵敏、线性、准确且精密					
标准曲线统计数据					
分析物	范围	加权	线性回归	准确度范围 (%)	%CV 范围
GEM91	0.25-1000 ng/mL	1/x	>0.99	85.4-114.7	2.01-11.43
GalNAc				85.2-114.4	2.01-13.44
GEM132				85.9-119.2*	1.97-9.67
ss DNA (20 mer)	0.50-1000 ng/mL			85.7-112.4	0.99-13.87

\*LLOQ的准确度(%)为119.2%根据生物分析方法验证指南是可接受的

QC统计数据					
分析物	QC水平	预期浓度 (ng/mL)	平均实测浓度 (ng/mL) (N=3)	平均准确度(%) (N=3)	平均CV(%) (N=3)
GEM91	LQC	0.75	0.74	98.17	6.42
GalNAc			0.69	92.30	2.90
GEM132			0.78	104.07	5.13
ss DNA (20 mer)			0.69	92.63	8.69
GEM91	MQC	50	52.97	105.95	2.82
GalNAc			49.79	99.56	6.42
GEM132			51.72	103.43	7.41
ss DNA (20 mer)			55.15	110.29	0.99
GEM91	HQC	750	756.55	100.87	4.61
GalNAc			733.97	97.87	13.44
GEM132			748.28	99.82	6.77
ss DNA (20 mer)			763.63	101.84	4.66

表1.使用OligoWorks试剂盒，在Andrew+移液机器人上自动化处理，并随后进行LC-MS/MS分析，获得血浆中GEM91、GEM132、GalNAc和ss-DNA 20 mer寡核苷酸线性准确度和精确定量标准曲线样品(A)和QC样品(B)的性能统计数据。

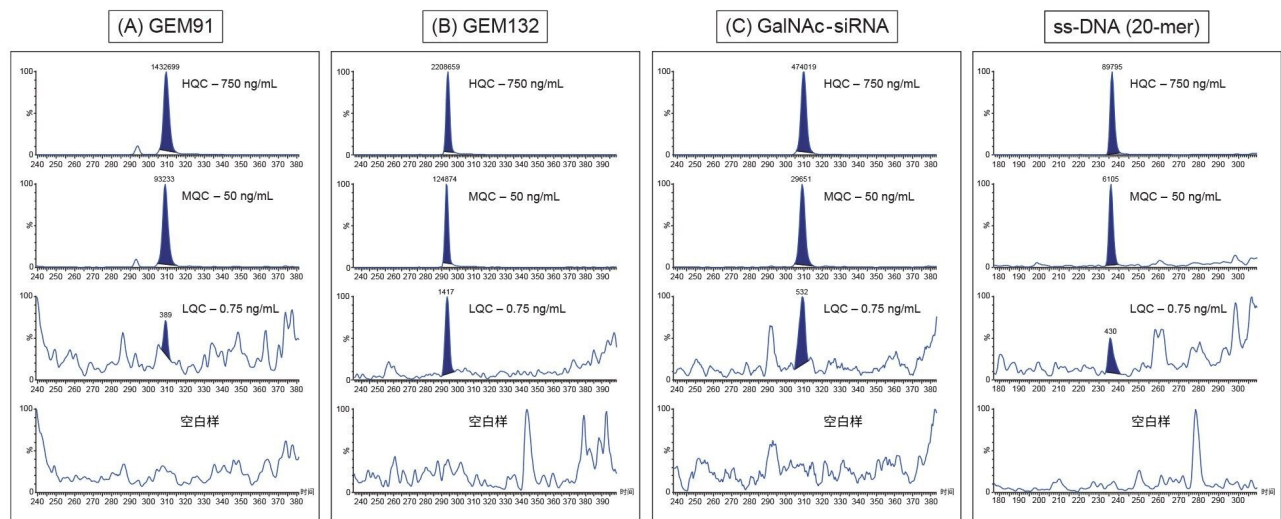


图5.GEM91 (A)、GEM132(B)、GalNAc (C)和ss DNA (D)的代表性QC色谱图。

## 结论

使用OligoWorks SPE微孔板试剂盒（附带简单的分步方案和经过预先测定的标准化无清洁剂试剂）可对血浆中的寡核苷酸进行准确、稳定的定量分析。该工作流程在Andrew+移液机器人上可实现完全自动化，并可通过下载OneLab Click & Execute（单击并执行）库方法，在不同日期、不同用户和不同实验室之间轻松、可重现地执行OligoWorks试剂盒样品前处理和萃取工作流程。这种完全自动化、标准化的方法（实现了寡核苷酸高回收率）极大地简化并优化了样品萃取过程，大幅提高了实验室工作生产率，减少了错误，并确保了整体分析方法的性能。

## 参考资料

1. Margot Lee, Nikunj Tanna, Mary Trudeau. 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, 沃特世应用纪要, [72000806ZH](#), 2023年9月。
2. OligoWorks SPE Kits and Components, Waters User Manual, [720008066](#) <  
<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>>

Xevo TQ Absolute三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

<https://www.andrewalliance.com/>

搭载OneLab软件的Andrew+移液机器人 >

720008068ZH, 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