

肝脏中siRNA含量的测定

张海明

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

siRNA (dsRNA) 通过核酸内切酶Dicer蛋白被切割成小的dsRNA片段 (siRNA)。随后, siRNA 与Argonaute-2 (AGO2) 蛋白结合, Argonaute-2蛋白被认为是称为RNA诱导沉默复合物“RISC”的多蛋白复合物的核心, 随后将siRNA分离成两条单链: 引导链 (guide strand) 和乘客链 (passenger strand)。然后, 乘客链被降解, 而引导链-RISC复合物与互补的靶向mRNA连接并将其破坏成非功能性部分, 从而阻断靶蛋白的翻译。

关键词

siRNA; 肝脏; Kinetex EVO C18; OTX; LC-MS/MS

化合物信息: 保密

实验部分

3.1仪器、试剂与材料

3.1.1主要仪器设备

液相色谱串联质谱仪(AB SCIEX Triple Quad™5500), 配有电喷雾离子源(ESI);
96孔正压装置(Agela Cleanert M96);

3.1.2试剂材料

96孔板: OTX
色谱柱: Kinetex EVO C18 (2.1×50 mm, 1.7 μm, 100 Å); P/N: 00B-4726-AN
实验用水、乙腈、HFIP、DIEA、碳酸氢铵、乙酰胺均为色谱级。

3.1.3样品

动物肝脏

3.2样品前处理方法

预处理: 将30 mg肝脏与150 μL Phenomenex OTX裂解液混合并匀浆, 匀浆后静置20 min, 待

净化;

活化: OTX板依次使用 1 mL甲醇、1 mL 50 mM pH=5.5乙酸铵水溶液活化;

上样: 加载预处理后的肝脏组织匀浆液至活化后孔板;

淋洗: 依次使用1 mL 50 mM pH=5.5乙酸铵水溶液、1 mL 50 mM pH=5.5乙酸铵水溶液水: 乙腈=1:1混合溶液淋洗;

洗脱: 用400 μL洗脱液 (1 mM TCEP in 100 mM pH=9.5碳酸氢铵水溶液: 乙腈: 四氢呋喃=2:1:1) 洗脱2次, 涡旋混合后上样。

3.3仪器检测条件

3.3.1色谱条件

色谱柱: Kinetex EVO C18 (2.1×50 mm, 1.7 μm, 100 Å)

流动相A相: 0.5% HFIP, 0.1% DIEA水溶液;

流动相B相: 0.5% HFIP, 0.1% DIEA乙腈溶液;

流速: 0.3 mL/min;

柱温: 40 °C;

进样量: 5 μL;

梯度程序见表1:

表1. 梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	B (%)
0	0.3	5
0.4	0.3	5
3.0	0.3	100
4.0	0.3	100
4.5	0.3	5
6.0	0.3	5

3.3.2质谱条件

离子源类型: 电喷雾离子源 (ESI-)

扫描方式: 多反应监测正负离子模式 (MRM)

喷雾针电压: -4500 V

离子源温度: 500 °C

加热器 (GS1) : 60 psi
 辅助加热气 (GS2) : 60 psi
 气帘气 (CUR) : 40 psi
 碰撞气 (CAD) : 9 psi

为获得较好的稳定和灵敏度，各化合物监测离子对的去簇电压 (DP) 和碰撞电压 (CE)，目标化合物定量离子对以及内标监测离子对等参数均经过系统优化，优化信息参见表2。本案例参数仅供参考不具备法律效力。

表2化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物	Q1	Q3	DP/V	CE/V
SiRNA	798.1	430.3	-80	-30

3.4结果与讨论

3.4.1线性范围

配制浓度范围1.6-80 mg/L siRNA肝脏匀浆液作为样品进行检测并以外标法绘制标准曲线。得到 $y=3.4e+003x-1.16e+003$ ($r=0.9993$) 的线性回归方程，线性良好。

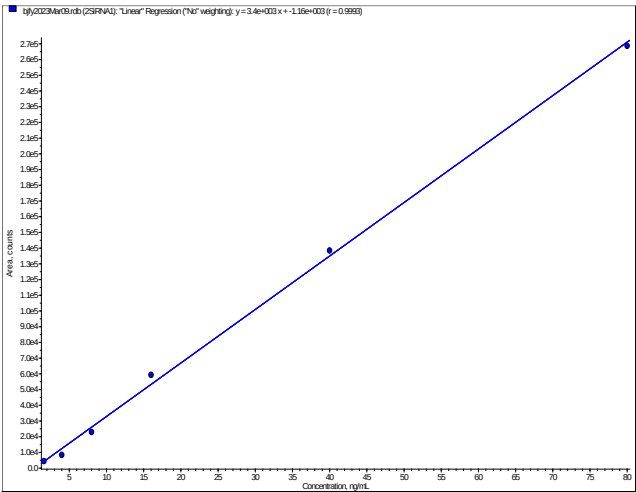


图1. 肝脏匀浆基质1.6-80mg/L线性

3.4.2方法精密度与准确度

本实验选择8 mg/L加标平行测定3次，以外标法计算回收率与精密度结果，由表3可知回收率为95%~99%，相对标准偏差RSD小于5%；

表3. 加标回收实验结果

化合物	理论加标浓度 (mg/L)	检测结果 (mg/L)	回收率%	RSD%
SiRNA	8	7.94	99.3	2.2
	8	7.72	96.5	
	8	7.63	95.3	

3.5实验谱图

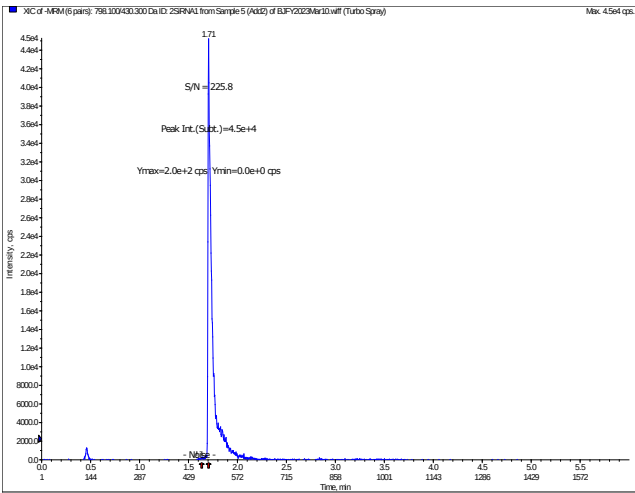


图2. S/N为225.8的8 mg/L 加标色谱图

结论

本文建立了肝脏中siRNA的SPE检测方法，其8 mg/L浓度下信噪比为225.8 能够满足检测需求，8 mg/L外标法添加回收率在95%~99%之间，RSD值均小于5%，能够满足标准检测方法要求。

附：相关产品

产品名称	规格描述	包装数量	订货号
Kinetex EVO C18	1.7 μ m, 2.1 $\times$ 50 mm	1支	00B-4726-AN
Clarity OTX 96	25 mg	1块/PK	8E-S103-CGA
保护柱卡套	Security Guard Kit	1/PK	KJ0-4282
保护柱柱芯	4 $\times$ 3.0 mm	10/PK	AJ0-4287



Xccelerator 加速服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息, 请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家, 我们很乐意为您提供帮助!

Confidential - Company Proprietary

