

血浆中20nt-RNA的分析方法 (Clarity OTX)

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

本实验采用固相萃取结合液相色谱-串联质谱的方法, 在多反应监测(MRM)模式下建立了血浆20nt-RNA的测定方法。血浆中的RNA经Clarity OTX 25mg 96孔固相萃取板净化, Kinetex EVO C18色谱柱 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm, 100 Å) 分离, 0.5% HFIP-0.1% DIEA水溶液和0.5% HFIP-0.1% DIEA乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱, 外标法进行定量。结果表明, 相对回收率高于80%, 能够满足检测要求。

关键词

RNA; Clarity OTX; Kinetex EVO C18

化合物信息

样品名称	序列	平均分子量
20nt-RNA	5' - TCC TCC GGA GCC AGA CTT CA - 3'	6760.81

实验部分

3.1仪器、试剂与材料

3.1.1主要仪器设备

SHIMADZU 30AD-AB、SCIEX API 5500+高效液相色谱串联质谱仪;

3.1.2试剂材料

乙腈为色谱纯; 甲酸色谱纯; HFIP; DIEA;
Phenomenex OTX裂解液; 碳酸氢铵; 乙酸铵;
乙酸; 氨水; TCEP-HCL;

3.1.3样品预处理

取 150 μL 牛血浆 (索莱宝 Cat.No.B9550 Lot.No.624D051) 置于2 mL 96孔收集板中并加入5 μL标品, 涡旋; 加入150 μL Phenomenex 裂解液涡旋

混合, 待净化;

3.1.4样品净化

依次使用1mL甲醇、1mL 50 mM pH=5.5乙酸铵水溶液, 活化25 mg Clarity OTX 96孔固相萃取板。

将待净化的预处理液加入活化后的96孔固相萃取板, 以3-5秒/滴速度正压上样, 至液滴不在流出时, 适度增大正压压力, 并保持2min后。

依次使用600 μL 50 mM pH=5.5乙酸铵水溶液、600 μL 50 mM pH=5.5 50%乙腈乙酸铵水溶液上样后的96孔板以3-5秒/滴速度正压淋洗, 至液滴不在流出时, 适度增大正压压力, 并保持2 min。

使用500 μL洗脱液 (1mM TCEP、100mM pH9.5碳酸氢铵水溶液: 乙腈: 四氢呋喃=2:1:1) 对淋洗后的96孔板以3-5秒/滴速度正压洗脱2次, 至液滴不在流出时, 适度增大正压压力, 并保持2 min。

涡旋混合收集好的洗脱液进样检测;

3.2仪器检测条件

3.2.1色谱条件

色谱柱: Kinetex EVO C18, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm; P/N: 00B-4726-AN

流动相: A: 0.5% HFIP-0.1% DIEA水溶液; B: 0.5% HFIP-0.1% DIEA乙腈溶液

流速: 0.3 mL/min;

柱温: 40°C;

进样量: 3 μL

进样器温度: 15 °C

梯度:

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0.40	0.40	95.0	5.0
3.00	0.40	0.0	100.0
4.00	0.40	0.0	100.0
4.50	0.40	95.0	5.0
6.00	0.40	95.0	5.0

3.2.2 质谱条件

- 离子源：ESI
- 扫描方式：负离子扫描
- 电喷雾电压：-4500 V
- 气帘气压力：40 psi
- 辅助气压力1：60 psi
- 辅助气压力2：60 psi
- 离子源温度：500 °C
- 采集方式：多反应监测(MRM)
- Q1、Q3均为单位分辨率
- 质谱参数：见表1

表1. 化合物的质谱参数

化合物	母离子	子离子	DP/V	CE/V
20nt-RNA	1056.0	1056.0	-60	-5
	791.8	791.8	-60	-5
	791.8	775.1	-60	-22
	791.8	346.0	-60	-24

3.3 实验结果

牛血浆基质100 ppb加标回收率与RSD结果

Sample Name	Sample ID	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Analyte Concentration (ng/mL)	Standard Quantity (ng/mL)	Use Recount	Recount Method	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	2111nHSpk200ppb	Standard	Ch2522Fid21.wif	3.71e+09	1.61e+05	200	100	Y	Y	199	99.2
2	2111nHSpk200ppb	Quality Control	Ch2522Fid21.wif	3.63e+09	1.33e+05	200	100	Y	Y	192	91.9
3	2111nHSpk200ppb	Quality Control	Ch2522Fid21.wif	3.10e+09	1.17e+05	200	100	Y	Y	187	81.5
4	2111nHSpk200ppb	Quality Control	Ch2522Fid21.wif	3.66e+09	1.29e+05	200	100	Y	Y	194	91.9
5	2111nHSpk200ppb	Standard	Ch2522Fid21.wif	3.70e+09	1.61e+05	200	100	Y	Y	203	101
6	2111nHSpk200ppb	Recount	Ch2522Fid21.wif	3.10e+09	1.17e+05	200	100	Y	Y	199	99.2

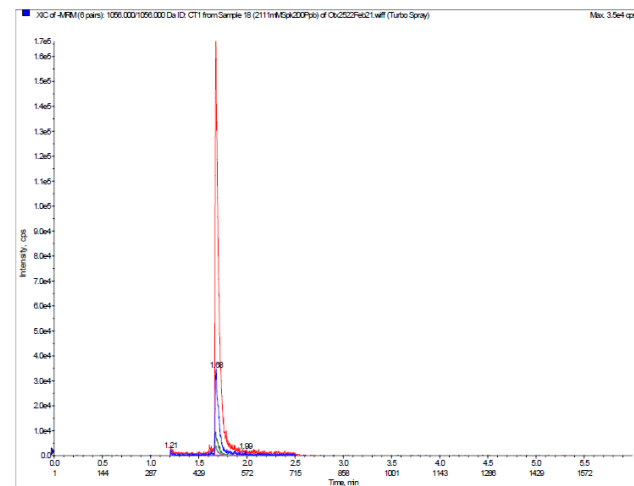


图1. 血浆基质200ppb溶液色谱图

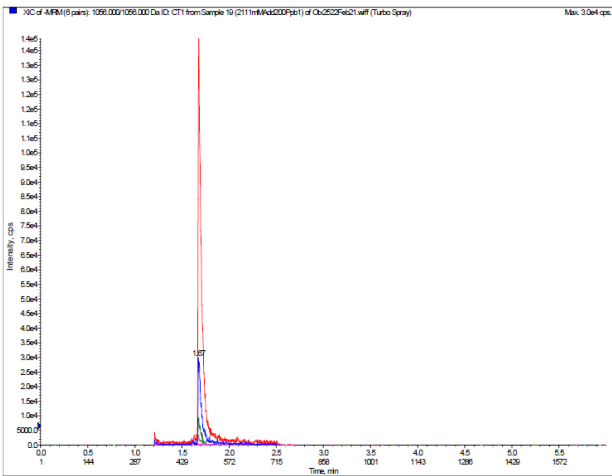


图2. 血浆基质200ppb加标回收溶液色谱图

结论

使用Kinetex EVO C18 (1.7 μm, 2.1 × 50 mm) 色谱柱配合Clarity OTX 96孔固相萃取板净化能够实现血浆中20nt-RNA的净化以及定量分析，结果表明，峰形良好，保留时间稳定，可以满足分析要求。

该样品比较特殊，加标体积过大会影响平行性。

RNA 样品易降解，需要抑制环境中的RNA 酶。需要用1mM TCEP 水溶液：甲醇=1:1 配置。24h 内4℃条件下降解率50%。

25mg OTX 板最大血浆上样体积150 μL。如果需要更大体积上样，选择100mg 板子。

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 μm, 2.1 × 50 mm	1支	00B-4726-AN
Clarity	Clarity	Clarity	Clarity
保护柱卡套	Security Guard Kit	1/PK	KJ0-4282
保护柱柱芯	4×3.0 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

