

异核苷杂寡核苷酸的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱测定*

张虎翼 杨振军 于宏武 闵吉梅 马灵台 张礼和**

(北京医科大学药学院抗肿瘤药物研究室, 北京 100083)

彭嘉柔 孙徐林

(北京医科大学医药卫生分析中心, 北京 100083)

〔摘要〕以芥子酸(sinapinic acid)为基质,对异核苷杂寡核苷酸(3-(R)-IsodT)₁₃·dT和(3-(S)-IsodT)₁₃·dT进行了基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱测定,准确地测得分子量,合成的寡核苷酸得以鉴定。

关键词:基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 寡核苷酸 异核苷

人工合成的寡核苷酸通过互补核酸氢键的特异结合,可以实现核酸序列的特异识别,这些寡核苷酸称之为反义寡核苷酸^[1,2]。由于其良好的应用前景,正受到广泛的关注。反义寡核苷酸在应用中必须克服许多困难,如透过细胞膜的能力,细胞内的稳定性、亲和性和特异结合能力等。于是,通过化学修饰寡核苷酸而得到高性能的衍生物成为研究的热点。由于昂贵的合成价格和某些修饰方法导致收率的降低及分离的困难,限制了合成规模,所获得的供试样品往往在纳摩尔水平,而其分子量又在几千甚至上万,这样就无法进行常规的结构鉴定。因此,适于微量样品测试的质谱手段成为当然的选择。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱是近年来发展起来的一种质谱方法^[3],由于它能够测定微量的大分子物质,因而在寡多聚物和生物大分子的研究中应用广泛^[4,5]。该方法已成为寡核苷酸质谱研究中最有力的工具之一^[6]。目前,国内也已开展了这方面的工作,一般用于蛋白质样品分析^[7,8]。

我室曾先后报道了 3-(R)-单脱氧异核苷^[9]、3-(S)-单脱氧异核苷^[10]及掺有 3-(S)-isodT 的三聚寡核苷酸^[11]的合成。为了进一步研究杂寡核苷酸的性质,采用亚磷酰胺法合成了 14 聚的异核苷杂寡核苷酸(3-(R)-IsodT)₁₃·dT(A)和(3-(S)-IsodT)₁₃·dT(B)。我们采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱方法,测定了寡核苷酸的分子量,确证了所获得的样品。

1 实验部分

1.1 寡核苷酸样品

1998-07-28 收

* 国家自然科学基金资助项目(29572037)

** 联系人

在 Applied Biosystems 381A DNA 合成仪上,应用 Applied Biosystems 标准程序(0.2 μ mol 水平),固相合成了(3-(R)-IsodT)₁₃·dT(A)和(3-(S)-IsodT)₁₃·dT(B)。高效液相分离纯化(ZORBAX[®] oligo column),经 Sephadex 15 柱脱盐,冷冻干燥得白色粉末。

1.2 基质

芥子酸(sinapinic acid,SA),采用 HP G2055A 标准溶液。

1.3 质量校正标样

HP-G2052A 蛋白标准样品,用外标法进行质量标定。

1.4 供试样品制备

分别将约 0.3OD/10 μ g 寡核苷酸样品 A 和 B 溶于 100 μ l 高纯水,配制成溶液,取 5 μ l 与等体积基质溶液(预先与二分之一体积的 0.1M 柠檬酸氢二胺混匀)混匀,取约 1 μ l 加到进样靶心,真空干燥结晶。

1.5 仪器

LDI-1700 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(Linear Scientific Inc., Reno, U. S. A.),氮激光器,波长 337nm,脉冲宽度 3ns,加速电压 30kv,激光能量在 1—10MJ 范围内可调节。负离子分析。质谱图为 50 次单次扫描的累加。样品测试前用 HP-G2052A 蛋白质标准样作质量校正。

2 结果讨论

图1是寡核苷酸A和B的飞行时间质谱图。寡核苷酸A给出了4194.4的[M-H]⁻

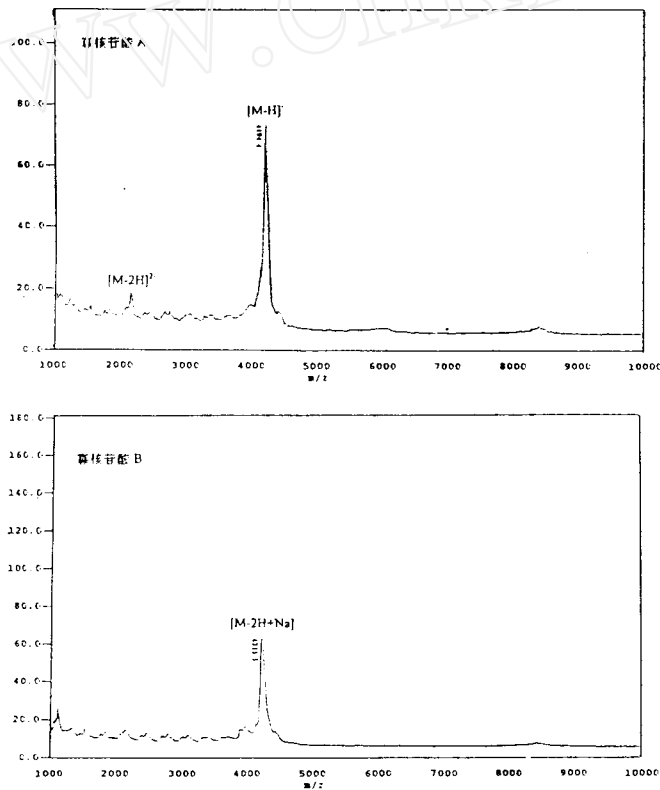


图1 寡核苷酸A(上)和B(下)的MALDI-TOFMS质谱

峰(计算值为 4193.7, $\Delta M=0.7$),同时出现了 $[M-2H]^{2-}$ 峰。寡核苷酸 B 中只出现了 4215.5 的 $[M-2H+Na]^{-}$ 峰(计算值为 4215.7, $\Delta M=0.2$)。

由于所合成的两条杂寡核苷酸链均为单一核苷酸组建,不存在序列问题,分子量即可以作为鉴定依据。这一结果准确地给出样品的分子量,证实了所合成寡核苷酸的正确性。从图中可以看到,只有 14 聚体的信号峰,说明分离效果很好,样品纯度较高。

芥子酸是 MALDI-TOFMS 测定蛋白质样品的常用基质,现用于寡核苷酸的测定也取得了很好的效果。这一方面是由于柠檬酸氢二胺的加入稳定了信号峰,在一定程度上压制了盐加合物的形成(寡核苷酸 B 出现加合物峰可能是由于脱盐不充分,样品含盐量相对较多所致);另一方面也与寡核苷酸的序列有关,一般认为,均聚寡胸苷酸同其它碱基组成的均聚或杂聚寡核苷酸相比,更容易获得分子信号峰^[12,13]。

以上结果表明,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱能够准确灵敏地测定微量的寡核苷酸分子量(本实验中样品测试浓度为 10pmol 水平,质量测定精度约 0.01%),为此类大分子的结构鉴定提供了强有力的分析手段。

参 考 文 献

- 1 Weitraub H M. *Sci. Am.*, 1990;262:40-46
- 2 Uhlmann E, Peyman A. *Chem. Rev.*, 1990;90:543-584
- 3 Karas M, Hillenkamp F. *Anal. Chem.*, 1988;60:2399-2301
- 4 Karas M, Nahr U, Gishmann U. *Mass Spectro. Rev.*, 1991;19:335
- 5 袁湘林, 邹汉法, 张玉莹. *分析化学*, 1998;26:234-238
- 6 Nordhoft E, Kirpelkar F, Roepstorff P. *Mass Spectrom. Rev.*, 1996;15:67-138
- 7 蔡耘, 廖杰, 钱小红等. *质谱学报*, 1996;17:34-38
- 8 彭嘉柔, 孙徐林, 于亭等. *质谱学报*, 1997;18:28-32
- 9 Yu H W, Zhang L R, Zhuo J C et al. *Bioorg. & Med. Chem.*, 1996;4:609-614.
- 10 Zhang H Y, Wu X J, Yu H W et al. *Chin. Chem. Lett.*, 1996;7:1089-1090
- 11 Yu H W, Xiang L R, Ma L T et al. *Chem. J. of Chin. Univ.*, 1997;18:1103-1106
- 12 Bornsen K O, Schar M, Widmer H M. *Chimia*, 1990;44:412-416
- 13 Parr R G, Fitzgerald M C, Smith L M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1992;6:369-372

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Oligodeoxynucleotides Consisting of Isonucleosides

Zhang Huyi, Yang Zhenjun, Yu Hongwu, Min Jimei, Ma Lingtai, Zhang Lihe
(School of Pharmaceutical Sciences, Beijing Medical University, Beijing 100083)

Peng Jiarou, Sun Xulin

(Medical and Healthy Analytical Center, Beijing Medical University, Beijing 100083)

Received 1998-07-28

Abstract

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry of oligodeoxynucleotides consisting of isonucleosides with sinapinic acid as matrix was reported. Modified oligonucleotides were identified by means of their molecular weights obtained.

Key Words: MALDI-TOFMS, oligodeoxynucleotides, isonucleosides