



УДК 577.113.6.088.5:543.51

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ МЕТОДОМ MS-MALDI

© 2005 г. А. В. Стрелецкий*, А. Ю. Козлова**#, Д. С. Есипов**,

А. Л. Каюшин*, М. Д. Коростелева*, С. Е. Есипов*

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

биологический факультет, кафедра биоорганической химии,

119992, Москва, Воробьевы горы, д. 1, корп. 12

Поступила в редакцию 05.10.2004 г. Принята к печати 01.11.2004 г.

С целью оптимизации условий определения молекулярных масс гомогенных и гетерогенных по структуре 14–42-мерных олигонуклеотидов проведен их MALDI-масс-спектрометрический анализ с использованием разных матриц и режимов съемки масс-спектров на приборе Vision 2000 фирмы “Thermo Bioanalysis Corp.” (Finnigan, США). Наиболее стабильные результаты, минимизирующие неконтролируемое разрушение олигонуклеотидов при съемке MALDI-масс-спектров, в том числе их апуринизацию, получены с использованием 2,4,6-тригидроксиацетофеноновой матрицы, а не 3-гидроксипиколиновой кислоты, рекомендуемой в большинстве работ по MS-анализу олигонуклеотидов. Разработанный подход позволяет определять молекулярные массы олигонуклеотидов, получаемых химическим синтезом, оценивать их компонентный состав и чистоту. Метод применен для масс-спектрометрического анализа олигонуклеотидов, содержащих 3’-(метил-С-фосфонатную) группу или модифицированное звено – 1,N⁶-дезоксизеноаденозин.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, MALDI, олигонуклеотиды, олигонуклеотиды модифицированные.

ВВЕДЕНИЕ

Масс-спектрометрия представляет собой один из физико-химических методов, используемых для установления строения органических молекул. Метод основан на получении из нейтральных органических молекул положительно или отрицательно заряженных газофазных ионов, определении их масс (отношения массы к заряду m/z , массового числа) и количеств (по величине ионного тока) и изучении их фрагментации. В последнее время методы масс-спектрометрии успешно применяются для анализа природных и синтетических олигонуклеотидов, в особенности метод матрично активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI) [1–4].

В MALDI-масс-спектрометрии ключом к успешному анализу соединений является правильный подбор матрицы и режима съемки масс-спектра, обеспечивающих минимальную фрагментацию молекулярных ионов. Основными задачами

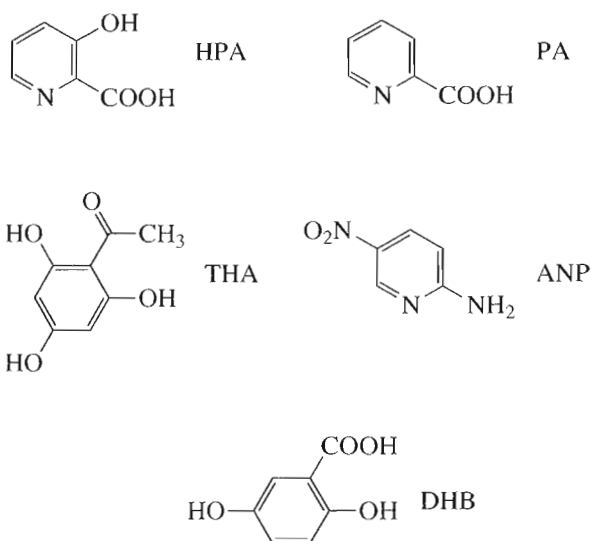
масс-спектрометрического анализа олигонуклеотидов являются: надежное определение их молекулярных масс, оценка качества готовых олигонуклеотидных препаратов, поэтапный контроль синтеза олигонуклеотидов, получение многолинейчатых масс-спектров фрагментации с целью изучения структуры олигонуклеотида.

Считается [5–7], что оптимальной матрицей, обеспечивающей хорошие результаты при режимах съемки спектров как положительно, так и отрицательно заряженных ионов олигонуклеотидов, является 3-гидроксипиколиновая кислота (HPA) в комбинации с такими добавками, как пиколиновая кислота (PA) и цитрат аммония. В ряде работ в качестве матриц успешно применялись 2,4,6-тригидроксиацетофенон (THA), 2-амино-5-нитропиридин (ANP), 2,5-дигидроксибензойная кислота (DHB) [8, 9].

В данной работе проведен масс-спектрометрический анализ гомогенных и гетерогенных 14–42-мерных олигонуклеотидов с целью подбора оптимальной матрицы и оптимальных режимов съемки, позволяющих полностью исключить неконтролируемое разрушение олигонуклеотидов и получить масс-спектры MALDI, содержащие только пики, соответствующие ионам с молекулярными массами соединений, присутствующих в изучаемых препаратах.

Сокращения: MALDI – матрично активированная лазерная десорбция/ионизация; εAde – 1,N⁶-этенoadенин; εA – 1,N⁶-дезоксизеноаденозин; DBU – 1,8-диазабидикло[5.4.0]ундек-7-ен; TEA – триэтиламин. Префикс “d” в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

#Автор для переписки (тел.: (095) 939-35-28; эл. почта: annak@soil.msu.ru).



РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез олигонуклеотидов

Синтетические модифицированные олигонуклеотиды в настоящее время находят все более

широкое применение не только как инструменты для научных исследований, но и как диагностические и терапевтические препараты в медицине. Одним из методов, а иногда и единственным, позволяющим подтвердить структуру и оценить чистоту олигонуклеотидных препаратов, является MALDI-масс-спектрометрия. В нашей работе мы использовали ряд модельных олигонуклеотидов (1)–(3), модифицированный олигонуклеотид, содержащий 3'-(метил-С-фосфонатную) (–P(O)(CH₃)(OH)) группу (4), олигонуклеотид, содержащий модифицированное основание 1,N⁶-этноаденин (5), а также обычные олигонуклеотиды (6)–(21) (таблица). Все олигонуклеотиды были синтезированы на автоматическом синтезаторе ASM102U (Новосибирск). Продукты реакции выделяли при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ. Гомогенность полученных олигонуклеотидов контролировали ионно-обменной ВЭЖХ и гель-электрофорезом.

Получение 3'-фосфорилированного олигонуклеотида (3) осуществляли по методике, предложенной Н.Ф. Кринецкой и соавт. [10], с некоторыми изменениями. Олигонуклеотид (4) синтезирован нами твердофазным амидофосфитным

Олигонуклеотиды, исследованные методом MALDI-масс-спектрометрии

Шифр	Олигодезоксирибонуклеотид (5' → 3')*	Величина [M–H] [–]	
		расчетная	эксперимент.
(1)	TTTTTTTTTTTTTT	4195.8	4197
(2)	TTTTTTTTTTTTTTU	4501.9	4502
(3)	TTTTTTTTTTTTTTp	4275.8	4276
(4)	TTTTTTTTTTTTTTpCH ₃	4273.8	4277
(5)	TTTTTTTTTTTTTεAT	4222.0	4229
(6)	AAAAAAAAAAAAAAAA	4322.0	4321
(7)	TCTTATCTCCACCCACCAGA	5956.0	5962
(8)	CCTGGATGTTGAGCTTCCTA	6098.0	6102
(9)	GCAGTCAGACGTTGCCTATT	6107.0	6116
(10)	GTGGTCTTCTACTTGTGTCAATAC	7323.8	7325
(11)	CAGAACCAGCAGAATCTTTGC	6398.2	6401
(12)	CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT	7198.7	7204
(13)	CAAGTCTTCACTGATCTTC	6017.0	6021
(14)	GCCTGGCGCCATTAAGAA	5820.9	5824
(15)	GTCGACCTGCAAGTTGATTCTGTATG	7991.3	8000
(16)	TAAAGAAAGACCCACCAGTC	6376.2	6377
(17)	ATGAATCGCATGACGTTCCG	6156.1	6163
(18)	CCGCGTCGACTTATTTGTCGATTTCTTC	8775.7	8791
(19)	CCGGAATTCGACCCGTGGTCTACTATCGTTAAGTTGAC	11643.6	11659
(20)	CGCCCAAGCTTTCGACCCGTGGTCTACTATCGTTAAGTTGAC	12815.4	12827
(21)	CGCTTGACATGGCCCTC	5121.4	5117

* Префикс "d" в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

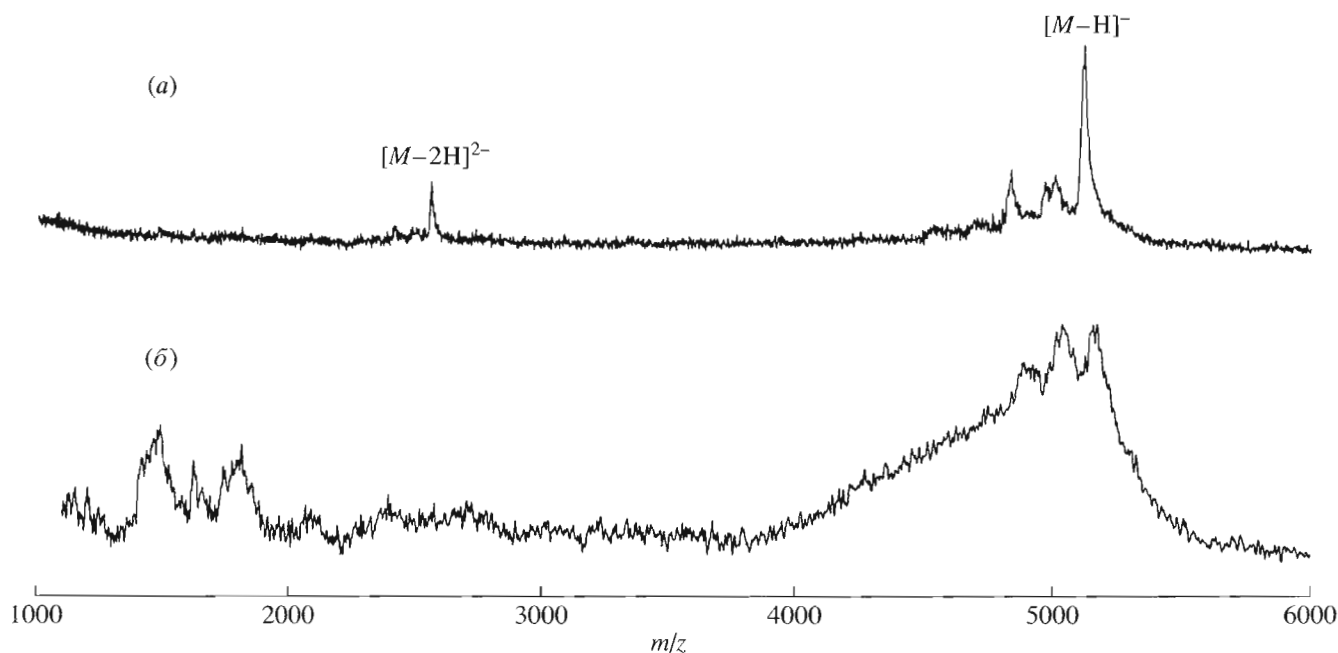


Рис. 1. MALDI-масс-спектры олигонуклеотида CGCTTGACATGGCCCTC (21), полученные при использовании в качестве матрицы THA (а) и DHB (б).

Нами были оценены молекулярные массы ряда олигогетеронуклеотидов (7)–(21) (таблица). Так, например, на рис. 1 приведены масс-спектры отрицательных ионов олигогетеронуклеотида (21) с использованием матриц THA и DHB. При использовании в качестве матрицы THA мы не наблюдали существенной апуринизации олигонуклеотидов (рис. 1а), в то же время при применении матрицы на основе DHB апуринизация имеет место (рис. 1б).

Разработанная методика MALDI-масс-спектрометрии, учитывающая технические возможности прибора Vision 2000 и специально подобранные условия подготовки образца, позволила получать масс-спектры анализируемых препаратов, содержащие преимущественно пики, отвечающие молекулярным массам олигонуклеотидов, присутствующих в препарате. Это важно при контроле качества олигонуклеотидных препаратов. Например, как видно из масс-спектра, представленного на рис. 2а, в препарате олигонуклеотида T_{14} (1) кроме основного вещества (молекулярный пик с m/z 4197) присутствуют примеси T_{13} - и T_{12} -меров, пики молекулярных ионов которых имеют величину m/z 3893 и 3586 соответственно. В области m/z 2000 присутствуют пики двухзарядных ионов этих олигонуклеотидов. Полученные масс-спектрометрические данные хорошо согласуются с данными анализа этого олигонуклеотида ионно-обменной хроматографией (данные не приведены).

Аналогичная ситуация наблюдалась и в масс-спектре олигонуклеотида A_{14} (6) (пик молекуляр-

ного иона с m/z 4321) (данные не приведены). В образце данного олигонуклеотида присутствовали примеси A_{13} - и A_{12} -меров (пики с m/z 4011 и 3695 соответственно), что также было подтверждено хроматографическими данными.

В масс-спектре олигонуклеотида $T_{14}U$ (2) (рис. 2б) пик молекулярного иона смещен по сравнению с пиком молекулярного иона олигонуклеотида T_{14} (1) (рис. 2а) на один уридиновый фрагмент (ионы с m/z 4502 $[T_{14}U]^-$ и 2251 $[T_{14}U]^{2-}$). Пик молекулярного иона с m/z 4276 в масс-спектре олигонуклеотида $T_{14}P$ (3) (рис. 2в) смещен на величину, соответствующую остатку фосфорной кислоты. В качестве примесей препарат $T_{14}P$ содержит олигонуклеотиды T_{14} , $T_{13}P$, T_{13} с m/z 4197, 3968, 3896 соответственно.

Интенсивность пиков как основных, так и многозарядных ионов понижается при переходе от коротких к более длинным олигомерам. Однако точность масс-спектрометрического определения молекулярных масс олигонуклеотидов остается достаточно высокой в диапазоне 4000–13000 и погрешность не превышает 0.1%, что согласуется с литературными данными [16].

Высокая информативность и однозначность получаемой из масс-спектров MALDI информации видны из представленных ниже примеров определения молекулярных масс модифицированных олигонуклеотидов, содержащих 3'-концевую (метил-С-фосфонатную) группу (4) [17, 18] или модифицированное звено – 1, N^6 -дезоксиэтенотенозин (5).

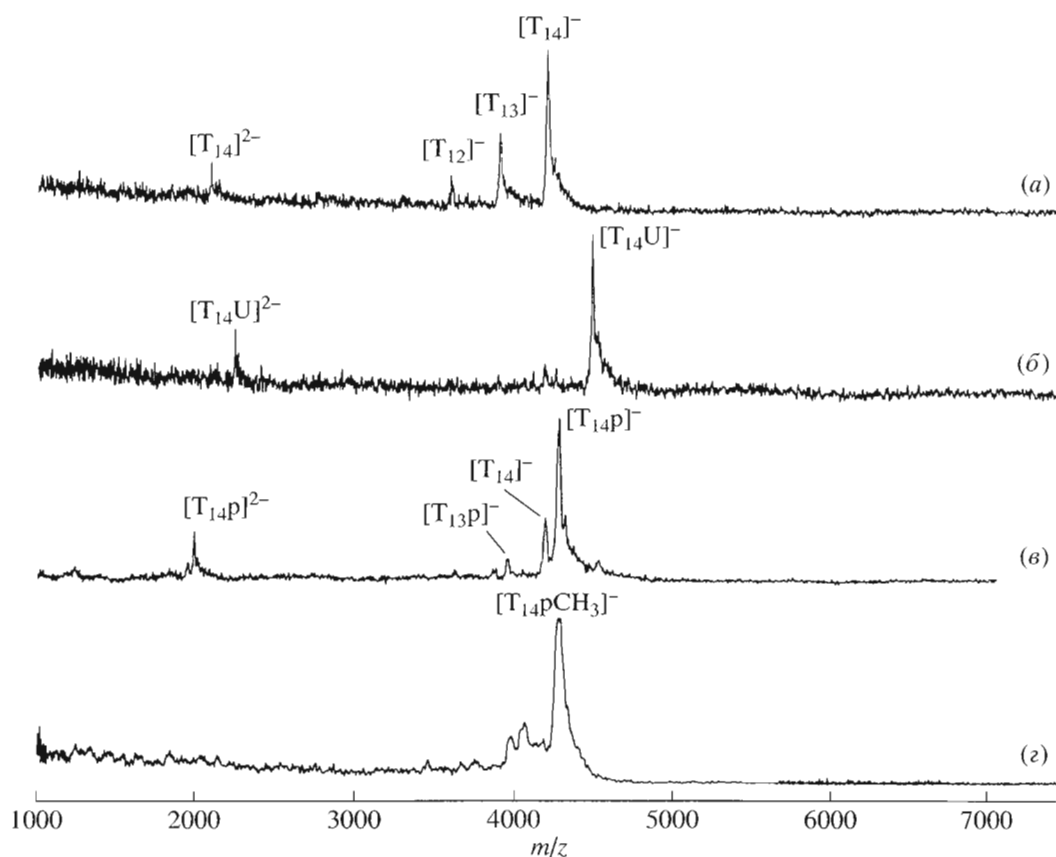


Рис. 2. MALDI-масс-спектры олигонуклеотидов T_{14} (1) (а), $T_{14}U$ (2) (б), $T_{14}P$ (3) (в), $T_{14}PCH_3$ (4) (г), полученные при использовании ТНА-матрицы.

В масс-спектре олигонуклеотида $T_{14}PCH_3$ (4) (рис. 2г) наблюдаются основной пик, соответствующий молекулярному иону с m/z 4277, и минорные пики ионов примесей.

На рис. 3 представлен масс-спектр продуктов, полученных при синтезе олигонуклеотида $T_{12}\epsilon AT$ (5). В спектре, помимо пика молекулярного иона целевого продукта синтеза (m/z 4229), присутствуют пик молекулярного иона олигомера, длина которого на одно тимидиновое звено меньше – $T_{11}\epsilon AT$ (m/z 3923), пики молекулярных ионов T_{13} , T_{12} (m/z 3894 и 3585) и пики молекулярных ионов олигомеров $[T_{12}\epsilon AT - \epsilon Ade]^-$ и $[T_{11}\epsilon AT - \epsilon Ade]^-$ (m/z 4086 и 3776), в которых модифицированное основание – 1, N^6 -этенoadенин – отсутствует. Эти олигомеры являются побочными продуктами синтеза, а их присутствие в препарате однозначно подтверждено пиками молекулярных масс в масс-спектре препарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту, 2,4,6-тригидроксиацетофенон, пиколовую кислоту, 3-гидрокси-пиколовую кислоту

(Fluka Chemicals); 2-амино-5-нитропиридин, метилдихлор-С-фосфонат (Aldrich). 1, N^6 -Дезоксиэтенoadенозин предоставлен сотрудником проблемной научно-исследовательской лаборатории химии ферментов МГУ Ю.В. Хроповым.

ТСХ проводили на пластинках DC-Alufolien, Kieselgel 60 F 254 (Merck) в системах хлороформ–метанол–TEA, 8 : 2 : 0.1 (А), хлороформ–этилацетат–TEA, 45 : 45 : 10 (Б). Обнаружение пятен на хроматограммах осуществляли в УФ-свете и прожиганием.

Колоночную адсорбционную хроматографию осуществляли на силикагеле Kieselgel 60, 0.063–0.2 мм (Merck) в системе (Б).

Олигонуклеотидный синтез осуществляли на автоматическом синтезаторе ASM102U (Новосибирск, Россия). В качестве носителя использовали LCAA-CPG (Cruachem, Великобритания) с иммобилизованными первыми звеньями. Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Unicam (Великобритания). ВЭЖХ на обращенной фазе осуществляли на хроматографе Beckman (США) с использованием колонки Силосорб С18 (4.6 × 250 мм) в системах: линейный градиент концентраций

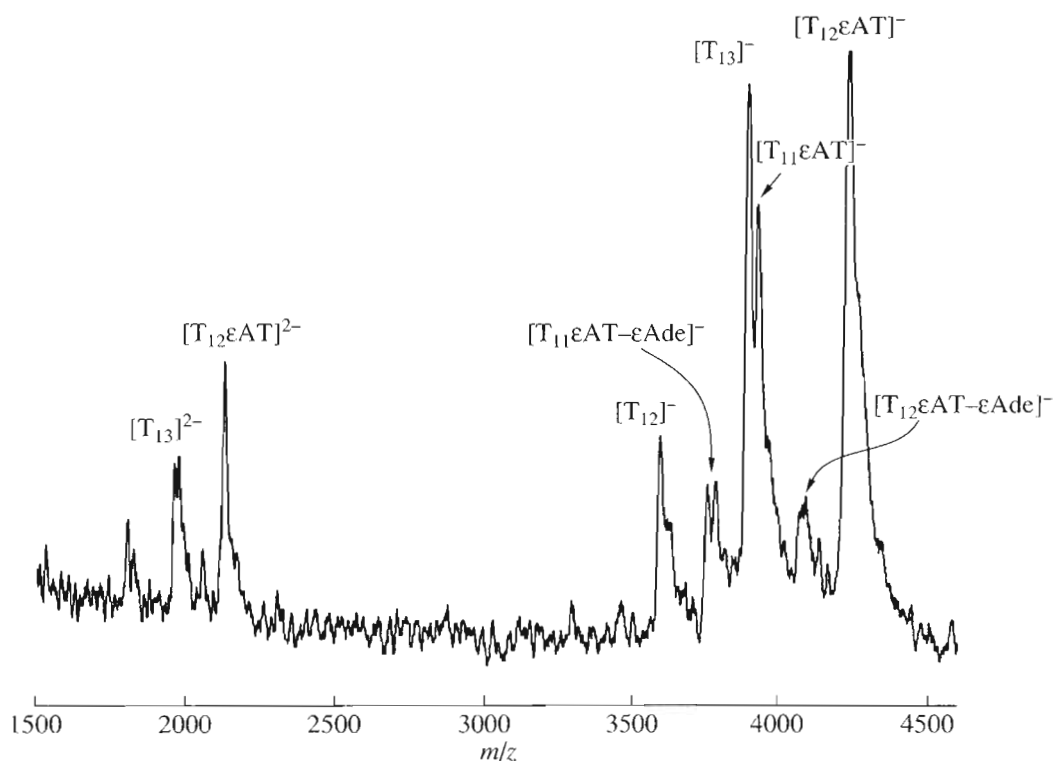


Рис. 3. MALDI-масс-спектр продуктов, полученных при синтезе олигонуклеотида $T_{12}\epsilon AT$ (5) (ТНА-матрица).

ацетонитрила в 0.1 М аммоний-ацетатном буфере (рН 7.5) от 25 до 40% за 20 мин (А); от 5 до 25% за 20 мин (Б).

Спектры ^{31}P -ЯМР записывали на импульсном Фурье-спектрофотометре Bruker MSL-200 (Германия) в $DMSO-d_6$ с рабочей частотой 81 МГц относительно 85% H_3PO_4 как внешнего стандарта (δ 0.000 м. д.) с подавлением и без подавления протонов. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре с времяпролетной базой Vision 2000, Thermo Bioanalysis Corp. (Finnigan, США).

5'-O-(4,4'-Диметокситритил)тимидин-3'-O-метилфосфоимидазолид (II) [10]. К раствору 125.3 мг (1.84 ммоль) имидазола в 400 мкл абс. ацетонитрила добавили 33 мкл (0.36 ммоль) метилдихлор-С-фосфоната, перемешивали в течение 1 ч, за это время выпал белый осадок имидазолидгидрохлорида. Затем при перемешивании к раствору метилфосфоимидазолида добавили раствор 216 мг (0.396 ммоль) 5'-диметокситритилтимидина в 400 мкл абс. тетрагидрофурана. Полноту прохождения реакции контролировали с помощью ТСХ в системе А по исчезновению исходного нуклеозида с R_f 0.74. R_f 0.81 (I). ^{31}P -ЯМР (δ , м. д.): 33.520, 33.730. Реакционную смесь без обработки использовали непосредственно для синтеза модифицированного носителя.

5'-O-[5'-O-(4,4'-Диметокситритил)тимидин-3'-илметилфосфо]-2'-O-ацетилуридин-3'-илсукцинил-LCAA-CPG (III). Носитель (100 мг), 5'-ди-

метокситрилуридин-3'-ацетил-2'-сукцинил-LCAA-CPG (DMTrU-LCAA-CPG) (I) с загрузкой 31 мкмоль/г обработали 2.5% раствором дихлоруксусной кислоты в дихлорметане, промыли метанолом, затем эфиром, высушили в вакууме масляного насоса в течение 5 ч. Тетразол (20 мг, 0.3 ммоль) растворили в 400 мкл реакционной смеси 5'-O-(4,4'-диметокситритил)тимидин-3'-O-метилфосфоимидазолида, полученной как описано выше, добавили к носителю. Перемешивали в течение 4 ч. Затем носитель промыли метанолом, эфиром и высушили в вакууме масляного насоса. Загрузка динуклеотида в DMTrU(CH₃)U-LCAA-CPG (III) составила 8.8 мкмоль/г.

5'-O-(4,4'-Диметокситритил)-2'-дезоксидезокси-1,N⁶-этноаденозин получен по стандартной методике как описано в работе [19].

5'-O-(4,4'-Диметокситритил)-2'-дезоксидезокси-1,N⁶-этноаденозин-3'-O-(N,N-диизопропил)цианоэтилфосфорамидит. К раствору 0.45 г (0.78 ммоль) 5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксидезокси-1,N⁶-этноаденозина в 10 мл абс. ацетонитрила прибавили 0.14 г (0.78 ммоль) тетразолида диизопропиламмония и 0.59 г (1.95 ммоль) бис(диизопропиламино)цианоэтилфосфита. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ в системе Б. По исчезновении исходного вещества к реакционной смеси добавили 1 мл метанола, через 10 мин упарили до состояния масла и растворили в 20 мл этилацетата, содержащего 10% ТЕА. Раствор промыли 10%

раствором бикарбоната натрия. Водный слой экстрагировали смесью этилацетат–ТЕА, 9 : 1. Объединенный органический слой высушили безв. Na_2SO_4 , упарили досуха и переупарили с ацетонитрилом. Остаток вспенили в вакууме масляного насоса. Продукт очищали колоночной хроматографией. Выход 0.50 г (82%).

Синтез олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды синтезировали стандартным твердофазным амидофосфитным методом. Для синтеза олигонуклеотида $\text{T}_{14}\text{p}(\text{CH}_3)\text{U}$ использовали полученный модифицированный носитель. Для синтеза олигонуклеотида T_{14}U использовали носитель DMTrU-LCAA-CPG (Ctuachem).

Олигонуклеотиды T_{14}p (3) и $\text{T}_{14}\text{pCH}_3$ (4). Олигонуклеотид с 3'-концевым уридином (T_{14}U или $\text{T}_{14}\text{p}(\text{CH}_3)\text{U}$ соответственно) растворили в 100 мкл дистиллированной воды, добавили 100 мкл 0.1 М раствора NaIO_4 , реакционную смесь выдерживали в темноте при 60°C в течение 0.5 ч. Затем добавили 20 мкл 1 М раствора маннозы, выдерживали в темноте при 60°C в течение 0.5 ч, после чего добавили 22 мкл 1 М раствора NaOH и снова выдерживали при 60°C в течение 0.5 ч. Затем реакционную смесь разбавили дистиллированной водой до объема 10 мл, пропустили через слой DEAE-сефадекса (~100 мкл). Олигонуклеотид элюировали 200 мкл 3 М LiClO_4 , пересаждали в 1.5 мл охлажденного ацетона. Выделение продуктов реакции осуществляли при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Олигонуклеотид $\text{T}_{12}\text{εAT}$ (5) синтезировали стандартным твердофазным амидофосфитным методом. Удаление защитных групп и отсоединение от носителя проводили, выдерживая носитель с синтезированным олигонуклеотидом в 10% растворе DBU в абс. метаноле в течение 5 сут. Затем метанол упаривали в вакууме, реакционную смесь разводили дистиллированной водой до объема 500 мкл. Выделение целевого олигонуклеотида проводили при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Масс-спектрометрический анализ олигонуклеотидов. 2,5-Дигидроксибензойную кислоту, 3-гидрокси-пиколиновую/пиколиновую кислоты (10 : 1) растворяли в смеси ацетонитрил–вода (7 : 3) из расчета 25 мг на 1 мл растворителя. 2,4,6-Тригидроксиацетофенон и 2-амино-5-нитропиридин растворяли в смеси 0.1 М цитрат аммония–ацетонитрил, 1 : 1 из расчета 15 мг на 1 мл растворителя. Анализируемые олигонуклеотиды растворяли в смеси ацетонитрил–вода, 1 : 1, концентрация растворенных соединений составляла 10^{-5} – 10^{-6} М.

Раствор анализируемого образца смешивали с матричным раствором в молярном соотношении 1 : 1000–1 : 10000. Затем не более 1 мкл смеси наносили на мишень и высушивали на воздухе. Масс-спектры олигонуклеотидов регистрировали в режиме отражения. Образец на мишени облучали N_2 -лазером (λ 337 нм) с длительностью импульса около

9 нс. Для понижения деструктивных свойств лазерного излучения его интенсивность подбиралась соответственно минимуму, при котором образовывались ионы анализируемых веществ. Масс-спектры анализируемых образцов регистрировались как для положительных, так и для отрицательных ионов. Каждый масс-спектр был получен в результате усреднения получаемого ионного сигнала при более чем 50 импульсов лазера. Для калибровки по массам были использованы олигонуклеотиды с известным составом – T_{14} (m/z 4195.8), T_{15} (m/z 4500.0) и T_{23} (m/z 6933.6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang L.-K., Gross M.L. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2000. V. 11. P. 854–865.
2. Spinelli N., Vasseur J.-J., Hayakawa Y., Imbach J.-L. // Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. 2001. V. 20. P. 947–950.
3. Meyer A., Spinelli N., Bres J.-C., Dell'Aquila C., Morvan F., Lefebvre I., Rayner B., Imbach J.-L., Vasseur J.-J. // Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. 2001. V. 20. P. 963–966.
4. Guerlavais T., Meyer A., Debart F., Imbach J.-L., Morvan F., Vasseur J.-J. // Anal. Bioanal. Chem. 2002. V. 374. P. 57–63.
5. Shahgholi M., Garcia B.A., Chiu N.H., Heaney P.J., Tang K. // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. E. 91.
6. Tang K., Allman S.L., Chen C.H. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1993. V. 7. P. 943–948.
7. Zhu Y.F., Chung C.N., Taranenko N.I., Allman S.L., Martin S.A., Hoff L., Chen C.H. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1996. V. 10. P. 383–388.
8. Roskey M.T., Juhasz P., Smirnov I.P., Takach E.J., Martin S.A., Hoff L.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochemistry. 1996. V. 93. P. 4724–4729.
9. Kong Y., Zhu Y., Zhang J.Y. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001. V. 15. P. 57–64.
10. Krynetskaya N.F., Zayakina G.V., Oretskaya T.S., Volkov E.M., Shabarova Z.A. // Nucleosides Nucleotides. 1986. V. 5. P. 33–43.
11. Miller P., Reddy M., Muracami A., Blake K., Lin S., Agris C. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 5092–5097.
12. Kochetkov N.K., Shibaev V.N., Kost A.A. // Tetrahedron Lett. 1971. № 22. P. 1993.
13. Leonard N.J. // CRC Crit. Rev. Biochem. 1984. V. 15. P. 125–199.
14. Невинский Г.А., Денисов А.Ю. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. С. 1693–1700.
15. Leonard A., McAuley-Hecht E., Gibson J., Brown T., Watson P., Hunter N. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 4755–4761.
16. Crain P.F., McCloskey J.A. // Curr. Opinion in Biotechnology. 1998. V. 9. P. 25–34.
17. Козлова А.Ю., Тумов М.И., Есупова О.В., Есупов Д.С. // Сб. мат-лов Школы-конференции "Горизонты физико-химической биологии". Пушкино, 2000. Т. 1. С. 87–88.
18. Arzumanov A.A., Victorova L.S., Jasko M.V., Yesipov D.S., Krayevsky A.A. // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 1276–1281.
19. Gait M.J. // Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach. N. Y.: IRL Press Ltd., 1984. P. 28–29.

Determination of Oligonucleotide Molecular Masses by MALDI Mass Spectrometry

A. V. Streletskii*, A. Yu. Kozlova**#, D. S. Esipov**, A. L. Kayushin*,
M. D. Korosteleva*, and S. E. Esipov*

Phone: + 7 (095) 939-3528; e-mail: annak@soil.msu.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Chair of Bioorganic Chemistry, Biological Faculty, Moscow State University,
Vorob'evy gory 1, Moscow, 119992 Russia

MALDI mass spectrometry (MS) of 14- to 42-mer homogeneous oligonucleotides and their mixtures was carried out using a Vision 2000 instrument (Thermo BioAnalysis, Finnigan, United States). Conditions for the determination of oligonucleotide molecular masses were optimized by applying various matrices and operation modes. The most reproducible results with minimal uncontrolled decomposition of the oligonucleotides including their apurination during the MALDI MS registration were obtained using 2,4,6-trihydroxyacetophenone as a matrix instead of 3-hydroxypicolinic acid, usually employed in the mass spectrometry of oligonucleotides. Our approach allows the determination of molecular masses of oligonucleotides obtained by chemical synthesis and the evaluation of their component composition and purity. It was applied to the mass spectrometric analysis of oligonucleotides containing a 3'-(methyl-C-phosphonate) group or a modified 1,*N*⁶-ethenodeoxyadenosine unit. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: MALDI mass spectrometry, modified oligonucleotides, oligonucleotides