

生物惰性液相色谱分析环状 RNA 纯度

LC-439

摘要： 本文使用生物惰性液相色谱仪分析环状 RNA 样品，采用反相离子对色谱法使主成分与杂质的分离度大于 1.5，实现基线分离。环状 RNA 样品重复分析 6 次，保留时间 RSD 小于 0.07%，峰面积 RSD 小于 2%，重复性佳。此方法适用于环状 RNA 样品的纯度分析。

关键词： 生物惰性液相色谱 环状 RNA 分离度 重复性

技术特点：

- ❖ 环状 RNA 与非环状 RNA 杂质实现基线分离，且重复性佳。
- ❖ 使用惰性液相色谱仪和生物惰性色谱柱，环状 RNA 样品在系统中无残留。

在 mRNA 疗法中，线性 mRNA 是首选，但它的缺点也很明显，必须在合成时进行大量修饰，以抵抗细胞内核酸酶的降解以及避免引起先天性免疫刺激。即便如此，修饰后的线性 mRNA 的半衰期仍然较短，这大大限制了其翻译后的治疗性蛋白产量。不同于线性 mRNA，环状 RNA (circRNA) 的共价闭合环状结构可以保护自身免受核酸酶的降解，从而具有更好的

稳定性和更长的寿命，易于产生更高水平蛋白。

环状 RNA 制剂的免疫原性和蛋白质表达稳定性依赖于纯度，未成环的线性 RNA 前体、nicked RNA 等杂质会导致细胞免疫反应，所以需要将环状 RNA 与其杂质分离，测定环状 RNA 的纯度。本文采用反相离子对方法分离环状 RNA 及其杂质，分离度高，重复性佳。

实验部分

1.1 仪器

生物惰性超高效液相色谱仪 Nexera XS inert，具体配置信息如下：

系统控制器：	CBM-40	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40D XSi×2	自动进样器：	SIL-40C XSi
柱温箱：	CTO-40C	检测器：	SPD-M40
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114		

1.2 分析条件

色谱柱：	Shim-pack Scepter Claris C18-300 (100×2.1 mm I.D., 1.9 μm) 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-31209-02		
流动相：	A 相 -100 mM TEAA 水溶液 (pH=7.0)，B 相 -A 相 : 乙腈 =4:1 (v/v)		
进样体积：	1 μL	流速：	0.3 mL/min
柱温：	50°C	波长：	260 nm
洗脱方式：	梯度洗脱，B 相初始浓度为 50%，时间程序见表 1。		

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
15.00	Pumps	Pump B Conc.	65
15.01	Pumps	Pump B Conc.	50
20	Control	Stop	

备注：100 mM TEAA 水溶液 (pH=7.0) 配制方法：准确称取 10.1 g 三乙胺和 6.0 g 乙酸，使用超纯水定容至 1000 mL，然后采用乙酸调节 pH 值至 7.0。

1.3 样品前处理方法

采用无酶水将样品稀释至 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

■ 结果与讨论

2.1 环状 RNA 样品色谱图及分离度结果

采用反相离子对色谱法分离环状 RNA 及其杂质，两峰分离度为 2.47，其中环状 RNA 的纯度为 64.57%。分析空白样品，无残留，具体如图 1 所示。岛津生物惰性液相色谱仪与生物惰性色谱柱，整个分析流路为惰性材质，可有效抑制环状 RNA 在不锈钢材质中的非特异性吸附，消除残留。

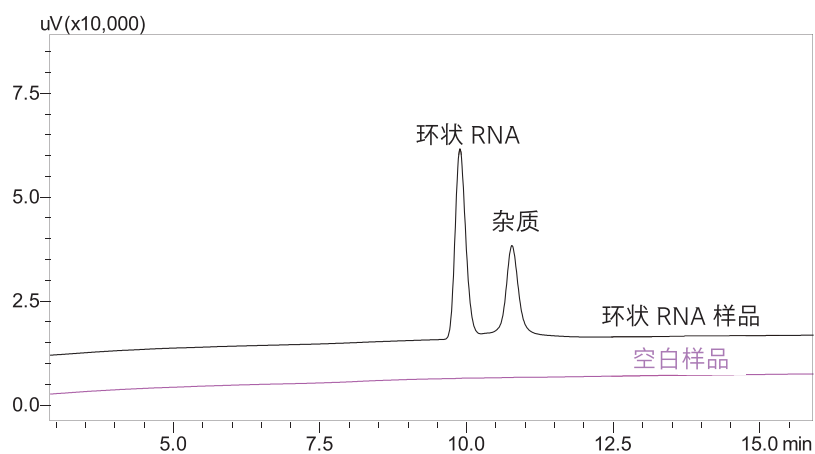


图 1 环状 RNA 样品和空白溶液色谱图

2.2 重复性实验结果

将样品重复分析 6 次，考察方法精密度。6 次重复分析得到保留时间 RSD 小于 0.07%，峰面积 RSD 小于 2%，重复性佳。

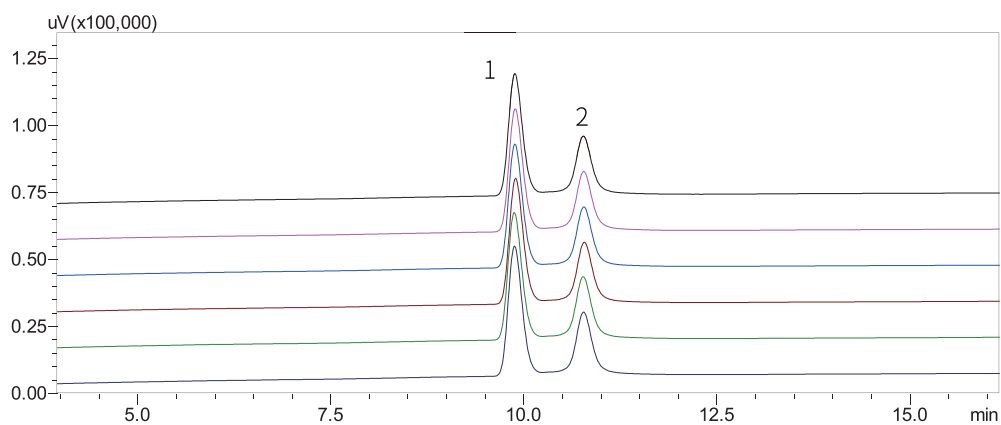


图 2 环状 RNA 样品重复分析色谱图比较 (n=6)

表 2 环状 RNA 样品重复性实验结果 (n=6)

峰号	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1	0.068	1.57
2	0.051	1.71

■ 结论

本文使用生物惰性液相色谱仪结合生物惰性色谱柱分析环状 RNA 样品，采用反相离子对色谱法使环状 RNA 主成分和非环状 RNA 杂质的分离度大于 1.5。样品重复性分析 6 次，保留时间和峰面积重复性结果均佳。此方法适用于环状 RNA 的纯度分析。

岛津应用云

