

LCMS-QTOF 用于 mRNA 药物加帽的分析

LCMS-QTOF-054

摘要： 本文使用岛津 LCMS-QTOF 联用系统，建立了一种 mRNA 药物加帽分析的方法。在高温条件下，使用聚合物基质反相色谱柱对 5'-加帽序列，生物素标记探针等进行分离，并通过 LCMS-9050 四极杆飞行时间质谱对色谱峰进行鉴定。在 260 nm 下计算各色谱峰的峰面积，单点外标法定量。该方法可用于 mRNA 药物加帽率的研究。

关键词： mRNA 加帽 反相色谱 高分辨质谱 Q-TOF

技术特点：

- ❖ 无需放射性标记，使用 LCMS-Q-TOF 技术对 mRNA 加帽工艺进行研究。
- ❖ LabSolutions Insight 软件配备解卷积功能，适合核酸、蛋白等大分子测定。

真核生物的 mRNA 转录后，在 5' 端生成 N7-甲基化的鸟苷三磷酸 (m7GpppG) 帽子结构，增强了 mRNA 稳定性，避免 mRNA 被核酸外切酶降解；同时帽子结构是翻译起始因子 eIF4E 识别位点，具有重要生理意义。mRNA 药物一般以 DNA 为模板，经体外转录 (IVT) 制备。加帽工艺一般有两种：第一种称为“转录后加帽”工艺，运用复合酶体系，经四步反应，在 mRNA 依次生成 5' 端鸟苷三磷酸 (GpppG, G Cap), N7-甲基化的鸟苷三磷酸 (m7GpppG, Cap0) 和核糖 2 位羟基甲基化 (m7GpppmG, Cap1)；第二种称为“共转录”加帽，即在 IVT 时，RNA 聚合酶将 m7GpppG 加入 mRNA 中，替换原有的 GTP。然而加帽过程可能产生加帽不完全，或反向序列帽子等杂质，

影响原料药的质量及稳定性。

传统的 5' 帽子结构研究采用外切酶水解，经聚丙烯酰胺 PAGE 凝胶电泳或离子色谱法检测 P³² 标记的 5'-帽子。本文采用 LCMS-Q-TOF 等技术对加帽效率进行研究，无需放射性标记，更适合治疗用的 mRNA 药物。

本文对比了“转录后加帽”、“共转录”两种加帽工艺，并以合成对照品为对照，进行单点外标定量。Cap 和 uncapped 片段，生物素标记探针以及 mRNA 片段经反相色谱分离，LCMS-9050 采集质谱数据，经 LabSolutions Insight 软件解卷积分析，实现了对 5' 加帽产物的识别与加帽率研究。该分析条件稳定，可靠，供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 - 四极杆飞行时间质谱仪，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-40	自动进样器：	SIL-40C X3
输液泵：	LC-40B X3	柱温箱：	CTO-40S
PDA 检测器：	SPD-M40	质谱：	LCMS-9050

1.2 分析条件

色谱条件

色谱柱：SHIMSEN Ankylo C18-300S, 100 mm×2.1 mm I.D., 3 μm
(P/N:380-01202-73)，岛津（上海）实验器材有限公司

洗脱液：A: 200 mM HFIP+8.3 mM TEA 水溶液 B: A 相 / MEOH=1:2

流速：0.25 mL/min 提取波长：260 nm

进样体积：5 μL 柱温：55°C

洗针模式：R0,R3 均为甲醇 / 乙腈 / 异丙醇 / 水 (1:1:1:1, 加 1%FA)

洗脱方式：梯度洗脱，起始为 20% B 相，见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
10.00	Pumps	Pump B Conc.	70
17.00	Pumps	Pump B Conc.	95
20.00	Pumps	Pump B Conc.	95
21.00	Pumps	Pump B Conc.	20
25.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式 : ESI-	加热模块温度 : 400°C
雾化气流速 : 3.0 L/min	干燥气流速 : 10.0 L/min
加热气流速 : 10.0 L/min	扫描模式 : MS scan, m/z 500-5000
接口温度 : 300°C	接口电压 : 4.5 kV
DL 温度 : 250°C	事件时间 : 0.6 s

1.3 供试品的制备

供试品溶液: 参考 Beverly 等 (2016)^[1] 的文献, 为了保证体外转录的 mRNA 的稳定性, mRNA 需要进行 5' 端加帽, 加帽工艺有两种: 1、经过多种复合酶作用, 依次生成 G cap, Cap0 和 Cap1 的帽子结构 (如图 1), 409 样品为此方式获得; 2、采用“共转录”方式, 在 5' 端加入 m7GpppG 替代 GTP, 再获得 Cap0 结构, 391 样品为此方式构建。为了采用 MS 对加帽核苷酸进行分析, 通常采用酶切的方式获得 5' 端寡核苷酸序列, 具体操作流程参考图 2, 生物素标记的探针与 mRNA 共同退火, 获得引物标记的序列, 经免疫磁珠捕获, RNase H 酶解, 获得含帽子寡核苷酸序列, 经纯化得到上机溶液。具体样品信息如下表 2 所示

表 2 样品信息

样品	浓度	平均分子量 Da	备注
AGG-38nt Cap	5μM	12515.8	uncapped U 对照
Cap probe	5μM	9762.5	
391-S1	/	391k	酶解未纯化
391-S2	/	391k	磁珠纯化
409-S1	/	409k	酶解未纯化
409-S2	/	409k	磁珠纯化
uncapped	/	12825.6	
Gcap	/	13089.8	
Cap0	/	13104.8	
Cap1	/	13119.2	

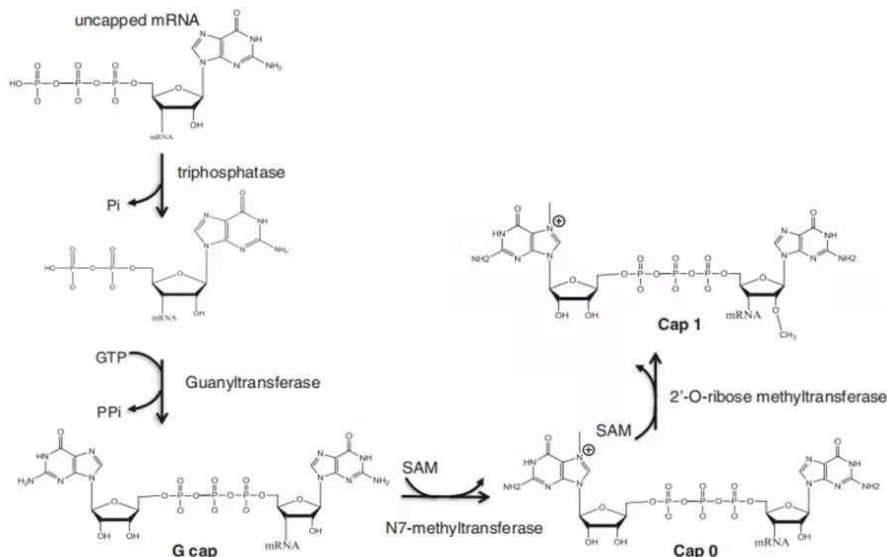


图 1 mRNA 体外转录后酶促加帽途径

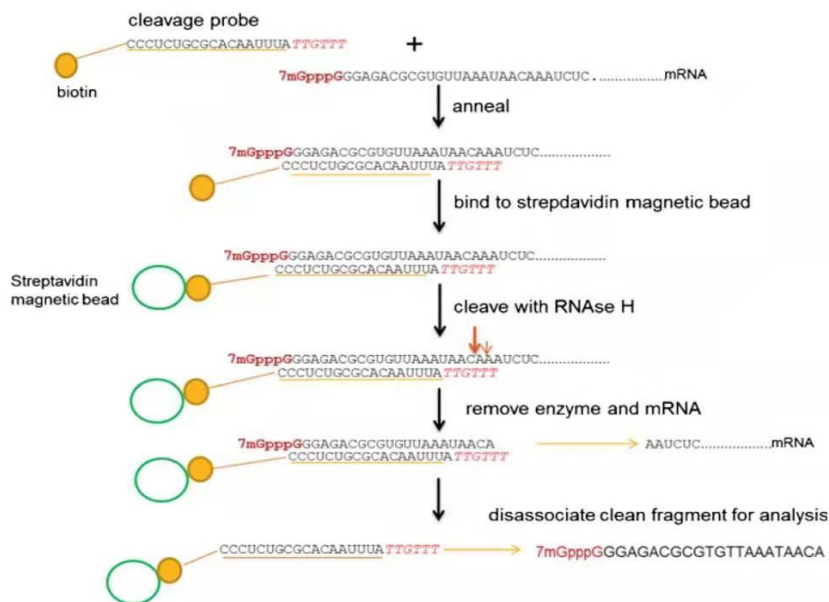


图 2 mRNA 5' 帽子酶切前处理 (序列仅供参考)

■ 结果与讨论

2.1 AGG-38nt Cap 及 Cap probe 对照品分离及鉴定结果

AGG-38nt Cap 是化学合成的帽子结构，AGG-38nt Cap 保留时间为 3.8 min，如图 3 所示。MS 数据经 LabSolutions Insight 分析，可以观察到 $[M-4H]^{4+}$ 的 m/z 3128， $[M-5H]^{5+}$ 的 m/z 2502... $[M-14H]^{14+}$ 的 m/z 892 等，经 LabSolutions Insight 解卷积算法计算，平均质荷比 $[M-H]^-$ 为 12515，与理论值吻合。

Cap probe 是 3' 端带有生物素标记的探针序列，与 AGG-38nt Cap 序列互补，其 5' 端以 TTGTTT- 起始，可特异性结合 RNase H。Cap probe 出峰时间 4.8 min，经 MS 确认， $[M-3H]^{3+}$ 的 m/z 3253， $[M-4H]^{4+}$ 的 m/z 2439... $[M-12H]^{12+}$ 的 m/z 812 等，如图 4 所示，经过解卷积分析，平均质荷比 $[M-H]^-$ 为 9762。

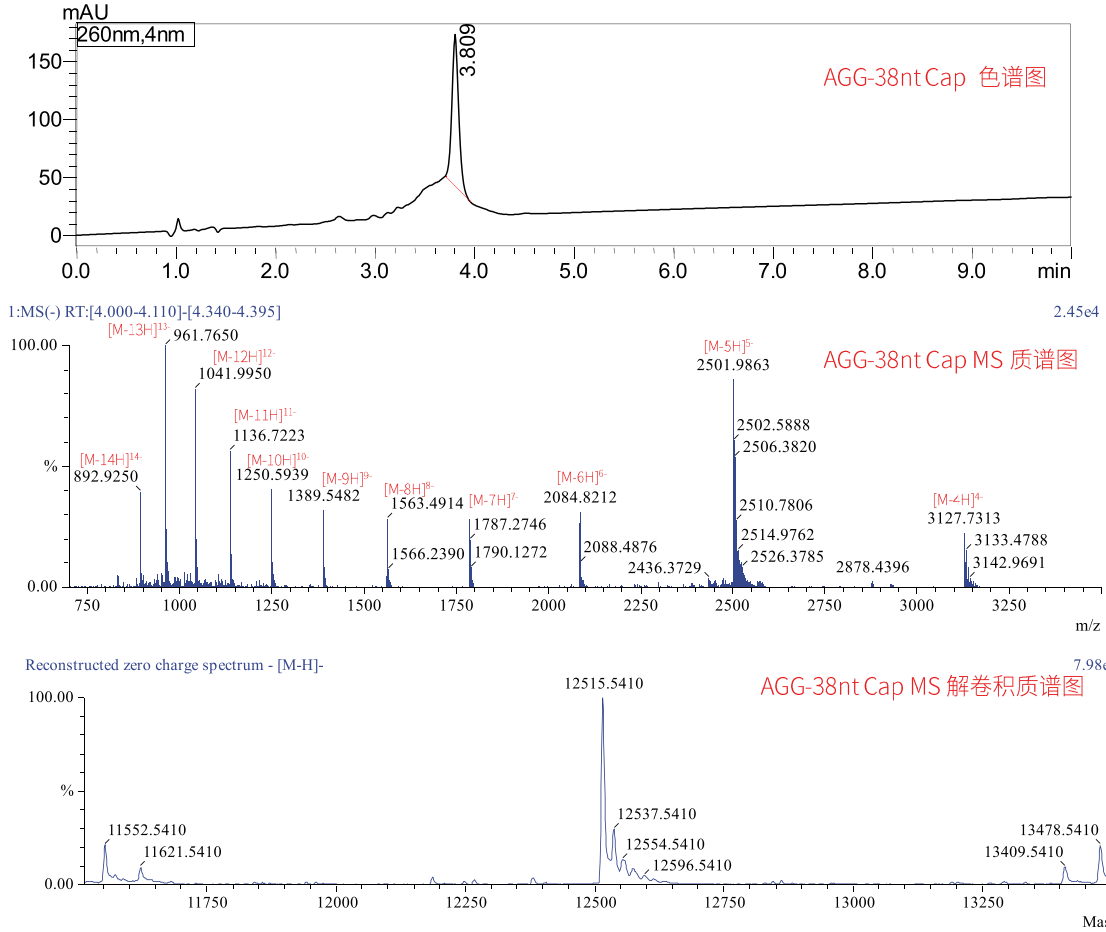
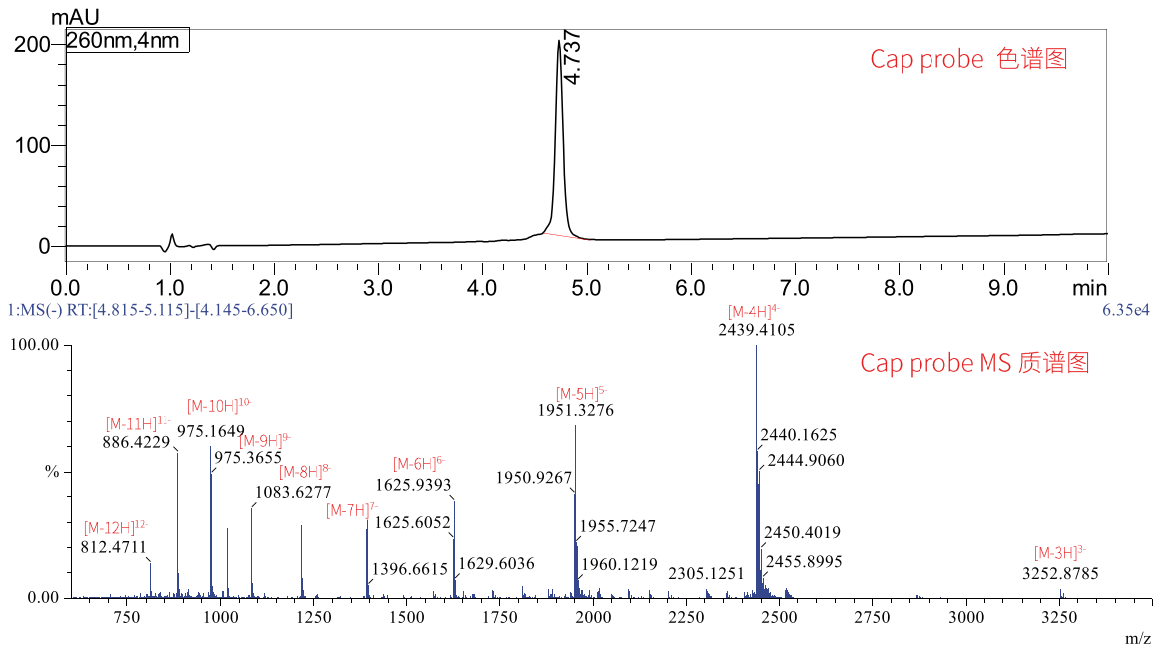


图3 AGG-38nt Cap 色谱图及质谱解卷积结果



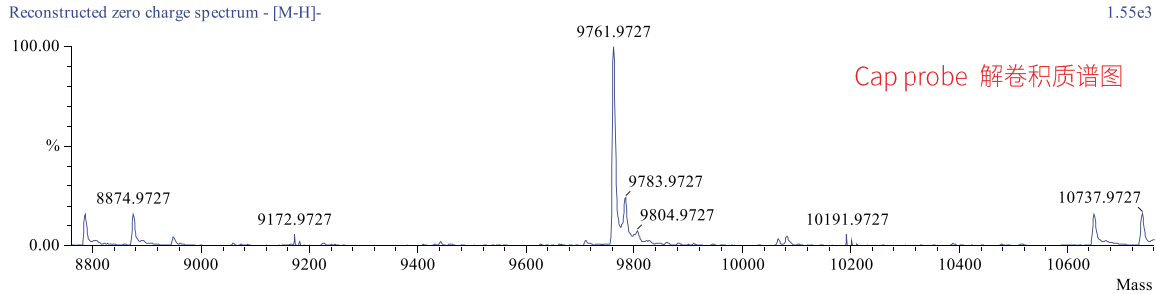


图4 Cap probe 色谱图及质谱解卷积结果

2.2 391 样品结果解析

391-s1 未纯化，因此色谱图上能看到较大的 mRNA 残余峰，而 391-s2 经过链霉亲和素 (SAV) 磁珠纯化，除去了蛋白及 mRNA 长序列片段，色谱图及解卷积结果如图 5 所示。391-s2 RT=3.8 min 的色谱峰经 MS 分析，可以观察到 $[M-5H]^{5-}$ 的 m/z 2623, $[M-6H]^{6-}$ 的 m/z 2185, ... $[M-12H]^{12-}$ 的 m/z 1092 等，如图 5 所示，经过解卷积分析，平均质荷比 $[M-H]^{-}$ 为 13121，与理论值相当，RT=3.8 min 色谱峰均为 Cap1 结构。IVT 制备的 mRNA，其尿嘧啶 (U) 被甲基-假尿嘧啶取代，所以，Cap1 与对照品 AGG-38nt Cap 结构类似，色谱保留时间一致，但质荷比不同。RT=4.7 min 色谱峰经质谱确认，为 Cap probe。

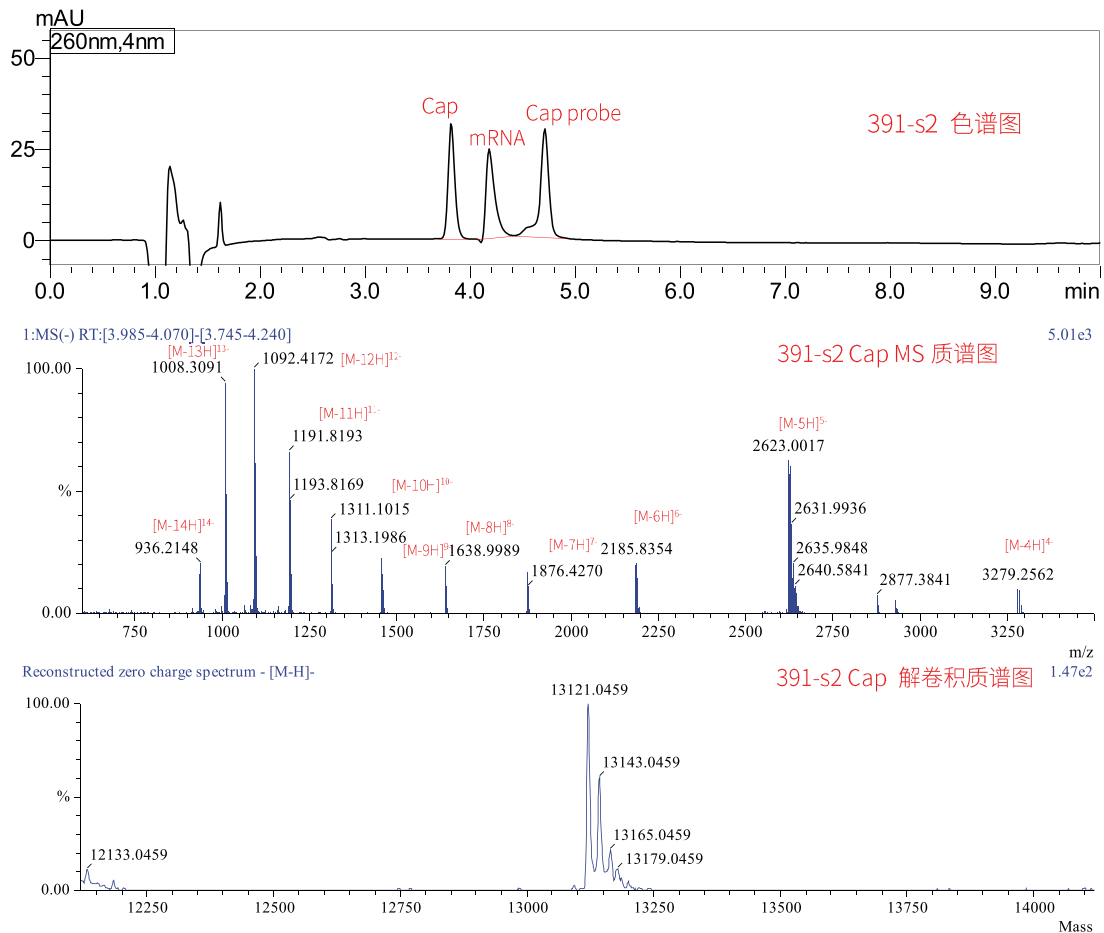


图5 391-s2 的色谱图及质谱解卷积结果

图 5 中 RT=4.18 min 色谱峰，经质谱分析，在 m/z 750-2000 范围内有微弱的一簇信号，如下图 6，推测为长序列 mRNA 片段，由于 ESI 模式的电荷分散效应，质谱信号极弱，无法解卷积。391-s2 经过 SAV 纯化，除去了 mRNA 大片段及酶，因此，391-s2 中 RT=4.18 min 峰面积为 140174，仅为 391-s1 中 RT= 4.18 min 的峰面积的 2.8%。

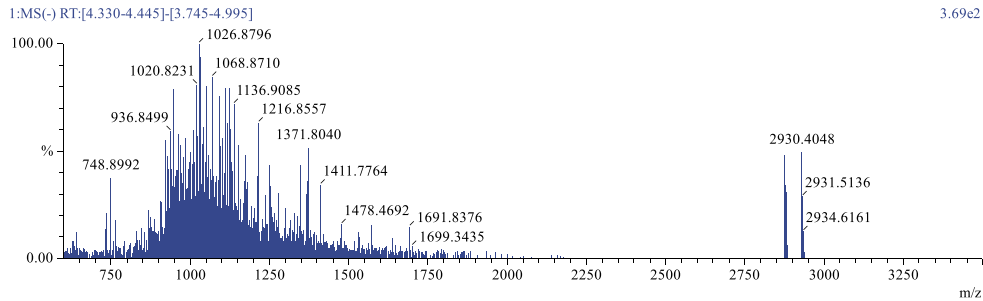


图 6 RT=4.18 min 的质谱图

2.3 409 样品结果解析

409-s1、409-s2 中 RT=3.8 min 的峰经 MS 分析，可以观察到 $[M-5H]^{5-}$ 的 m/z 2608, $[M-7H]^{7-}$ 的 m/z 1863, 经解卷积分析，质荷比 $[M-H]^{-}$ 为 13049, 与理论值吻合，为 Cap1 结构。4.7 min 色谱峰经质谱确认，为 Cap probe; RT=4.2 min 色谱峰经质谱确认，推测为 mRNA 长序列片段。

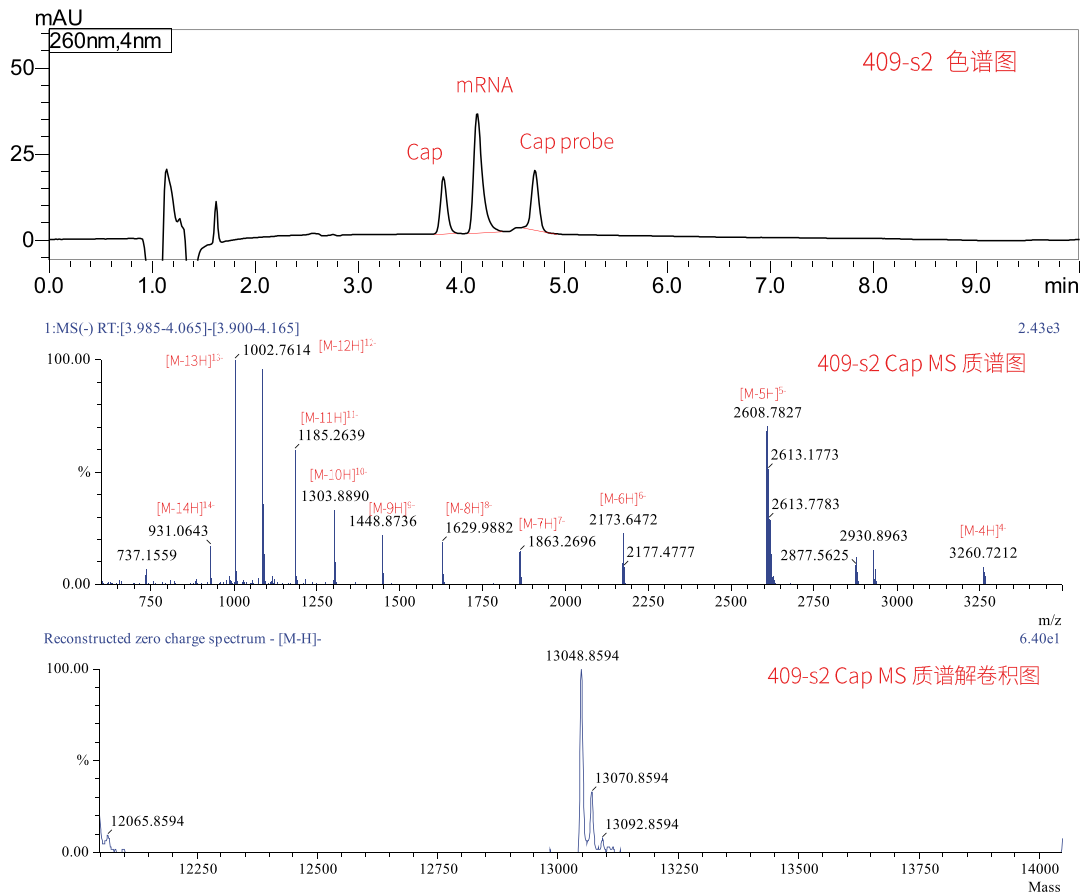


图 7 409-s2 的的质谱图

2.4 Cap1 浓度分析

根据质谱定性结果，391 和 409 样品中 RT=3.8 min 峰均为 Cap1 结构，没有其他类似结构共流出。因此，以 AGG-38nt Cap 为对照品，根据紫外色谱峰面积，单点法计算各样品中 Cap1 的浓度，结果如下表 3 所示。s2 浓度均高于 s1，这表明磁珠纯化可以获得较高浓度的 Cap1，有利于色谱分离与检测；此外，391-s2 和 409-s2 浓度分别为 1.53 μM 、1.72 μM ，表明两种工艺加帽效率相当。对照品及样品对比色谱图如图 8 所示。

表 3 样品中 Cap1 浓度

峰名称	保留时间	峰面积	稀释倍数	浓度 μM
AGG-38nt Cap	2.91	717439	1	5
391-s1	2.85	39957	3.5	0.97
391-s2	2.93	62794	3.5	1.53
409-s1	2.97	11575	3.5	0.28
409-s2	2.95	70627	3.5	1.72

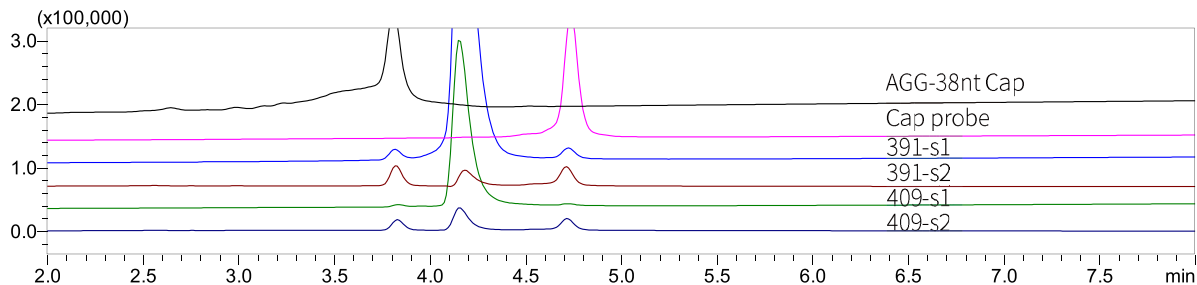


图 8 对照品及样品色谱图 (260 nm)

结论

基于岛津 LCMS-QTOF 联用系统，建立了一种 mRNA 加帽的质谱分析方法。核酸电负性强，本方法采用三乙胺离子对试剂，实现在反相模式分离，流动相中添加六氟异丙醇，促进了核酸在负模式下的电离，对酶解后的 mRNA 片段进行分离和检测，并分别采用紫外和质谱的数据进行了色谱定性和质谱多电荷解卷积分析，两种工艺的加帽样品均能准确定性 Cap1、Cap probe，以合成的 AGG-38nt-Cap 为标准，单点外标法计算 Cap1 含量，391-s2 和 409-s2 中 Cap1 浓度分别为 1.53 μM 、1.72 μM ，表明两种工艺加帽效率相当。该方法可用于 mRNA 加帽效率评估，也可供寡核苷酸质量控制提供参考。

参考标准：

[1] Beverly M, Dell A, Parmar P, et al. Label-free analysis of mRNA capping efficiency using RNase H probes and LC-MS[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(18):5021-5030. DOI:10.1007/s00216-016-9605-x.

岛津应用云

