

使用四极杆飞行时间质谱仪分析 mRNA 5' 帽结构

01-00733-CN

Junna Nakazono

特点描述

- ◆ LCMS-9050 四极杆飞行时间质谱仪和 LabSolutions Insight™ Biologics 分析软件能够表征 mRNA 的 5' 帽结构。
- ◆ 该软件能够简单地确认核酸及其杂质的片段覆盖率。
- ◆ 该软件能够分析用户设置的修饰和杂质。

■ 引言

由于其在 COVID-19 疫苗中的功效，mRNA 的新药发现模式受到越来越多的关注，并且预计其在疫苗和其他药物中的应用将增长。目前获得授权的 mRNA 疫苗使用体外转录合成，在 5' 端添加了 Cap-1 结构 (m7GpppRm-)。这种修饰有助于识别 mRNA、提高翻译效率和在细胞中保持 mRNA 稳定性，使得 5' 帽结构分析成为 mRNA 质量控制的重要因素。

本应用新闻介绍了使用 LCMS-9050 四极杆飞行时间质谱仪和 LabSolutions Insight Biologics 分析软件对 mRNA 5' 帽结构的研究。

■ 样品

鉴于 mRNA 是一种大分子，LC/MS 分析通常通过分析裂解酶反应产生的片段来完成。本研究中的模型样品由使用质粒 DNA 作为模板通过体外转录获得的具有 36 个碱基的 Cap-1 结构 mRNA (Cap-1 基团) 组成。5' 帽修饰的未反应 RNA (pppR-) 也作为杂质提供用于分析。

■ 分析条件

使用 Nexera™ XS inert 和 LCMS-9050 系统在数据相关采集 (DDA) 模式下进行分析。分析条件如表 1 所示。

表 1 分析条件

UHPLC (Nexera XS inert)

色谱柱:	Shim-pack Scepter™ Claris C18-120* (150 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm)
流动相 A:	95 mM HFIP、5 mM DIPEA - 水
流动相 B:	70 mM HFIP、5 mM DIPEA、65% 乙腈 - 水
梯度程序:	B 浓度 5% (0-2 min) - 25% (22 min) - 90% (23-24 min) - 5% (24.1-30 min)
流速:	0.3 mL/min
柱温:	60°C
进样量:	5 μL

MS (LCMS-9050)

离子化:	ESI 负
型号:	MS m/z 550-2500, MS/MS (DDA) m/z 100-2500
雾化气流量:	3.0 L/min
干燥气流量:	10.0 L/min
加热气流量:	10.0 L/min
接口温度:	250°C
DL 温度:	250°C
加热模块温度:	400°C

■ 设置分析参数

LabSolutions Insight Biologics 软件用于分析核酸及其杂质。首先，用户使用软件的核碱基、接头、核糖和修饰预设，在参数配置窗口中创建核酸序列。根据需要，可以在每个选项卡中添加和删除核碱基、接头、核糖和碱基修饰。一旦输入序列，软件就会显示分子式、单同位素质量和结构式 (图 1)。

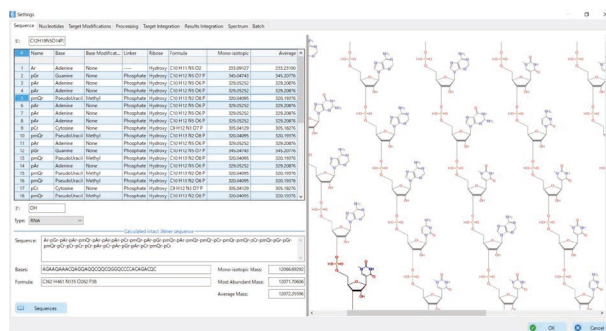


图 1 参数配置窗口

“目标修饰”选项卡也用于选择预期的杂质。除杂质，如不同的链长、缺失的核碱基、脱嘌呤/脱嘧啶、脱氨基和保护基团，以及加合离子和未知的修饰基团外，该软件还可以检索用户添加的分子变化。为了能够在本研究中检测作为杂质的 5' 帽修饰的未反应基团，添加了“5' 未加帽”作为目标修饰 (图 2)。

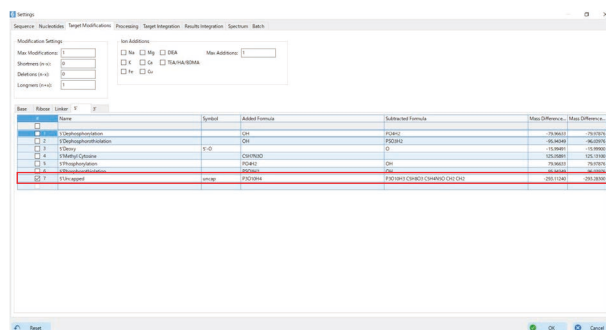


图 2 设置目标修饰

■ 确定 Cap-1 和未反应基团

图 3 显示了通过将 Cap-1 基团和未反应基团各 0.5 μg 混合而获得的分析样品的组分色谱图。质谱图显示为组分色谱图，基于 MS1 谱图，并将不同电荷态和同位素的信号相结合。图 4 显示了多电荷分析的结果。还检测到了金属加合物。

此外，在 Cap-1 基团和未反应基团中检测到具有额外胞苷 (C) 的长序列 (N+1 基团)，比例分别为 6.6% 和 7.9% (图 5)。这些基团被推定为体外转录产生的次级反应产物。

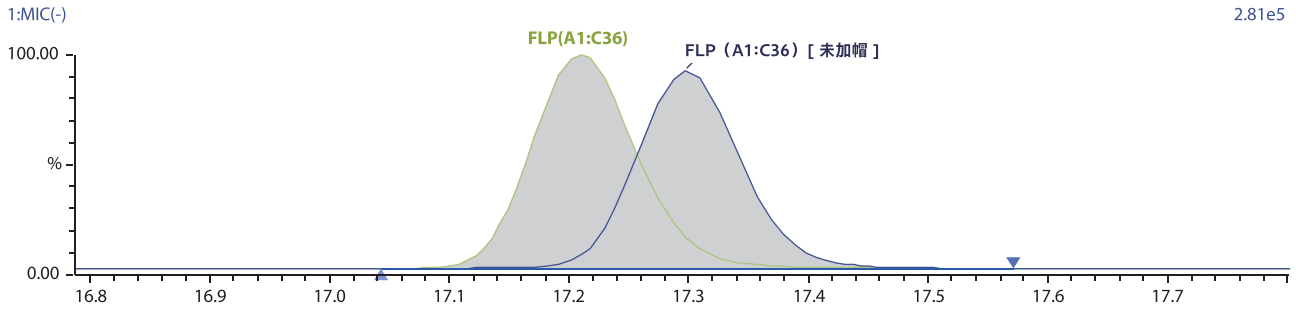


图 3 Cap-1 基团和未反应基团混合物的组分色谱图
FLP (A1:C36) 表示 Cap-1 基团, FLP (A1:C36) [未加帽] 表示未反应的基团。

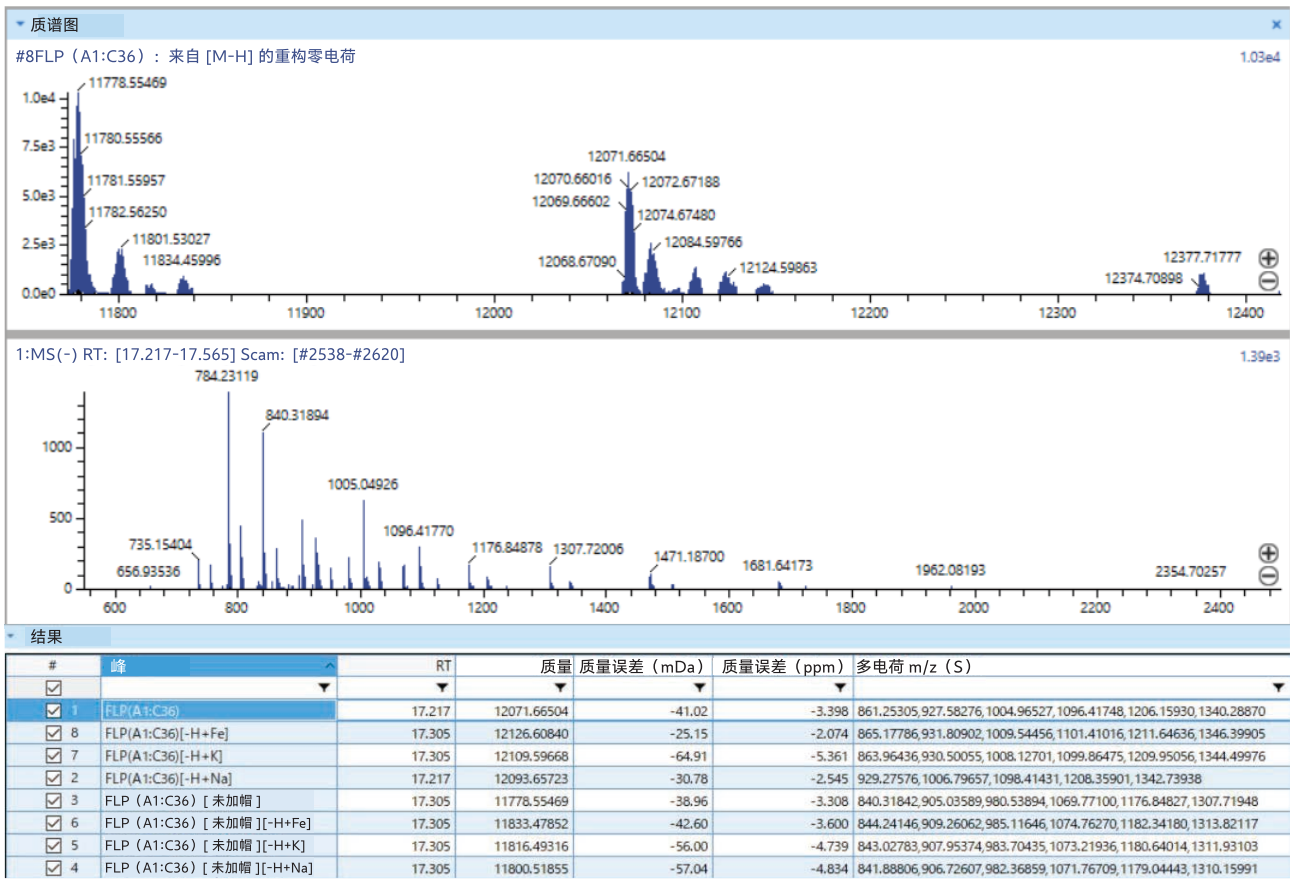


图 4 多电荷分析结果
上图: 去卷积质谱; 中图: 质谱; 下图: 识别结果

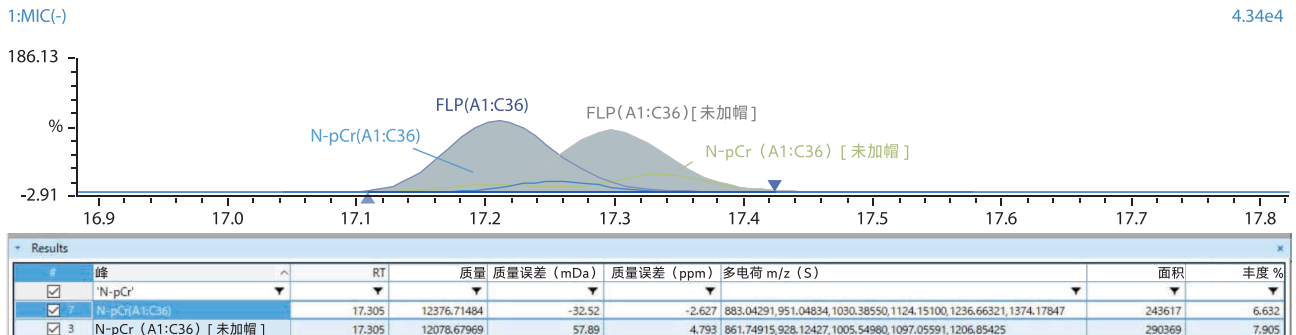


图 5 Cap-1 基团和未反应基团混合物中 N+1 基团识别的结果
N-pCr (A1:C36) 和 N-pCr (A1:C36) [未加帽] 分别表示 Cap-1 基团和未反应基团的 N+1 基团。

■ 序列识别

图 6 显示了基于 MS/MS 谱中碎片离子信息的未反应基团中序列覆盖的结果。在识别所选目标修饰后，修饰的位置以红色显示。

未反应基团中 N+1 基团的鉴别也揭示了特征碎片离子，包括 3' 侧 C 加成 (图 7)。检测到不同的链长用红色倒三角形表示。

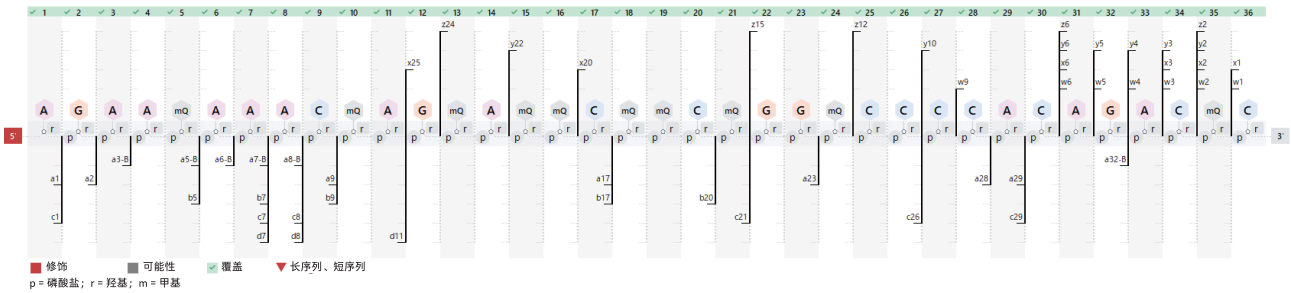


图 6 未反应基团的序列覆盖结果

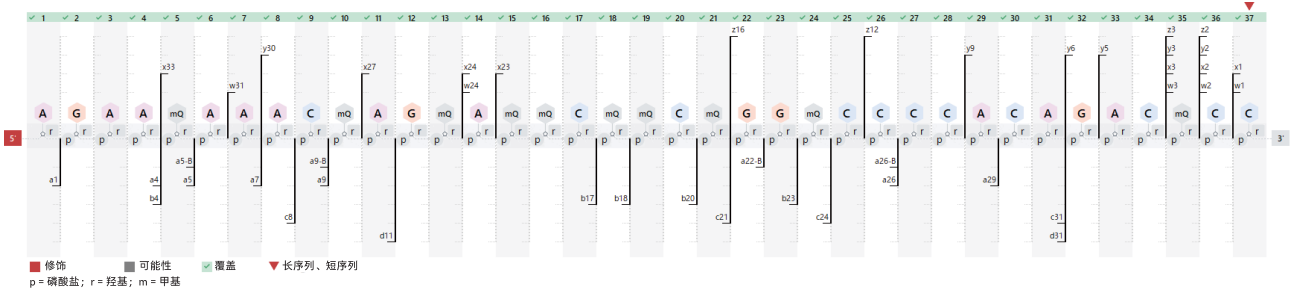


图 7 未反应基团中 N+1 基团的序列覆盖结果

■ 杂质定量

使用 LabSolutions Insight Biologics 软件对通过在 Cap-1 基团中加标浓度为 0、5 和 10% (w/w) 的未反应基团而获得的样品进行分析。分析显示峰面积值具有良好的线性 ($R^2 > 0.99$) (图 8)。

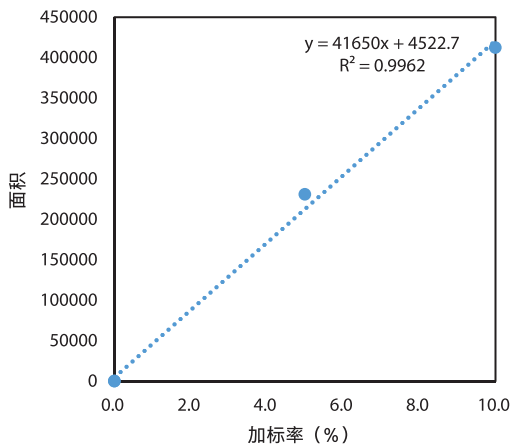


图 8 未反应基团 (杂质) 峰面积值的线性

■ 结论

在本研究中,使用高分辨率 LCMS-9050 质谱仪和 LabSolutions Insight Biologics 软件对 5' 帽修饰的 mRNA 进行分子量鉴定和序列分析。除检测 Cap-1 和未反应的基团之外,该仪器和软件还能够对杂质 (N+1 基团) 进行检测和序列鉴定。LabSolutions Insight Biologics 软件通过序列覆盖窗口简化了对不同链长的修饰、删除和添加的识别。

通过在 Cap-1 基团中添加浓度为 0、5 和 10% 的未反应基团 (杂质), 该软件得到了具有良好线性的杂质面积值。

相关应用

1. 使用 LabSolutions Insight™ Biologics 软件的寡核苷酸杂质分析工作流程
[应用新闻 01-00595A-EN](#)
2. 使用单四极杆质谱仪对寡核苷酸治疗剂中的杂质进行简单分析
[应用新闻 01-00656-EN](#)

岛津应用云



LabSolutions Insight、Nexera 和 Shim-pack Scepter 是 Shimadzu Corporation 或其附属公司在日本和 / 或其他国家的商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2024 年 6 月