

特点描述

- ◆ LCMS-2050 单四极杆 (SQ) 质谱仪和 LabSolutions Insight™ Biologics 分析软件可以确认核酸的分子量。
- ◆ LCMS-2050 可实现与 LC 系统相似的用户友好操作。
- ◆ 该软件使用户能够根据需要设置修饰和杂质的分析参数。

■ 引言

由于 mRNA 对 COVID-19 疫苗的有效性，关于 mRNA 的新药发现模式已经受到越来越多的关注。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。

应用新闻 01-00733 中介绍的四极杆飞行时间质谱仪可用于 SQ 不能进行的核酸序列覆盖鉴定。然而，SQ 质谱仪易于使用，操作方式与 LC 相似，因此在确认分子量 (如质量控制) 方面的需求日益增加。以下是使用 LCMS-2050 SQ 质谱仪和 LabSolutions Insight Biologics 分析软件进行 5' 加帽 mRNA 分析的介绍。

■ 样品

鉴于 mRNA 是一种大分子，LC/MS 通常通过分析酶切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-2050 系统进行分析。分析条件如表 1 所示。LCMS-2050 配备了加热型 DUIS 离子源进行电离，兼具 ESI 和 APCI 的优势。

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-2050)

离子化:	ESI/APCI (DUIS) 负
接口电压:	-2.0 kV
型号:	MS m/z 550-2000
雾化气流量:	2.0 L/min
干燥气流量:	5.0 L/min
加热气流量:	7.0 L/min
脱溶温度:	250°C
DL 温度:	200°C

■ 设置分析参数

LabSolutions Insight Biologics 软件可分析核酸及其杂质。首先，用户使用软件预置的核碱基、接头、核糖和修饰，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)。

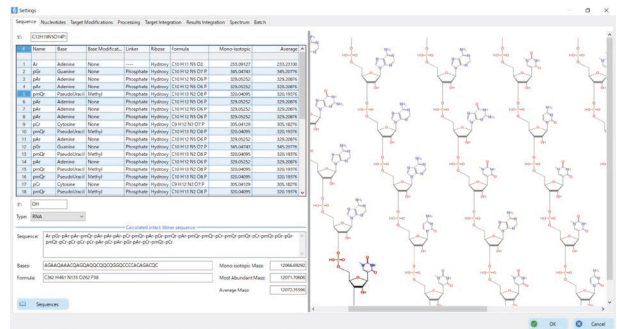


图 1 参数配置窗口

“目标修饰”选项卡也用于选择预期的杂质。除了不同链长、缺失核碱基、脱嘌呤/脱嘧啶、脱氨基和保护基团、额外离子和未知的修饰基团等杂质外，该软件还可以根据需要检索用户添加的分子变化。在本研究中，为了能够检测作为杂质的 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)。

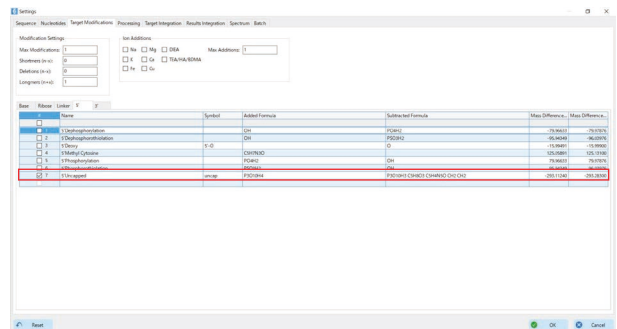


图 2 设置目标修饰

■ 鉴定 Cap-1 和未反应基团

图 3 显示了通过在未反应基团中添加 10% (w/w) Cap-1 基团 (0.5 µg) 获得的分析样品的组分色谱图。该谱图基于 MS1 谱图, 并将不同化合价和同位素的信号相结合显示为组分色谱图。

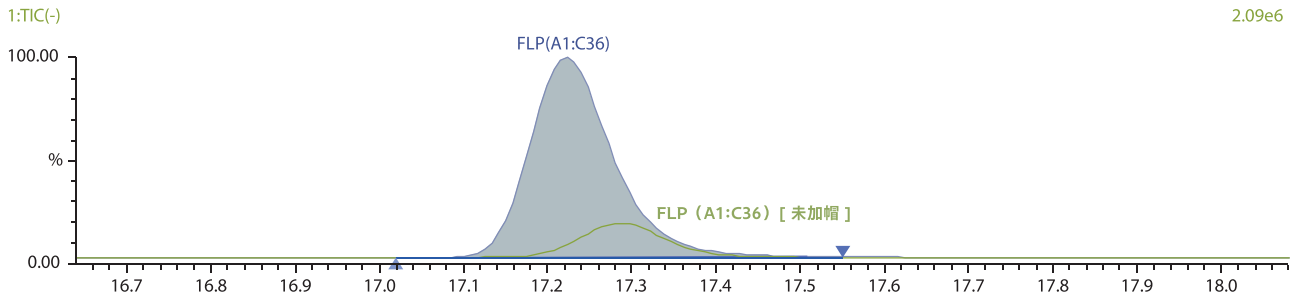


图 3 Cap-1 基团和未反应基团的组分色谱图
FLP (A1:C36) 表示 Cap-1 基团, FLP (A1:36) [未加帽] 表示未反应的基团。

图 4 显示了 Cap-1 基团的多电荷分析。与理论分子量值相比, 检测到的 Cap-1 和未反应基团的质量误差小于 1 Da。

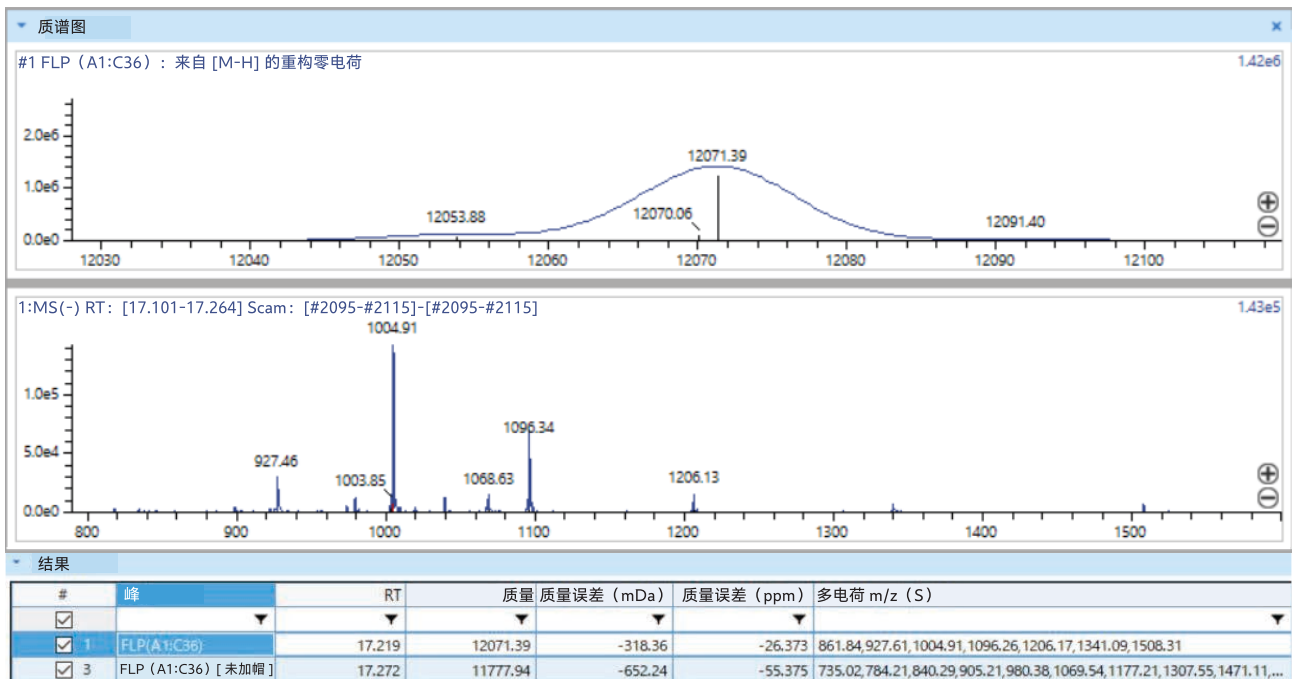


图 4 多电荷离子分析结果
上图: 解卷积质谱; 中图: 质谱; 下图: 识别结果

■ 结论

在本研究中, 使用 LCMS-2050 质谱仪和 LabSolutions Insight Biologics 软件对 5' 帽修饰的 mRNA 进行分子量鉴定。与理论分子量值相比, 检测到的 Cap-1 和未反应基团的质量误差小于 1 Da。LCMS-2050 展示了它易于使用, 并且与液相色谱的操作方式相似的特点, 这使得它适合于确认分子量, 例如用于质量控制。

相关应用

1. 使用四极杆飞行时间质谱仪分析 mRNA 5' 帽结构
[应用新闻 01-00733-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](#)

LabSolutions Insight、Nexera、DUIS 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 7 月