

利用 LCMS 对 mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料进行定性分析

LCMS-048

摘要： 本文采用 Nexera XS Inert 生物惰性超高效液相色谱和单四极杆质谱 LCMS-2050 联用仪对 mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料 NTP 和 dNTP 进行定性分析。NTP 和 dNTP 中含磷酸基团，易与金属产生吸附作用，Nexera XS Inert 在保证超高耐压的前提下，管路经 peek 材料内衬，实现全流路惰性化，抑制金属吸附，使 NTP 和 dNTP 的色谱峰型良好。通过优化流动相和质谱采集参数，采用 DUIS (ESI+APCI) 离子源的负离子模式分析待测样品。结果显示，该方法无需复杂的样品前处理、操作简单，检测的 NTP 和 dNTP 色谱峰型良好且均有较好的保留，适用于 mRNA 和 DNA 原料进厂质控分析，可对其原料进行快速分子量确认。

关键词： mRNA DNA 原料 NTP dNTP

技术特点：

- ◆ Nexera XS Inert 和 LCMS-2050 联用可抑制金属吸附，峰型良好，获得分子量信息。
- ◆ 本方法无需复杂的样品前处理，操作简便，分析速度快，可以进行高通量检测。

核苷三磷酸 (NTP) 是一种含有三个磷酸基团的核苷酸，包括 ATP、UTP、CTP、GTP，是 mRNA 生产过程中体外转录的原料。若将 NTP 中核糖替换成去氧核糖，那么会使核苷三磷酸变成去氧核苷三磷酸 (dNTP)，包括 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP。dNTP 是合成 DNA 的原料，常用于 PCR、qPCR、RT-PCR、cDNA 或普通 DNA 合成、引物延伸反应、DNA 测序、DNA 标记等各种常规分子生物反应。核苷酸原料的检测与分析是 mRNA 和 DNA 生产物料质控的重要一环。

NTP 和 dNTP 中含磷酸基团，若使用常规高效液相色谱仪分析，易与系统中不锈钢管路等金属部件产生

吸附作用，影响色谱峰峰形，且易产生残留。岛津最新推出 Nexera XS Inert 生物惰性超高效液相色谱仪，在保证超高耐压的前提下，管路经 peek 材料内衬，实现全流路惰性化，抑制金属吸附，使 NTP 和 dNTP 的色谱峰型良好。

本实验采用 Nexera XS Inert 生物惰性超高效液相色谱和单四极杆质谱 LCMS-2050 联用仪对 mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料进行定性分析，无需复杂的样品前处理、操作简单、分析速度快，适用于 mRNA 和 DNA 原料进厂质控分析，可对其原料进行快速分子量确认。

■ 实验部分

1.1 仪器

Nexera XS Inert 生物惰性超高效液相色谱与单四极杆质谱 LCMS-2050 联用系统，具体配置信息如下：

系统控制器：	CBM-40	自动进样器：	SIL-40C XSi
脱气机：	DGU-405	柱温箱：	CTO-40C
输液泵：	LC-40D XSi×2	质谱仪：	LCMS-2050 单四极杆质谱仪
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114		



图 1 单四极杆液质联用仪 LCMS-2050

1.2 分析条件

色谱柱： Shim-Pack Scepter C18-120 [Metal free] (50 mm×2.1 mm I.D., 3μm) ,
 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-31073-01)
 流动相： A相 -10mM DIPEA+25mM HFIP, B相 - 甲醇
 进样体积： 5 μL 柱温： 40°C
 流速： 0.3 mL/min 洗针液： 甲醇 / 水 =1:1 (v:v)
 洗脱方式： 梯度洗脱, B相初始浓度为 0%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	0
3	Pumps	Pump B Conc.	30
4	Pumps	Pump B Conc.	30
4.1	Pumps	Pump B Conc.	0
8.00	Control	Stop	

质谱条件

离子源： DUIS (ESI+APCI) 雾化气流速： 2.0 L/min
 DL 温度： 250°C 干燥气流速： 5.0 L/min
 脱溶剂温度： 300°C 加热气流速： 7.0 L/min
 扫描模式： Scan (-) 扫描范围： 200~600

1.3 样品前处理方法

将 NTP 和 dNTP 样品用水溶解, 并稀释至 100 μmol/L。

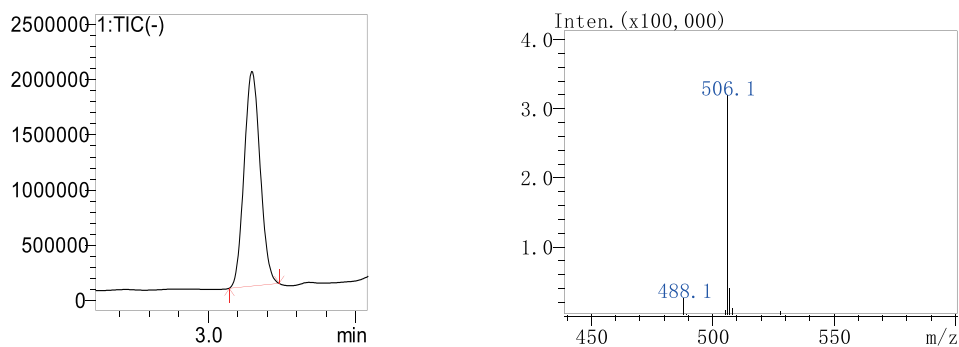
■ 结果与讨论

2.1 mRNA 体外转录原料 NTP 分子量及分析结果

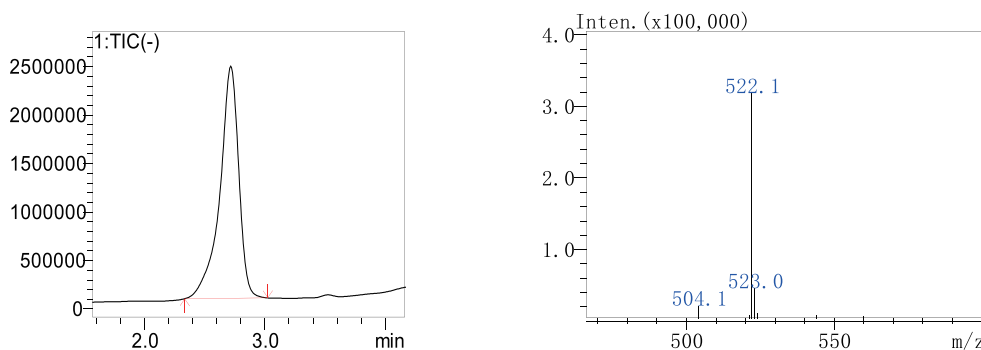
对 mRNA 体外转录原料 ATP、GTP、CTP、UTP 进行检测, 总离子流图和质谱图见图 2, 核苷酸的分子式、理论分子量、实测分子量见表 2。其中 ATP 检测到 m/z 506.1 峰、GTP 检测到 m/z 522.1 峰、CTP 检测到 m/z 482.1 峰、GTP 检测到 m/z 483.1 峰, 均为 [M-H]⁻ 峰。

表 2 NTP 分子式及分子量检测结果

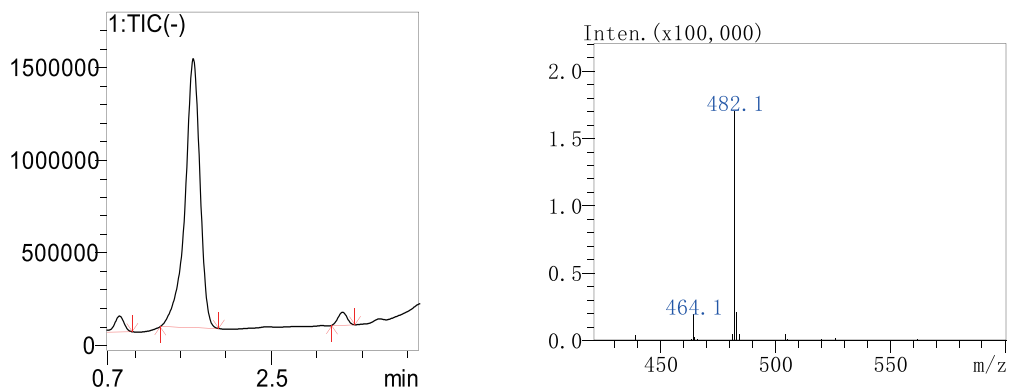
序号	名称	分子式	分子量	实测值
1	ATP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	507.0	506.1
2	GTP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₄ P ₃	523.0	522.1
3	CTP	C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₁₄ P ₃	483.0	482.1
4	UTP	C ₉ H ₁₅ N ₂ O ₁₅ P ₃	484.0	483.1



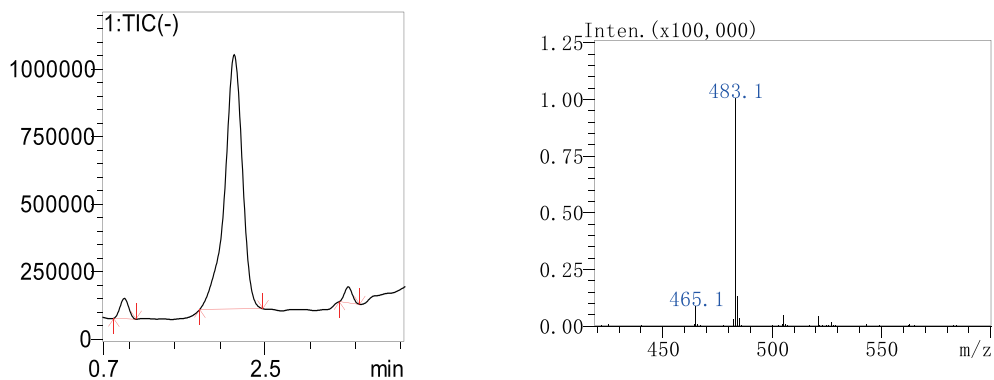
1a. ATP 总离子流色谱图和质谱图



1b. GTP 总离子流色谱图和质谱图



1c. CTP 总离子流色谱图和质谱图



1d. UTP 总离子流色谱图和质谱图

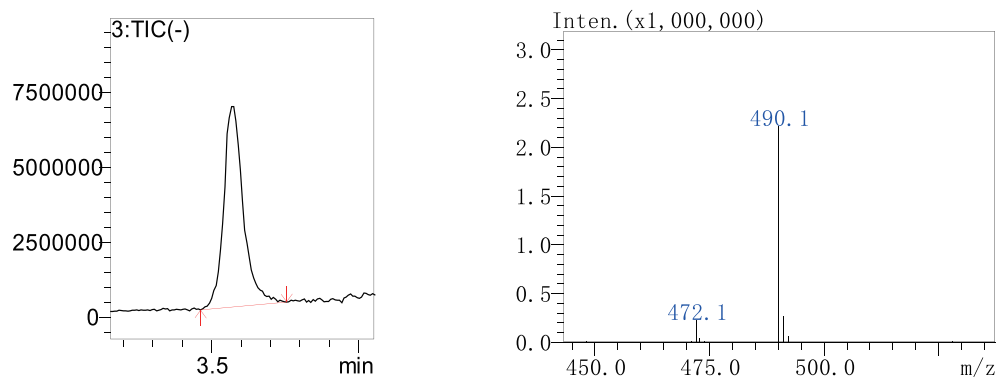
图2 NTP 总离子流色谱图和质谱图

2.2 聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dNTP 分子量及分析结果

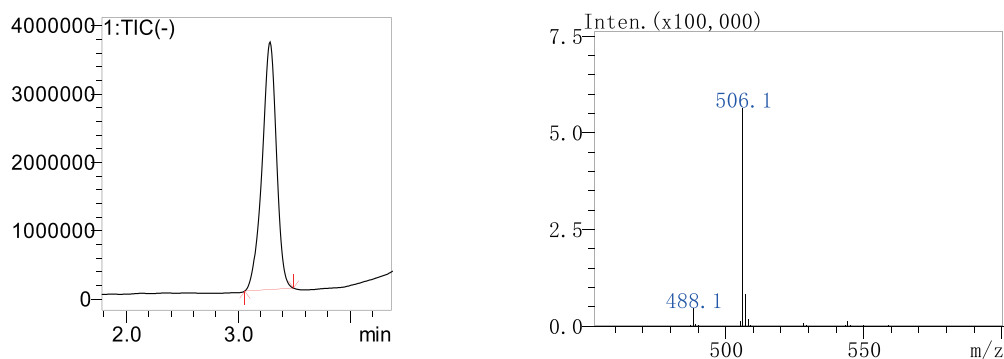
对聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 进行检测，总离子流图和质谱图见图 3，脱氧核苷酸的分子式、理论分子量、实测分子量见表 3。其中 dATP 检测到 m/z 490.1 峰、dGTP 检测到 m/z 506.1 峰、dCTP 检测到 m/z 466.1 峰、dGTP 检测到 m/z 481.1 峰，均为 [M-H]⁻ 峰。

表 3 dNTP 分子式及分子量检测结果

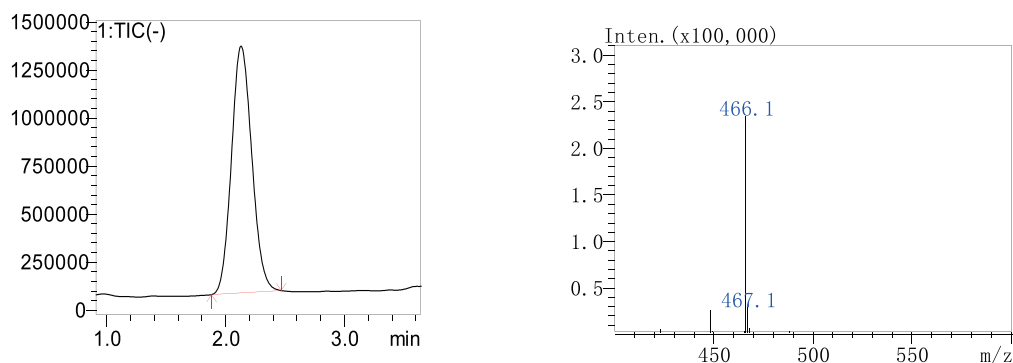
序号	名称	分子式	分子量	实测值
1	dATP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₂ P ₃	491.0	490.1
2	dGTP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	507.0	506.1
3	dCTP	C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₁₃ P ₃	467.0	467.1
4	dTTP	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₁₄ P ₃	482.0	482.1



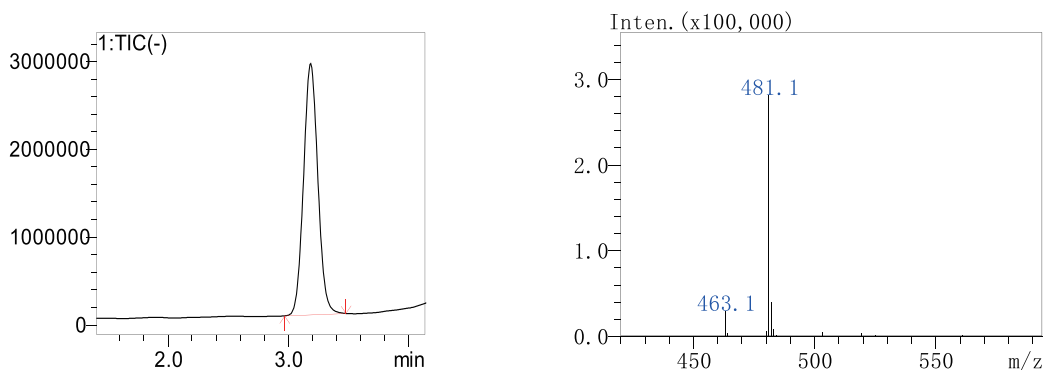
2a. dATP 总离子流色谱图和质谱图



2b. dGTP 总离子流色谱图和质谱图



2c. dCTP 总离子流色谱图和质谱图



2d. dTTP 总离子流色谱图和质谱图

图3 dNTP 总离子流色谱图和质谱图

■ 结论

本文采用 Nexera XS Inert 生物惰性超高效液相色谱和单四极杆质谱 LCMS-2050 联用仪对 mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料进行定性分析，利用液相色谱进行分离，单四极杆质谱检测原料的分子量。该方法无需复杂的样品前处理、操作简单、分析速度快，可分离出原料中杂质，结果可靠，适用于 mRNA 和 DNA 原料进厂质控分析，可对其原料进行快速分子量确认。

岛津应用云

