

应用台式 MALDI-TOF MS 分析 mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料的分子量及组成

MALDI-038

摘要：本文应用岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对 mRNA 和 DNA 生产所用的 NTP 和 dNTP 原料进行质谱分析，可直接检测到核苷酸原料的分子量及组成形式。本方法操作简便、分析速度快，结果直接可靠，为 mRNA 和 DNA 生产相关原料的质量控制提供了参考。

关键词： MALDI-TOF mRNA DNA 原料 NTP dNTP

技术特点：

- ❖ 一次实验可直接检测到核苷酸原料的分子量及组成形式。
- ❖ 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。

mRNA 和 DNA 生产过程中需要用到多种核苷酸类原料。例如，mRNA 生产时，体外转录的直接原料为 NTP(ATP、UTP、CTP、GTP)，DNA 聚合酶生产 DNA 时的直接原料为 dNTP(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)。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。

本文应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对 NTP、dNTP 原料进行了分析，直接检测到了原料的分子量及分子组成形式。该检测方法无需复杂的样品前处理、操作简单、分析速度快，检测通量高，结果直接可靠，可作为核酸原料质控的日常检测手段。

■ 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式：	线性正离子模式	激光能量：	75-80
激光器：	355 nm 固态激光器	离子门阈值：	300
扫描范围：	m/z 300-2000	脉冲引出质量 (Da)：	1500

1.3 样品前处理

取样品加水稀释为 100 μ M，作为样品工作液。吸取 0.5 μ L NaTFA 溶液 (1 mg/mL)、1 μ L DHB 基质溶液 (30 mg/mL)、0.5 μ L 样品工作液依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

■ 结果与讨论

2.1 mRNA 体外转录原料 NTP 分子量及组成分析

应用 MALDI-8020 对 mRNA 体外转录原料 ATP、GTP、CTP、UTP 进行检测，结果见图 2，核苷酸的分子式、理论分子量、实测分子量见表 1。以图 2A 为例，ATP 检测到 m/z 530.12、m/z 552.16、m/z 574.13、m/z 596.11 的离子峰，依次对应 ATP 的 $[M+Na]^+$ 、 $[M+2Na-H]^+$ 、 $[M+3Na-2H]^+$ 以及 $[M+4Na-3H]^+$ 的化合物形式^[1,2]，可能为 ATP 中三磷酸基团上 H 离子被 Na 离子部分或全部取代后的产物。同样地，GTP、CTP、UTP 也依次检测到了结合 1-4 个 Na 离子的化合物离子形式，结果见表 1 及图 2。除核苷酸目标峰外，样品还检测到基质背景峰，如 m/z 551。

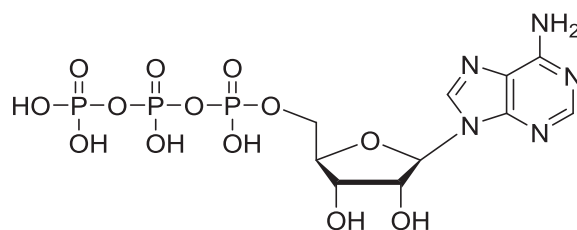


图 1 ATP (三磷酸腺苷) 结构式 (核苷酸结构式示例)

表 1 NTP 分子式及分子量检测结果

名称	分子式	$[M+Na]^+_{mono}$		$[M+2Na-H]^+_{mono}$		$[M+3Na-2H]^+_{mono}$		$[M+4Na-3H]^+_{mono}$	
		理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值
ATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	529.99	530.12	551.97	552.16	573.95	574.13	595.93	596.11
GTP	$C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3$	545.98	546.15	567.96	568.10	589.94	590.08	611.93	612.05
CTP	$C_9H_{16}N_3O_{14}P_3$	505.97	506.12	527.96	527.94	549.94	549.83	571.92	571.88
UTP	$C_9H_{15}N_2O_{15}P_3$	506.96	507.02	528.94	528.85	550.92	550.93	572.90	--

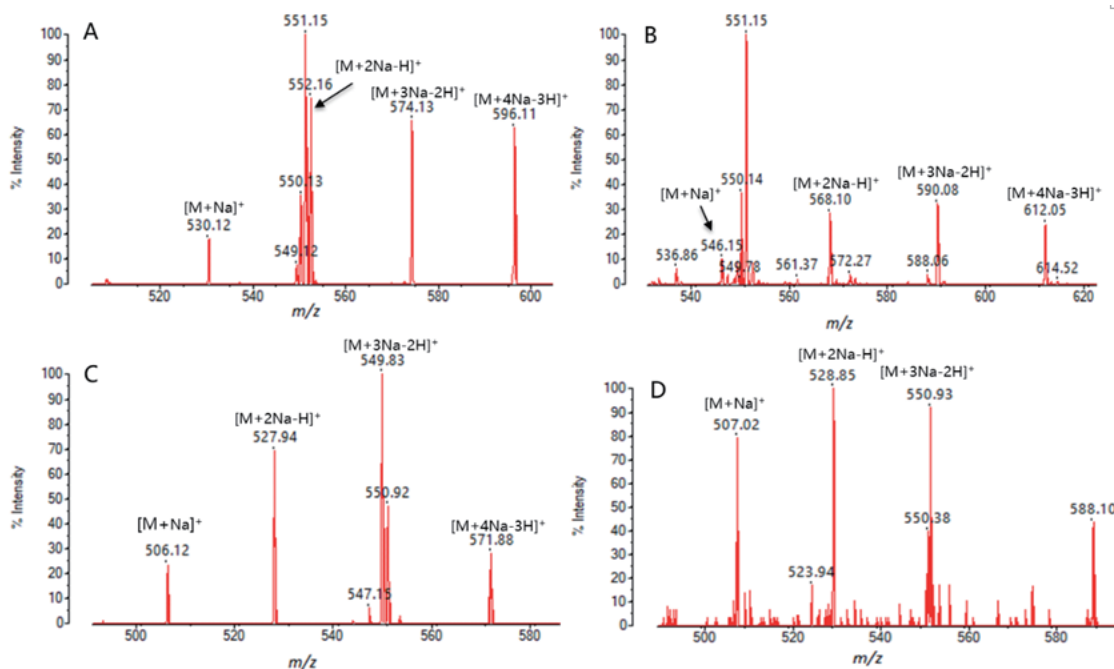


图 2 RNA 药物生产原料 NTP 一级质谱图 (A: ATP, B: GTP, C: CTP, D: UTP)

注: m/z 551 为基质背景峰

2.2 聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dNTP 分子量及分析

应用 MALDI-8020 对聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 进行检测, 结果见图 3。如图 3A 所示, dATP 检测到 m/z 514.16、m/z 536.04、m/z 558.03、m/z 579.99 的离子峰, 依次对应 dATP 的 $[M+Na]^+$ 、 $[M+2Na-H]^+$ 、 $[M+3Na-2H]^+$ 以及 $[M+4Na-3H]^+$ 的化合物形式, 可能为 dATP 中三磷酸基团上 H 离子被 Na 离子部分或全部取代后的产物。同样地, dGTP、dCTP、dTTP 也依次检测到了结合 1-4 个 Na 离子的化合物离子形式, 结果见表 2 及图 3。

表 2 dNTP 分子式及分子量检测结果

名称	分子式	$[M+Na]^+_{mono}$		$[M+2Na-H]^+_{mono}$		$[M+3Na-2H]^+_{mono}$		$[M+4Na-3H]^+_{mono}$	
		理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值
dATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{12}P_3$	513.99	514.16	535.97	536.04	557.95	558.03	579.94	579.99
dGTP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	529.99	530.08	551.97	552.09	573.95	574.04	595.93	596.04
dCTP	$C_9H_{16}N_3O_{13}P_3$	489.98	489.98	511.96	511.98	533.94	533.90	555.93	555.95
dTTP	$C_{10}H_{17}N_2O_{14}P_3$	504.98	505.23	526.96	526.98	548.94	548.91	570.92	570.95

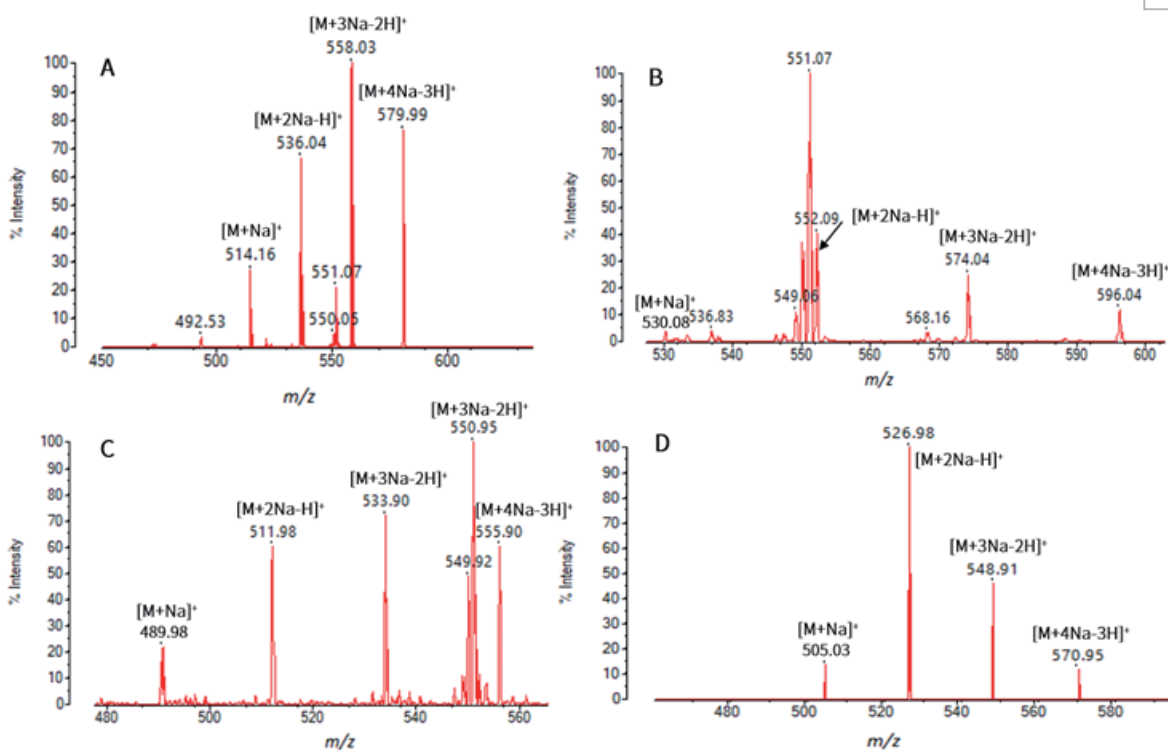


图 3 DNA 药物生产原料 dNTP 一级质谱图 (A: dATP, B: dGTP, C: dCTP, D: dTTP)

注: m/z 551 为基质背景峰

结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对 mRNA 体外转录原料 NTP 以及 DNA 原料 dNTP 进行了分析, 所有原料均检测到了显著的加钠峰, 可以对结果进行快速确证。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快, 结果直接、准确、可靠, 有望在 mRNA 体外转录原料和 DNA 原料质控方面有更加广泛的应用。

■ 参考文献

1. Eric Largy, Alexander König, Anirban Ghosh, Debasmitta Ghosh, Sanae Benabou, Frédéric Rosu, and Valérie Gabelica. Mass Spectrometry of Nucleic Acid Noncovalent Complexes. Chemical Reviews. 2022, 122, 7720-7839

2. Noah P. Christian, Steven M. Colby, Lori Giver, Chris T. Houston, Randy J. Arnold, Andrew D. Ellington and James P. Reilly. High Resolution Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Analysis of Single-stranded DNA of 27 to 68 Nucleotides in Length. RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, 1995, VOL. 9,1061-1066

岛津应用云

