

体积排阻色谱法分析mRNA的Poly(A)尾

Martin Gilar

Waters Corporation

摘要

沃特世成功开发出首款针对SARS-CoV-2病毒的治疗性信使RNA (mRNA)疫苗。治疗性mRNA分子还可以在癌症治疗中用作蛋白质替代疗法或疫苗接种方法。mRNA技术飞速发展，因此亟需开发相应的分析方法。目前的mRNA分析方法包括分析5'端帽状态、mRNA一级序列、工艺杂质和3'端poly(A)尾。本应用纪要介绍了一种稳定耐用且操作简单的poly(A)尾长测量方法。该方法利用核糖核酸酶T1酶解mRNA分子来释放出poly(A)尾，然后采用体积排阻色谱法(SEC)分离酶解产物和poly(A)尾。使用由核酸标准品构建的SEC校准曲线估算poly(A)尾长。

优势

- 快速、耐用的poly(A)尾长分析方法
- 大幅减少样品前处理步骤
- 适用于QC检测的简单的SEC-UV方法

简介

治疗性信使RNA分子为单链核酸，长度通常为2,000–10,000个核苷酸。治疗性mRNA的结构由若干个不同的部分组成，包括修饰的5'端帽、3'和5'非翻译区(UTR)、mRNA编码区或基因转录序列以及在3'端的poly(A)尾（见图

1)。5'端帽可大幅减少RNA降解，同时通过固定细胞中的核糖体而促进翻译过程。3'和5'非翻译区直接影响翻译，通常优化此区域的序列以实现尽可能高的RNA翻译效率。mRNA编码区编码目的基因(GOI)。此区域被翻译成所需蛋白质，且通常包含修饰的核苷酸（通常为N1-甲基假尿苷），以降低清除率并提高蛋白质产量。最后，poly(A)尾存在于3'端，此区域在大幅减少RNA降解和维持mRNA的体内稳定性方面起关键作用。mRNA疫苗中poly(A)尾的长度通常为100-150个核苷酸(nt)。

SARS-CoV-2疫苗取得成功之后，大量投资开始涌向mRNA技术。关于针对多种病原体和病毒的mRNA疗法以及mRNA疫苗，目前有多项临床研究正在进行中。mRNA技术的新进展也促进了其他有前景的应用，例如癌症免疫疗法、体内CRISPR基因编辑和其他蛋白质替代疗法。

mRNA治疗药物是一种新型药物；这类药物属于生物聚合物大分子，故而存在特有的分析挑战。因此，我们需要新的分析方法来支持mRNA研究，以及mRNA治疗药物和疫苗的开发、生产和QC放行，包括产品表征和杂质分析。由于液相色谱(LC)和质谱(MS)法难以直接分析完整的大分子核酸¹，因此通常用特定的酶（例如核糖核酸酶(RNase) T1)来酶解完整的mRNA分子²。核糖核酸酶T1可以在鸟苷酸的3'端裂解单链RNA，在产物的3'端留下磷酸基团。由于mRNA序列中经常存在鸟苷，因此核糖核酸酶T1酶解会产生相对较短的寡核苷酸混合物，以便通过LC MS/MS方法分离和测序(3-5)。由于mRNA分子的poly(A)尾部分不含鸟苷残基，因此核糖核酸酶T1酶解物产生的寡核苷酸主要由一条oligo(A)序列组成，该序列明显长于酶解物中的其他寡核苷酸（见图1）。该寡核苷酸的长度通常为100~150 nt。

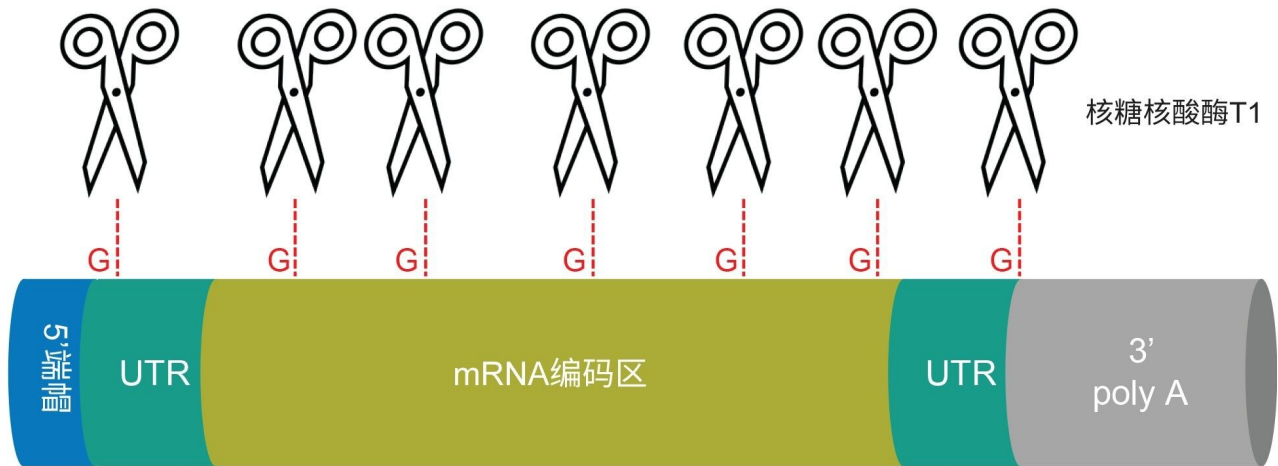


图1.mRNA结构示意图。剪刀指示核糖核酸酶T1的推断性裂解位点。酶解产生短链RNA寡核苷酸并释放出3'端poly(A)尾。

本应用纪要介绍了一种简单的SEC方法，能够测定用核糖核酸酶T1酶解完整mRNA后产生的poly(A)尾的长度。通过SEC分离酶解产物、2-30 nt寡核苷酸和poly(A)尾寡核苷酸。根据poly(A)寡核苷酸的保留时间，并与使用腺苷核糖核苷酸标准品制备的SEC校准曲线比较，测得mRNA poly(A)尾的平均长度。这项技术是对离子对反相(IP RP)液相色谱法的有力补充，可以对长度不超过约150 nt的寡核苷酸实现n/n-1分离，并从另一个角度测定poly(A)尾长的异质性。IP RP LC方法将在后续的应用纪要[720007873ZH](#)中详细介绍。

实验

EPO mRNA标准品购自TriLink Biotechnologies，部件号L-7209。EPO mRNA包含Cap 1 5'结构，其经过聚腺苷酸化，并且整个序列中包含修饰的5-甲氧基尿苷。Fluc-beta mRNA样品购自AmpTec，部件号M1436/1000-C1-A120-NM-P0。此mRNA经过聚腺苷酸化，并且序列中包含未修饰的尿苷。使用以下方案，用核糖核酸酶T1 (Thermo Fisher，部件号EN0542，1000 U/ μ L) 对1 mg/mL mRNA样品溶液进行酶解：

将50 μ L 1 mg/mL mRNA与10 μ L rCutSmart 10x缓冲液 (New England Biolabs，部件号B6004S) 混合，再加入2 μ L核糖核酸酶T1。将样品在37 °C下酶解30 min。酶解后，加入1 μ L Quick CIP酶 (New England Biolabs，部件号M0525S，5000 U/mL)，以去除寡核苷酸的3'磷酸基团。去磷酸化在室温下进行30 min。将1 μ L酶解物注入SEC色谱柱或使用离子对反相液相色谱法分析。

SEC条件

液相色谱系统：	ACQUITY™ Premier UPLC™ (配备SM-FTN和QSM)
检测：	PDA, Ti 5 μ L流通池, 260 nm
色谱柱：	ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 4.6 x 150 mm, 1.7 μ m (P/N: 186009963)
柱温：	25 °C
样品温度：	10 °C

进样体积:	1.0 μ L (样品)
流速:	0.2 mL/min
流动相A:	0.1 M磷酸盐缓冲液, pH 8, 用0.1 μ m滤膜过滤
流动相B:	30:70甲醇:水, 用于储存色谱柱
色谱软件:	Empower™ v 3.0

IP RP LC条件

液相色谱系统:	ACQUITY Premier UPLC (配备SM-FTN和QSM)
检测:	PDA, Ti 5 μ L流通池, 260 nm
色谱柱:	ACQUITY Premier BEH C ₁₈ 寡聚核苷酸分析专用柱, 300 Å, 2.1 \times 150 mm, 1.7 μ m (P/N: 186010541)
柱温:	60 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	1.0 μ L (样品)
流速:	0.3 mL/min
流动相A:	100 mM乙酸辛铵(OAA)的40%乙腈和1%六氟异丙醇(HFIP)溶液, v:v
流动相B:	100 mM OAA的90%乙腈和1% HFIP溶液

流动相D:	100%乙腈
梯度:	40 min内46% A、54% B和0% D分别变为28% A、62% B和10% D
色谱软件:	Empower v 3.0

结果与讨论

体积排阻色谱(SEC)是一种根据分子的流体动力学尺寸对其进行分离的方法。在本研究的第一步中,我们筛选了填充有1.7 μm 或2.5 μm 吸附剂的Waters™ 150 x 4.6 mm SEC色谱柱,考察其分离15~150 nt寡核苷酸的能力。ACQUITY UPLC BEH SEC 1.7 μm 125 Å色谱柱适用于分离2~25 nt的寡核苷酸。ACQUITY Premier SEC 250 Å 1.7 μm 蛋白分析专用柱适用于分离20~150 nt的寡核苷酸,而ACQUITY BEH SEC 450 Å 2.5 μm 色谱柱则适用于分离50~4000 nt的核酸(数据未显示)。

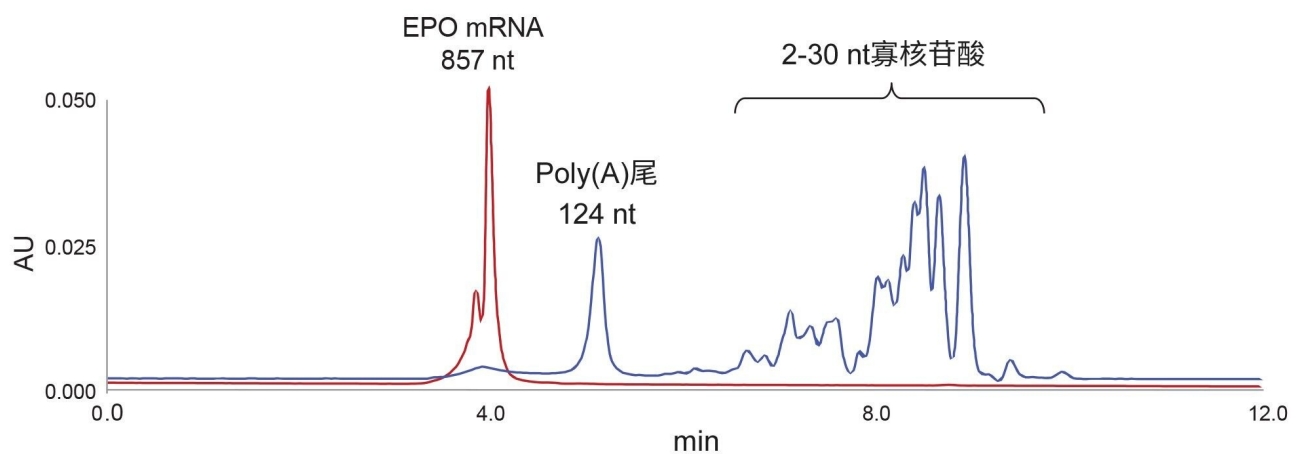


图2.使用核糖核酸酶T1酶解857 nt EPO mRNA (红色色谱图)。采用ACQUITY Premier SEC 250 Å, 4.6 x 150 mm, 1.7 μm 蛋白分析专用柱分离酶解产物、poly(A)尾和2-30 nt短链寡核苷酸(蓝色色谱图)。

基于这项初步研究的结果，我们在进一步的实验中选择了ACQUITY Premier SEC 250 Å 1.7 μm蛋白分析专用柱。图2显示，该色谱柱使未酶解的mRNA、mRNA的核糖核酸酶T1酶解产物（即释放的poly(A)尾）以及短链寡核苷酸实现了出色的分离。图3显示了使用寡核糖核苷酸腺苷标准品构建校准曲线并根据该曲线得到的poly(A)尾长度匹配结果。

30–150 nt范围内寡核苷酸的校准趋势 $\log N = a \times t_r + b$ 呈线性。 N 为核苷酸数量， t_r 为保留时间， a 和 b 为线性回归常数。利用该校准曲线，根据观察到的SEC峰保留时间计算RNA poly(A)尾的长度。

图3b所示为使用合成RNA oligo(A)标准品进行SEC色谱柱校准的结果。30、40和60 nt样品的纯度较高，而50 nt的oligo(A) RNA峰受到截断合成杂质的污染明显更多。如预期一样，在100 nt标准品中检出许多合成杂质。对于全长产物，100 nt寡核苷酸的估计纯度（基于SEC分析）约为9%。

与oligo(A)标准品相比（图3b），poly(A)尾峰明显伸长和展宽（图3a）。这是因为poly(A)尾峰不均匀，它由多种密切相关的poly(A)尾物质组成。SEC方法无法分离 $N-x$ 和 $N+x$ poly(A)尾异构体。但是，SEC UV方法可以简单估算poly(A)尾峰中主要寡核苷酸的长度。如果需要有关poly(A)尾物质异质性的信息，可以使用高分离度离子对反相液相色谱法，该方法能够分离高达150 nt的寡核苷酸中的 N 和 $N-x$ 物质。此外，还可以优化高分离度IP-RP方法，将其与质谱联用。

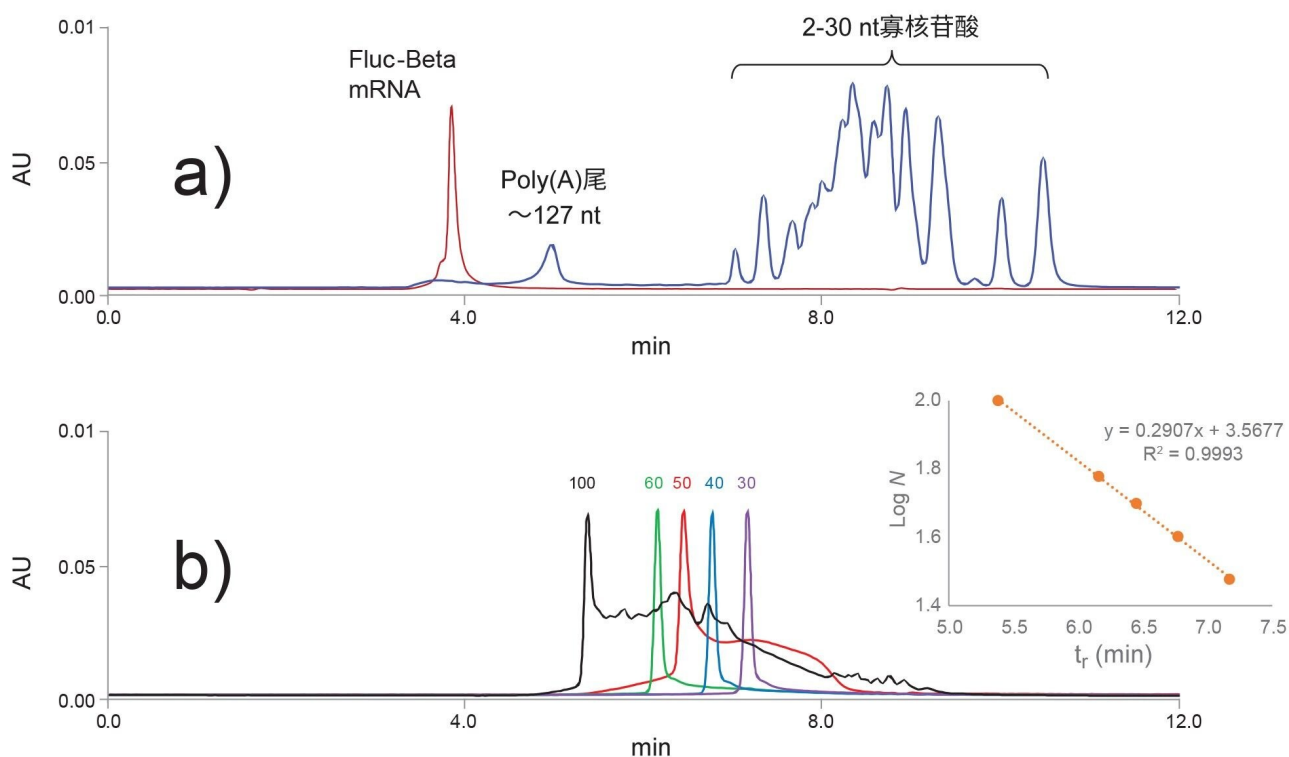


图3.a) 使用核糖核酸酶T1酶解1970 nt *Fluc-beta mRNA* (红色色谱图)。采用ACQUITY Premier SEC 250 Å, 4.6 x 150 mm, 1.7 μm蛋白分析专用柱分离酶解产物、poly(A)尾和2-30 nt短链寡核苷酸 (蓝色色谱图)。b) 使用30、40、50、60和100 nt寡核糖核苷酸(A)合成标准品进行SEC校准。线性校准结果见插图。通过外推校准曲线估算更大的poly A尾的长度。

使用高分离度IP RP LC UV研究poly(A)尾异质性

要对100–150 nt的寡核苷酸进行高效的IP RP LC分离，需要使用填充亚2 μm颗粒的色谱柱(6, 7)和强离子对流动相，例如100 mM乙酸辛铵(3)。图4显示了100 nt oligo(A) RNA合成标准品与使用核糖核酸酶T1从EPO mRNA酶解物中释放出的poly(A)尾的分离结果。IP RP LC法可以使高达150 nt的寡核苷酸实现n/n-x物质部分分离。poly(A)尾由10-15个寡核苷酸组成，集中在丰度最高的峰附近，估计长度为124 nt。本研究特别采用的IP RP LC流动相与MS检测不兼容，124 nt的峰长度是根据poly(A) RNA合成标准品确定的。这种精确的IP PR LC方法将在后续的应用纪要中更详细地介绍。

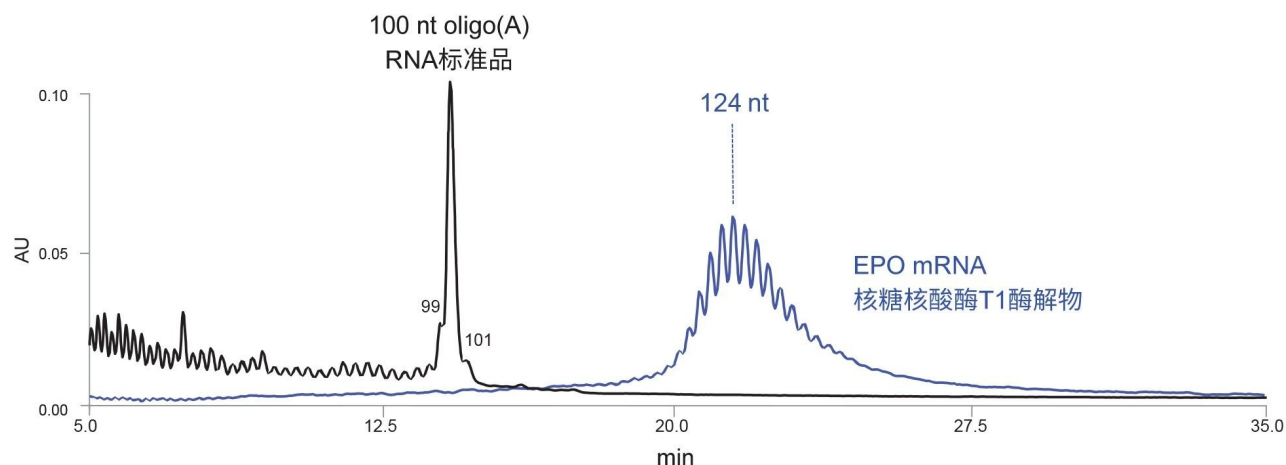


图4. 使用ACQUITY Premier BEH 300 Å 1.7µm寡核苷酸分析专用柱，通过高分离度IP RP LC方法分离100 nt oligo(A)合成RNA寡核苷酸标准品（黑色色谱图）和经核糖核酸酶T1酶解的EPO mRNA酶解物（蓝色色谱图）。poly(A)尾信号中丰度最高的峰估计长124 nt。

结论

本研究开发出一种能够简单、稳定地分析mRNA poly(A)尾长的SEC-UV方法。研究发现，ACQUITY Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱最适合该分析。使用寡核糖核苷酸(A)合成标准品进行SEC校准，结果在30–150 nt长度范围内呈线性。研究还发现，第二种方法(IP RP LC UV)也适用于分离长达150 nt的长链寡核苷酸。该方法使用ACQUITY Premier BEH C₁₈ 300 Å寡核苷酸分析专用柱作为poly(A)尾异质性的潜在质量控制分析方法，并且同样不需要严格进行MS检测。利用合成寡核糖核苷酸(A)标准品确定poly(A)尾长和异质性。这两种方法均采用了具有MaxPeak™高性能表面的色谱柱，确保寡核苷酸物质获得稳定的回收率(8-11)。

参考资料

1. M. Packer, D. Gyawali, R. Yerabolu, J. Schariter, and P. White, *Nat. Commun.*, 12, 6777 (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-26926-0.

2. T. Jiang, N. Yu, J. Kim, J.R. Murgo, M. Kissai, K. Ravichandran, E.J. Miracco, V. Presnyak, and S. Hua, *Anal.Chem.*, 91, 8500-8506 (2019).DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01664.
3. M. Donegan, J.M. Nguyen, and M. Gilar, *J. Chromatogr.A*, 1666, 462860 (2022).DOI: 10.1016/j.chroma.2022.462860.
4. A. Goyon, P. Yehl, and K. Zhang, *J. Pharm.Biomed.Anal.*, 182, 113105 (2020).DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113105.
5. V.B. Ivleva, Y.Q. Yu, and M. Gilar, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 24, 2631–2640 (2010).DOI: 10.1002/rcm.4683.
6. M. Gilar and U.D. Neue, *J. Chromatogr.A*, 1169, 139–150 (2007).DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.005.
7. M. Gilar, K.J. Fountain, Y. Budman, U.D. Neue, K.R. Yardley, P.D. Rainville, R.J. Russell, 2nd, and J.C. Gebler, *J. Chromatogr.A*, 958, 167-182 (2002).
8. G.J. Guimaraes, J.M. Sutton, M. Gilar, M. Donegan, and M.G. Bartlett, *J. Pharm.Biomed.Anal.*, 208, 114439 (2022).DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114439.
9. J.M. Nguyen, M. Gilar, B. Koshel, M. Donegan, J. MacLean, Z. Li, and M.A. Lauber, *Bioanalysis*, (2021).DOI: 10.4155/bio-2021-0115.
10. M. Gilar, M. DeLano, and F. Gritti, *J. Chromatogr.A*, 1650, 462247 (2021).DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462247.
11. M. DeLano, T.H. Walter, M.A. Lauber, M. Gilar, M.C. Jung, J.M. Nguyen, C. Boissel, A.V. Patel, A. Bates-Harrison, and K.D. Wyndham, *Anal.Chem.*, 93, 5773-5781 (2021).DOI: 10.1021/acs.analchem.0c05203.

特色产品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

[ACQUITY Premier系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739)

[Xevo TQD三重四极杆质谱仪 <https://www.waters.com/134608730>](https://www.waters.com/134608730)

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007853ZH, 2023年2月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号