

DNAPac RP结合Vanquish Flex液相应用于mRNA含量测定

徐培辉 金琦芸

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

mRNA, DNAPac RP、含量、Vanquish Flex

摘要

本文基于赛默飞Vanquish Flex超高效液相色谱系统，采用DNAPac RP液相色谱柱，在己胺离子对乙腈流动相条件下，能够保留mRNA并得到优异的峰型，对于mRNA类样品的含量测定提供了一种新的参考方案。

1. 引言

核酸是蛋白之外，生物制品领域另一重要分支，近年来，核酸药物引起了公众和研究单位的极大热情。虽然mRNA本身是一种单链RNA，但是其链间的碱基之间也会出现配对形成多维结构比如三叶草形状的三维结构，这种高级结构在核糖体的翻译活性中有功能用途，但是不利于分析。为了测定mRNA的含量，所需的主峰应洗脱为尖峰，这只有在RNA被“线性化”后才可行^[1]。大分子生物学中典型的线性化条件是添加6M尿素或10%甲酰胺，但是在液相分析中尿素或者甲酰胺的添加会增加色谱柱背压和导致峰展宽，所以在液相分析中常常使用添加有机溶剂、高温、高PH中的一种或者混合使用实现mRNA的线性化^[2]。

DNAPac RP是专门设计用于分离单双链核苷酸的反相色谱柱，其固定相本身是疏水的大孔径聚合物微球，没有硅胶反相键合的烷基配体，可以耐受0-14的PH值和100℃的高温；另外由于其固定相上没有键合任何官能团，所以MS检测器上流失极低且兼容甲醇、乙腈、六氟异丙醇等试剂。

本文用赛默飞液相色谱柱DNAPac RP结合液相系统Vanquish Flex，以己胺-乙腈体系开发一种快速的方案，分别考察了流动相PH、柱温及离子对种类对主峰保留和峰型的影响，对于几百至几千碱基的mRNA样品测定有参考意义。

2. 实验部分

2.1 仪器、色谱耗材及试剂

2.1.1 Thermo Fisher Vanquish Flex

2.1.2 色谱柱Thermo Fisher DNAPac RP 4 μm, 2.1x50mm (P/N: 088924)



2.1.3 样品瓶 (Thermo Fisher, P/N: 6ESV9-04PP)

2.1.4 无核酸酶水 (P/N: AM9906)

2.1.5 己胺, >99.0% (GC)

2.1.6 HPLC级三乙胺

2.1.7 N,N-二异丙基乙胺, 98.0% (GC)

2.1.8 乙酸 (Thermo Fisher, P/N: 984303)

2.1.9 乙腈 (Thermo Fisher, P/N: A955-4)

2.1.10 纯化后mRNA原液

2.2 样品前处理

取纯化后的样品，用无核酸酶水稀释10倍，待进样

2.3 仪器色谱条件

色谱柱: DNAPac RP 4 μm , 2.1 x 50 mm

流动相A: 离子对试剂水溶液

- 25 mM HA (己胺) 用乙酸调节PH=7.0/8.5/10.5
- 100 mM TEA (三乙胺) 用乙酸调节PH=8.5
- 25 mM DIPEA (N,N-二异丙基乙胺) 用乙酸调节PH=8.5

流动相B: 乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C/60°C/80°C

进样量: 2.5 μL

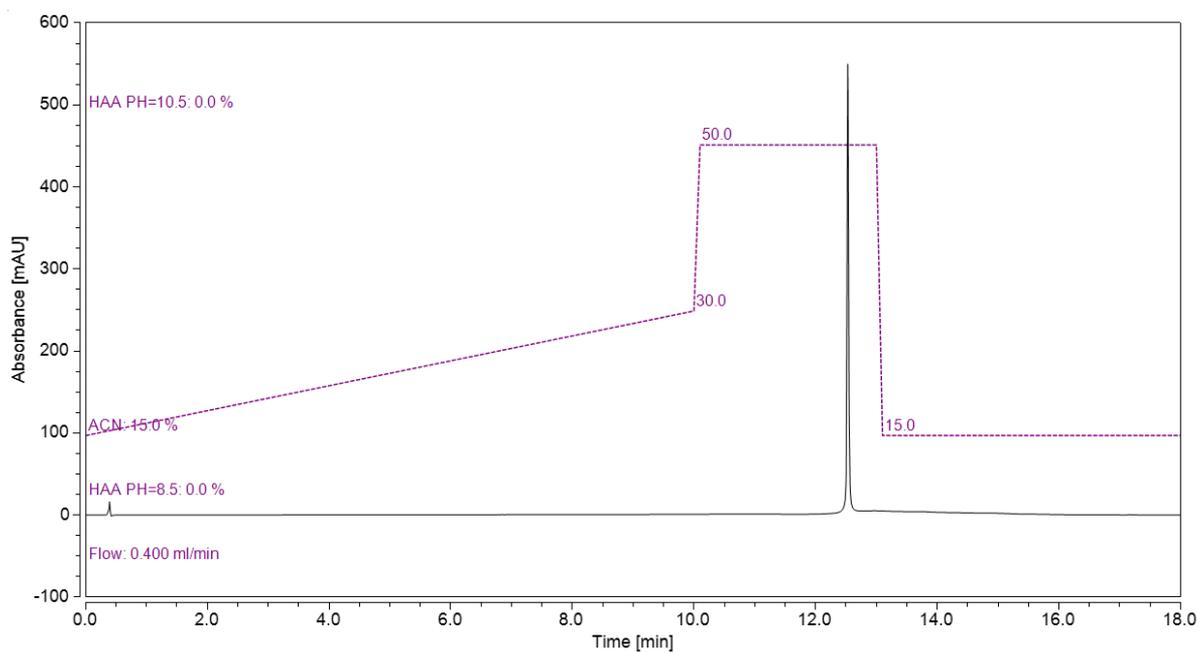
检测波长: 260 nm

梯度条件: 见谱图中

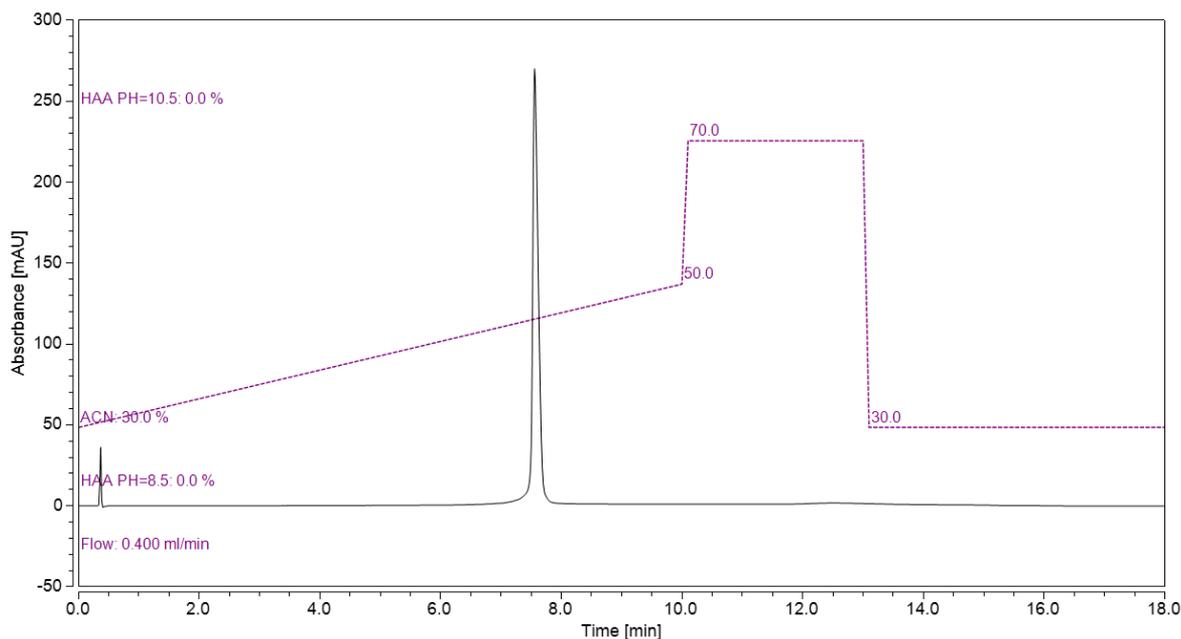
3. 实验结果与讨论

3.1 快速条件摸索

色谱柱选择赛默飞世尔核酸特色色谱柱DNAPacRP, 规格为2.1x50 mm, 参照产品手册选择色谱参数^[3], 流速选择最佳流速0.4mL/min, 试剂选择实验室常用的己胺作为离子对试剂, 配置成25mM的水溶液, 用乙酸调节PH为8.5, 已知mRNA样品约为4000nt, 先尝试15%-30%的乙腈运行10min的梯度, 柱温为60°C, 进行初步的方法摸索, 如图一所示, mRNA在50%乙腈下才能慢慢洗脱出来, 继续调整有机相乙腈的比例为30%-50%运行10min, 如图二所示, 可以得到较为满意的保留和峰型。



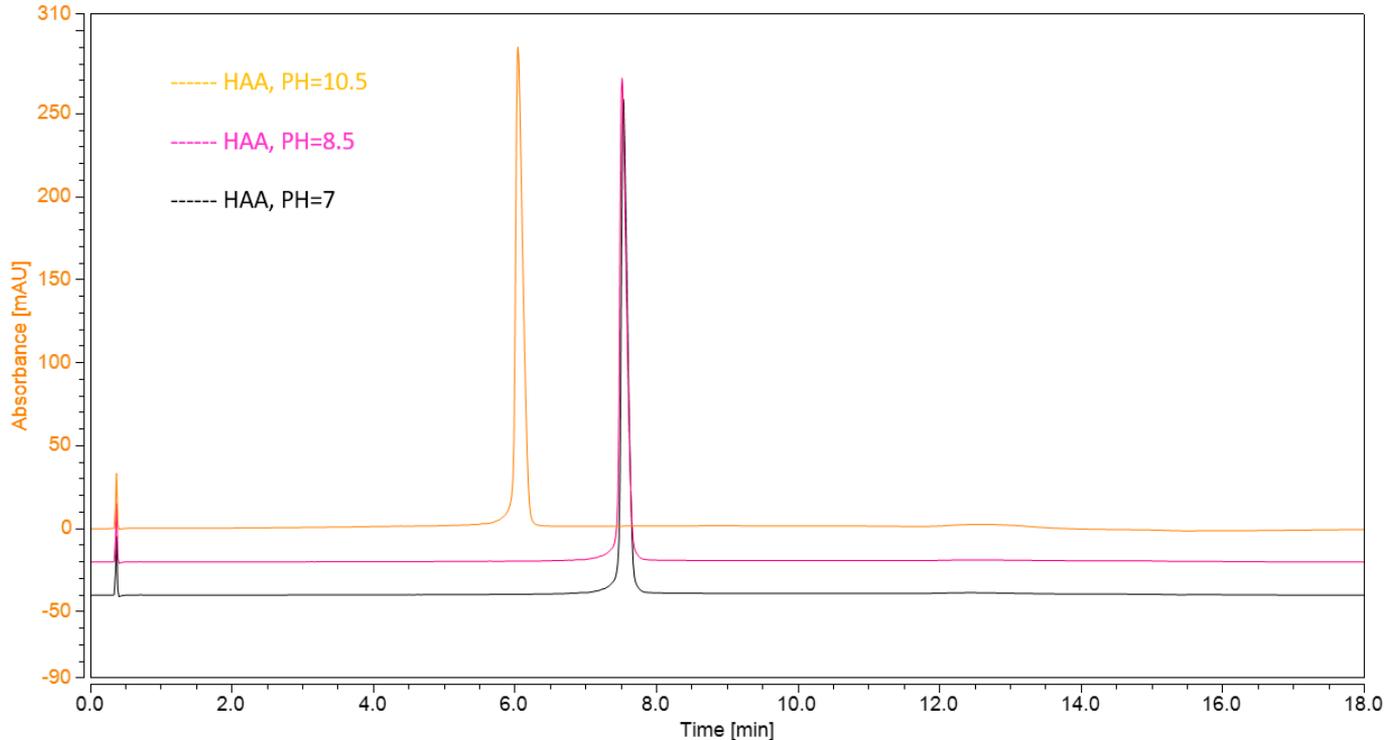
图一 15%-30%乙腈10min梯度的谱图



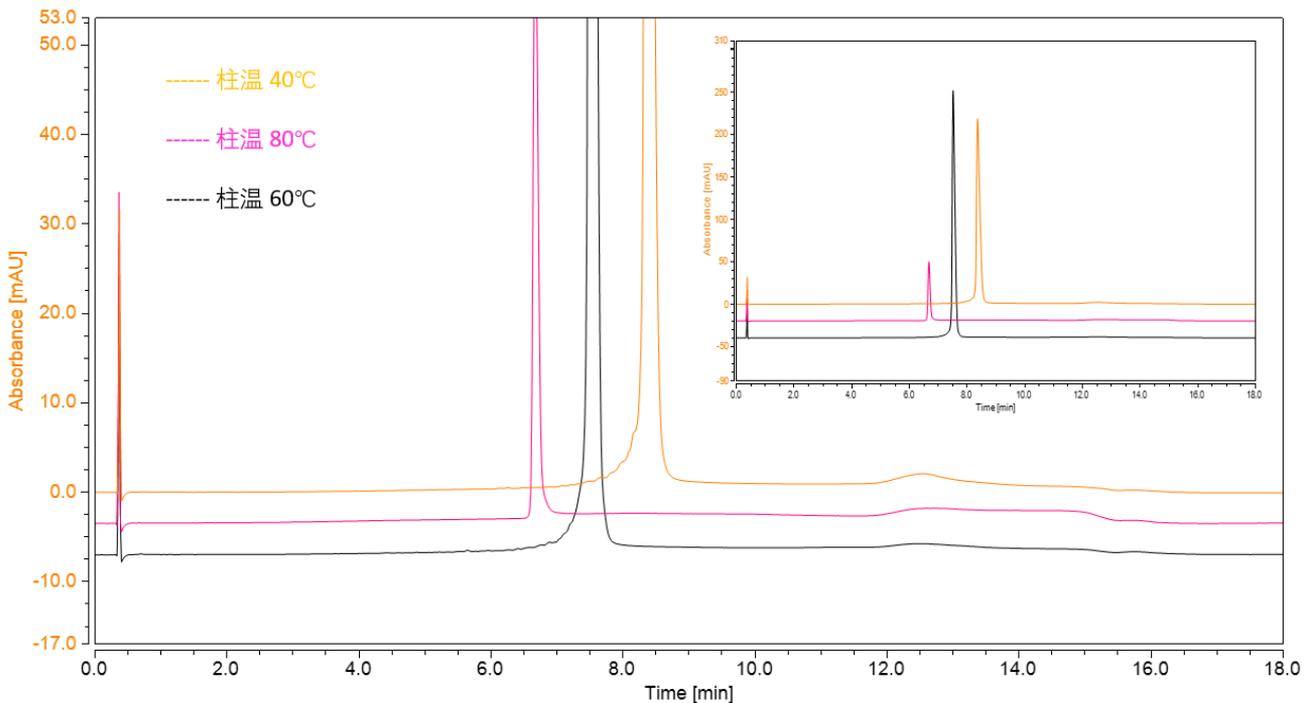
图二 30%-50%乙腈10min梯度的谱图

3.2 考察PH、柱温、离子对试剂种类对保留和峰型的影响

用乙酸调节25mM HA的PH分别为7.0、8.5和10.5，参照图二的条件，结果如图三所示，PH=10.5时保留减弱，峰型前沿相对较大，PH为7.0和8.5是保留和峰型差异不大。选择PH=8.5继续考察柱温的影响，设置柱温为40℃、60℃和80℃，如图四所示，柱温80℃下，峰响应大幅度降低且峰明显产生拖尾，40℃和60℃柱温差异不大。

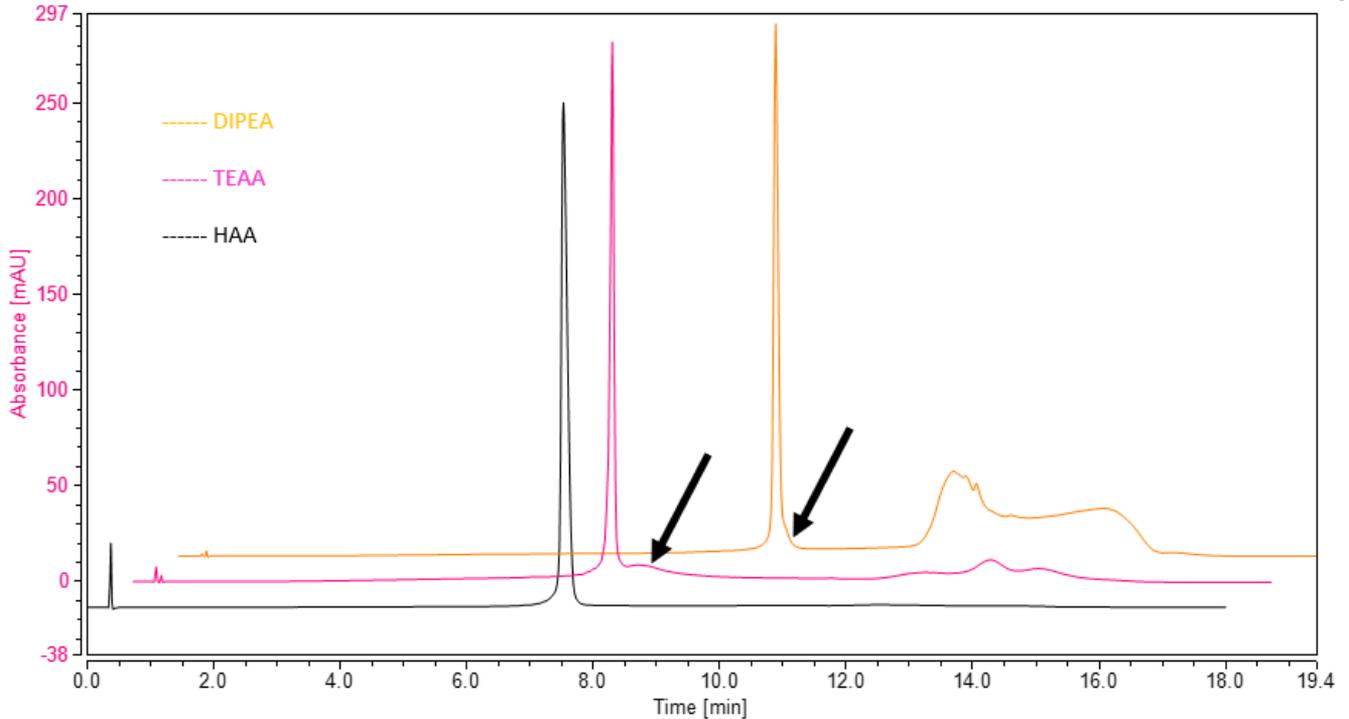


图三 7.0、8.5和10.5三个PH值下的谱图



图四 柱温40℃、60℃和80℃下的谱图（整体图为右上）

选择60℃柱温，离子对试剂水溶液PH为8.5继续考察离子对种类的影响，分别配置成25 mM HA、100 mM TEA、25 mM DIPEA，用乙酸调节PH，以适当的梯度运行10min，如图五所示，HA离子对下能得到较为理想的峰型，TEA和DIPEA下峰型不理想，两者主峰后都出现不同程度的鼓包峰。



3.3 关于方法稳定性的探讨

在mRNA分析中可能会遇到一些方法稳定性的问题，比如保留不稳定、灵敏度下降等，除了离子对试剂浓度变化引起之外，色谱柱污染也会导致上述问题。反相分离模式用于mRNA样品的分析常见的污染问题是残留。90%乙腈水做流动相，60℃的柱温下，以运行方法一半的流速清洗色谱柱10-20倍柱体积或者通过进样10 μL 0.1 mol/L的氢氧化钠，以分析方法中A和B起始比例为流动相，等度运行5min，柱温和流速保持和方法一致，连续运行1-3针可以很好的解决残留问题。

4. 结论

对于4000nt的mRNA可以在赛默飞世尔核酸特色色谱柱DNAPac RP上有合适的保留和峰型，可以作为含量测定的一种手段。DNAPac RP色谱柱1500A大孔径聚合物微球可以耐受0-14的PH和100℃高温，非常适合分子量大的mRNA样品的分析。在此液相方案中己胺离子对试剂选择性最好，可参照本文条件，即25mMHAA，PH=8.5-乙腈体系，柱温60℃做一个快速的方法开发。

5. 参考文献

- [1] Kanavarioti, A. HPLC methods for purity evaluation of man-made single-stranded RNAs, Sci. Rep. 2019, 9, 1019. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37642-z>
- [2] AN 000471-Simultaneous reversed-phase and anion-exchange method scouting with a dual system for mRNA impurity determination
- [3] Thermo Scientific Product Manual for DNAPac RP Columns: DNAPac RP Columns Product Manual. <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-065679-LC-DNAPac-RP-Man065679-EN.pdf>



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
SCIENTIFIC