

用于 mRNA 分析的大孔径聚合物反相 PLRP-S 色谱柱

使用不同分子大小的实验参数和比较分析结果

作者

Jennifer Bouchenna, Claire Butré,
Damien Mouvet, Arnaud Delobel
Quality Assistance S.A.,
Donstiennes, Belgium

Andrew Coffey 和
Andrea Angelo P. Tripodi
安捷伦科技有限公司，
英国彻奇斯特雷顿

摘要

自发现有效的递送方法以来，信使 RNAs (mRNAs) 在医疗保健行业越来越受欢迎。这些复杂的大分子旨在使细胞能够产生有助于对抗疾病的关键蛋白质和酶。mRNA 的合成分为几个阶段：启动、延伸、编辑（加工）和终止。这一过程非常复杂，因此，必须进行全面的质量控制，以确保产生正确的分子，或检测是否存在杂质。杂质也可能是储存期间产物降解的结果。在这方面，液相色谱是一种成熟的分离技术，但要获得有效的分析分离仍充满挑战。在本应用简报中，我们探讨了开发 mRNA 的离子对反相 (IP-RP) 分离方法时的一些关键参数。

前言

基于 mRNA 的疗法正在成为医疗保健领域传统生物疗法的一种安全有效的替代方法。这些治疗性 mRNA 分子经过精心设计，能够递送特定的遗传密码，这些遗传密码进入细胞后可以指导目标蛋白质的合成。这种创新的方法在包括基因疗法、靶向癌症治疗、传染病和心血管疾病在内的各种医学领域均有应用。这些药物还具有高效且易于生产预防性疫苗的优势，已被证明是对抗 COVID-19 传播的一种安全、有效的策略。然而，该领域的一个重大挑战是 RNA 的稳定性，因为这些分子在加工、配制和储存的各个阶段都很容易降解。因此，分析方法在评估 RNA 分子的完整性方面发挥着至关重要的作用。RNA 大分子降解为较小的片段是一种常见的降解途径。通常采用阴离子交换 (AEX)、IP-RP 和体积排阻色谱法 (SEC) 等技术来鉴定这些杂质。在这些技术中，IP-RPLC 经常是首选技术，它可以提供高分离度。IP-RP 能够通过改变色谱条件（包括离子对试剂的选择、柱温和流动相组成）实现对各种 RNA 化合物的表征。传统的烷基键合硅胶固定相孔径相对较小，不适用于尺寸较大的 mRNA 大分子。相比之下，聚合物反相吸附剂（例如基于聚苯乙烯/二乙烯基苯的 PLRP-S）更具优势，并且能够提供更大的孔径（包括 1000 Å 和 4000 Å）。在本应用简报中，我们使用两种模型 mRNA 化合物 Cas9 mRNA 和 EPO mRNA 考察了 1000 Å 和 4000 Å PLRP-S 色谱柱的性能差异。Cas9 mRNA 编码 CRISPR 相关蛋白 9，长度为 4521 个核苷酸；EPO mRNA 的长度仅 855 个核苷酸。

实验部分

试剂与化学品

所有试剂均为 HPLC 级或更高等级。

仪器

使用配备紫外检测器的 UHPLC 仪器。方法参数列于表 1 中。

样品前处理

Cas9 mRNA 和 EPO mRNA 来自 TriLink BioTechnologies，且溶于不含 RNA 酶的水中，浓度为 0.5 mg/mL。

通过加热至 85 °C 并持续 2 小时来进行热降解。

流动相配制

使用 1 M TEAA 溶液配制流动相。将该溶液用合适的溶剂稀释。利用乙酸将各溶液的 pH 值调节至 pH 7。

表 1. 方法条件

	HPLC 条件
色谱柱	(A) Agilent PLRP-S 1000 Å, 2.1 × 50 mm, 5 µm (B) Agilent PLRP-S 4000 Å, 2.1 × 50 mm, 5 µm
流动相	洗脱液 A: 0.1 M TEAA 水溶液 洗脱液 B: 0.1 M TEAA 的 50/50 ACN/水溶液
流速	0.2 mL/min
柱温	75 °C
进样量	2 µL
检测	UV, 260 nm
总运行时间	23 分钟

表 2. 梯度

时间	%A	%B
0	85	15
15	60	40
17	0	100
20	0	100
20.5	85	15
23	85	15

结果与讨论

最初，测试了使用含 0.1 M TEAA 水溶液和 0.1 M TEAA 的 25% 乙腈/水溶液的流动相洗脱 mRNA 样品。然而，这些分析条件下产生的峰形并不符合要求，即使在柱温 75 °C 下，也会出现峰前伸现象和明显的峰展宽。因此，通过将流动相 B 中的乙腈浓度增加至 50% v/v 并在梯度结束时增加净化步骤，对分析方法进行了改进。核酸与 TEAA 离子之间的相互作用使该复合物具有疏水性，改善了它与色谱柱固定相的相互作用。乙腈是一种添加剂，可以降低流动相的极性，改善核酸离子对片段从色谱柱上的洗脱。分离过程基于片段大小：随着乙腈百分比的升高，更大的核酸能够实现洗脱。分离梯度从 15% 至 40% B，流速为 0.2 mL/min（线性流速 345 cm/h）且柱温为 75 °C。

图 1a 和 1b 分别为使用上述条件所得到的 Cas9 mRNA 在 PLRP-S 4000 Å 和 PLRP-S 1000 Å 色谱柱上的洗脱曲线。孔径较大 (4000 Å) 的色谱柱能够改善完整 mRNA 与杂质之间的分离。为了评估方法和色谱柱性能，将 Cas9 mRNA 和 EPO mRNA 样品在 85 °C 加热 2 小时。观察到热处理后的 Cas9 mRNA 的洗脱时间早于天然 Cas9，并且在主峰之前洗脱出小峰，表明存在小分子片段。还观察到主峰的峰面积减小以及杂质的峰面积增加。

EPO mRNA 也获得了类似的结果（图 2a 和 2b）。对于天然 EPO mRNA 和热处理后的 EPO mRNA 样品，与 PLRP-S 1000 Å 色谱柱相比，4000 Å 色谱柱表现出更优异的分选性能和峰分离度。热处理似乎并没有改变主峰的保留时间，但出现了更多较早洗脱的杂质，采用更大孔径的 PLRP-S 4000 Å 色谱柱能够更清晰地观察到这些杂质。热处理还导致主峰的峰面积减小以及杂质的峰面积增加。此方法的一个显著特征是运行时间显著缩短 (15 min) 和峰宽明显变窄。此方法证明了使用 PLRP-S 色谱柱能够分离各种长度的 mRNA。

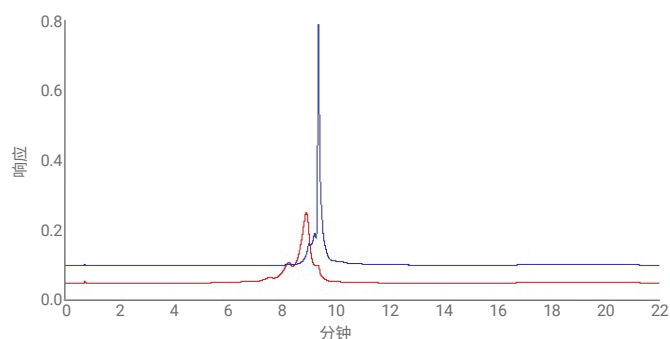


图 1a. Cas9 mRNA（蓝色：天然；红色：热处理）在 Agilent PLRP-S 4000 Å 色谱柱上的洗脱曲线

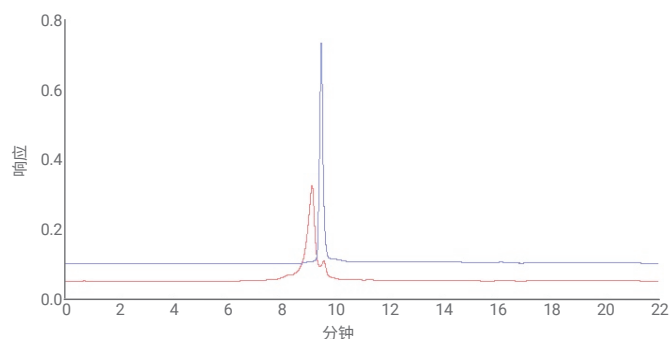


图 1b. Cas9 mRNA（蓝色：天然；红色：热处理）在 Agilent PLRP-S 1000 Å 色谱柱上的洗脱曲线

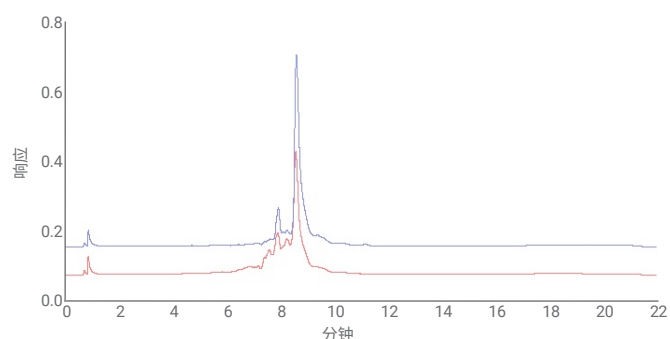


图 2a. EPO mRNA（蓝色：天然；红色：热处理）在 Agilent PLRP-S 4000 Å 色谱柱上的洗脱曲线

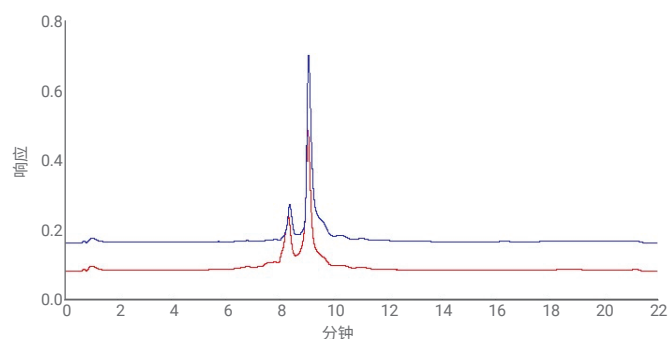


图 2b. EPO mRNA（蓝色：天然；红色：热处理）在 Agilent PLRP-S 1000 Å 色谱柱上的洗脱曲线

然而，尽管 4000 Å 色谱柱的传质有所改善，但仍有少量物质被保留在色谱柱上（可接受范围内），并对后续进样造成交叉污染，这种情况并不少见。对于较大的 mRNA，交叉污染现象会略微更明显，但仍低于 2.5%（图 3a 和 3b）。此外，交叉污染现象也可能受到进样量、分析条件（梯度斜率、流速、温度）以及梯度曲线中是否包含高含量有机物清洗的影响。

结论

我们开发了一种 IP-RP 方法用于 mRNA 样品的纯度测定。各种长度的 mRNA 样品在较短的分析时间内实现了良好的洗脱和分离，且交叉污染较低。PLRP-S 聚合物材料是一种理想的选择，为所研究的 mRNA 提供了理想的孔径。更具体而言，使用 Agilent PLRP-S 4000 Å 色谱柱，天然样品和热处理后的样品均轻松获得了高分离度和出色的峰分离。

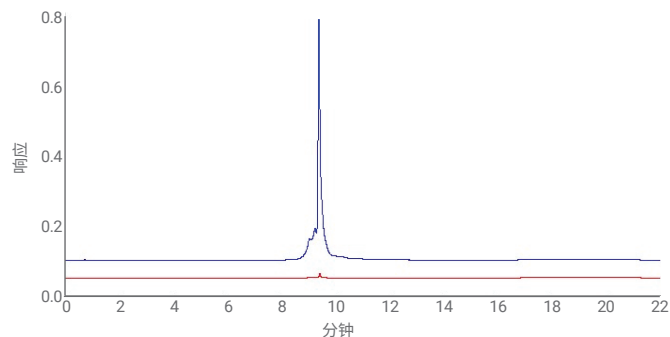


图 3a. Cas9 mRNA（蓝色：天然；红色：后续空白中的交叉污染）在 Agilent PLRP-S 4000 Å 色谱柱上的洗脱曲线

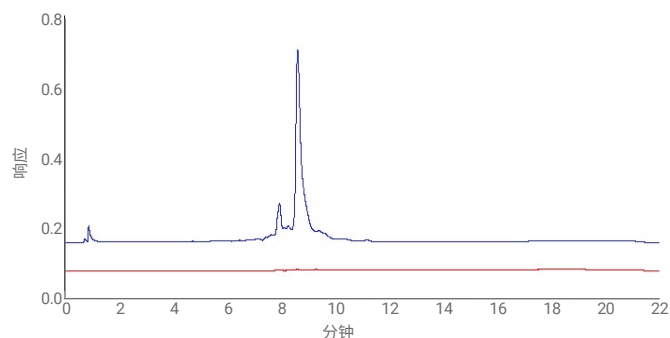


图 3b. EPO mRNA（蓝色：天然；红色：后续空白中的交叉污染）在 Agilent PLRP-S 4000 Å 色谱柱上的洗脱曲线

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem

DE39329943

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2024
2024 年 3 月 20 日，中国出版
5994-7199ZHCN