

mRNA的阴离子交换色谱分析方法

Szabolcs Fekete, Hua Yang, Stephan M. Koza, Kevin Wyndham, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

摘要

mRNA治疗药物和疫苗是一类相对较新的生物药物，已出现显著增长并在各种生物技术应用中表现出巨大潜力。因此，需要评估mRNA样品分析方法（特别是在较少变性的条件下）的异质性。本应用纪要证明，在中性pH条件下以30–50 °C柱温使用阴离子交换柱可能适用于此类分析。离子对和经典盐梯度条件均可应用。本文探讨了温度对阴离子交换柱的影响以及如何利用该色谱柱检测mRNA分子的构象变化。

优势

- 快速定量分析mRNA样品
- 在本研究应用的条件下，mRNA的一级结构和序列得以保留，从而可以分析完整结构的异质性
- 通过优化柱温来调整保留性、峰形和回收率
- 离子对和经典盐梯度条件均可应用

简介

信使RNA (mRNA)在疾病治疗和预防中的应用目前发展迅猛，已有数百万人成功接种了对抗SARS-CoV-2的mRNA疫苗。mRNA是DNA基因序列的转录本形式。在细胞主体内，mRNA与核糖体（一种细胞器）结合，然后将核苷酸序列翻译成氨基酸序列或蛋白质。mRNA治疗药物和疫苗现在代表了一类主要的新型先进治疗药品(advanced therapy medicinal product, ATMP)。这些先进的mRNA药物及候选疫苗需要采用灵敏且信息丰富的分析方法来

表征生物物理特性。现行的参考方法是在高温和添加有机助溶剂的条件下采用离子对反相液相色谱(IP-RP)¹⁻⁴。另一种常用方法是采用毛细管凝胶电泳(CGE)⁵。

如果能够建立改善的方法，阴离子交换(AEX)色谱分离有可能成为一种分析完整mRNA的可靠手段。很少有文献提到关于mRNA的分析级阴离子交换分离方法。迄今为止报告的离子交换方法中，分离度最高的一种是采用薄膜颗粒固定相和中性pH氯化钠或高氯酸钠盐梯度与60 °C相结合，或在10 °C下采用异常高的pH 12盐梯度进行分离⁶。这些分离条件可能不适合保留mRNA以理想状态分析其完整结构的异质性。之所以应用这类相对严苛的条件，主要原因在于较长寡核糖核苷酸（例如长度超过50个核苷酸）结构的分子内相互作用距离短，并排列有各种易接近的碱基堆积构象⁷。它们的自身结构可能导致存在若干构象异构体。变性条件（例如高pH、高温和添加有机助溶剂）可通过破坏碱基配对和碱基堆积相互作用促进分离。在某些条件下，mRNA可能由此发生线性化，从而有机会分离并洗脱为更尖锐的色谱峰。

本文对mRNA离子交换液相色谱分析提出了一种变性条件更少的替代技术，即执行盐梯度离子交换分离，但选用的盐来自一系列同样能产生离子对效应的试剂。本实验用于梯度洗脱的盐为四甲基氯化铵，结合柱温40 °C进行分离。除离子对盐之外，也可以使用NaCl、KCl或NaClO₄等常用盐梯度进行简单的离子置换分离，但从结果可以看出，可能需要60 °C的高柱温才能实现高分离度分离。

实验

样品和流动相制备

EPO mRNA（长度：858个核苷酸）和Cas9 mRNA（长度：4521个核苷酸）购自TriLink Biotechnologies（美国加利福尼亚州圣地亚哥）。将样品用水稀释至25 µg/mL，然后直接进样，无需进一步前处理。

液相色谱条件

条件A（AEX经典盐梯度）

液相色谱系统：

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio（四元）

检测条件：

UV检测（波长260 nm）

样品瓶：

聚丙烯样品瓶（部件号：186002639）

色谱柱: Protein-Pak High Res Q, 5 μ m, 4.6 \times 100 mm (部件号: 186004931)

柱温: 60 $^{\circ}$ C

样品温度: 5 $^{\circ}$ C

进样体积: 5.0 μ L (样品)

流速: 0.6 mL/min

流动相A: 25 mM TRIS水溶液(pH = 7.6)

流动相B: 2 M氯化钠(NaCl)的25 mM TRIS溶液(pH = 7.6)

梯度: 推荐的梯度倾斜度: 4–5 Δ B%/min
例如, 流动相B在12 min从20%增加到70%

条件B (AEX离子对)

液相色谱系统: ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio (四元)

检测条件: UV检测 (波长260 nm)

样品瓶: 聚丙烯样品瓶 (部件号: 186002639)

色谱柱: Protein-Pak High Res Q, 5 μ m, 4.6 \times 100 mm (部件号: 186004931)

柱温: 40 $^{\circ}$ C

样品温度: 5 $^{\circ}$ C

进样体积：	5.0 μ L（样品）
流速：	0.6 mL/min
流动相A：	25 mM TRIS水溶液(pH = 7.6)
流动相B：	3 M四甲基氯化铵(TMAC)的25 mM TRIS溶液(pH = 7.6)
梯度：	推荐的梯度倾斜度：4–5 Δ B%/min 例如，流动相B在10 min从60%增加到100%

色谱柱活化

使用至少20-50倍柱体积的流动相平衡色谱柱。然后对目标样品进行几次连续(3-4)高载样量进样，以活化固定相的活性位点。在开始定量分析之前，确保连续进样的峰面积相对标准偏差足够低（例如，RSD < 2%）。

结果与讨论

AEX经典盐梯度

我们选择两个样品（Cas9和EPO mRNA）作为代表性示例来证明无孔季胺阴离子交换剂在mRNA分析中的适用性。使用Tris缓冲流动相以及NaCl盐梯度，柱温范围为30~60 $^{\circ}$ C。在这些条件下，样品在60 $^{\circ}$ C时分离度最高（图1）。60 $^{\circ}$ C柱温下的峰拖尾也更小。

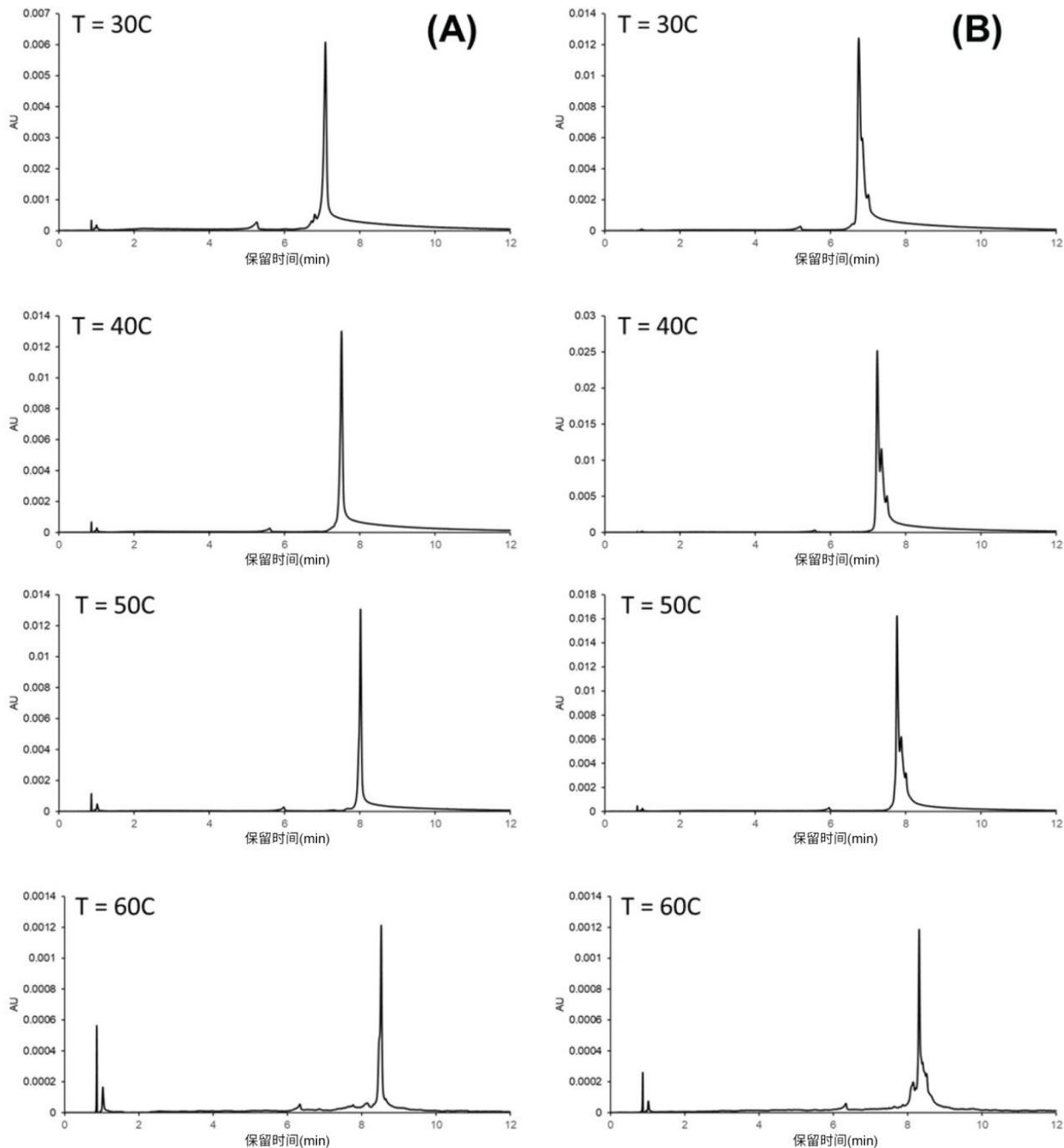


图1.Cas9 mRNA (A)和EPO mRNA (B)的离子交换分离结果，使用阴离子交换柱、Tris缓冲流动相和氯化钠梯度结合一系列不同的柱温(30~60 °C)。

AEX离子对

使用烷基铵盐作为流动相添加剂分离DNA片段⁸⁻¹⁰。与常用的NaCl或KCl相比，烷基铵盐的有趣之处体现在，它能够使核酸片段主要按长度（大小）递增顺序洗脱。此外，四甲基氯化铵作为流动相盐最近已用于分离腺相关病毒

的空衣壳和完整衣壳¹¹。

第二个示例探讨了替代流动相的潜在优势，即使用Tris缓冲流动相和四甲基氯化铵盐梯度分离Cas9和EPO mRNA样品，柱温同样为30~60 °C。从这些分离可以看出，样品在大约40 °C的较低柱温下分离度最高。在40 °C时观察到EPO mRNA样品中两种酸性变体获得基线分离。使用NaCl梯度时，无论柱温为多少，都无法获得该分离度。因此，该示例表明，在应用四甲基氯化铵梯度、中性pH流动相且柱温不超过50 °C的条件下，可以获得独特的结果。该方法可以实现更高的分离度，我们相信这种分离能够更准确地反映mRNA样品完整性（图2）。虽然需要执行额外工作，但四甲基氯化铵盐梯度与小于或等于60 °C的分离温度相结合，可能特别适用于单链核酸分析。

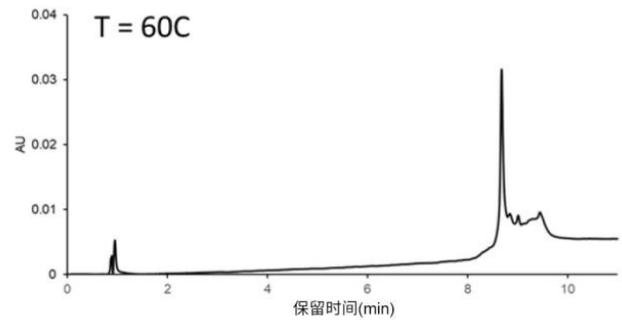
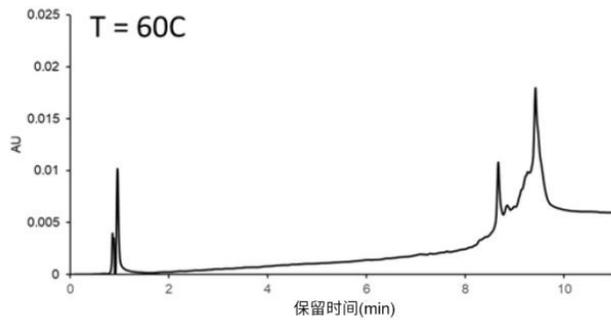
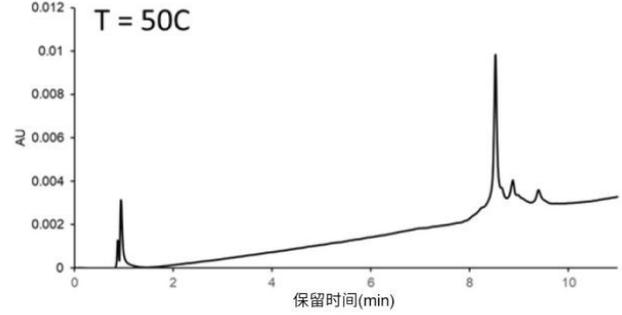
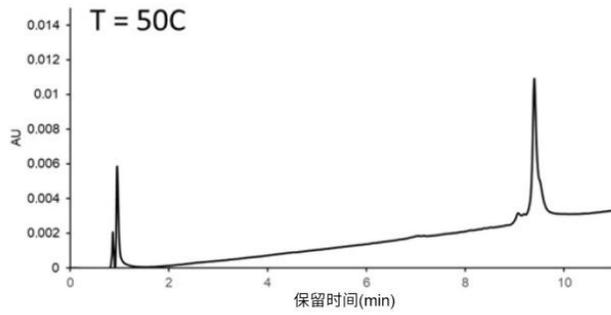
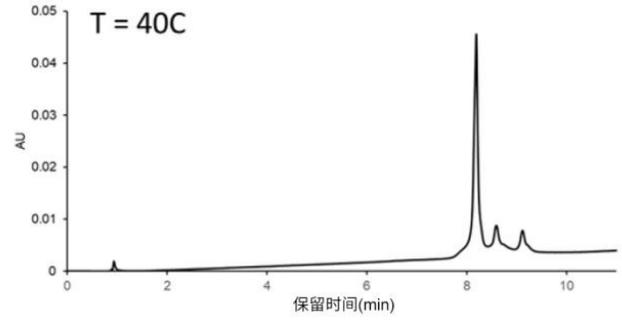
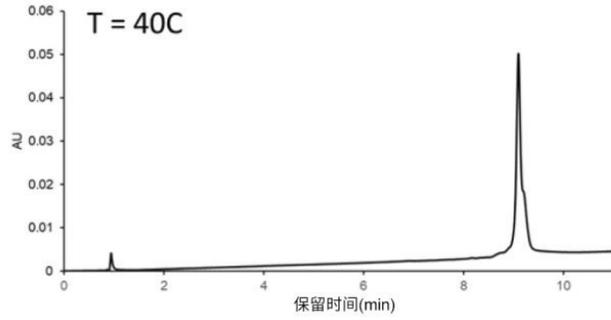
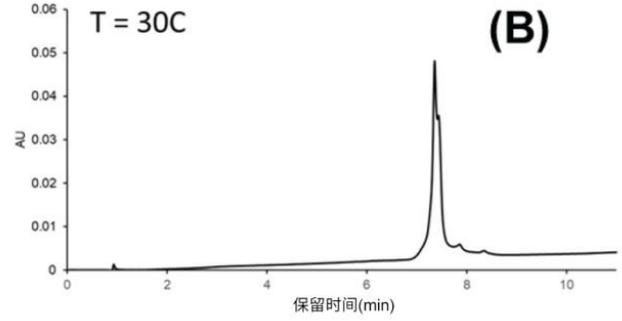
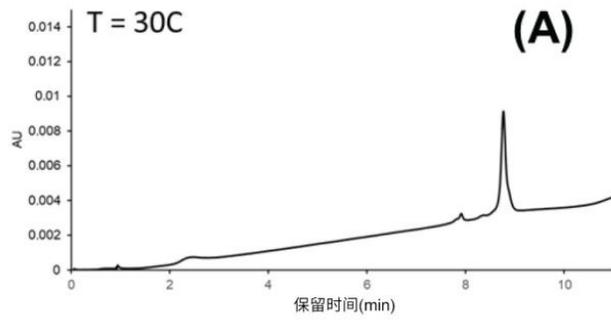


图2.Cas9 mRNA (A)和EPO mRNA (B)的离子交换分离结果，使用阴离子交换柱、Tris缓冲流动相和四甲基氯化铵梯度结合一系列不同的柱温(30~60 °C)。

结论

mRNA序列由核糖体翻译成蛋白质，并且代表了一类新型先进治疗药品。表征、监测和放行mRNA候选药物需要采用灵敏且信息丰富的分析方法。在若干分析技术中，IP-RPLC是较为成熟的一种参考方法。现行IP-RPLC方法通常采用严苛条件，这些条件可能不适合研究mRNA自身结构或内在异质性。本文提出了一种变性条件较少的阴离子交换方法作为IP-RPLC的替代选择。Protein-Pak High Res Q阴离子交换柱在经典盐梯度和离子对分离模式下为mRNA样品提供了合适的峰形和选择性。我们提出了两种方法，一种方法运行氯化钠梯度，另一种方法则使用四甲基氯化铵梯度。我们发现，在梯度倾斜度为4–5 $\Delta B\%/min$ 、流速为0.5–0.6 mL/min时，能够更好地平衡分离度与分析时间。对于大多数mRNA样品，40–50 $\Delta B\%$ 的梯度范围足以满足要求，并可针对任何mRNA轻松调整。除梯度倾斜度和 $\Delta B\%$ 范围外，柱温也是一个重要的方法变量，它可以影响回收率、保留性和峰形。温度会改变mRNA的自身结构。因此，测试柱温对色谱指标（包括保留性和回收率）的影响可能很有用，从而能够对mRNA分子的折叠和自身结构进行独特的观察。

参考资料

1. A. Azarani, K.H. Hecker, RNA Analysis by Ion-Pair Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 2–9. <https://doi.org/10.1093/nar/29.2.e7>.
2. J.M. Nguyen, S.H. Chan, B. Roy, M. Gilar, B. Robb, W. Chen, M.A. Lauber, 使用离子对反相液相色谱法和 BioAccord LC-MS系统快速分析合成的mRNA帽状结构, 沃特世应用纪要, 2021 [720007329ZH](https://doi.org/10.1093/nar/29.2.e7).
3. Z. Huang, S. Jayaseelan, J. Hebert, H. Seo, L. Niu, Single-Nucleotide Resolution of RNAs Up to 59 Nucleotides by High Performance Liquid Chromatography. *Anal Biochem.* 435 (2013), 35–43, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.12.011>.
4. Z. Huang, C.Y. Lin, W. Jaremko, L. Niu, HPLC Purification of RNA Aptamers up to 59 Nucleotides with Single-Nucleotide Resolution. *Methods Mol Biol.* 1297 (2015) 83–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2562-9_6.
5. M. Barciszewska, A. Sucha, S. Bałabańska, M.K. Chmielewski, Gel Electrophoresis in a Poly-Vinylalcohol Coated Fused Silica Capillary for Purity Assessment of Modified and Secondary-Structured Oligo- and Polyribonucleotides. *Sci Rep.* 6 (2016) 19437. <https://doi.org/10.1038/srep19437>.
6. A. Kanavarioti, HPLC Methods for Purity Evaluation of Man-Made Single-Stranded RNAs, *Scientific Reports* 9, 2019, 1–13, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37642-z>.
7. S. Halder, D. Bhattacharyya, RNA Structure and Dynamics: A Base Pairing Perspective. *Prog Biophys*

*Mol Biol.*113 (2013) 264–283, <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2013.07.003> <
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2013.07.003>>.

8. 欧洲专利申请, EP0691148A2.
9. 美国专利, 5856192.
10. H. Yang.S.M. Koza, W. Chen, Separation and Size Assessment of dsDNA Fragments by Anion-Exchange Chromatography (AEX), Waters Application Note, 2021, [720007321EN](#).
11. H. Yang.S.M. Koza, W. Chen, Anion-Exchange Chromatography for Determining Empty and Full Capsid Contents in Adeno-Associated Virus, Waters Application Note, 2021, [720006825EN](#).

特色产品

- [ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <https://www.waters.com/10166246>](https://www.waters.com/10166246)

720007412ZH, 2021年10月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.