

使用BioAccord LC-MS系统通过离子对反相LC-MS方法分析Poly(A)尾异质性

Catalin E. Doneanu, Joseph Fredette, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

本应用纪要展示了使用BioAccord LC-MS系统分析mRNA的Poly(A)尾异质性的优势。

优势

- 使用搭载waters_connect信息学平台的BioAccord LC-MS系统开发的LC-MS分析方法，能够稳定地分析mRNA Poly(A)尾长度和异质性，包括测定Poly(A)尾寡核苷酸区域的平均分子量，这是研究治疗性mRNA和预防用mRNA时的常见分析项目。

简介

最近，信使RNA (mRNA)成为了一类新兴生物药物，佐证实例之一是科研人员基于SARS-CoV-2刺突蛋白mRNA序列编码成功开发出两种高效的疫苗并获批投入使用¹⁻²。开发能监测mRNA分子关键属性的分析方法对于有效控制生产工艺至关重要，但为诸如mRNA疫苗之类分子比较大的mRNA (>1,000个核苷酸) 开发分析方法的难度相当大。

Poly(A)尾是所有治疗性mRNA都有的功能结构之一，它是分子3'端仅包含腺苷残基的长序列 (50~250个核苷酸)

3-6。分析时，通常使用核糖核酸酶T1 (RNase T1)裂解鸟苷残基后的序列，从mRNA分子中分离出3'端寡核苷酸7-8。本研究考察了BioAccord LC-MS系统对Poly(A)尾寡核苷酸片段进行完整分子量分析的能力。

实验

试剂和样品前处理

N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA, 纯度99.5%, 产品目录号387649-100ML)、1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇 (HFIP, 纯度99%, 产品目录号105228-100G)、乙醇 (HPLC级, 产品目录号459828-2L) 和碳酸氢铵 (LiChropur LC-MS Supelco试剂, 产品目录号5330050050) 购自Millipore Sigma (美国密苏里州圣路易斯)。乙腈 (LC-MS级, 产品目录号34881-1L) 和甲醇 (LC-MS级, 产品目录号34966-1L) 购自Honeywell (美国北卡罗来纳州夏洛特)。HPLC级I级去离子(DI)水使用MilliQ系统 (密理博公司, 美国马萨诸塞州贝德福德) 净化。流动相每日现配现用。

用于mRNA酶解的无核酸酶超纯水 (产品目录号J71786.AE) 购自Thermo Fisher Scientific (美国马萨诸塞州沃尔瑟姆)。

20 nmol的120 mer多腺苷mRNA寡核苷酸 (Poly (A)尾) 购自Integrated DNA Technologies (美国艾奥瓦州克拉尔维尔)。该寡核苷酸序列第28位掺入了一个胞苷, 第56位掺入了一个尿苷, 第84位掺入了一个鸟苷, 并且第112位掺入了另一个尿苷, 具体序列为5'- AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA CAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AUA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAG AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA UAA AAA AAA -3'。在Poly (A)尾序列中掺入这四个残基是为了让120 mer RNA核苷酸在化学合成过程中更稳定。未使用HPLC进一步纯化120 mer全长寡核苷酸产物(FLP), 以防止其在大规模色谱纯化过程中发生降解。合成Poly (A)尾寡核苷酸的元素组成为C1197 H1439 N592 O724 P119, 平均分子量为39,388.64 Da。

用去离子水配制浓度为10 μ M的Poly (A)尾寡核苷酸储备液, 进样5 μ L, 相当于柱上进样50 pmol的120 mer寡核苷酸。

萤火虫荧光素酶mRNA (Fluc- β mRNA, 产品目录号M1436/1000-C1-A120-NM-PO, 浓度1.63 mg/mL) 购自Amp Tec (德国汉堡)。使用来自米曲霉的核糖核酸酶T1 (RNase T1) (购自Millipore Sigma, 产品目录号R1003-100KU) 酶解mRNA。酶解mRNA时, 将20 μ L Fluc mRNA与5 μ L酶解缓冲液 (100 mM碳酸氢铵)、13 μ L无核酸酶超纯水和2 μ L经1:100稀释的RNase T1硫酸铵溶液 (同样使用无核酸酶超纯水制备) 混合。在QuanRecovery MaxPeak 300 μ L样品瓶中制备酶解混合物, 置于37 $^{\circ}$ C下温育15 min, 然后立即进行LC-MS分析。

使用UNIFI应用程序2.1.2.4版采集所有数据集, 然后使用waters_connect信息学平台中的INTACT Mass应用程序

1.6.0.18版进行处理。

采用MaxEnt 1电荷去卷积算法处理寡核苷酸ESI-MS谱图，得到准确的完整分子量测量结果。

液相色谱条件

LC-MS系统：	配备ACQUITY Premier UPLC（二元）的 BioAccord LC-MS系统
保护柱：	VanGuard FIT柱套（P/N：186007949），装有一根填充1.7 μm BEH C ₁₈ 颗粒的2.1 × 5 mm ACQUITY Premier FIT柱芯（P/N：186009459）
色谱柱：	ACQUITY Premier OST色谱柱, 1.7 μm, 130 Å, 2.1 × 50 mm（P/N：186009484）
柱温：	60 °C
流速：	300 μL/min
流动相：	溶剂A：8 mM DIPEA（N,N-二异丙基乙胺），40 mM HFIP（1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇），溶于去离子水中，pH 8.8 溶剂B：4 mM DIPEA，4 mM HFIP，溶于75%乙醇中
样品温度：	6 °C
样品瓶：	QuanRecovery MaxPeak HPS样品瓶（P/N：186009186）
进样体积：	5 μL

清洗溶剂

清除溶剂： 50%甲醇

样品管理器清洗溶剂： 50%甲醇

密封清洗液： 20%乙腈的去离子水溶液

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	溶剂A含量 (%)	溶剂B含量 (%)	曲线图
0.00	0.3	100	0	初始
10.00	0.3	85	15	-
10.50	0.3	15	85	6
11.00	0.3	15	85	6
11.10	0.3	100	0	6
15.00	0.3	100	0	6

质谱条件

采集模式： 全扫描

电离模式： ESI(-)

毛细管电压： 0.8 kV

锥孔电压： 45 V

离子源温度： 120 °C

脱溶剂气温度： 500 °C

脱溶剂气体(N₂)压力： 6.5 bar

TOF质量范围:	400-5000
采集速率:	2 Hz
实时校正标准液:	waters_connect实时校正标准液 (P/N: 186009298)
用于数据采集和处理的信息学平台:	waters_connect
数据采集:	UNIFI应用程序2.1.2.4版
数据处理:	INTACT Mass应用程序1.6.0.18版

结果与讨论

自1961年mRNA被发现以来，已经有很多研究提出用mRNA来治疗各种疾病²。有几种组成结构是所有治疗性mRNA和预防用mRNA分子共有的，包括位于分子5'端的端帽序列、两个非翻译区、开放阅读框(ORF)序列 - 编码目标基因，以及位于分子3'端的Poly(A)尾。这些组成结构如图1中的示意图所示。合成mRNA在结构上与天然存在的细胞mRNA相似，但它们经过工程改造，具有经过修饰的端帽序列（约50个核苷酸）⁹以及由50~250个腺苷组成的长链Poly(A)尾³⁻⁶。这两个经过修饰的区域是治疗性mRNA的关键质量属性(CQA)，在体外转录(IVT)细胞机制识别mRNA的过程中发挥着重要作用。此外，5'-端帽和3'-Poly(A)尾可提高IVT过程的效率¹。最后，由于端帽和Poly(A)尾区域分别位于mRNA分子的两端，它们在保持合成mRNA的稳定性方面发挥着关键作用。



图1.mRNA分子组成结构的示意图位于3'端的Poly(A)尾寡核苷酸是RNase T1处理后产生的典型裂解产物。

合成Poly(A)尾寡核苷酸LC-MS方法优化

文献中已经报道过好几种分析完整5'-端帽寡核苷酸和完整Poly(A)尾变体的LC-MS分析方法^{10-13,14,15}。出于多方面的原因，Poly(A)尾的LC-MS表征相较于5'-端帽寡核苷酸分析更具挑战性。Poly(A)尾的核苷酸序列更长，因此在负离子模式的ESI-MS研究中，相较于比它短得多的端帽序列而言，Poly(A)尾更难电离。此外，Poly(A)尾的异质性较高，制备后稳定性不理想，极易发生酶降解。不仅如此，不同物种合成Poly(A)尾的生物过程尚不完全清楚，因此很难准确预测IVT过程可能产生的所有不同序列变体³⁻⁶。基于上述原因，我们决定在初步实验中使用化学合成的Poly(A)尾类似物，以利更好地控制寡核苷酸序列，而且120 mer寡核苷酸经工程改造后，溶于去离子水中的稳定性更高，适用于长期LC-MS研究（样品溶解后最长可保持稳定达4周）。

我们首先采用适合分离短链寡核苷酸（例如分离通常由20~25个核苷酸组成的siRNA寡核苷酸及其杂质）的离子对流动相来分析合成Poly(A)尾¹⁶⁻¹⁸。图2是分离粗制（未纯化）合成120 mer Poly(A)低聚物得到的UV色谱图。由图可见色谱峰很宽（约0.3 min），说明TEA（三乙胺）离子对试剂显然不适合用于分离这种分子比较大的寡核苷酸。

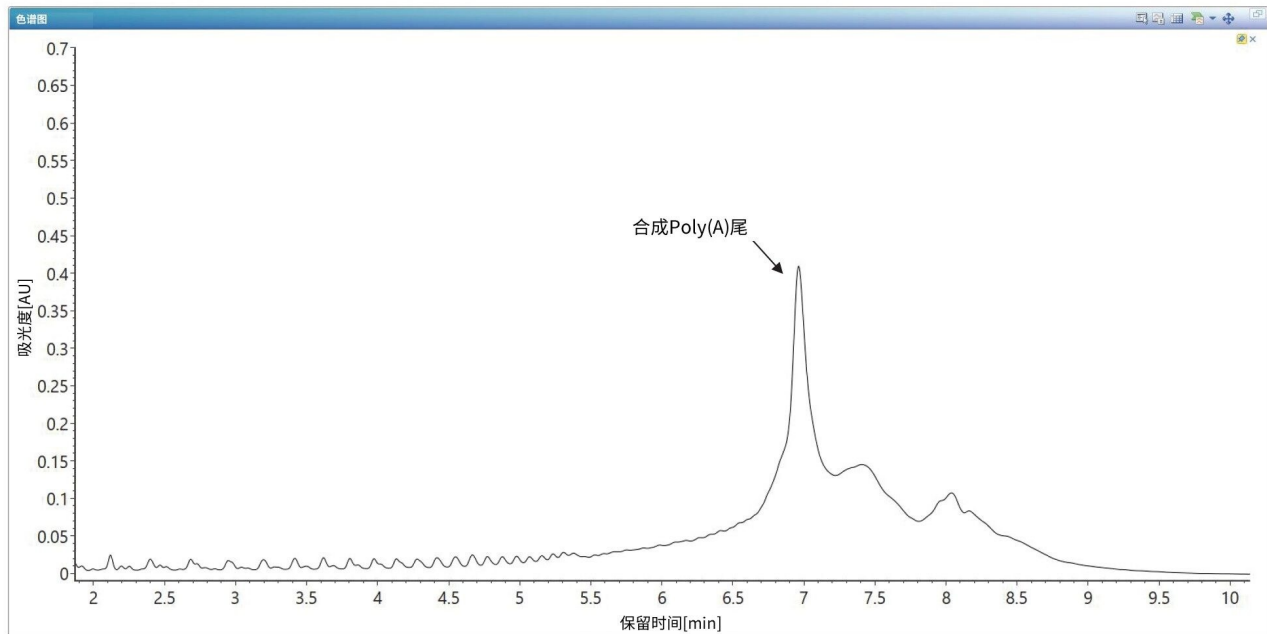


图2.使用TEA（三乙胺）作为离子对试剂，对120 mer合成Poly(A)尾寡核苷酸进行IP-RP分离所得的TUV色谱图。溶剂A为含7 mM TEA和40 mM HFIP的去离子水溶液，溶剂B为含3.5 mM TEA和20 mM HFIP的50%甲醇溶液。TEA会导致产生相当宽的色谱峰（峰宽为0.3 min），因此不适用于分离较大的寡核苷酸(>40 mer)。

有文献建议使用支化离子对试剂 - DIPEA (N,N-二异丙基乙胺) 分离较大的寡核苷酸, 包括通常为100 mer的单向导RNA寡核苷酸(sgRNA)^{7,19}。如图3中的叠加UV色谱图所示, 存在DIPEA时, Poly(A)尾的色谱峰形状显著改善 (峰宽约0.1 min)。为了优化120 mer寡核苷酸的ESI-MS谱图强度, 我们分别使用甲醇、乙腈和乙醇这三种不同的有机溶剂作为流动相B洗脱液开展了研究。甲醇是TEA分离短链寡核苷酸的常用溶剂, 但在分离较大的寡核苷酸时, 其他两种有机溶剂 (乙腈和乙醇) 产生的Poly(A)尾峰要略微尖锐一些, 如图3中的色谱图所示¹⁶⁻¹⁸。

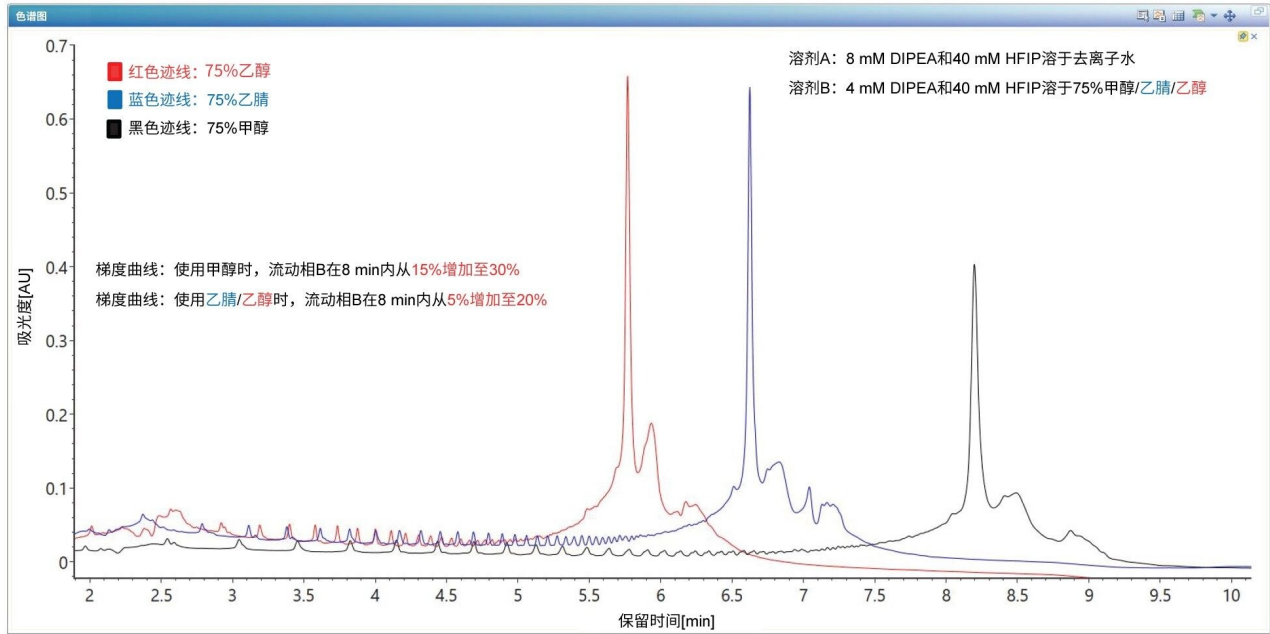


图3. TUV叠加色谱图, 显示了使用DIPEA (N,N-二异丙基乙胺) 作为离子对试剂和三种不同的有机溶剂对120 mer合成Poly(A)尾寡核苷酸进行IP-RP分离所得的结果。溶剂A为含8 mM DIPEA和40 mM HFIP的去离子水溶液, 溶剂B为含4 mM DIPEA和4 mM HFIP的75%有机溶剂溶液, 有机溶剂包括: 1) 甲醇 (黑色迹线); 2) 乙腈 (蓝色迹线) 和3) 乙醇 (红色迹线)。DIPEA的性能比TEA更出色, 在分析Poly(A)尾120 mer寡核苷酸这种比较大的寡核苷酸时, 能够产生更尖锐的色谱峰 (峰宽约0.1 min)。

使用甲醇时, 以DIPEA为离子对试剂的ESI-MS信号强度相较于TEA增加了约3倍 (数据未显示), 而乙腈和乙醇还可以进一步改善Poly(A)尾寡核苷酸的MS响应, 如图4所示。乙腈通常是大分子寡核苷酸IP-RP LC-MS分析的优选有机溶剂, 不过最近有研究人员提出用乙醇作为它的替代溶剂用于Poly(A)尾分析^{7,15,19}。图4所示的ESI-MS合并谱图证实, 使用乙醇时得到的ESI-MS信号优于乙腈。

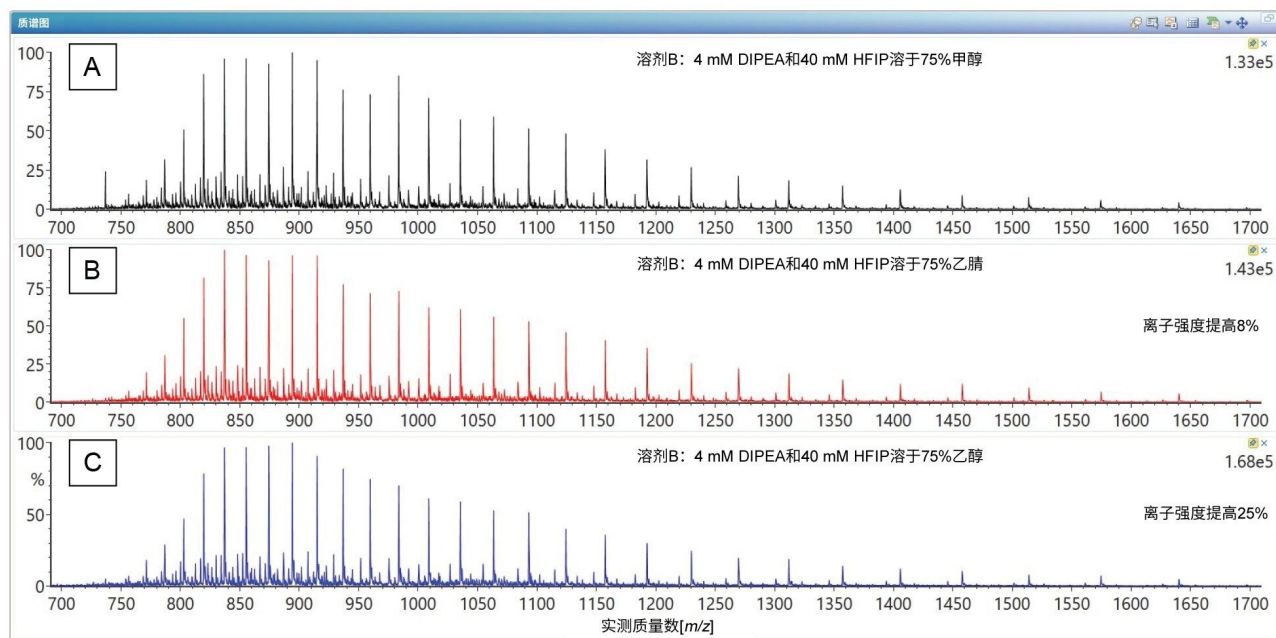


图4. Poly(A)尾寡核苷酸IP-RP分离(图3)后采集的ESI-MS合并谱图溶剂A为含8 mM DIPEA和40 mM HFIP的去离子水溶液, 溶剂B为含4 mM DIPEA和4 mM HFIP的75%有机溶剂溶液, 有机溶剂包括: 甲醇(图A)、乙腈(图B)和乙醇(图C)乙醇是优选溶剂, 因为它能产生最强的ESI-MS信号。

图5B是使用8 mM DIPEA/40 mM HFIP的75%乙醇溶液作为洗脱液B采集到的完整分子量ESI-MS谱图, 它上方的图5A是去卷积谱图。为了提高ESI-MS信号的灵敏度并尽可能减少钠加合物的信号水平, 我们优化了ESI源参数(ESI电压、锥孔电压、离子源温度、脱溶剂气温度)。另外值得一提的是, 离子对试剂的选择、所有其他试剂的用量和化学纯度以及流动相制备程序对于生成更清晰、加合物信号水平更低的ESI-MS谱图十分重要, 这些因素有助于灵敏地检测低丰度寡核苷酸。

除了化学合成的主要目标物质 - 120 mer寡核苷酸外, 粗制样品中还包含一些清晰可见的短链寡核苷酸杂质, 这些杂质在图2和图3所示色谱图中的主峰之前洗脱。粗制样品中可能还存在略长或略短的Poly(A)物质(刚超过或略低于120 mer目标值), 但RP-IP色谱法无法分离这些极为相近的物质。不过, 已有研究表明, 体积排阻色谱(SEC)能够更好地分离这些类型的混合物²⁰。对于共洗脱的寡核苷酸, 无论其保留时间或色谱图如何, waters_connect INTACT Mass应用程序都会对检出的所有寡核苷酸(强度高于用户指定的阈值)执行自动去卷积^{19,21}。这种方法(不基于RT的自动去卷积)特别适用于分析母体寡核苷酸物质周围分布的共洗脱寡核苷酸杂质。在图3所示色谱图的红色迹线中, 所有在5.5~6.5分钟之间洗脱的寡核苷酸的ESI-MS谱图均使用MaxEnt1算法进行了自动去卷积处理, 且去卷积设置经过软件的自优化²²。

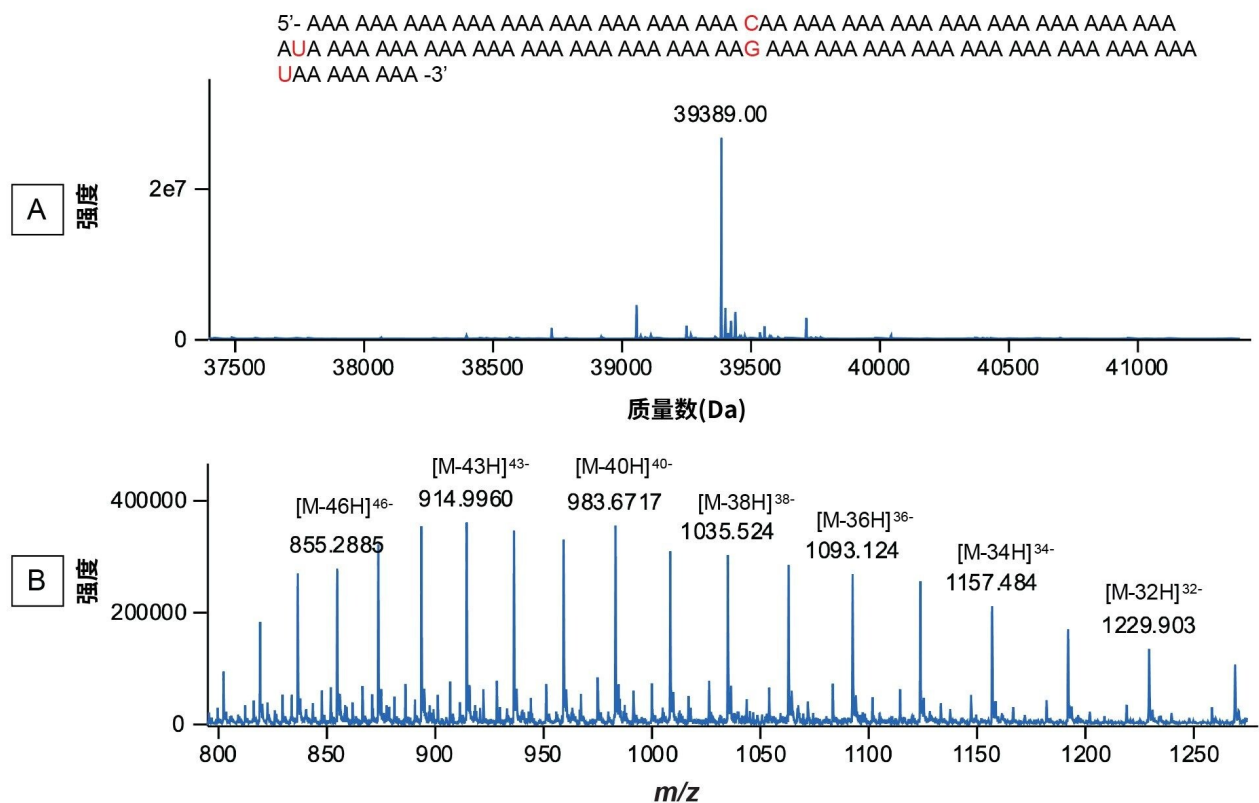


图5.合成120 mer Poly(A)尾寡核苷酸的INTACT Mass谱图：(A) MaxEnt1电荷去卷积谱图；(B)原始ESI-MS谱图。图A所示的120 mer序列第28位掺入了一个胞苷，第56位掺入了一个尿苷，第84位掺入了一个鸟苷，并且第112位掺入了另一个尿苷。这四个残基的作用是提高Poly(A)尾的化学稳定性。

接下来，我们比对20种可能修饰的列表（包括添加和去除最多10个腺苷残基的质量数(329.2059 Da)）对去卷积谱图执行了自动搜索，如图6中的INTACT Mass屏幕截图所示。图7为自动生成的去卷积谱图结果报告。如这份报告所示，推断性鉴定出七种Poly(A)尾物质，质量精度优于25 ppm。除预期的120 mer Poly(A)外，还鉴定出三种腺苷残基多于它的物质（121、122和123 mer），以及三种腺苷残基少于它的物质（117、118和119 mer）。根据ESI-MS响应鉴定出的含量最低的物质是123 mer，丰度水平为1.5%。

Available modifiers

Name	Average mass	Monoisotopic mass	Formula	Type
n-dT	-304.193180	-304.046038	-C10H13N2O7P	Oligonucleotide
n-dAs	-329.272140	-329.034762	-C10H12N5O4P5	Oligonucleotide
n-dCs	-305.247440	-305.023529	-C9H12N3O5P5	Oligonucleotide
n-dGs	-345.271540	-345.029677	-C10H12N5O5P5	Oligonucleotide
n-dTs	-320.258780	-320.023194	-C10H13N2O6P5	Oligonucleotide
n+A	-329.205940	-329.052520	-C10H12N5O6P	Oligonucleotide
n+C	-305.181240	-305.041287	-C9H12N3O7P	Oligonucleotide
n+G	-345.205340	-345.047435	-C10H12N5O7P	Oligonucleotide
n+U	-306.166000	-306.025302	-C9H11N2O8P	Oligonucleotide
n+As	-345.271540	-345.029677	-C10H12N5O5P5	Oligonucleotide
n+Cs	-321.246840	-321.018443	-C9H12N3O6P5	Oligonucleotide
n+Gs	-361.270940	-361.024591	-C10H12N5O6P5	Oligonucleotide
n+Us	-322.231600	-322.002459	-C9H11N2O7P5	Oligonucleotide
n-cetAs	-371.308820	-371.045327	-C12H14N5O5P5	Oligonucleotide
n-cetCs	-347.284120	-347.034093	-C11H14N3O6P5	Oligonucleotide
n-cetGs	-387.308220	-387.040241	-C12H14N5O6P5	Oligonucleotide

Selected modifiers

Modifier name	Minimum	Maximum	Group	Impurity	Edit
n+A		10	None	<input type="checkbox"/>	
n+A		10	None	<input type="checkbox"/>	

Preview of possible modifications: 20

Modification name	Average mass	Monoisotopic mass	Number of modifiers	Impurity
n+A	-329.205940	-329.052520	1	<input type="checkbox"/>
n+A	329.205940	329.052520	1	<input type="checkbox"/>
n+A(2)	-658.411880	-658.105040	2	<input type="checkbox"/>
n+A(2)	658.411880	658.105040	2	<input type="checkbox"/>
n+A(3)	-987.617820	-987.157560	3	<input type="checkbox"/>
n+A(3)	987.617820	987.157560	3	<input type="checkbox"/>
n+A(4)	-1316.823760	-1316.210080	4	<input type="checkbox"/>

图6. INTACT Mass应用程序屏幕截图，显示了120 mer合成Poly(A)尾粗制样品中可能存在的20种寡核苷酸修饰，包括添加和去除最多10个腺苷的质量数(329.2059 Da)之后的物质。

Results								
TIC		TUV 260		MS				
Identity: Pass		Purity: Pass						
	Molecule ID	Component	Observed mass (Da)	Expected mass (Da)	Mass error (ppm)	Identity result	Observed TIC RT (mins)	Observed UV RT (mins)
1						Pass		
2	39,388.64	39388.64 All Forms				Pass		
Poly(A)尾种类:								
3	39,388.64	39,388.64	120-mer	39,389.17	39,388.64	13.4	Pass	6.75 6.70
4	39,388.64	39388.64 n-rA	119-mer	39,060.32	39,059.43	22.8	Pass	6.75 6.70
5	39,388.64	39388.64 n+rA	121-mer	39,718.44	39,717.85	14.8	Pass	6.75 6.70
6	39,388.64	39388.64 n-rA(2)	118-mer	38,730.98	38,730.23	19.4	Pass	6.75 6.70
7	39,388.64	39388.64 n+rA(2)	122-mer	40,047.76	40,047.05	17.6	Pass	6.75 6.70
8	39,388.64	39388.64 n-rA(3)	117-mer	38,401.57	38,401.02	14.3	Pass	6.75 6.70
9	39,388.64	39388.64 n+rA(3)	123-mer	40,377.12	40,376.26	21.3	Pass	6.75 6.70

图7. *INTACT Mass*应用程序报告中显示了120 mer *sgRNA*寡核苷酸分析的处理结果。总共鉴定出7种寡核苷酸，长度从117 mer到123 mer不等，质量精度优于25 ppm。

mRNA酶解物的Poly(A)尾分析

我们将这种为合成Poly(A)尾开发的LC-MS分析方法应用于分析RNase T1酶解的Fluc（萤火虫荧光素酶）mRNA。之前的一篇文献提出了一种从复杂mRNA酶解混合物中分离Poly(A)尾寡核苷酸的方法，该方法先使用(dT)₂₅磁珠富集寡核苷酸组分，然后再进行LC-MS分析¹⁴。而在我们的实验中，分离酶解混合物时（如图8所示），Poly(A)尾在UV和TIC色谱图中最后洗脱，分离良好、丰度较高。

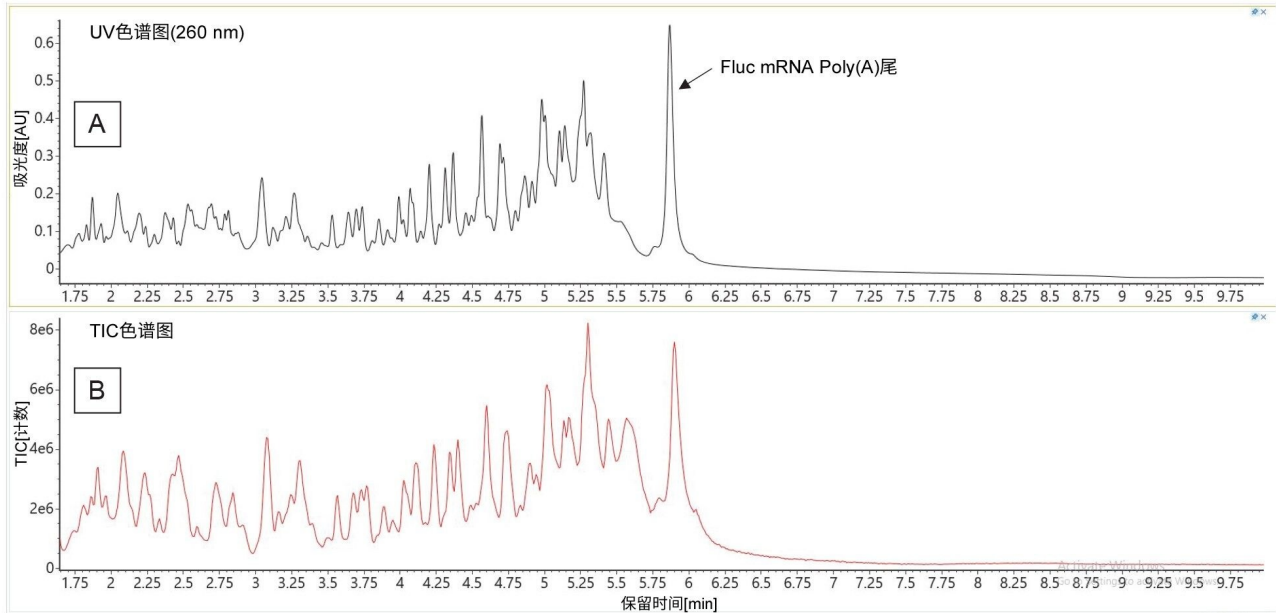


图8. *RNase T1*酶解的 *Fluc mRNA* 的分离结果：(A)在260 nm处记录的UV色谱图；(B) *BioAccord LC-MS*系统记录的TIC色谱图

相应的去卷积ESI-MS谱图（图9）表明，122~132 mer寡核苷酸的Poly(A)异质性相对较高，其依据是谱图中出现了许多间隔一个腺苷质量数(329.2 Da)的信号。使用自定义去卷积参数进行INTACT Mass处理后，这11种Poly(A)变体测量结果的质量精度几乎全部优于30 ppm，如图10中所示。

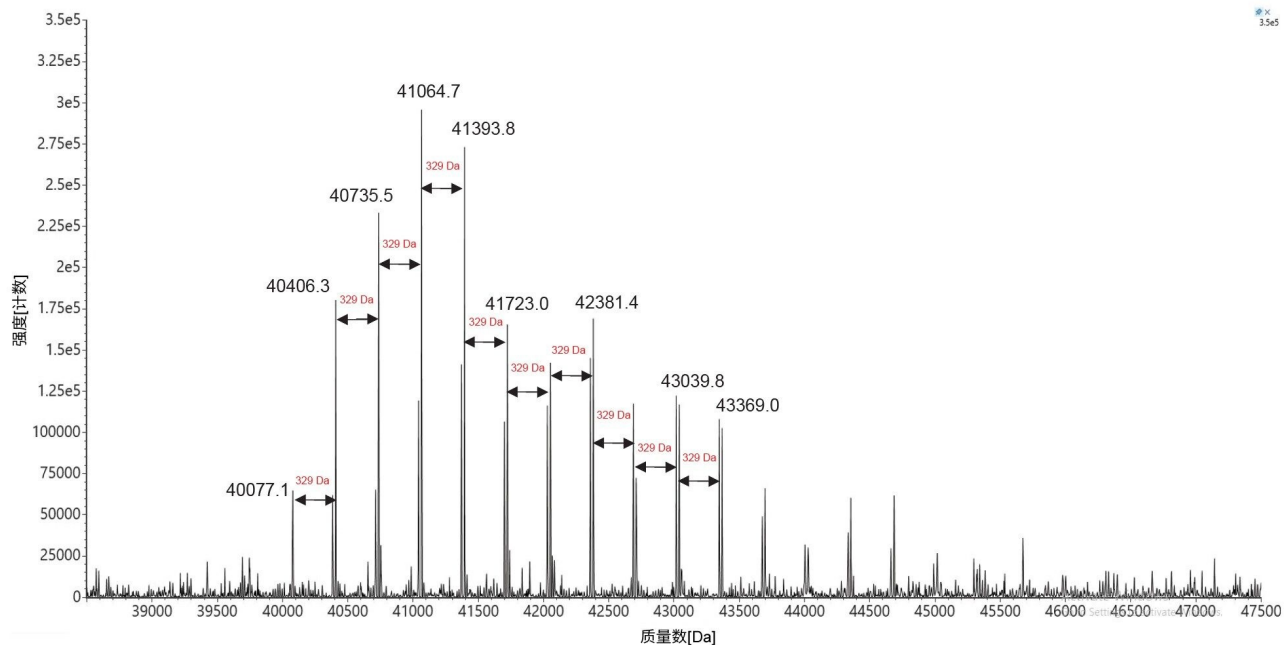


图9.使用RNase T1酶解Fluc mRNA后得到的Poly(A)尾寡核苷酸混合物的MaxEnt1电荷去卷积谱图。Poly(A)尾寡核苷酸的测定结果很分散，与检测到的第一种Poly(A)尾寡核苷酸(122 mer)相比，后面检测到的寡核苷酸最多增加了11个腺苷的质量。

Results								
		TIC	TUV 260	MS				
Identity: Pass		Purity: Pass						
	Type	Molecule ID	Component		Observed mass (Da)	Expected mass (Da)	Mass error (ppm)	
Poly(A)尾种类:								
3	Product	40,077.13	40,077.13	122-mer	●	40,077.70	40,077.13	14.3
4	Impurity	40,077.13	40077.13 n+rA	123-mer	●	40,406.87	40,406.34	13.3
5	Impurity	40,077.13	40077.13 n+rA(2)	124-mer	●	40,737.24	40,735.54	41.8
6	Impurity	40,077.13	40077.13 n+rA(3)	125-mer	●	41,065.36	41,064.75	14.9
7	Impurity	40,077.13	40077.13 n+rA(4)	126-mer	●	41,394.22	41,393.95	6.3
8	Impurity	40,077.13	40077.13 n+rA(5)	127-mer	●	41,723.64	41,723.16	11.6
9	Impurity	40,077.13	40077.13 n+rA(6)	128-mer	●	42,053.29	42,052.37	22
10	Impurity	40,077.13	40077.13 n+rA(7)	129-mer	●	42,381.56	42,381.57	-0.4
11	Impurity	40,077.13	40077.13 n+rA(8)	130-mer	●	42,712.01	42,710.78	28.8
12	Impurity	40,077.13	40077.13 n+rA(9)	131-mer	●	43,040.98	43,039.98	23.2
13	Impurity	40,077.13	40077.13 n+rA(10)	132-mer	●	43,369.49	43,369.19	7

图10. *INTACT Mass*应用程序报告中显示了 *Fluc mRNA Poly(A)*尾分析的处理结果。总共鉴定出11种寡核苷酸，长度从122 mer到132 mer不等，质量精度优于30 ppm。

另一个图示（图11）绘制了ESI-MS信号及其相应的强度，以计算 *Fluc mRNA*的Poly(A)尾的平均质量数，其对应于126.5 mer的寡核苷酸。Poly(A)分散性以及平均质量数测量值都是治疗性mRNA分子的重要质量属性。本研究根据IP-RP LC-MS数据得出的平均Poly(A)尾长度与SEC-UV方法得出的值高度相关²⁰。因此，使用合成Poly(A)尾寡核苷酸开发的分析方法可有效分析预防用/治疗性mRNA酶解得到的Poly(A)尾。

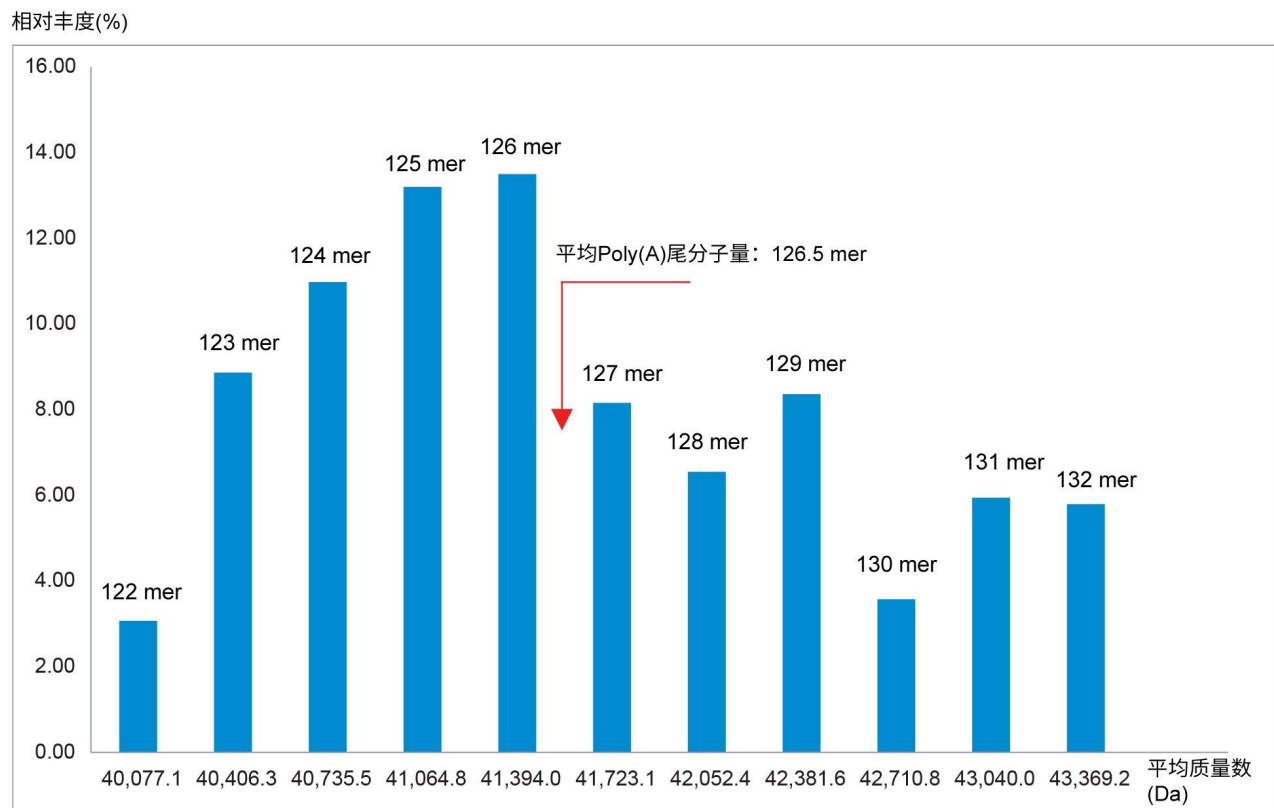


图11. *Fluc* mRNA Poly(A)尾的平均ESI-MS谱图强度与Poly(A)尾长度的分布情况

结论

- 使用在BioAccord LC-MS系统上开发的IP-RP LC-MS分析方法可以获取预防用/治疗性mRNA Poly(A)尾寡核苷酸区域的长度和异质性信息，以及平均分子量。
- 由合规的waters_connect信息学平台控制的台式BioAccord LC-MS系统可以准确测量各种共洗脱的Poly(A)尾寡核苷酸，质量精度优于25 ppm
- 为合成Poly(A)类似物开发的LC-MS分析方法可成功应用于分析预防用/治疗性mRNA酶解产生的真实Poly(A) 3'端片段。

参考文献

1. Jackson NAC, Kester KE, Casimiro D, Gurunathan S, DeRosa F. The Promise of mRNA Vaccines: A Biotech and Industrial Perspective, *npj Vaccines*, 2020, 11, 1–6.
2. Sahin U, Kariko K, Tureci O. mRNA-Based Therapeutics – Developing a New Class of Drugs, *Nat Rev*, 2014, 13, 759–780.
3. Sheets MD, Wickens W. Two Phases in the Addition of a Poly(A) Tail, *Genes & Develop*, 1989, 3, 1401–1412.
4. Dreyfus M, Regnier P. The Poly(A) Tail of mRNAs: Bodyguard in Eukaryotes, Scavenger in Bacteria, *Cell*, 2002, 111, 611–613.
5. Chang H, Lim J, Ha M, Kim VN. TAIL-seq: Genome-Wide Determination of Poly(A) Tail Length and 3' End Modifications, *Mol Cell*, 2014, 53, 1044–1052.
6. Nicholson AL, Pasquinely AE. Tales of Detailed Poly(A) Tails, *Trends Cell Biol*, 2019, 29, 191–200.
7. Jiang T, Yu N, Kim J, Murgu JR, Kissai M, Ravichandran K, Miracco EJ, Presnyak V, Hua S. Oligonucleotide Sequence Mapping of Large Therapeutic mRNAs via Parallel Ribonuclease Digestions and LC-MS/MS, *Anal Chem*, 2019, 91, 8500–8506.
8. Vanhinsbergh C, Criscuolo A, Sutton JN, Murphy K, Williamson AJK, Cook K, Dickman MJ. Characterization and Sequence Mapping of Large RNA and mRNA Therapeutics Using Mass Spectrometry, *Anal Chem*, 2022, 94, 7339–7349.
9. Muttach F, Muthmann N, Rentmeister A. Synthetic mRNA Capping, *Beilstein J Org Chem*, 2017, 13, 2819–2832.
10. Beverly M, Dell A, Parmar P, Houghton L. Label-Free Analysis of mRNA Capping Efficiency Using RNase H probes and LC-MS, *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408, 5021–5030.
11. Nguyen J, Chan SH, Roy B, Gilar M, Robb B, Chen W, Lauber MA. 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, [720007329ZH](#), 2021.
12. Muthmann N, Spacek P, Reichert D, van Dulmen M, Rentmeister A. Quantification of mRNA Cap-

Modifications by Means of LC-QqQ-MS, *Methods*, 2022, 203, 196–206.

13. Chan SH, Whipple JM, Dai N, Kelley TM, Withers K, Tzertzinis G, Correa Jr IR, Robb GB. RNase-H-based Analysis of Synthetic mRNA 5' Cap Incorporation, *RNA*, 2022, 28, 1144–1155.
14. Beverly M, Hagen C, Slack O. Poly A Tail Length Analysis of In Vitro Transcribed mRNA by LC-MS, *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410, 1667–1677.
15. Strezsak SR, Pimentel AJ, Hill IT, Beuning PJ, Skizim NJ. Novel Mobile Phase to Control Charge States and Metal Adducts in the LC/MS for mRNA Characterization Assays, *ACS Omega Reviews*, 2022, 7, 22181–22191.
16. Doneanu C E, Fox J, Harry E, Knowles C, Yu Y Q, Fredette J, Chen W. 利用符合法规要求的自动化LC-MS工作流程对寡聚核苷酸进行完整质量数确认和纯度分析, 沃特世应用纪要, [720006820ZH](#), 2020.
17. Doneanu C E, Fox J, Harry E, Knowles C, Yu Y Q, Fredette J, Chen W. 使用BioAccord LC-MS系统对各种经过大量修饰的寡核苷酸进行完整质量数确认分析, 沃特世应用纪要, [720007028ZH](#), 2020.
18. Doneanu C E, Knowles C, Fox J, Harry E, Yu Y Q, Fredette J, Chen W. 使用装配ACQUITY Premier产品的BioAccord LC-MS系统分析寡核苷酸杂质, 沃特世应用纪要, [720007301ZH](#), 2021.
19. Doneanu C E, Boyce P, Shion H, Fredette J, Berger S J, Gastall H, Yu Y Q. LC-MS 使用搭载ACQUITY™ Premier的BioAccord™系统和全新的自动化INTACT Mass应用程序对siRNA、单向导RNA和杂质进行LC-MS分析, 沃特世应用纪要, [720007546ZH](#), 2022.
20. Gilar M. 体积排阻色谱法分析mRNA的Poly(A)尾, 沃特世应用纪要, [720007853ZH](#), 2023.
21. Shion H, Boyce P, Berger S J, Yu Y Q. INTACT Mass™ - 一款用于生物治疗药物快速质量数确认和纯度评估的通用waters_connect™应用程序, 沃特世应用纪要, [720007547ZH](#), 2022.
22. Ferrige AG, Seddon MJ, Green BN, Jarvis SA, Skilling J. Disentangling Electrospray Spectra With Maximum Entropy, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1992, 6, 707–711.

特色产品

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

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

UNIFI生物制药平台解决方案 <<https://www.waters.com/10195515>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

720007925ZH, 2023年8月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

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