

使用高分辨质谱X500B QTOF系统分析mRNA的加帽效率

Analysis of mRNA capping efficiency using X500B QTOF System

宋洋, 罗继, 陈泓序, 郭立海

Song Yang, Luo Ji, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

Keywords: X500B QTOF系统, mRNA, 加帽效率

mRNA疫苗属于最为前沿的第三代疫苗, 就是将编码某种抗原蛋白的病毒基因片段直接导入动物体细胞内(疫苗注射到人体), 并通过宿主细胞的蛋白质合成系统产生抗原蛋白, 诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答, 以达到预防和治疗疾病的目的。相比于质粒DNA疫苗, mRNA疫苗保持了胞内表达蛋白的优点, 同时克服了质粒DNA疫苗免疫原性低、可能产生抗载体的非特异性免疫的缺点, 且没有整合到宿主DNA的风险。

mRNA作为疫苗, 通常以线性化的DNA作为模板, 通过体外转录(IVT)获得。真核生物mRNA的5'有一个由三磷酸桥接的7-甲基鸟苷(m7G)帽, 这种结构被称为Cap 0。Cap 0在翻译起始因子的招募过程中起着非常重要的作用, 而且在胞质中还可以防止mRNA被降解。在高等真核生物中, 第一个近端核苷酸的核糖2号碳羟基甲基化形成Cap 1结构(m7GpppmN), 其中约有50%的mRNA的近端第二个核苷酸的核糖2号碳羟基甲基化形成Cap 2结构(m7GpppmNmN), 如图1所示¹。因此加帽效率是mRNA疫苗生产



过程中重要的质量参数。作为疫苗使用的mRNA长度通常为几千个核苷酸(nt), 而5'端的帽子结构的分子量约为300, 类似于一个核苷酸的分子量, 几千个核苷酸长度下无法区分单个核苷酸的差异, 需要酶切为短片段才可以通过质谱技术进行分离和检测。特定的核糖核酸酶(RNase)可将mRNA加帽端切割为15-30 nt的片段, 利用质谱技术对酶切后的片段进行检测, 可有效分离未加帽与加帽的mRNA片段, 根据加帽片段占未加帽与加帽片段之和的比例表征mRNA的加帽效率。

样本信息:

mRNA	序列1 (S1)	GGGAGAGmU***mUCAGCmUGmUCA
测试品	序列2 (S2)	GGGAGAGmU***mUCAGCmUGmUCAC

长度为21或22个核苷酸的mRNA, 其中m表示甲基化修饰。

试剂:

RNase H, RNase H反应缓冲液购自New England Biolabs; 链霉亲和素涂层磁珠购自Invitrogen; 无酶水、甲醇、磁力架购自Thermo。

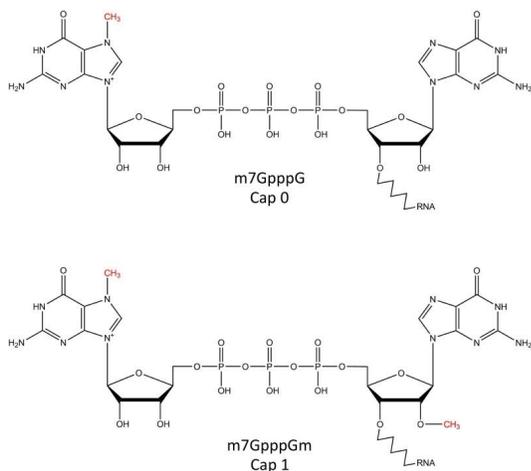


图1. mRNA加帽结构式

1. 样品前处理中的清洗缓冲液配置 (5 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.5 mM EDTA; 1 M NaCl) : 吸取1 mL 50 mM Tris-HCl、10 μL 0.5 M EDTA(pH8.0)、2 mL 5 M氯化钠, 加无酶水至10 mL, 2~8 °C保存备用。
2. 样品前处理中的缓冲液A (0.1 M NaOH、0.05 M NaCl) : 吸取1 mL 1 M氢氧化钠、100 μL 5 M 氯化钠, 加无酶水至10 mL, 2~8 °C保存备用, 有效期六个月;
3. 样品前处理中的缓冲液B (0.1 M NaCl) : 吸取200 μL 5 M氯化钠, 加无酶水至10 mL, 2~8 °C保存备用, 有效期六个月;

样本前处理方法:

设计引物的长度为25 nt, 在5'端设计4个DNA碱基对, 5'端或3'端设计BioTEG。

1. mRNA样品与引物退火处理

- 1) 取500 pmol引物 (10 pmol/μL, 50 μL)、10 × Rnase H反应缓冲液 (12 μL)、100 pmol mRNA、补加无酶水至120 μL反应体系 (引物与样品比例为5:1);
- 2) 退火程序为95 °C 5 min, 降温至65 °C、55 °C、40 °C各2 min, 最终设置为22 °C。

2. 磁珠提取前处理

- 1) 取适量磁珠 (10 mg/mL) 于1.5 mL离心管, 置于磁力架上, 去掉多于液体, 加入相同体积缓冲液A, 混匀后置于磁力架上, 去掉缓冲液A, 重复上述过程1次;
- 2) 加入相同体积缓冲液B, 混匀后置于磁力架上, 去掉缓冲液B, 加入相同体积Buffer B, 100 μL分装待用;

3. RNase H酶切反应

- 1) 100 μL待用磁珠放置于磁力架上, 去掉Buffer B, 加入退火反应液, 室温轻轻震荡30min;
- 2) 加入10 μL RNase H (50 U), 吹打混匀, 37 °C静置3h; 然后放置于磁力架, 弃掉上清, 避免碰到磁珠;

4. 寡核苷酸片段回收

- 1) 上述酶解液放置于磁力架, 弃掉上清, 加入100 μL 清洗缓冲液, 混匀后置于磁力架上, 去掉清洗缓冲液, 重复上述过程2次;
- 2) 加入100 μL无酶水, 混匀后置于磁力架上, 去掉无酶水, 重复上述过程2次;
- 3) 加入100 μL 75%甲醇 (80 °C预热), 80 °C 3 min, 置于磁力架,

取上清至新的EP管中; 氮气吹干, 备用;

5. 进行质谱分析之前, 加100 μL无酶水溶解。

色谱方法:

使用SCIEX ExionLC™ AC液相系统, 使用飞诺美Gemini 3 μm C18 100A, LC Column 100×2.1 mm色谱柱进行分析。A相: 水, 25 mM 六氟异丙醇 (HFIP), 50 mM 二异丙基乙胺 (DIPEA); B相: 90% 甲醇, 25 mM HFIP, 50 mM DIPEA。柱温: 45 °C; 进样量: 5 μL; 分离梯度: 见表1。

表1. mRNA加帽效率分析方法的液相梯度

Time [min]	Flow [mL/min]	B.Conc [%]
0.50	0.3000	10.0
4.00	0.3000	45.0
4.50	0.3000	85.0
6.50	0.3000	85.0
6.70	0.3000	10.0
10.00	STOP	

质谱方法:

使用SCIEX X500B QTOF质谱系统对样品进行负离子模式的采集。喷雾气: 55 psi, 辅助加热气: 55 psi, 气帘气: 35 psi, 离子源温度: 600 °C, 离子源电压: -4500 V, 碰撞气: 7 psi, 去簇电压: -80 V。一级扫描, 扫描范围400-2500, 采集时间0.5 s。Time bins to sum设置为8。

数据结果:

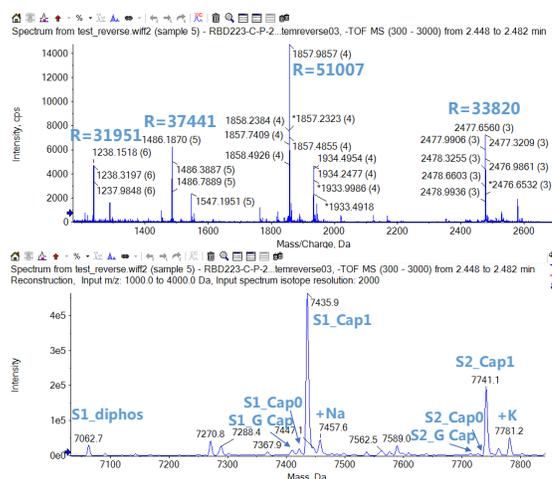


图2. mRNA样品的一级质谱图以及解卷积之后的完整分子量分布图

原始质谱图浏览:

mRNA等大分子样品，质荷比往往很大，此时低质荷比（ m/z ）区间的分辨率没有意义。真正有意义的是高 m/z 区间的分辨率。SCIEX X500B QTOF系统的分辨率与 m/z 没有关联，能够在全 m/z 区间，特别是大分子鉴定最为关键的 m/z 700-3000的区间内依然保持三万以上的分辨率，能够保证大分子样品的精准鉴定。解卷积之后，能够非常清晰的看到样品中两个序列的加帽峰，以及少量未加帽的G cap或diphos峰（图2）。

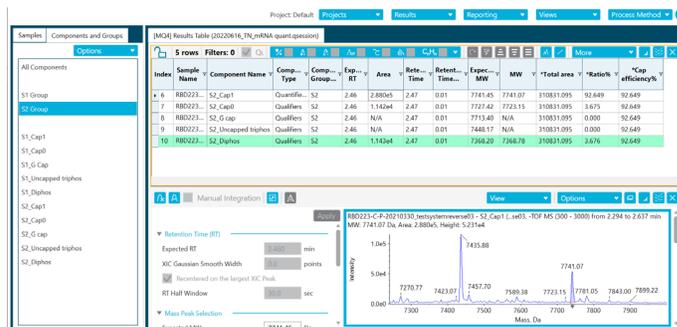


图3. Sciex OS Analytics分析mRNA加帽样品数据

加帽率计算:

SCIEX OS能够支持质谱方法编辑、质谱数据采集、数据浏览以及结果分析、报告出具，是一站式的数据采集和分析平台，mRNA加帽率的检测全程只需要使用这一款软件即可以满足需求。计算加帽率的方法编辑简单，调用Intact Quant功能，输入各成分目标分子量，按照实际情况选择考虑解卷积参数，再确定合适的保留时间即可。在查看结果时，可单独计算每个组分所占总组分的比例，如图2中ratio即为每个成分所占比例，也可以合并加帽峰，直接查看加帽效率百分比（Cap efficiency，图3）。此外，也可以自定义flagging rules，标注出比如加帽率不达标的样品（图4）。按照该计算方法，两个样品的加帽率计算结果如表2所示。

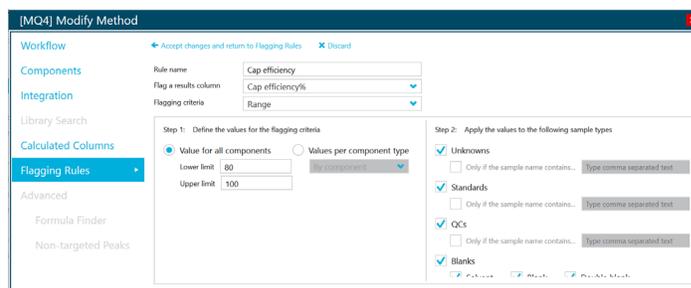


图4. Flagging rules 功能支持自定义范围

表2. mRNA样品的加帽率计算结果

类型	理论分子量	实测分子量	Area	*Total area	*Ratio%	*Cap efficiency%
S1_Cap1	7436.45	7435.93	6.33E+05	7.16E+05	88.33	88.33
S1_Cap0	7422.42	7423.19	2.56E+04	7.16E+05	3.572	88.33
S1_G Cap	7408.4	7410.68	2.10E+04	7.16E+05	2.935	88.33
S1_Uncapped triphos	7143.17	7143.63	7.79E+03	7.16E+05	1.088	88.33
S1_Diphos	7063.2	7062.98	2.92E+04	7.16E+05	4.074	88.33
S2_Cap1	7741.45	7741.07	2.88E+05	3.11E+05	92.66	92.66
S2_Cap0	7727.42	7727.15	1.14E+04	3.11E+05	3.664	92.66
S2_G cap	7713.4	N/A	N/A	3.11E+05	0	92.66
S2_Uncapped triphos	7448.17	N/A	N/A	3.11E+05	0	92.66
S2_Diphos	7368.2	7368.78	1.14E+04	3.11E+05	3.676	92.66

总结

1. SCIEX X500B QTOF系统进行样品采集，对mRNA样品能够保持全质量范围（m/z 1000至3000）分辨率30000以上，保证了数据的质量和准确。
2. 使用SCIEX OS软件平台进行方法编辑、仪器控制、数据浏览、数据分析、报告出具，无需进行繁琐的数据转移和新软件学习，省时省力，简单高效。
3. 借助OS软件内嵌的Analytics功能，能够快速的对mRNA加帽率进行计算，且可以自定义flagging rules，设定一个范围，轻松标注出不合格的样品。

参考文献：

1. Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(16):7511-7526. doi:10.1093/nar/gkw551

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在英国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-2-14951-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：SCIEX-China