

# SCIEX毛细管凝胶电泳和液相串联高分辨质谱对mRNA PolyA尾分布的分析

## Analysis of Poly A tail distribution of mRNA by SCIEX capillary gel electrophoresis and LC-high resolution mass spectrometry

吕小磊, 高铁, 罗继, 陈泓序, 郭立海

Lv Xiaolei, Gao Tie, Luo Ji, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX应用支持中心, 中国

SCIEX, China

**关键词:** mRNA PolyA, 毛细管凝胶电泳, LC-MS

**Keywords:** mRNA PolyA, capillary gel electrophoresis, LC-MS

### 1. 引言

mRNA是基因表达的关键中间产物, 承载着从DNA转录到蛋白质翻译的遗传信息。mRNA的成熟和稳定性是通过一系列的后转录修饰来调控的, 其中最重要的一个过程就是3'末端的polyA加尾。这个过程是在mRNA 3'末端添加一串多腺苷酸 (polyadenylate, polyA) 序列。这个PolyA尾有助于维持mRNA的稳定性、运输和转译效率, 影响着mRNA的半衰期。例如, 较长的polyA尾通常与较高的翻译效率和mRNA稳定性相关, 而polyA尾缩短则是mRNA降解的重要信号。根据mRNA种类的差异, 通常PolyA尾的长度在几十至几百个核苷酸 (nt) 之间。

PolyA尾的添加效率和分布是mRNA疫苗的质量控制参数之一, 毛细管凝胶电泳 (CGE) 和液相串联高分辨质谱 (LC-MS) 在PolyA尾的分析中发挥着重要作用。

- CGE方法可有效区分不同长度的PolyA尾, 达到单核苷酸的分离, 从而测定不同片段的含量, 可作为PolyA尾的质控方法, 如果使用CGE进行长度的准确测定, 需要使用适宜长度的标准品或依据LC-MS的分析结果;
- LC-MS在polyA尾的分析中, 可准确测定不同长度PolyA尾的分子量, 依据分子量和核苷酸序列匹配出对应的长度, 但不同长度的PolyA尾由于在离子源中的离子化效率不同, LC-MS技术对含量测定的准确性不及CGE, 更适合在产品表征中使用。

在对PolyA尾进行单核苷酸分辨率的分布分析时, 由于mRNA长度较长, 为几千个核苷酸, 需要对mRNA进行酶切处理, 特定的核糖核酸酶 (RNase T1) 可将mRNA的PolyA尾进行切割。本文使用CGE与LC-MS技术 (图1所示) 对相同的PolyA尾进行分析。LC-MS可以准确测得每个片段的长度, 对应LC-MS的结果, 可得知CGE结果中的不同长度PolyA的准确长度。CGE的结果根据峰面积归一化法, 可得到每个长度PolyA的准确含量。两个方法结合为企业的产品研发和质控提供有力的支持。



图1. A: PA800 Plus 药物分析系统, B: X500B QTOF 高分辨质谱系统, C: ssDNA 100-R 试剂盒

## 2. 样品信息及前处理

mRNA样品由某疫苗企业提供，参照SCIEX Tech Note进行样品前处理<sup>1</sup>，通过酶切、纯化、回收步骤，得到100 pmol/L的mRNA PolyA，加入纯水溶解配成5 pmol/L的浓度。

## 3. 仪器和方法

### 3.1 毛细管凝胶电泳方法

#### 3.1.1 毛细管凝胶电泳仪器和试剂

PA800 Plus制药分析系统匹配紫外检测器 (SCIEX)；ssDNA 100-R试剂盒 (PN 477480, 包含DNA涂层毛细管、ssDNA 100-R固体凝胶、固体7 M尿素和固体Tris Borate) 购自SCIEX。

凝胶缓冲液配置：在Tris-Borate 瓶中加入135 mL无酶水，使其充分溶解；在溶解后的Tris-Borate缓冲液瓶中缓慢将7 M 尿素 (Urea) 瓶中的固体加入，使7 M 尿素充分溶解，得到Tris-Borate-Urea溶液，作为背景电解质；取5 mL 背景电解质溶液置于ssDNA 100-R固体凝胶中，搅拌过夜使其充分溶解，作为分离凝胶缓冲液。

#### 3.1.2 毛细管凝胶电泳方法

根据ssDNA 100-R试剂盒推荐方法，分别设置平衡方法、凝胶填充方法、分离方法和关机方法。毛细管：DNA涂层毛细管，100 μm内径，20/30.2 cm (有效/总长度)；毛细管温度：30 °C；样品储存温度：10 °C；UV检测器检测波长：254 nm。样品进样条件：-5 kV, 40 s；分离条件：-9 kV, 60 min。

### 3.2 LC-MS方法

#### 3.2.1 色谱方法

使用SCIEX ExionLC™ AD系统，色谱柱为Phenomenex Gemini NX-C18, 3 μm ,C18 100 Å, 150 × 2.1 mm，流动相中加入离子对试剂1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP, ≥ 99.8%)和diisopropylethylamine (DIEA, ≥ 99.5%)，购自sigma公司，A相：水，100 mM HFIP, 10 mM DIEA；B相：乙腈，100 mM HFIP, 10 mM DIEA。柱温：40 °C，进样体积15 μL，分离梯度见表1。

#### 3.2.2 质谱方法

使用SCIEX X500B QTOF高分辨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700-3000，采集时间1 s。

表1. 液相梯度

Time[min]	Flow[mL/min]	B.Cone[%]
0.0	0.3	10.0
0.5	0.3	10.0
4.0	0.3	38.0
4.5	0.3	80.0
6.0	0.3	80.0
6.1	0.3	10.0
10.0	0.3	10.0

## 4. 实验结果

### 4.1 毛细管凝胶电泳结果

利用毛细管凝胶电泳方法分析mRNA酶切后的PolyA，结果如图2所示，mRNA酶切后的PolyA检测到两组明显的峰(Group 1和Group 2)，每一组峰都可根据单碱基实现分离，并且在两组峰之间还检测到含量较少的一些可能是碎裂的核酸片段。根据软件进行积分，可测得Group 1和Group 2的含量 (以校正峰面积百分比表示) 分别为51.78%和44.34%。

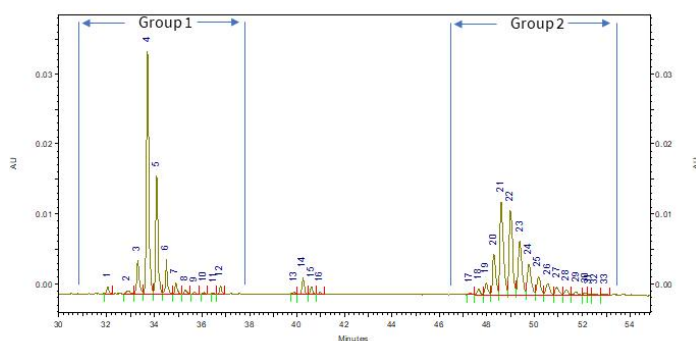


图2. 毛细管凝胶电泳法对mRNA的PolyA尾的分析。

### 4.2 LC-MS结果

如图3A所示，从TIC图上看样品在3.49 min和3.68 min有两个峰，分别解卷积之后得到分子量为10873 (图3B) 和23702.5 (图3C)，并且能看到一系列分子量相差329的峰，即不同长度的PolyA，其中3.49 min峰的分布为32A ~ 35A，3.68 min分布为71A ~ 80A。

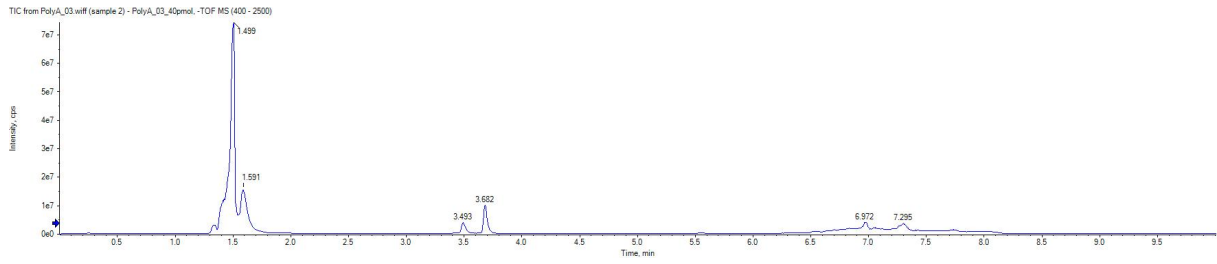


图3A. 样品总离子流图 (TIC), 在3.49 min和3.68 min有两个峰

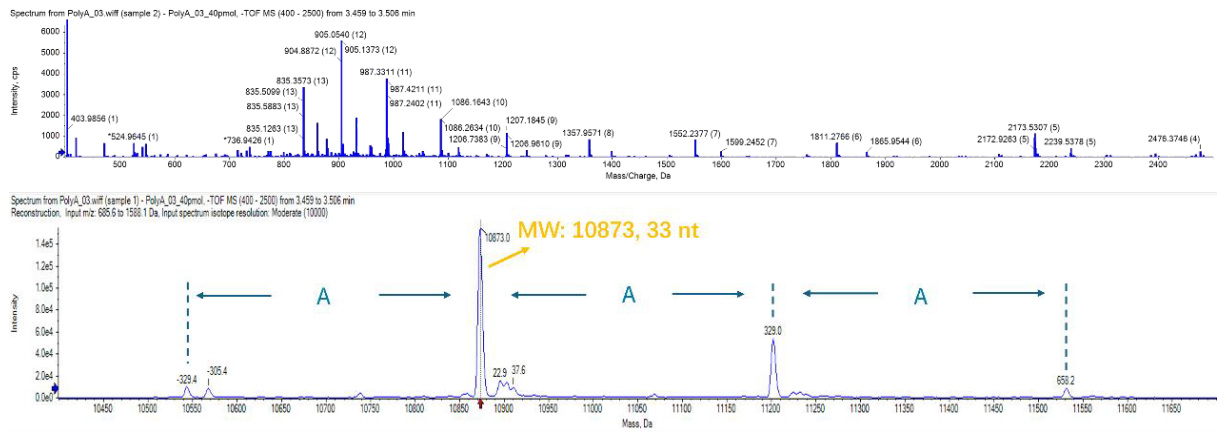


图3B. 样品3.49 min峰解卷积结果

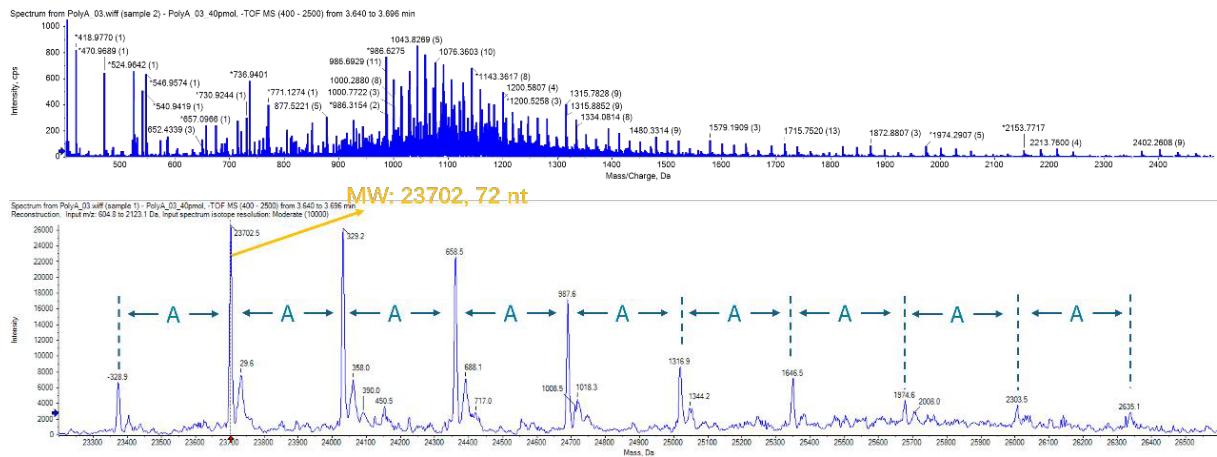


图3C. 样品3.68min峰解卷积结果

### 4.3 毛细管凝胶电泳与LC-MS结果的比较

LC-MS得到准确的polyA尾长度信息, 对比CGE结果中两组峰中含量最高的PolyA尾, 可以确认CGE结果中Group 1和Group 2中最高峰分别为33A和72A。对两个技术中共同检测到的不同长度的PolyA

含量进行比较, 发现含量分布趋势具有良好的一致性(图4)。对于两组不同的片段, 可以发现相比CGE的结果, LC-MS中32A-35A的含量较高。这是由于不同长度的PolyA片段在LC-MS的离子源中离

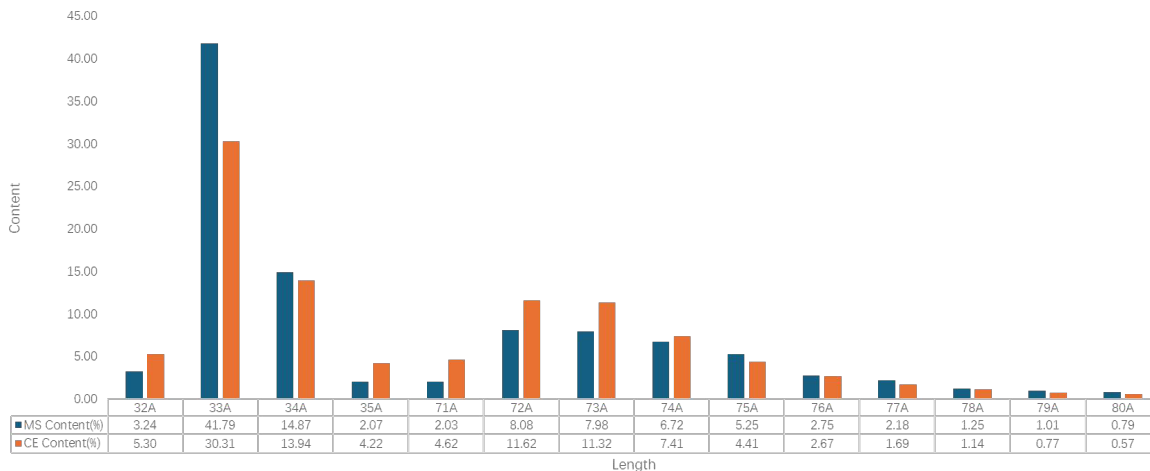


图4. PolyA尾分布的比较

子化效率存在差异，片段较小的更容易离子化，而片段较大的离子化效率相对较低；CGE方法不涉及离子化效率的损失，对于不同长度的PolyA均可准确定量，除了两个技术共同检测到的PolyA尾，在CGE结果中检测到更多的大小不同polyA尾及两组峰之间的杂质片段，说明在该分析条件下，CGE的检测灵敏度更高。

使用LC-MS进行定性分析，使用CGE进行定量分析，两个方法相互补充有效搭配，可为mRNA产品的研发和质控提供有效检测方案。

## 5. 总结

1. CGE可以按照片段大小对不同mRNA片段进行分离，实现不同长度PolyA尾的分离，分离度可达一个核苷酸，积分后通过校正峰面积百分比可有效测定目标长度PolyA尾的含量，相比于LC-MS，由于不涉及离子化效率问题，相对定量结果更准确且稳定。

2. LC-MS可以采集到mRNA片段高质量的谱图，也可以实现单个核苷酸的分离，相比于CGE方法，LC-MS结果经过解卷积以后可以得到不同长度PolyA尾的准确分子量，从而测定PolyA尾的不同长度。
3. CGE和LC-MS均可以用于mRNA的PolyA尾分析，两种方法分析得到的PolyA分布趋势一致，但是CGE方法定量更准确，可以在研发中使用LC-MS的方法进行polyA尾的表征，而在质控环节使用定量更加准确的CGE方案。

## 参考文献

1. 毛细管凝胶电泳法对mRNA PolyA尾巴分布的分析. SCIEX technical note, RUO-MKT-02-14117-ZH-A.
2. Beverly M, Hagen C, Slack O. Poly A tail length analysis of in vitro transcribed mRNA by LC-MS. Anal Bioanal Chem. 2018 Feb;410(6):1667-1677.

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. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-32858-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: 021-2419-7201  
传真: 021-2419-7333  
官网: [sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)