

IVT转录过程中NTPs和帽子类似物残留的检测

陆珺

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

目前, 治疗用的mRNA是在T7聚合酶的作用下, 以线性化的质粒为模板通过体外转录合成。转录后体系中可能存在转录相关的酶、DNA模板、核苷三磷酸(ntps)底物、帽子类似物等杂质组分。对中控样品进行检测, 一方面可以优化补料的配比提高生产效率, 另外一方面可以减少影响最终产品安全性的杂质生成。本实验采用高效液相色谱法, 选择Biozen Oligo(1.7 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm)色谱柱建立一种可以同时分离4种NTP和帽子类似物的高效液相色谱条件, 该条件可以用于在mRNA体外转录过程中的NTPs和帽子类似物的残留进行定量检测。结果显示, Biozen Oligo可以满足分析要求。

本实验采用Biozen Oligo生物惰性硬件的核壳色谱柱对mRNA样品进行分析。主要考虑到两点: 第一, NTPs和帽子类似物含有高能磷酸键, 非常容易跟不锈钢硬件产生路易斯酸碱作用从而造成吸附, 引起峰拖尾和回收率低的问题。而Biozen系列色谱柱有钛内衬, 可以抑制这种吸附作用; 另外一方面, 核壳柱和普通全多孔硅胶色谱柱相比, 具有高柱效, 高分离度, 高灵敏度, 低背压等特点。

关键词

NTPs、帽子类似物、残留、生物惰性、Biozen Oligo

化合物信息

表1. 化合物信息

样品名称	分子式	分子量
ATP	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ Na ₃ O ₁₃ P ₃	573.127
CTP	C ₉ H ₁₃ N ₃ Na ₃ O ₁₄ P ₃	549.1
GTP	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ Na ₃ O ₁₄ P ₃	589.130
UTP	C ₉ H ₁₂ N ₂ Na ₃ O ₁₅ P ₃	550.087
Cap Analog	C ₃₂ H ₄₃ N ₁₅ O ₂₄ P ₄ (free acid)	1145.6720(Free acid)

实验部分

3.1仪器、试剂与材料

3.1.1主要仪器设备

Thermo U3000 高效液相色谱;

UV检测器

3.1.2试剂材料

三乙胺, 己胺, 磷酸为分析纯; 甲醇为色谱纯; 实验用水为屈臣氏蒸馏水。

NTPs和帽子类似物的样品为云舟生物提供, 用无酶水稀释成混标, 浓度分别为1mM。

Luciferase IVT mRNA 样品1和2为云舟生物提供, 用无酶水稀释成约为1.2 μ g/ μ L。

*特别感谢云舟生物科技(广州)股份有限公司提供此次样品, 云舟生物作为全球基因递送技术的创新型企业, 提供基因递送方案的设计研发与优化, 科研用载体定制(包括基因载体构建、质粒DNA制备、病毒包装、CRISPR/shRNA文库构建、稳转细胞株构建、mRNA体外转录、重组蛋白表达纯化等)全产业链服务。以其优异的产品和服务, 为科研工作者以及相关企业提供宝贵的支持。

3.2样品前处理方法

样品用无酶水稀释后上样。

3.3仪器检测条件

3.3.1色谱条件

色谱柱: Biozen Oligo (1.7 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm); P/N: 00D-4791-AN

流动相: A: 取400mL纯水, 精密加入1.5mL磷酸混匀, 再加入5mL三乙胺和200 μ L正己胺充分溶解, pH值约为7.2 .

B: 甲醇

流速: 0.2mL/min;

检测器: 260nm

柱温: 35 $^{\circ}$ C;

进样量: 0.1 μ L

梯度:

时间/min	A%	B%
0	95	5
2	95	5
15	60	40
18	10	90
18.1	95	5
25	95	5

3.4实验图谱

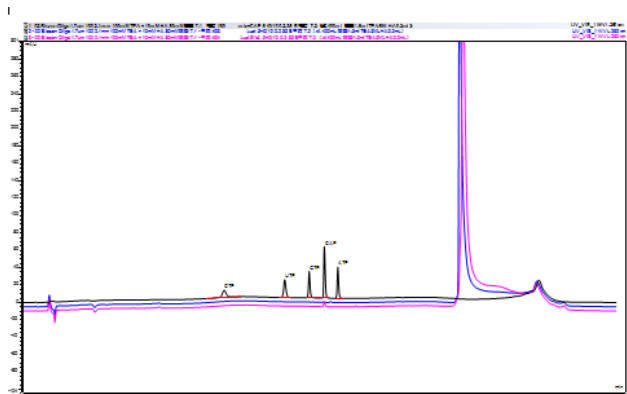


图1. ATP /UTP /GTP /CTP/帽子类似物 (黑色) 和两个mRNA样品 (蓝色和粉色) 叠图

结论

本实验建立的UHPLC的色谱条件, 可以在25分钟内完成分析, NTPs和帽子类似物分离度高。Luciferase IVT mRNA 样品1和2的合成工艺路线有所差别, 其中Luciferase IVT mRNA 样品2 (粉色) 中含有帽子类似物的残留, 通过该色谱方法可以分离出来以便后续进行定量分析。该方法对于mRNA样品中几种目标杂质进行分离分析, 峰形对称, 分离度好, 满足对分析精度和通量的要求



Xccelerator 加速服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息, 请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家, 我们很乐意为您提供帮助!

Confidential - Company Proprietary

