

mRNA 的液相分离

自 2020 年 mRNA 作为新冠疫苗获批上市以来，mRNA 作为治疗性药物在各种传染病、癌症、遗传病等方面的研究开发中得到快速发展。其特征解析与品质管理、亦或生产过程中的分析、纯化中常常使用 HPLC 进行分离。

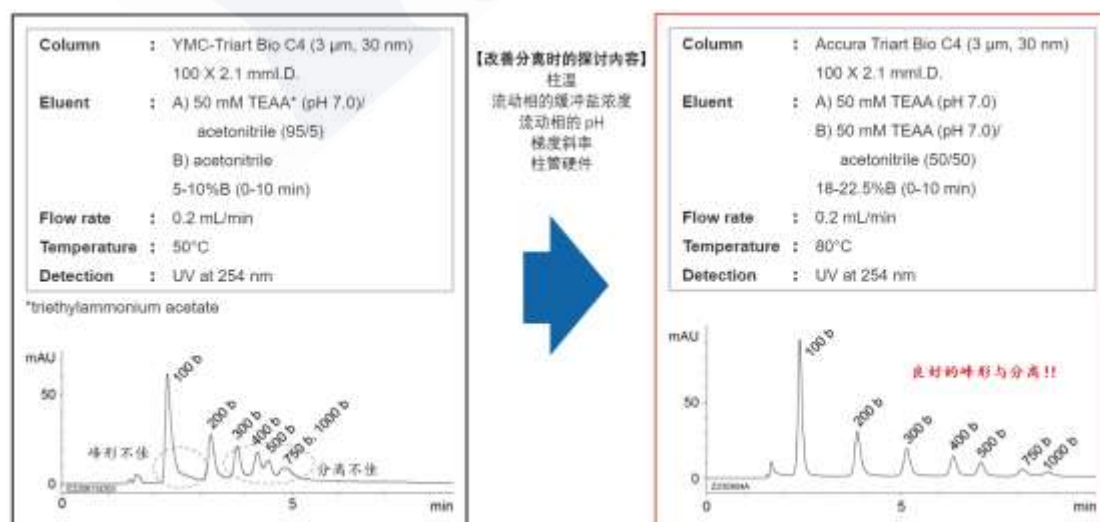
此处就反相模式、离子交换模式下 mRNA 的液相分离案例进行分享。

反相模式下的分离

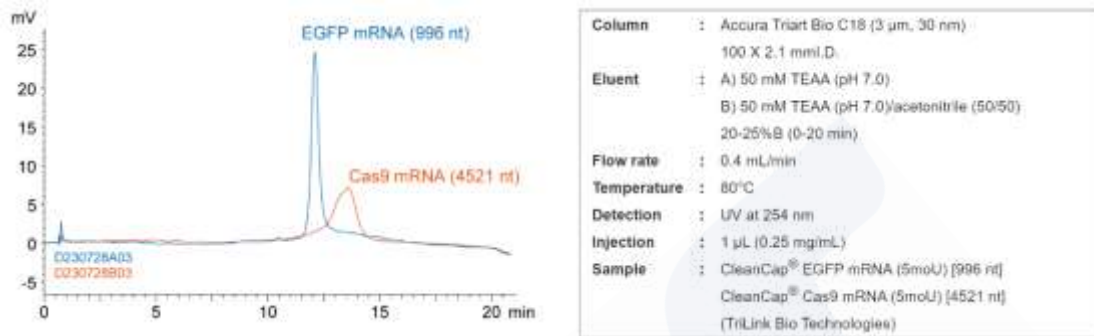
因 mRNA 的分子尺寸偏大，因此适于选用大孔径填料的色谱柱。mRNA 是一种带负电荷的强极性分子，因在反相分离中保留偏弱，故流动相中常需添加带正电荷游离基的三乙胺 (TEA) 等离子对试剂。

下面谱图 (A) 中，对 mRNA 典型样品 (100–1000 bases RNA marker) 的分析案例进行了展示。该案例使用大孔径 (30 nm) 的 Triart Bio C4，流动相为醋酸三乙胺 (TEAA) 的水溶液与乙腈体系。通过对各个条件进行优化，实现了峰形的改善，所有峰均获得良好分离。谱图 (B) 中，参考了 RNA marker 的分离条件，使用 Accura Triart Bio C18 分离 EGFP mRNA (996 nt) 与 Cas9 mRNA (4521 nt)，两种 mRNA 在不同的时间洗脱流出。

(A) RNA marker (100-1000 bases) 的分离



(B) 市售 mRNA 的分离



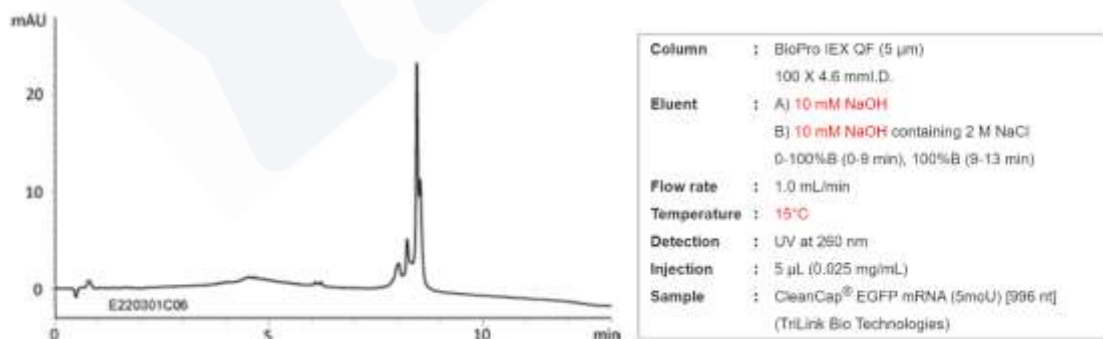
离子交换模式下的分离

使用阴离子交换模式进行 mRNA 分离时，为了获取良好的峰形，可提高缓冲盐的 pH 或添加添加剂。

下图 (A) 中，使用高 pH 的 NaOH 作为流动相，获得尖锐的峰形，且小峰亦实现分离。须注意，为了抑制因碱性造成样品的分解，需要花费时间在分析技巧上进行优化，如使用 15°C 的低温条件进行短时间的快速分析等。

图 (B) 是使用往 Tris 缓冲盐中加入有离子对试剂效果的四甲基氯化铵 (TMAC) 的案例。使用 pH8.1、柱温 30°C 的温和条件，实现了 EGFP mRNA 与 Cas9 mRNA 的分离。

(A) 高 pH 条件



(B) 添加离子对试剂的条件

