

# 毛细管凝胶电泳法对mRNA PolyA尾巴分布的分析

## Analysis of Poly A tail distribution of mRNA by capillary gel electrophoresis

高铁<sup>1</sup>, 李炎<sup>2</sup>, 马旻新<sup>2</sup>, 王文涛<sup>1</sup>, 陈泓序<sup>1</sup>

Gao Tie<sup>1</sup>, Li Yan<sup>2</sup>, Ma Minxin<sup>2</sup>, Wang Wentao<sup>1</sup>, Chen Hongxu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SCIEX, 中国; <sup>2</sup> 四川省药品检验研究院

<sup>1</sup> SCIEX, China; <sup>2</sup> Sichuan Institute for Drug Control

**关键词:** 毛细管凝胶电泳, mRNA, PolyA尾巴

### 1. 引言

mRNA疫苗是在第一代减毒/灭活疫苗和第二代亚单位疫苗基础上发展起来的第三代疫苗。体外合成的mRNA经肌肉注射至小鼠体内后有活性蛋白产生。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 3'端的PolyA尾巴结构可通过转录模板的设计添加, 也可在转录后通过酶法进行加尾。PolyA尾巴有助于维持mRNA的稳定性、运输和转译效率, 影响着mRNA的半衰期。根据mRNA种类的差异, 通常PolyA尾巴的长度在几十至几百个核苷酸(nt)之间。PolyA尾巴的添加效率和分布是mRNA疫苗的质量控制参数之一, 作为疫苗使用的mRNA长度通常为几千个核苷酸, 如需对PolyA尾巴进行单核苷酸分辨率的分布分析时, 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尾巴进行切割, 利用毛细管凝胶电泳技术对酶切后的片段进行检测, 可有效区分不同长度的PolyA尾巴片段, 并可达单核苷酸分离。

毛细管电泳匹配UV检测器, 利用ssDNA 100-R试剂盒, 可根据寡核苷酸链的大小进行分布检测, mRNA 3'端不同长度的PolyA尾巴片段可在CE中明显分离, 并利用校正峰面积百分比对目标长度的PolyA尾巴进行定量。

### 2. 试剂及方法

#### 2.1 仪器和试剂



图1. PA800 Plus药物分析系统与ssDNA 100-R试剂盒

PA800 Plus制药分析系统匹配紫外检测器(SCIEX); ssDNA 100-R试剂盒(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, RNase H反应缓冲液购自New England Biolabs; Oligo dT mRNA纯化试剂盒、RNase T1酶、无酶水、甲醇、磁力架购自Thermo。

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。

#### 2.2 样品及前处理

mRNA原液均由某疫苗企业提供, mRNA样品的PolyA尾巴长度约为90 nt, mRNA原液经过如下前处理, 进行PolyA尾巴部分的酶切与提取。

### 1. mRNA酶切处理

- 100 pmol mRNA加热至95℃后迅速降至25℃；加入10 μL RNase H buffer、2 μL RNase T1，加水至100 μL；37℃反应3 h；

### 2. PolyA尾巴片段的纯化

- Oligo dT 磁珠混匀，取75 μL，弃上清，100 μL 结合缓冲液清洗两次，弃上清；磁珠与第一步反应液充分混合，室温混匀5 min后，磁力架收集磁珠，弃上清；

### 3. PolyA尾巴片段洗脱回收

- 100 μL Washing buffer中文？清洗3次，加100 μL 75%甲醇溶液（预热80℃），80℃保温1 min；磁力架分离磁珠，上清液转移至新EP管中，浓缩仪浓缩干备用，分析前加10 μL水溶解（理论浓度1 pmol/μL）。

## 2.3 毛细管凝胶电泳方法设置

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℃；样品储存温度：10℃；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。

### 2.3.1 平衡方法的时间程序

如图2所示，平衡方法主要目的是进行毛细管的冲洗和平衡。

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI:F1	BO:F1	forward	ddH2O Rinse
2	Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI:C1	BO:C1	forward	TBE Urea Buffer Rinse
3	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	forward	ssDNA Gel Fill
4	Separate - Voltage	3.0 kV	5.00 min	BI:B1	BO:B1	0.17 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis
5	Separate - Voltage	9.0 kV	10.00 min	BI:B1	BO:B1	0.17 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis
6	End						

图2. 平衡方法的时间程序

### 2.3.2 凝胶填充方法的时间程序

如图3所示，凝胶填充方法主要目的是进行凝胶缓冲液的填充，运行5针样品的分离方法后进行一次凝胶填充。

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	forward	ssDNA Gel Fill
2	Separate - Voltage	9.0 kV	10.00 min	BI:B1	BO:B1	0.17 Min ramp, reverse polarity, both	Pre-electrophoresis
3	End						
4							

图3. 凝胶填充方法的时间程序

### 2.3.3 分离方法的时间程序

如图4所示，分离方法主要目的是进行PolyA尾巴的分离检测。

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 5	ddH2O dp
2	Inject - Voltage	5.0 kV	40.0 sec	SI:A1	BO:B1	Overide, reverse polarity	S sample injection
3	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 5	ddH2O dp
4	Separate - Voltage	9.0 kV	60.00 min	BI:E1	BO:E1	0.17 Min ramp, reverse polarity, both, In / Out vial inc 5	Separation
5	Autoseal						
6	End						
7							

图4. 分离方法的时间程序

### 2.3.4 关机方法的时间程序

如图5所示，关机方法主要目的是进行毛细管的冲洗和光源的关闭。

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI:C1	BO:C1	forward	TBE Urea Buffer Rinse
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	forward	ssDNA Gel Fill
3	Separate - Voltage	9.0 kV	10.00 min	BI:B1	BO:B1	0.17 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis
4	Lamp - Off						Lamp off
5							

图5. 关机方法的时间程序

## 3. 结果与分析

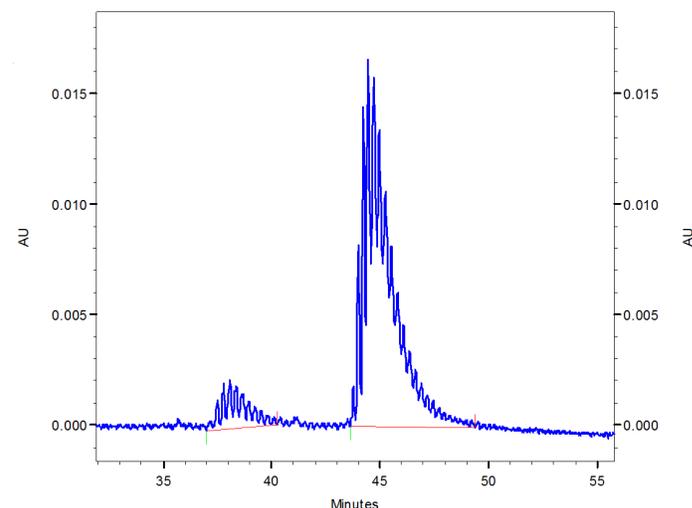


图6. 毛细管凝胶电泳法对mRNA酶切后的PolyA尾巴的分析；峰组1和峰组2为mRNA酶切后的两组PolyA尾巴。

利用毛细管凝胶电泳方法分析mRNA酶切后的PolyA尾巴，mRNA酶切后的PolyA尾巴理论浓度为1 pmol/μL。结果如图6A所示，mRNA酶切后的PolyA检测到两组峰，每一组峰都可根据单碱基进行分离，考察PolyA尾巴的分布范围。如需要计算PolyA尾巴准确的长度，可使用设计的寡核苷酸标准品作为参考。根据软件进行积分，可测得两组峰的含量（以校正峰面积百分比表示）分别为12.64%和87.36%。

PA800 Plus药物分析系统在进行短片段（< 100 nt）的mRNA分析时，分离度可达到单个核苷酸的分离；在mRNA的PolyA尾巴分布分析中，将mRNA酶切为适合的片段，可实现不同长度PolyA的有效分离。用于测定目标长度PolyA尾巴的含量。

#### 4. 结论

该毛细管凝胶电泳方法具有如下特点：

- **高效分离：**按照片段大小对不同mRNA片段进行分离，可实现不同长度PolyA尾巴的分离，分离度可达一个核苷酸。
- **定量准确：**积分后以校正峰面积百分比可有效测定目标长度PolyA尾巴的含量。
- **操作方便：**具有商品化的样品前处理试剂盒和分离试剂盒，适用于mRNA产品的放行分析。
- **符合法规：**仪器具有操作（OQ）认证，操作软件能够进行权限设置和审计追踪。

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。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14117-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](http://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](https://www.sciex.com.cn)