

CGE-LIF方法对环状RNA疫苗的纯度分析

Purity analysis of CircRNA vaccine by CGE-LIF method

刘冬科¹, 高铁¹, 李响², 陈泓序¹, 郭立海¹

Liu Dongke¹, Gao Tie¹, Xiang Li², Chen Hongxu¹, Guo Lihai¹

¹ SCIEX, 中国; ² 中国食品药品检定研究院重组药物室, 北京

¹ SCIEX, China; ² NIFDC, China

关键词: 毛细管凝胶电泳; 激光诱导荧光检测器; 环状RNA; 前体线性RNA; 未成环RNA

1. 前言

近年来, 环状RNA (CircRNA) 成为疫苗领域最新的研究热点, 以稳定性、生产工艺简单吸引多家疫苗企业纷纷布局。与 mRNA 疫苗相比, 其优势在于: 1. CircRNA 的 3' 和 5' 末端共价连接形成一个闭合的连续循环, 没有游离末端, 耐受核酸外切酶, 比线性 mRNA 更加稳定。2. CircRNA 无需加帽、加尾等修饰, 免疫原性更低, 更适合长期多次给药。3. CircRNA 可在胞内持续表达蛋白, 半衰期长, 利用这一优势可降低给药频率。此外, 在双抗的应用上, 一个 CircRNA 可以同时携带多个蛋白编码序列, 递送抗体编码序列时, 无需考虑 LNP 对多条不同 mRNA 包裹递送的复杂工艺问题, 产品更加均一稳定。

目前, 不同类型 CircRNA 的成环机制也有所不同, 但一般是以线性化质粒为模板进行体外转录得到单链 RNA (前体线性 RNA, Precursor RNA), 再以此为基础进行环化过程, 见图 1, 其中 CircRNA 与未成环 RNA (Nicked RNA) 长度相等, 均短于 Precursor RNA。环化完成后, 需对 CircRNA 及产品相关杂质进行表征, 以评价环化效率、纯化工艺、产品质量等。本技术说明利用毛细管凝胶电泳匹配激光诱导荧光检测器 (CGE-LIF) 有效分离了 CircRNA 疫苗产品中 CircRNA 及产品相关杂质 Precursor RNA、Nicked RNA 等, 进而对 CircRNA 进行了纯度分析, 可作为 CircRNA 疫苗质量控制的有力分析工具。

2. 仪器和试剂

2.1 试剂及样品

RNA 9000 Purity & Integrity Kit (SCIEX, PN C48231), 具体内

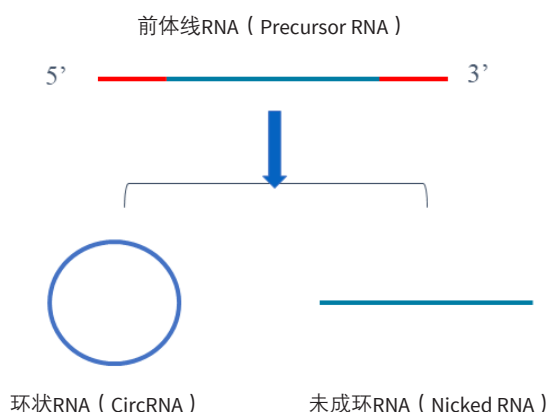


图1. CircRNA 环化过程示意图

容如表1, SLS 溶剂 (SCIEX, PN 608082)。背景电解质配置: 5 mL Nucleic Acid Extended Range Gel 与 10 μ L SYBR™ Green II RNA Gel Stain 混匀, 即得。

CircRNA 疫苗相关样品由某疫苗企业提供, CircRNA 与 Nicked RNA 长度相同, 均为 1885 nt, 相应的 Precursor RNA 长度 2150 nt, 均使用 SLS 试剂稀释至 1 ng/ μ L 左右。

表1. RNA 9000 Purity & Integrity Kit

Component	Quantity
Acid Wash/Regenerating Solution (0.1N HCl)	100 mL
CE Grade Water	140 mL
LIF Performance Test Mixture	20 mL
Nucleic Acid Extended Range Gel	140 mL
SYBR™ Green II RNA Gel Stain	0.11 mL
ssRNA Ladder (0.05 kB to 9 kB)	70 μ L

2.2 仪器及方法

SCIEX PA 800 Plus 药物分析系统，匹配激光诱导荧光检测器 (LIF)。熔融石英毛细管：20/30.2 cm (有效/总长度)，50 μm 内径；LIF检测器激发波长：488 nm，发射波长：520 nm。样品室

温度：10 °C；毛细管温度：预平衡方法20°C，分离方法30°C，关机方法15°C；CGE-LIF预平衡、分离、关机方法时间程序分别见图 2、3、4。

Initial Conditions LIF Detector Initial Conditions Time Program								
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:F1	BO:F1	forward	Water Rinse
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:E1	forward	HCl Rines
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI:F1	BO:F1	forward	Water Rinse
4		Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	Gel Rinse
5		Wait		0.00 min	BI:D1	BO:D1		Water Dip
6		Wait		0.00 min	BI:D1	BO:D1		Water Dip
7	0.00	Separate - Voltage	6.0 KV	20.00 min	BI:C1	BO:C1	2.00 Min ramp, reverse polarity	Separation
8	20.00	Wait		0.00 min	BI:D1	BO:D1		Water Dip
9	20.01	End						
10								

图2. CGE-LIF预平衡方法时间程序

Initial Conditions LIF Detector Initial Conditions Time Program								
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	70.0 psi	1.00 min	BI:E1	BO:E1	forward, In / Out vial inc 8	HCl Rinse
2		Rinse - Pressure	70.0 psi	1.00 min	BI:F1	BO:F1	forward, In / Out vial inc 8	Water Rines
3		Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 8	Gel Rinse
4		Separate - Voltage	30.0 KV	2.00 min	BI:C1	BO:C1	0.17 Min ramp, reverse polarity, In / Out vial inc 8	Pre-Voltage
5		Wait		0.00 min	BI:D1	BO:D1	In / Out vial inc 8	Water Dip
6		Inject - Voltage	1.0 KV	3.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, reverse polarity	Electrokinetic Injection
7		Wait		0.00 min	BI:D1	BO:D1	In / Out vial inc 8	Water Dip
8	0.00	Separate - Voltage	6.0 KV	22.00 min	BI:C1	BO:C1	2.00 Min ramp, reverse polarity, In / Out vial inc 8	Separation
9	8.00	Autozero						
10	22.00	End						
11								

图3. CGE-LIF分离方法时间程序

Initial Conditions LIF Detector Initial Conditions Time Program								
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:E1	forward	HCl Rinse
2		Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:F1	BO:F1	forward	Water Rines
3		Wait		0.00 min	BI:D1	BO:D1		Water Dip
4		Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1		Home
5		Laser - Off						
6								

图4. CGE-LIF关机方法时间程序

3. 结果

利用CGE-LIF方法对CircRNA及其相关杂质进行检测分析，通过标准品验证，在SYBRTM Green II RNA Gel Stain染料条件下确认出峰顺序依次为Nicked RNA, Precursor RNA, CircRNA，如图5所示。

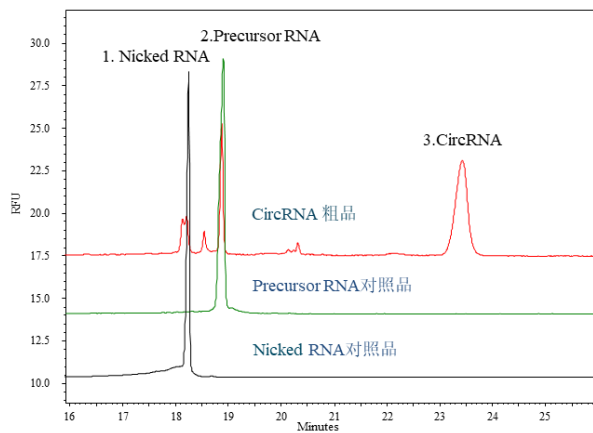


图5. CGE-LIF分离分析CircRNA及其相关杂质

纯度是评价CircRNA质量的重要指标，可通过32karat软件对样品中各峰进行积分，并以校正峰面积百分比表示纯度，CircRNA粗品中CircRNA纯度为61.30%。

4. 结论

本文介绍了CGE-LIF方法配合使用RNA 9000纯度与完整性测定试剂盒对CircRNA疫苗生产过程中的CircRNA及产品相关杂质进行分离分析，在SYBRTM Green II RNA Gel Stain染料条件下出峰顺序依次为Nicked RNA、Precursor RNA、CircRNA，并以校正峰面积百分比表示CircRNA纯度。因此，CGE-LIF可作为CircRNA疫苗研发和质控过程中的有效分析工具。

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。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15386-ZH-B



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

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)