

毛细管凝胶电泳法对mRNA加帽效率的分析

Analysis of capping efficiency of mRNA by capillary gel electrophoresis

高铁, 王文涛, 陈泓序

Gao Tie, Wang Wentao, Chen Hongxu

SCIEX, 中国

SCIEX, China

关键词: 毛细管凝胶电泳, mRNA, 加帽效率

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作为疫苗, 通常以线性化的DNA作为模板, 通过体外转录 (IVT) 获得。其中在mRNA 5'端的甲基鸟苷帽子 (cap) 是mRNA在生产过程中重要的组成结构, 根据甲基化程度不同可形成三种类型的帽子: cap0、cap1和cap2, 而一个帽子结构的分子量与核苷酸的分子量相近。帽子结构是翻译起始所必须的结构, 为核糖体识别mRNA提供信号, 并协助核糖体与mRNA结合使翻译从起始密码子开始。因此加帽效率是mRNA疫苗生产过程中重要的质量参数。作为疫苗使用的mRNA长度通常为几千个核苷酸 (nt), 而5'端的帽子结构的分子量约为300, 类似于一个核苷酸的分子量, 几千个核苷酸长度下无法区分单个核苷酸的差异, 需要酶切为短片段才可以通毛细管电泳技术进行分离和检测。特定的核糖核酸酶 (RNase) 可将mRNA加帽端切割为15-30 nt的片段, 利用毛细管凝胶电泳技术对酶切后的片段进行检测, 可有效分离未加帽与加帽的mRNA片段, 根据加帽片段占未加帽与加帽片段之和的比例表征mRNA的加帽效率。

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 5'端未加帽和加帽片段在CE中明显分离, 利用校正峰面积百分比来表征加帽效率。



图1. PA800 Plus药物分析系统与ssDNA 100-R试剂盒

2. 试剂及方法

2.1 仪器和试剂

PA800 Plus制药分析系统匹配紫外检测器 (SCIEX); ssDNA 100-R试剂盒购自SCIEX, RNase H, RNase H反应缓冲液购自New England Biolabs; 链霉亲和素涂层磁珠购自Invitrogen; 无酶水、甲醇、磁力架购自Thermo。

样品前处理中的清洗缓冲液配置 (5 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.5 mM EDTA; 1 M NaCl): 吸取1 mL 50 mM Tris-HCl、10 μ L 0.5 M EDTA (pH 8.0)、2 mL 5 M氯化钠, 加无酶水至10 mL, 2~8 $^{\circ}$ C保存备用。

样品前处理中的缓冲液A (0.1 M NaOH、0.05 M NaCl): 吸取1 mL 1 M氢氧化钠、100 μ L 5 M氯化钠, 加无酶水至10 mL, 2~8 $^{\circ}$ C保存备用, 有效期六个月;

样品前处理中的缓冲液B (0.1 M NaCl)：吸取200 μL 5 M氯化钠，加无酶水至10 mL，2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用，有效期六个月；

凝胶缓冲液配置：在Tris-Borate Buffer瓶中加入135 mL无酶水，使其充分溶解；在溶液后的Tris-Borate Buffer瓶中缓慢将7 M尿素 (Urea) 瓶中的固体加入，使得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 Tris-Borate-Urea溶液置于ssDNA 100-R Gel，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

未加帽 (uncap) 及加帽 (cap) 的mRNA原由国内某公司提供，均进行酶切处理。帽子结构为cap1。未加帽的mRNA作为对照样品，用于峰的指认。

2.2.1 设计引物 (探针Probe)：

设计引物的长度为25 nt，在5'端设计4个DNA碱基对，5'端或3'端设计BioTEG。

2.2.2 前处理过程：

1. mRNA样品与引物退火处理

- 取500 pmol引物 (10 pmol/ μL , 50 μL)、10 \times Rnase H反应缓冲液 (12 μL)、100 pmol mRNA、补加无酶水至120 μL 反应体系 (引物与样品比例为5:1)；
- 退火程序为95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min，降温至65 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 各2 min，最终设置为22 $^{\circ}\text{C}$ 。

2. 磁珠提取前处理

- 取适量磁珠 (10 mg/mL) 于1.5 mL离心管，置于磁力架上，去掉多于液体，加入相同体积缓冲液 A，混匀后置于磁力架上，去掉缓冲液A，重复上述过程1次；
- 加入相同体积缓冲液B，混匀后置于磁力架上，去掉缓冲液B，加入相同体积 Buffer B，100 μL 分装待用；

3. RNase H酶切反应

- 100 μL 待用磁珠放置于磁力架上，去掉Buffer B，加入退火反应液，室温轻轻震荡30min；
- 加入10 μL RNase H (50 U)，吹打混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 静置3h；然后放置于磁力架，弃掉上清，避免碰到磁珠；

4. 寡核苷酸片段回收

- 上述酶解液放置于磁力架，弃掉上清，加入100 μL 清洗缓冲液，混匀后置于磁力架上，去掉清洗缓冲液，重复上述过程2次；
 - 加入100 μL 无酶水，混匀后置于磁力架上，去掉无酶水，重复上述过程2次；
 - 加入100 μL 75%甲醇 (80 $^{\circ}\text{C}$ 预热)，80 $^{\circ}\text{C}$ 3 min，置于磁力架，取上清至新的EP管中；氮气吹干，备用；
5. 进行毛细管凝胶电泳分析之前，加20 μL 无酶水溶解。

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，30/40.2 cm (有效/总长度)；毛细管温度：30 $^{\circ}\text{C}$ ；样品储存温度：10 $^{\circ}\text{C}$ ；UV检测器检测波长：254 nm。样品进样条件：-5 kV，4 s；分离条件：-9 kV，45 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:D	BO:D1	forward	ssDNA Gel Fill
4	0.00 Separate - Voltage	3.0 KV	5.00 min	BI:B1	BO:B1	0.17 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis between Buffer Vials
5	5.00 Separate - Voltage	9.0 KV	10.00 min	BI:B1	BO:B1	0.17 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis between Buffer vials
6	15.00 End						
7							

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, In / Out vial inc 5	ssDNA Gel Fill
2	0.00 Separate - Voltage	9.0 KV	10.00 min	BI:B1	BO:B1	0.17 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis between Buffer vials
3	10.00 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样品中加帽与未加帽的 mRNA 片段的分离检测。

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 dip
2	Inject - Voltage	5.0 KV	4.0 sec	SI:A1	BO:B1	Override, reverse polarity	Sample injection
3	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 5	ddH2O Dip
4	Separate - Voltage	9.0 KV	45.00 min	BI:E1	BO:E1	0.17 Min ramp, reverse polarity, b	Separation Between Buffer Vials
5	Autozero						
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	5.00 Min ramp, reverse polarity	Pre-electrophoresis between Buffer vials
4	Lamp - Off						Lamp Off
5							

图5. 关机方法的时间程序

3 结果与分析

利用毛细管凝胶电泳方法单独运行引物、未加帽与加帽的 mRNA 片段，引物的浓度为 10 pmol/μL，未加帽和加帽片段经过分光光度计测定后核酸浓度均为 218 ng/μL，根据片段长度换算后的摩尔浓度约为 33 pmol/μL。结果如图6A所示。根据引物的出峰时间，可以判断加帽片段中的峰1为引物峰。在图6B中，将未加帽与加帽的片段进行混合，可以看到二者的分离。像上述混合物中添加未加帽片段，峰3增高，因此可判断峰2为未加帽片段，峰3为加帽片段。峰2和峰3在此条件下的分离度为 1.41，峰4为未加帽片段样品中的杂质。

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-02-14046-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

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)

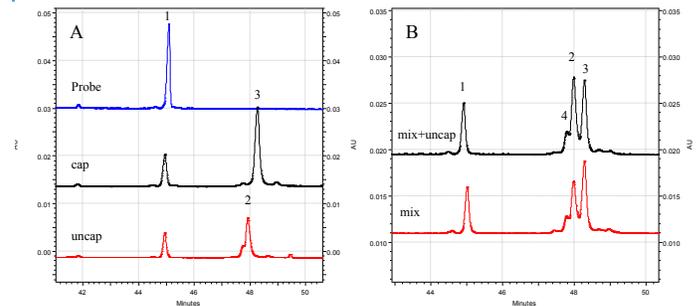


图6. 毛细管凝胶电泳法对 mRNA 未加帽和加帽片段的分析。A: 红色: 未加帽片段 (uncap), 黑色: 加帽片段 (cap), 蓝色: 引物 (probe); B: 红色: 未加帽与加帽片段的混合物 (mix), 黑色: 混合物中添加未加帽片段 (mix+uncap); 峰1: 引物, 峰2: 未加帽片段, 峰3: 加帽片段, 峰4: 杂质峰

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 加帽效率的分析中，将 mRNA 酶切为适合的片段 (约为 15-30 nt)，对于分子量相差 300 (约为一个核苷酸) 的未加帽和加帽的片段，可实现有效分离；对图6A中加帽片段的图谱进行积分处理，根据加帽片段占未加帽片段和加帽片段的校正峰面积百分比可算得加帽效率为 94.2%。

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，可实现未加帽片段与加帽片段的高效分离，分离度 1.41。
- **定量准确：**根据加帽片段占未加帽片段与加帽片段的校准峰面积百分比可表征加帽效率，本说明中的加帽效率为 94.2%。
- **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。