

# CE-SDS作为质控方法进行mRNA polyA尾长度计算及含量分析

## CE-SDS was used as a quality control method to analyze length and content of polyA tail of mRNA

刘冬科, 兰朝辉, 高铁, 陈泓序, 刘冰洁

Liu Dongke, Lan Zhaohui, Gao Tie, Chen Hongxu, Liu Bingjie

SCIEX, 中国

SCIEX, China

**关键词:** CE-SDS; mRNA; polyA 尾; polyA ladder

### 1. 前言

mRNA的3'端polyA尾广泛参与调控mRNA成熟、核输出、胞内稳定性及蛋白质翻译全过程, polyA尾的精准检测是mRNA药物研发、生产中的重要质控环节, 国家药品监督管理局药品审评中心(CDE)发布的《mRNA疫苗药学研究技术指导原则》将polyA尾长度、加尾效率及结构均一性列为mRNA产品关键质量属性, 要求贯穿工艺开发、工艺验证与成品放行全流程<sup>[1]</sup>。世界卫生组织(WHO)发布的《RNA疫苗质量评估指南》、美国药典《Analytical Procedures for mRNA Vaccines》亦将polyA尾检测纳入法定质控体系, 成为保障mRNA药物有效性与安全性的重要依据<sup>[2-3]</sup>。基于此, 开发高效、准确的polyA尾检测方法, 对推动mRNA产业规范化、标准化发展具有重要的应用意义。

在PA800 Plus药物分析系统上, ssDNA 100-R试剂盒(PN 477480)及SDS-MW试剂盒(PN 390953)可实现寡核苷酸单碱基分离及polyA尾的含量分析, 但长度检测多使用质谱法, 而质谱在mRNA质控放行阶段难以普及<sup>[4-5]</sup>。本研究在SDS-MW试剂盒方案基础上, 验证CE-SDS可作为单一质控方法同时对polyA尾进行准确的长度计算及含量分析:

- 利用已知长度的polyA ladder建立长度与迁移时间的线性关系, 外标法计算样品polyA尾的长度。加标定性结果证明利用polyA ladder标曲计算polyA尾长度的方式准确、可靠。
- 根据峰面积归一化法, 软件可自动计算各长度polyA的含量。

### 2. 方法及试剂

#### 2.1 仪器及设置

PA800 Plus药物分析系统, 检测器波长: UV, 254 nm, 采集频率: 4 Hz; 样品室温度: 15 °C, 毛细管温度: 25 °C, 窗口狭缝: 2号(100 × 200 μm), 毛细管: 熔融石英毛细管, 50 μm内径, 有效/总长度=20/30.2 cm。进样条件: -5 kV, 20 s; 分离电压: -10 kV, 50 min。

毛细管针间冲洗和胶填充: 0.1 mol/L氢氧化钠溶液在70 psi压力下冲洗3 min, 然后用0.1 mol/L盐酸溶液在70 psi压力下冲洗1 min, 再用去离子水在70 psi压力下冲洗1 min, 最后用SDS凝胶分离缓冲液在70 psi压力下冲洗5 min。

#### 2.2 试剂及样品

SDS-MW试剂盒(PN 390953), 用到其中的SDS Gel buffer(SCIEX, A30341), 50 μm内径熔融石英毛细管(SCIEX, 338451), 0.1 M盐酸溶液, 0.1 M氢氧化钠溶液。

PolyA尾巴部分的酶切与纯化试剂: RNase-free-ddH<sub>2</sub>O(Vazyme, PN P071)、RNase T1酶(Thermo, EN0541)、LiCl(Sigma-Aldrich, L116328)、Tris(Sigma-Aldrich, RDD008)、HCl(Sigma-Aldrich, 258148)、无酶水(Thermo, 4387936)、甲醇(Sigma-Aldrich, 322415)、磁力架(Thermo, 12321D)、EDTA(Sigma-Aldrich, 4008-M)、mRNA Capture Beads 2.0(Vazyme, PN N403)。

6个不同长度polyA标准品(IDT合成, 浓度1.0 mg/mL): 20 nt、40 nt、60 nt、80 nt、100 nt、120 nt, 序列见表1。mRNA样品由某企业提供, 为两段式的polyA尾, 长度约为30 nt、70 nt。

表1. 不同长度寡核苷酸标准品的序列

| 长度     | 序列                                                                                                                           |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 20 nt  | rAAAAAAAAAAAAAAAAAG                                                                                                          |
| 40 nt  | rAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAG                                                                                   |
| 60 nt  | rAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAG                                                                 |
| 80 nt  | rAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAG                                         |
| 100 nt | rAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAG                   |
| 120 nt | rAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAG |

2.3 样品前处理

- mRNA样品经如下前处理，进行polyA尾巴部分的酶切。
- 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）。

3. 分析与讨论

3.1 polyA尾长度计算

6个不同长度的polyA ladder：20 nt、40 nt、60 nt、80 nt、100 nt、120 nt，在CE-SDS方法下可实现良好分离（图1A），长度与出峰时间成正比，以各polyA ladder的迁移时间为横坐标，长度为纵坐标，建立线性标准曲线，线性良好，R<sup>2</sup>=0.9983（图1B）。

polyA尾样品可检测到两组峰，分离度较好（图1A）。polyA ladder与polyA尾样品的电泳图叠加发现Group1峰长度分别在20 nt~40 nt之间，由10个小峰组成，分别记为1-1、1-2、……、1-10。Group2峰长度在60 nt~80 nt之间，由13个小峰组成，分别记为2-1、2-2、……、2-13。

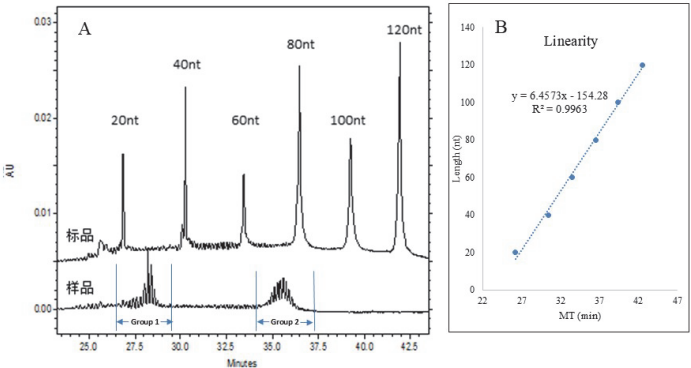


图1. polyA ladder与polyA尾样品电泳叠图（A）及polyA ladder标曲（B）

将两组峰中各小峰的迁移时间带入polyA ladder标曲计算各峰长度，结果如图2表格所示，Group 1与Group 2的峰均呈现一个碱基长度的递增，Group1的10个峰长度在23 nt~30 nt，最高峰为27 nt。Group 2的13个峰长度在67 nt~79 nt，最高峰为73 nt，计算结果可精确到1个碱基长度。

为进一步验证计算结果的准确性，向polyA尾样品内加入20 nt、40 nt、60 nt、80 nt四个polyA ladder加标定性。Group 1从20 nt开始计数，每个峰累加一个碱基长度，10个峰分别对应22 nt~31 nt的10个碱基长度，最高峰为27 nt。Group 2从60 nt计数，每个峰累加一个碱基长度，13个峰分别对应为67 nt~79 nt的13个碱基长度，最高峰为73 nt，这与polyA ladder标准曲线的计算结果一致。

上述结果证明通过polyA ladder计算polyA尾碱基长度的方式准确、可靠，同时印证了CE-SDS方法可实现polyA尾的单碱基分离。

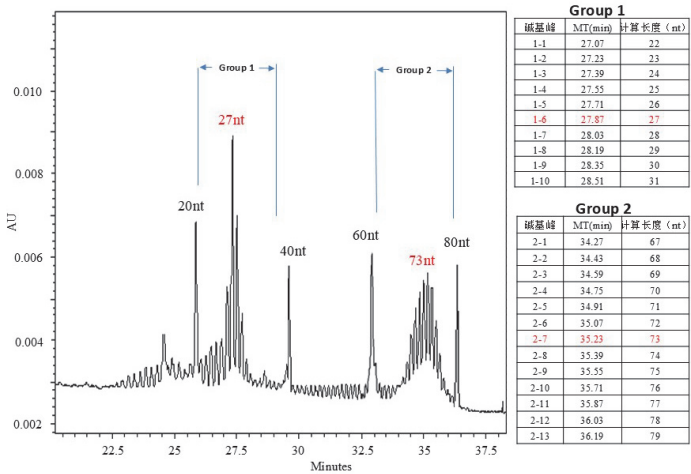


图2. polyA尾样品加标电泳图（左）及polyA ladder计算出的碱基峰长度（右）

### 3.2 polyA尾定量

根据软件积分，Group 1和Group 2的含量（以校正峰面积百分比表示）分别为49.75 %和50.25 %。对两组峰中的各碱基峰单独积分，含量分布如图3，横坐标为polyA尾长度，纵坐标为校正峰面积百分比（%），即含量占比，其中27 nt、73 nt的峰含量最高，分别占比16.72%、7.28%。

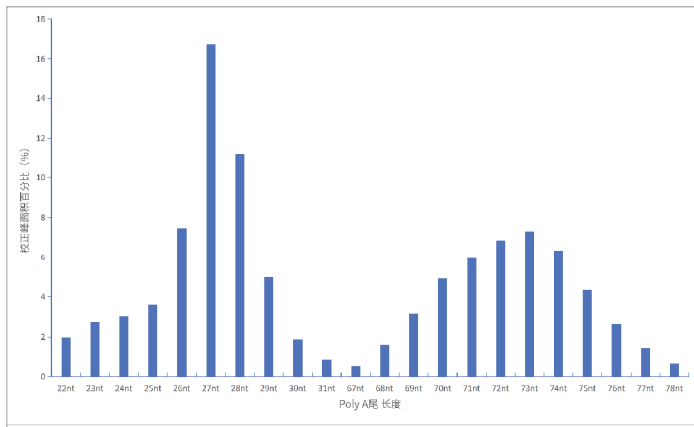


图3. 样品polyA尾长度分布柱状图

## 4. 结论

利用CE-SDS方法可实现polyA尾单碱基分离的优势，将已知长度的polyA ladder通过外标法准确计算polyA尾的长度，同时软件积分进行polyA尾的含量分析。因此，CE-SDS可以作为单一质控方法实现同时对polyA尾长度计算及含量分析，为mRNA产品质控提供简便、准确的检测方案。

### 参考文献：

1. 国家药品监督管理局药品审评中心。预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则（试行）[EB/OL]. (2026-01-27).
2. World Health Organization. Evaluation of the quality, safety and efficacy of mRNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations[EB/OL]. (2021)[2026-06-15].
3. United States Pharmacopeial Convention. Analytical Procedures for Quality of mRNA Vaccines and Therapeutics: Draft Guidelines(3rd Ed.)[EB/OL]. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2024-08-02.
4. 毛细管凝胶电泳法对mRNA PolyA尾巴分布的分析，SCIEX technical note, RUO-MKT-02-14117-ZH-A.
5. 高灵敏度、高稳定性的CGE方法对mRNA PolyA尾巴分布的分析——使用SDS-MW试剂盒的方法，SCIEX technical note, MKT-34795-A.

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。

© 2026 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-39109-A



#### SCIEX中国

北京分公司  
北京市昌平区生命科学园科学园路  
18号院A座一层  
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](http://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