

毛细管凝胶电泳方法用于mRNA疫苗中宿主残留DNA(HCD)的分布分析

Integrity analysis of bivalent mRNA vaccine by capillary gel electrophoresis

唐红梅, 张晓霞, 陈泓序, 罗继, 刘冰洁

Hongmei Tang, Xiaoxia Zhang, Hongxu Chen, Ji Luo, Bingjie Liu

SCIEX, 中国;

SCIEX, China;

Key words: Capillary Gel Electrophoresis, mRNA vaccine, HCD, Integrity

1. 引言

用传代细胞株生产的生物制品, 其终产品中通常会存在宿主细胞残留 DNA(HCD)。由于HCD具有潜在的安全风险对病毒感染性、致瘤性、免疫原性以及致突变性, 残留的HCD已得到生物制药公司和监管机构的广泛关注。在过去的几十年里, 不同国家的监管机构相继发布了生物样本中残留HCD片段的可接受量等相关指南, 同时各国药典也提供数种经典的检测方法, 建立合适的宿主细胞残留DNA检测方法有助于监测生产工艺, 确保生物制品的安全性; 目前美国食品药品监督管理局(FDA)和中国国家药品监督管理局(NMPA)均在基因治疗新产品生产指导类型文件中明确指出HCD的片段要小于200 bp, 残留量小于10 ng/剂。为了满足监管机构对mRNA疫苗中HCD的产品特性、功能及安全性的严格评估要求, 必须对多个关键质量属性(CQA)进行细致监控。定量聚合酶链反应(QPCR)方法是常用于HCD片段分析的方法, 但是QPCR方法需要先扩增, 不能检测非特异性片段; 与定量聚合酶链反应(QPCR)相比, 毛细管凝胶电泳法无需预先对HCD片段进行扩增和标记, 就能够检测样本中所有大小的残留HCD片段, 从而有效避免了Q-PCR仅能检测特定片段的缺点, 并且分析速度更快。其中Shen等人率先进行了标记使用SYBR Green I对DNA进行染色, 并利用毛细管凝胶电泳-激光诱导荧光(CGELIF)技术分析MDCK细胞来源的流感病毒疫苗和vero细胞来源的呼吸道合胞病毒疫苗中残留HCD片段的大小

分布^[1]。Gao等人采用CGE-LIF方法对重组蛋白类新冠疫苗^[2], 慢病毒^[3], 狂犬疫苗中^[4]的HCD进行了分析; Wang等人采用CGE-LIF方法已完成腺相关病毒中的HCD分布分析^[5], 并优化了前处理方案。此外, 激光诱导荧光检测器(LIF)具有极高的灵敏度, 因此能够为样品中残留碎片的分布分析提供更准确的结果。

在本研究中, 采用SCIEX公司的20 kb DNA Plasmid and Linear Kit试剂盒结合LIF检测器建立了一种CGE-LIF方法分析含有双链DNA基因组的mRNA疫苗产品中残留HCD片段的尺寸分布。在本研究中, 毛细管凝胶电泳-激光诱导荧光(CGELIF)能够根据片段尺寸的差异实现核酸的分离, 并成功用于残留HCD片段的尺寸分布分析。

2. 试剂及方法

2.1 试剂和样品

试剂: DNA 20 kb Plasmid and Linear Kit (PN 5311708) 试剂盒包含: DNA 20 kb Plasmid and Linear gel(SCIEX, 5312283); DNA 20 kb Plasmid and Linear conditioning solution(SCIEX, 5312283); DNA 20 kb Plasmid and Linear sample buffer(SCIEX, 5312283); CE Grade water(SCIEX, C48034); 0.1N HCl (Acid wash/regenerating solution) (SCIEX, 5312349); SYBR™ Gold Nucleic Acid gel stain; DNA 20 kb Plasmid test mix; 200 bp marker(需要基因合成公司合成)。

样品: 经过QIAquick试剂盒(QIAGEN, PN 28104)提取纯化后的HCD样品, 浓度约30 ng/μL。前处理流程图如下图1所示;

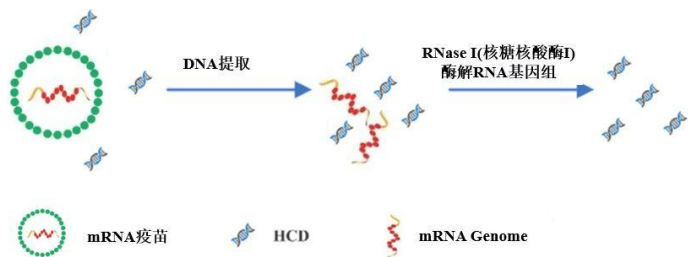


图1. mRNA疫苗中HCD纯化流程示意图

2.2 样品及前处理

配制背景凝胶缓冲液：取80 μL SYBRTM Green II RNA Gel Stain 溶于20 mL DNA 20 kb Plasmid and Linear gel 中，涡旋混匀备用。

样品溶液制备：使用已用去离子水进行3倍稀释的TE溶液将样品稀释到约1 ng/ μL ，涡旋混匀作为待测溶液。

200 bp marker溶液制备：使用已用去离子水进行3倍稀释的TE溶液将200 bp marker稀释到约0.001 ng/ μL ，涡旋混匀作为外标法待测溶液。

样品与200 bp marker混合液：取100 μL 2 ng/ μL 的样品溶液与100 μL 0.002 ng/ μL 的200 bp marker溶液涡旋混合均匀作为待测溶液，使得最终溶液中样品浓度为1 ng/ μL ，200 bp marker浓度为0.001 ng/ μL (内标溶液)。

2.3 仪器及方法设置

采用SCIEX PA 800 plus 药物分析系统，匹配LIF检测器，采集频率：4 Hz，激发波长488 nm，发射波长520 nm；熔融石英毛细管：50 μm 内径，20/30.2 cm (有效/总长度)；毛细管温度：22 $^{\circ}\text{C}$ ；样品室温度：10 $^{\circ}\text{C}$ ；电压进样条件：-8 kV，20 s；分离条件：-9 kV，15 min。

毛细管预处理：新毛细管运行前，需要先进行condition动态涂层；每次序列运行开始时，依次用0.1 N HCl(70 psi, 1 min)、去离子水(70 psi, 1 min)和凝胶缓冲液(70 psi, 10 min)冲洗毛细管。进样前后各冲洗毛细管两端一次，然后用电进样方式(-8 kV, 20 s)进样。分离程序为-9 kV，15 min，并在分离时施加两端20 psi的气压。

3. 结果与分析

3.1 CGE方法分离结果

图2为HCD样品分离电泳谱图，本文通过两种方式进行定位；一种是外标法，200 bp marker单独运行用于定位样品中大于200 bp的片段；另一种是内标法，样品与200 bp marker混合对样品中大于200 bp的片段进行定位。从分离结果可以看出作为外标加入的200 bp marker与混合样品中的200 bp marker出峰位置一致，定位准确；样品中PK#5,6是大于200 bp的片段，校正峰面积比例为8.1%。

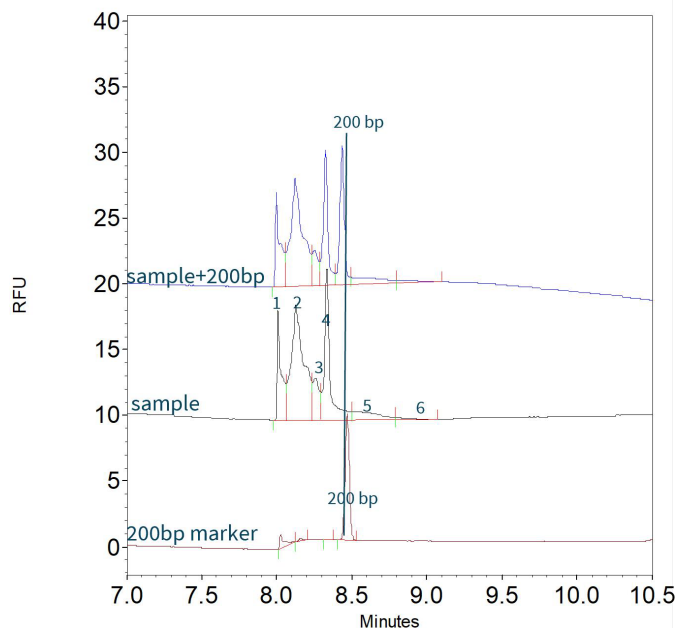


图2. mRNA疫苗中HCD分布结果

4. 结论

本文借助于PA 800 plus 生物制药分析系统以及SCIEX的DNA 20 kb Plasmid and Linear Kit 试剂盒对mRNA疫苗中HCD进行分析，主要结论如下：

1. 采用 CGE-LIF方法搭配DNA 20 kb Plasmid and Linear Kit 试剂盒，提供了一种能够方便快捷的方案用于mRNA疫苗中HCD片段的分布分析，并能够准确的对样品中大于200 bp片段进行定位。
2. 激光诱导荧光检测器(LIF)具有极高的灵敏度，能够为样品中残留碎片的分布分析提供更准确的结果。

5. 参考文献

1. Size distribution analysis of residual host cell DNA fragments in lentivirus by CGE-LIF, Electrophoresis 2022, 1-10.
2. CGE-LIF方法对重组蛋白类新冠疫苗中宿主细胞残留DNA片段大小的分布分析, SCIEX Technical Note, RUO-MKT-02-15490-ZH-A.
3. CGE-LIF方法对慢病毒中宿主细胞残留DNA片段大小的分布分析, SCIEX Technical Note, RUO-MKT-02-13912-ZH-A.
4. CGE-LIF方法分析不同工艺阶段狂犬疫苗中宿主残留DNA的片段大小分布, SCIEX Technical Note, RUO-MKT-02-15816-ZH-A.
5. CGE-LIF方法对重组腺病毒疫苗中宿主细胞残留DNA片段大小的分布分析, SCIEX Technical Note, RUO-MKT-02-14119-ZH-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-37221-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

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](#)