

毛细管凝胶电泳法对SgRNA的纯度分析

Purity analysis of SgRNA by capillary gel electrophoresis

唐红梅, 张晓霞, 陈泓序, 罗继, 郭立海

Hongmei Tang, Xiaoxia Zhang, Hongxu Chen, Ji Luo, Lihai Guo

SCIEX, 中国;

SCIEX, China;

Keywords: CGE, SgRNA, Purity

1. 引言

向导RNA (SgRNA, small guide RNA) 在RNA编辑过程中可以引导尿苷残基插入或缺失到动质体中, 可以与pre-RNA配对, 属于小型非编码RNA。SgRNA在CRISPR-Cas9基因编辑系统中具有准确识别靶基因序列的作用, 其效果可影响编辑的效率、是否发生脱靶等。SgRNA的长度通常为60-80 nt, 长的可达100 nt左右; 常用的HPLC方法对片段较长的SgRNA分离度不够, 并且需要用到有机溶剂, 对环境有影响; 毛细管凝胶电泳法可以对片段长度为99 nt的SgRNA样品进行有效分离并对其纯度进行分析。

本文以100 nt, 99 nt, 97 nt, 95 nt和90 nt的RNA标准品为例, 考察了这些片段的分离情况, 并对99 nt的SgRNA样品进行了纯度分析。SCIEX单链DNA分析试剂盒(ssDNA 100-R)基于核酸片段大小进行分离, 可以将100 nt与99 nt片段长度的RNA标准品分离, 并且100 nt与97 nt、95 nt、90 nt RNA标准品的分离度大于1。因此对于长至100 nt左右的SgRNA样品, 可以实现其N+1和N-1的杂质分离及准确定量。

2. 试剂及样品

2.1 试剂

ssDNA 100-R试剂盒 (SCIEX, 477480), 包含DNA涂层毛细管 (477477)、ssDNA 100-R Gel凝胶粉末 (77621)、Tris-Borate Buffer、7 M Urea、pd(A) 40-60 Test Mix (477626);

其它试剂: 去离子水(Millipore)。

2.2 样品及前处理方法

样品: 100 nt、99 nt、97 nt、95 nt、90 nt片段长度的RNA标准品和99 nt的SgRNA均由某药企提供; 样品初始浓度均为0.05 nmol/ μ L;

制备Tris-Borate-Urea Buffer溶液: 将135 mL的DDI水添加到含有Tris-Borate干粉的试剂瓶中, 使用磁子在800 rpm下搅拌溶液20至30 min, 确保硼酸完全溶解。缓慢将干燥的7 M尿素添加到Tri-硼酸盐缓冲液中, 同时继续搅拌溶液; 在室温下搅拌溶液2 h, 直至尿素完全溶解且缓冲液澄清;

制备ssDNA 100-R Gel Buffer溶液: 向冻干的凝胶粉末中加入5.0 mL经0.45 μ m滤膜过滤后的Tris-Borate-Urea缓冲液; 用干净且干燥的磁子在800 rpm下搅拌溶液4-6 h, 直到凝胶完全溶解;

制备样本溶液: 将样品置于1.5 mL离心管中, 加入无酶水稀释至终浓度为1ng/ μ L; 准确移取20 μ L稀释后的样品溶液加入到NanoVial样品管中, 用于后续检测;

制备混合样本溶液: 将样品置于1.5 mL离心管中, 加入无酶水将混合物稀释至样品终浓度为0.5 ng/ μ L、标准品浓度为0.25 ng/ μ L; 准确移取20 μ L样品溶液加入到NanoVial样品管中, 用于后续检测;

3. 仪器及方法

采用SCIEX PA 800 Plus药物分析系统, 匹配紫外检测器, 采集频率: 4 Hz, 检测波长为: 254 nm; 窗口狭缝: 100 \times 200 μ m; DNA涂层毛细管, 100 μ m内径, 20/30.2 cm(有效长度/总长度); 进样条件: -5 kV, 4 s; 分离电压: -9.0 kV, 45 min; 毛细管温度: 50 $^{\circ}$ C; 样品室温度: 15 $^{\circ}$ C。

毛细管平衡方法：分别用去离子水、TBE 尿素 Buffer在20 psi 气压下各冲洗毛细管2 min、然后在50 psi气压下填充ssDNA 100-R Gel 10 min；分别用3 kv、9 kv进行预分离，反向电极，时间分别为5 min，10 min；

凝胶填充方法：在50 psi气压下填充ssDNA 100-R Gel 10 min；用9 kv电压进行预分离，反向电极，时间10 min；

每隔5次分离，应使用凝胶填充法更换一次毛细管中的 ssDNA 100-R Gel。

4. 结果与分析

4.1 100 nt 与99 nt、97 nt、95 nt、90 nt的RNA标准品的分离结果

考察100 nt 与99 nt、97 nt、95 nt、90 nt的RNA标准品的分离，分离结果如下图1。

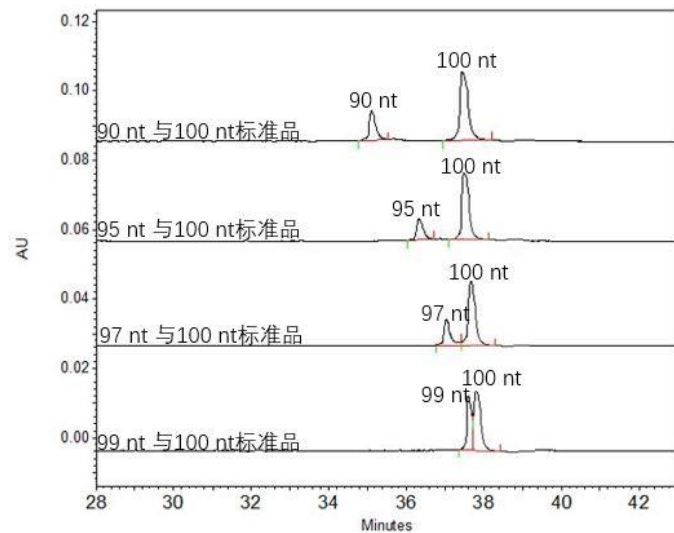


图1. 100 nt与99nt、97nt、95nt、90nt的RNA标准品的分离谱图。

毛细管凝胶电泳法依据核酸片段大小进行分析，100 nt与99 nt、97 nt、95 nt、90 nt的RNA标准品的分离度见表1；100 nt与99 nt片段长度的RNA标准品能够分离，分离度0.6，而100 nt与97 nt、95 nt、90 nt RNA标准品的分离度均大于1。

表1. 100 nt与99 nt、97 nt、95 nt、90 nt的RNA标准品分离度结果

片段长度	分离度
100 nt与99 nt	0.6
100 nt与97 nt	1.9
100 nt与95 nt	3.2
100 nt与90 nt	6.0

4.2 99 nt 片段长度SgRNA样品的纯度分析

片段长度为99 nt 的SgRNA样品纯度分析结果如下图2。毛细管凝胶电泳法依据核酸片段大小进行分析，通过与100 nt片段长度标准品谱图出峰位置对比，确认99nt样品谱图中峰2是100 nt片段，因此99 nt片段长度 SgRNA样品的纯度为92.54%。

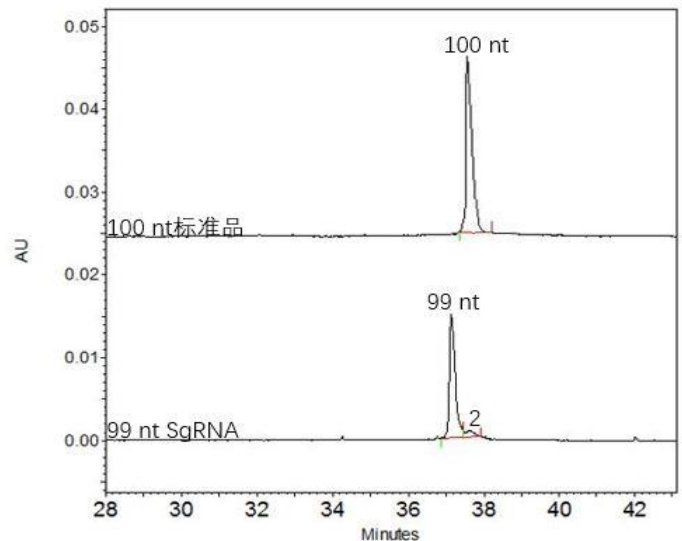


图2. 毛细管凝胶电泳法对99 nt 片段长度SgRNA纯度分析的电泳图

5. 结论

本文采用SCIEX成熟稳定的ssDNA 100-R单链寡核苷酸分析试剂盒，可以实现100 nt与99 nt、97 nt、95 nt、90 nt的RNA标准品的分离，其中100 nt与97 nt、95 nt、90 nt RNA标准品的分离度均大于1；因此，对于100 nt左右的SgRNA样品，可以实现其N+1和N-1的杂质分离及准确定量。该方法可有效应用于SgRNA样品与其杂质的分离及纯度分析。

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。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15645-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：021-2419-7201
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](#)