

CGE-LIF方法对mRNA疫苗的纯度分析

Purity Analysis of mRNA Vaccine by Using CGE-LIF

高铁, 任挺钧, 陈泓序

Gao Tie, Ren Tingjun, Chen Hongxu

SCIEX, 中国

SCIEX, China

Keywords: mRNA; Vaccine; PA 800 Plus; Capillary Gel Electrophoresis; LIF

1. 前言

RNA疫苗是具有免疫性、安全性及灵活性的基因疫苗。相比传统疫苗, mRNA疫苗能够刺激免疫系统产生平衡、长效的保护。在mRNA疫苗的生产过程中, 会产生不完整的片段, 这部分作为杂质存在于mRNA疫苗中。因此需要利用有效的分析手段评价mRNA疫苗的纯度。

琼脂糖凝胶电泳在分析核酸纯度时, 其复杂的人工操作、冗长的分析时间、较差的分离度和不精准的定量等劣势导致该方法逐步被取代。毛细管凝胶电泳是更有效分离核酸的方法, 具有分离分析时间短、定量准确、自动化程度高等优势, 适用于从几百至上千长度核酸的分离, 可有效用于mRNA疫苗纯度的检测和评价。

SCIEX PA 800 Plus药物分析系统是经典的毛细管电泳仪器(如图1), 在mRNA疫苗的纯度分析中, 可根据样品的不同长度设计不

同的凝胶缓冲液, 选择合适的分离电压和毛细管温度等参数。从硬件和软件上SCIEX PA 800 Plus药物分析系统具有如下优势:

- 可优化的凝胶缓冲液成分及浓度: 通过改变凝胶大分子的浓度使不同长度的核酸达到最优分离度;
- LIF检测器: 作为超高灵敏度的检测器, 在进行核酸分析时, 其基线更平滑、灵敏度更高, 有助于杂质的检测和积分的准确性;
- 更准确的积分条件: 32 Karat™软件可设置适合的宽度、阈值、肩灵敏度等参数, 准确积分还原mRNA疫苗纯度的真实数据;
- 适用于核酸样品的样品温控: 仪器可设置4-60 °C样品储存温度, mRNA疫苗样品在室温储存易变性, 保证低温储存环境可保证mRNA疫苗样品的稳定;
- 用于微量样品分析的nanoVial: nanoVial适合微量样品的进样分析, 可放置5 µL样品即可完成进样;
- 可选择的仪器参数: 仪器可设置1-30 kV的分离电压和15-60 °C的毛细管温度控制, 可根据样品的出峰时间选择合适的分离电压和毛细管温度。

2. 试剂和方法

2.1. 试剂和样品

聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, Sigma, PN 437190), 10 × TBE buffer (Sigma, PN 574795), 尿素 (Sigma, PN U5378), SYBRTM Green II RNA Gel Stain (10000 concentrate in DMSO, Thermo, PN S7564), 无核酶水 (Ambion, PN AM9938)。

mRNA疫苗样品由国内某厂家提供(长度约为4000 bp, 浓度为1 mg/mL, 溶于无核酶水中)。



图1. PA 800 Plus药物分析系统(①)匹配LIF检测器(②)和nanoVial(③)。

2.2. 样品前处理方法

mRNA疫苗样品用无核酶水稀释至0.5 mg/mL；稀释后的样品在65 °C金属浴中加热5 min后立即放在冰块上降温。移取20 µL至nanoVial (SCIEX, PN 5043467) 中。

2.3. 凝胶缓冲液的配置

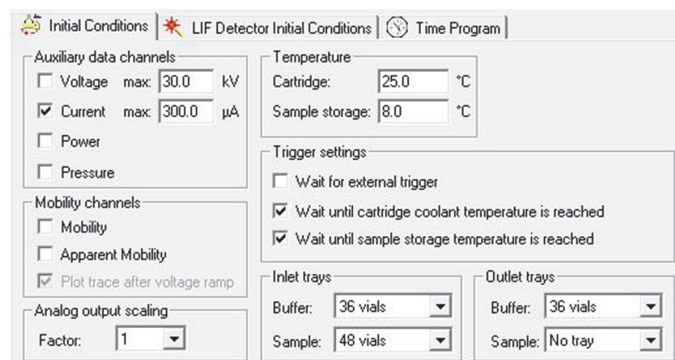
- 配置30 mL 1× TBE缓冲液：取3 mL 10× TBE缓冲液，添加28 mL 无核酶水；
- 配置含1% PVP和4 M尿素的1× TBE缓冲液：分别称取0.2 g PVP和4.8 g尿素，使用1× TBE缓冲液溶解，充分溶解后定容至20 mL；
- 配置含有染料的凝胶缓冲液：20 mL含1% PVP和4 M尿素的1× TBE缓冲液添加2 µL 染料（1/100000稀释染料），充分混匀作为凝胶缓冲液。

2.4. 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；分离条件：-5 kV，30 min；进样条件：-5 kV，3 s；毛细管温度：25 °C；样品室温度：8 °C；LIF检测器激发波长：488 nm，发射波长：520 nm。图2为毛细管活化和分离mRNA疫苗样品的初始条件，图3为毛细管活化和分离的检测器条件。

新毛细管活化：0.1 mol/L氢氧化钠溶液 50 psi压力下冲洗10 min，无核酶水50 psi 压力下冲洗10 min，凝胶缓冲液70 psi 压力下冲洗10 min。图4为毛细管活化的时间程序。

每针运行间毛细管的冲洗：无核酶水70 psi 压力下冲洗1 min，凝胶缓冲液70 psi 压力下冲洗10 min。图5为分离mRNA疫苗样品的时间程序。



Initial Conditions | LIF Detector Initial Conditions | Time Program

Auxiliary data channels

- Voltage max: 30.0 kV
- Current max: 300.0 µA
- Power
- Pressure

Mobility channels

- Mobility
- Apparent Mobility
- Plot trace after voltage ramp

Analog output scaling

Factor: 1

Temperature

Cartridge: 25.0 °C

Sample storage: 8.0 °C

Trigger settings

- Wait for external trigger
- Wait until cartridge coolant temperature is reached
- Wait until sample storage temperature is reached

Inlet trays

Buffer: 36 vials

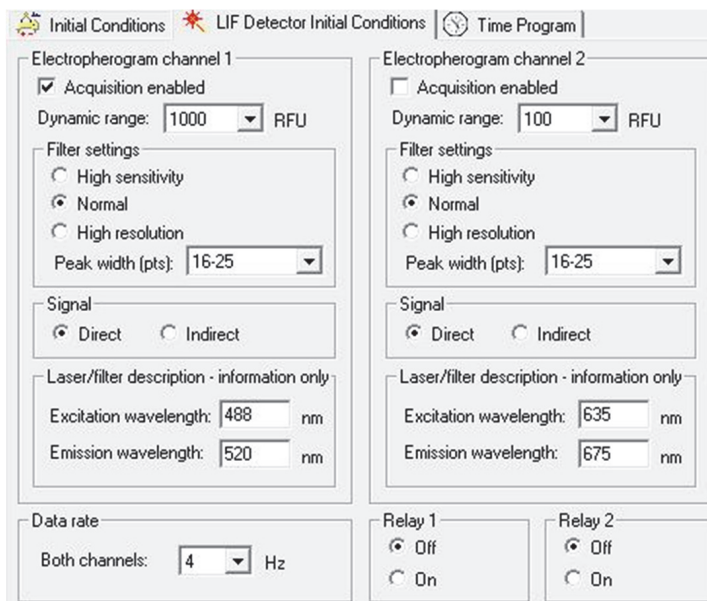
Sample: 48 vials

Outlet trays

Buffer: 36 vials

Sample: No tray

图2. 初始条件。



Initial Conditions | LIF Detector Initial Conditions | Time Program

Electropherogram channel 1

- Acquisition enabled
- Dynamic range: 1000 RFU
- Filter settings:
 - High sensitivity
 - Normal
 - High resolution
- Peak width (pts): 16-25
- Signal:
 - Direct
 - Indirect
- Laser/filter description - information only
 - Excitation wavelength: 488 nm
 - Emission wavelength: 520 nm

Electropherogram channel 2

- Acquisition enabled
- Dynamic range: 100 RFU
- Filter settings:
 - High sensitivity
 - Normal
 - High resolution
- Peak width (pts): 16-25
- Signal:
 - Direct
 - Indirect
- Laser/filter description - information only
 - Excitation wavelength: 635 nm
 - Emission wavelength: 675 nm

Data rate

Both channels: 4 Hz

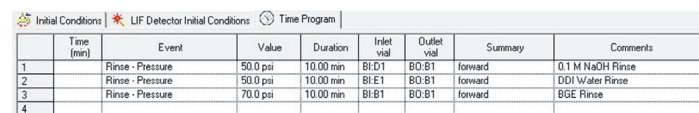
Relay 1

- Off
- On

Relay 2

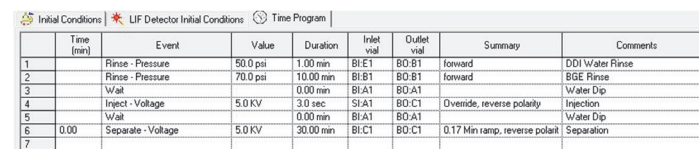
- Off
- On

图3. 检测器条件。



Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:B1	forward	0.1 M NaOH Rinse
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:E1	BO:B1	forward	DDI Water Rinse
3	Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	BGE Rinse
4							

图4. 毛细管活化的时间程序。



Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	1.00 min	BI:E1	BO:B1	forward	DDI Water Rinse
2	Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	BGE Rinse
3	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1		Water Dip
4	Inject - Voltage	5.0 KV	3.0 sec	SI:A1	BO:C1	Oveinde, reverse polarity	Injection
5	Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1		Water Dip
6	Separate - Voltage	5.0 KV	30.00 min	BI:C1	BO:C1	0.17 Min ramp, reverse polarit	Separation
7							

图5. 分离mRNA疫苗样品的时间程序。

3. 结果

mRNA疫苗样品在此条件下可检测到主峰及杂质，如图6。在LIF检测器的条件下，基线平整，可检测到很含量较小的核酸片段。经过32 Karat™软件的积分处理，可测得mRNA疫苗样品的纯度为92.61%。

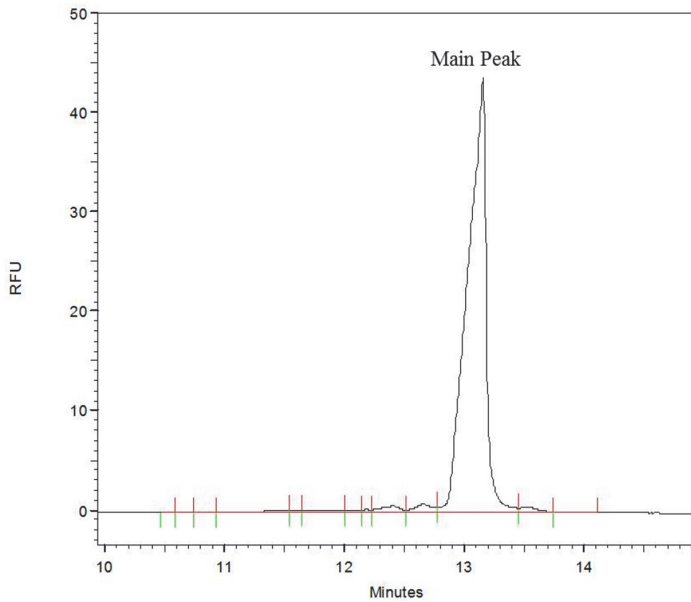


图6. CGE-LIF法分析mRNA疫苗样品（长度约为4000 bp）纯度的电泳图。

4. 结论

本文利用毛细管凝胶电泳匹配LIF检测器考察了长度约为4000 bp的mRNA疫苗样品的纯度，在含有1% PVP、4 M尿素和十万分之一染料的1×TBE凝胶缓冲液中检测到mRNA疫苗样品的纯度为92.61%。

在评估不同长度mRNA（1000-5000 bp）的纯度时，可通过改变PVP的浓度优化mRNA疫苗及其片段杂质的分离度和方法的适用性，也可尝试其它凝胶缓冲液寻求更优的分离条件。同样，可调节的仪器参数也可辅助达到最优的mRNA分离条件。

毛细管凝胶电泳在考察mRNA疫苗的纯度的同时，也可根据对照品或标准品的迁移时间进行峰的鉴定，进行mRNA疫苗产品的鉴别。是mRNA疫苗研究和产品质量控中不可或缺的分析工具。

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。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-12225-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
广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)