

毛细管凝胶电泳用于mRNA疫苗原液及制剂的完整性分析

Analysis of purity and integrity of mRNA vaccine by capillary gel electrophoresis

张晓霞, 唐红梅, 陈泓序, 罗继, 郭立海

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

SCIEX, 中国;

SCIEX, China;

Keywords: Capillary Gel Electrophoresis, LIF, mRNA vaccine, Purity, Integrity

1. 引言

新冠疫情的爆发使市场对于mRNA疫苗的关注度提升到了空前的高度, 相比于传统疫苗mRNA疫苗在安全性、有效性、开发速度和规模化生产能力等方面具有显著优势。然而, mRNA本身不稳定, 极易被无处不在的核酸酶降解, 使得mRNA疫苗在生产、工艺、长期储存等过程存在挑战。因此, 一种简单高效的mRNA疫苗纯度分析和分子大小表征方法对其质量、疗效、安全性和优化制造工艺至关重要。

毛细管凝胶电泳法 (CGE-LIF) 是有效分离核酸的方法, 具有分辨率高、分离分析时间短、定量准确、自动化程度高等优势, 适用于从几十至上万长度核酸的分离, 可有效用于mRNA疫苗纯度及完整性的分析检测。

本文利用SCIEX PA 800 Plus药物分析系统, 采用CGE-LIF方法对mRNA疫苗进行纯度和完整性进行表征。该方法分离度高、重复性好, 适用于不同阶段mRNA疫苗原液及LNP包裹的mRNA制剂的纯度和完整性表征。

2. 试剂及方法

2.1 试剂和样品

试剂: 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)、SLS (SCIEX, PN608082)、去离子水 (Millipore)。

样品: RNA 9000 Ladder (500nt、1000nt、1500nt、2000nt、2500nt、3000nt、4000nt、5000nt、6000nt、9000nt) (Thermo Fisher, PN AM7152)、样品1 (mRNA疫苗原液, 浓度为1000 ng/μL, 片段长度为4000 nt)、样品2 (LNP包裹的mRNA疫苗制剂: 主要包括向导RNA(gRNA, 100nt以内)和目标核酸(4000nt左右), 核酸总浓度为500 ng/μL)。

2.2 试剂及样品溶液制备

背景缓冲液制备: 分别称取0.2 g PVP和4.8 g尿素, 加入50 mL的离心管中, 用1 × TBE溶液 (10 × TBE溶液用去离子水稀释10倍) 充分溶解后定容至20 mL, 加入2 μL染料 (即1:20000稀释染料), 混匀即得含1%PVP和4M尿素的背景缓冲液。

样品制备: a) RNA 9000 Ladder用SLS溶液先稀释至10.0 ng/μL, 再根据实验需要用SLS稀释至不同浓度。样品1用SLS溶剂稀释至1.0 ng/μL。样品2先用2%的TritonX 1:1混匀, 静置10 min, 破乳, 破乳后的样品再用SLS溶剂稀释至5.0 ng/μL。

2.3 仪器及方法

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; 毛细管: 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: 25 °C; 样品室温度: 8 °C; 进样条件: 电压进样, -5 kV, 3 s; 分离条件: -5 kV, 20 min。

毛细管预冲洗: 序列运行前毛细管先用0.1 N HCl进行50 psi冲洗10 min, 再用去离子水进行50 psi冲洗10 min, 最后用背景缓冲液进行70 psi冲洗10 min。每次运行开始时, 毛细管先使用去离子水进行50 psi冲洗2 min, 再用背景缓冲液进行70 psi冲洗10 min。

3. 结果与讨论

3.1 RNA 9000 Ladder重复性

RNA 9000 Ladder分离结果如图1, 结果显示, 在15 min内完成RNA 9000 Ladder所有10个marker (500 nt-9000 nt)的分离, 且各峰的分度好, 所有峰之间的分离度均超过1, 说明该方法适用RNA样品长度范围广。

连续3针运行, 重复性结果如图1和表1, 各峰迁移时间重复性RSD值在0.05%-0.18%, 校准峰面积百分比RSD值在0.71%-2.55%。说明该方法重复性好, 可用于RNA样品纯度分析。

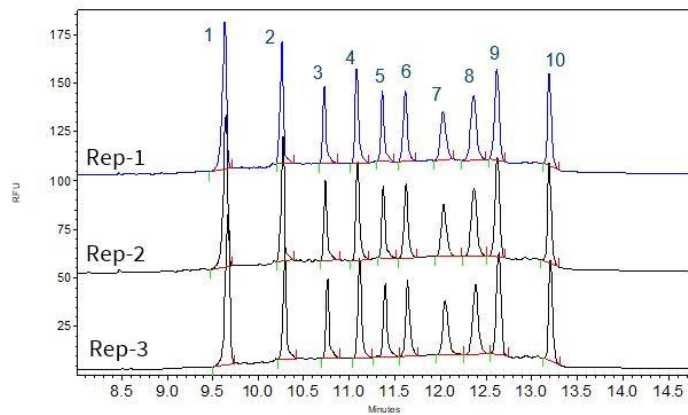


图1. RNA ladder的重复性分离结果

表1. RNA 9000 Ladder各峰的重复性结果 (n=3)

Pk #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Length(nt)	500	1000	1500	2000	2500	3000	4000	5000	6000	9000
RSD%(MT)	0.18	0.17	0.16	0.15	0.13	0.12	0.11	0.1	0.08	0.05
RSD%(CAP)	1.8	0.71	1.65	1.09	2.55	1.25	2.26	1.12	1.73	0.98

注: MT指迁移时间; CAP指校准峰面积百分比

3.2 RNA 9000 Ladder检测灵敏度结果

将RNA 9000 Ladder溶液稀释至一系列不同浓度 (2.0 ng/ μ L、1.0 ng/ μ L、100.0 pg/ μ L、10.0 pg/ μ L、1.0 pg/ μ L), 当溶液浓度为1.0 pg/ μ L时, 所有10个marker依然能够明显检出 (如图2所示), 说明该方法检测灵敏度高。

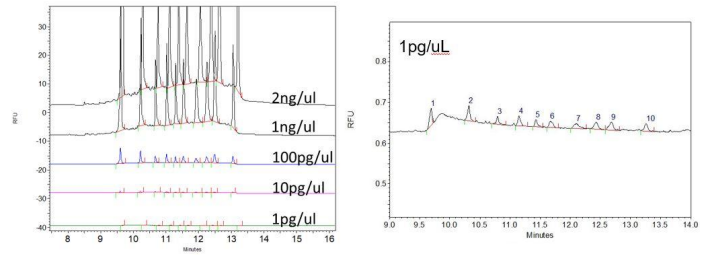


图2. 不同浓度下RNA 9000 Ladder电泳图谱

3.3 mRNA疫苗结果样品检测结果

利用该CGE-LIF方法对mRNA疫苗样品进行分离检测, 结果如图3, a为mRNA原液纯度分析电泳图; b为LNP包裹的mRNA制剂纯度分析电泳图, 其中9min左右的峰为gRNA (指导mRNA在真核细胞内的编辑和删除), 目标片段出峰位置在14 min左右; c为RNA 9000 Ladder混标的电泳图。

从电泳图谱上可看出, mRNA原液和制剂中主峰的出峰位置一致, 说明该方法稳定性好, 可用于纯化过程纯度监控以及稳定性放行对过程。从图3b可看出, 100 nt以内的gRNA和4000 nt左右的mRNA能够清晰的分离和检测, 说明该CGE-LIF方法适合分析范围从几十到上万长度的RNA分离检测。

mRNA原液样品(a)纯度检测结果为66.39%, 主峰片段长度计算结果为4574 nt; LNP包裹的mRNA制剂样品(b)纯度检测结果为36.22%, 主峰片段长度计算结果为4436 nt, 符合实际分子量值范围。

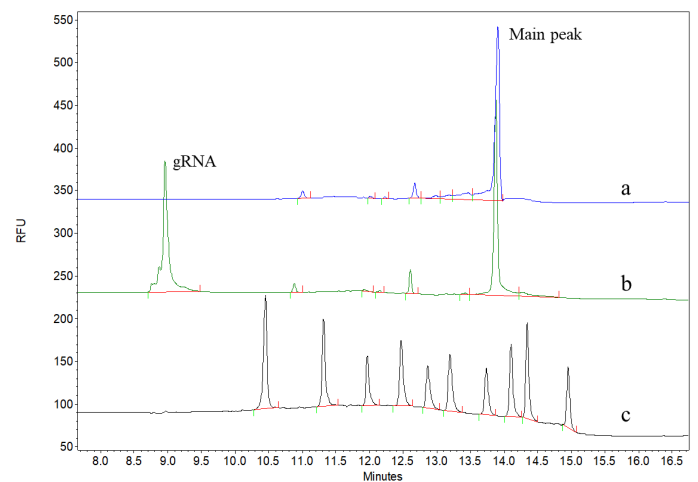


图3. mRNA疫苗原液及制剂样品CGE-LIF分离结果电泳图。
(a: mRNA原液; b: LNP-mRNA制剂; c: RNA 9000 Ladder)

4. 结论

本文采用CGE-LIF方法进行mRNA疫苗纯度及完整性分析，通过RNA 9000 Ladder混标进行重复性和检测灵敏度的考察，各峰迁移时间重复性RSD值在0.05%-0.18%，校准峰面积百分比RSD值在0.71%-2.55%，展示了CGE-LIF方法用于RNA样品纯度及完整性分析良好的稳定性和较高的检测灵敏度。同时，mRNA原液和制剂主峰迁移时间重复性高度一致，说明CGE-LIF方法迁移时间重复性高，可用于纯化过程mRNA疫苗纯度监控以及稳定性考察、产品放行等不同阶段质量控制。该方法下，LNP包裹的mRNA制剂能够清晰地分离和检测到片段在100 nt以内的gRNA和长度在4000 nt左右的目标RNA片段，展示了CGE-LIF方法的较宽的分析范围，适用于多种不同mRNA疫苗产品的质量评估。

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。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15181-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](https://www.sciex.com.cn)