

毛细管凝胶电泳方法用于二价mRNA疫苗的完整性分析

Integrity analysis of bivalent mRNA vaccine by capillary gel electrophoresis

唐红梅¹, 刘一颖², 张晓霞¹, 李雨利², 刘佳雯², 陈泓序¹, 罗继¹, 郭立海¹

Hongmei Tang¹, Yiyang Liu², Xiaoxia Zhang¹, Yuli Li², Jiawen Liu², Hongxu Chen¹, Ji Luo¹, Lihai Guo¹

¹ SCIEX, 中国; ²北京先声祥瑞生物制品股份有限公司, 中国

¹ SCIEX, China; ² Beijing Simcere Sanroad Biological Products Co., Ltd, China

Key words: Capillary Gel Electrophoresis, mRNA, Integrity

1. 引言

mRNA疫苗通过精确的mRNA指令引导细胞合成特定蛋白质, 为预防和治疗疾病提供了一种创新手段。传统的单价mRNA疫苗仅含有单一抗原成分, 而二价mRNA疫苗包含两个mRNA片段, 能够提供更广泛的保护范围。为了满足监管机构对mRNA治疗和疫苗产品特性、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。这包括确保mRNA序列的完整性、维持mRNA溶液在目标pH值, 以及严格控制潜在杂质。在二价mRNA疫苗中, 两个关键片段的长度极为接近, 若分析方法的分离度不足, 可能导致某一片段的杂质与相邻片段的核酸或杂质相互干扰。因此, 迫切需要开发一种具有更高分离度的mRNA完整性检测方法, 以便清晰区分这两个片段, 并准确检测每个片段的杂质峰。目前, mRNA完整性分析的方法包括反相高效液相色谱(RP-HPLC)和毛细管电泳等。但在分离二价mRNA疫苗时, RP-HPLC的分离度并不理想。毛细管凝胶电泳(CGE)作为一种更为高效的核酸分离技术, 以其卓越的分度、精确的定量能力和高度的自动化水平而受到青睐, 特别适合于分离长度从几百到上千的核酸, 因此能够有效地用于二价mRNA疫苗中两个mRNA序列片段的分离和分析。

本文以二价mRNA疫苗为研究对象, 采用SCIEX公司的RNA9000 Purity & Integrity试剂盒进行二价mRNA疫苗完整性分析。该试剂盒能够实现二价mRNA疫苗中两个关键片段(2230 nt与2825 nt)的基线分离, 2200 nt与2800 nt的分离度高达6.5。得益于试剂盒的高分离效率, 能够对二价mRNA疫苗中的杂质进行精确定量, 为疫苗的质量和安全性提供了有力保障。

2. 试剂及方法

2.1 试剂和样品

试剂: RNA 9000 Purity & Integrity 试剂盒 (SCIEX, PN C48231) 包含: 0.1M 盐酸、CE 级水 (SCIEX, PNC48034)、LIF Performance Test Mixture (SCIEX, PN76022)、Nucleic Acid Extended Range Gel (SCIEX, 5308349)、ssRNA Ladder (0.05 kb to 9kb)、SYBRTM Green II RNA Gel Stain (500×); Sample Loading Solution (SLS) (SCIEX, PN608082)。

样品: 二价mRNA疫苗由北京先声祥瑞公司提供, 浓度为2315 ng/μL, 包含的两个mRNA片段长度分别为2230 nt、2825 nt。

2.2 样品及前处理

配制背景凝胶缓冲液: 取10 μL SYBRTM Green II RNA Gel Stain 溶于5 mL Nucleic Acid Extended Range Gel 中, 涡旋混匀备用。

ssRNA Ladder样品制备: 取2 μL ssRNA Ladder, 溶于48 μL SLS 溶液中, 涡旋混匀作为待测溶液。

样品制备: 样品用SLS溶液稀释至2 ng/μL, 涡旋混匀作为待测溶液。

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; 中性涂层毛细管: 50 μm 内径, 20/30.2 cm (有效/总长度); 毛细管温度: 30 °C; 样品室温度: 10 °C; 电压进样条件: -1 kV, 3 s; 分离条件: -6 kV, 25 min。

毛细管预处理: 新毛细管及序列运行前, 毛细管先用去离子水 50 psi 冲洗 5 min, 凝胶缓冲液 50 psi 冲洗 10 min; 每次运行开始时, 毛细管先用去离子水 70 psi 冲洗 1 min, 凝胶缓冲液 50 psi 冲洗 5 min。

3. 结果与分析

3.1 CGE方法分离结果

图1为样品分离电泳谱图，从结果可以看出CGE方法可以将样品包裹的两个mRNA片段即2230 nt与2825 nt片段实现基线分离，表明CGE方法分离度高；CGE方法的高分离度保证了每个mRNA片段的杂质也能得以分离。图1中Pk#3为2230 nt主峰，校正峰面积百分比为50.89 %；PK#5为2825 nt主峰，校正峰面积百分比为45.78 %。

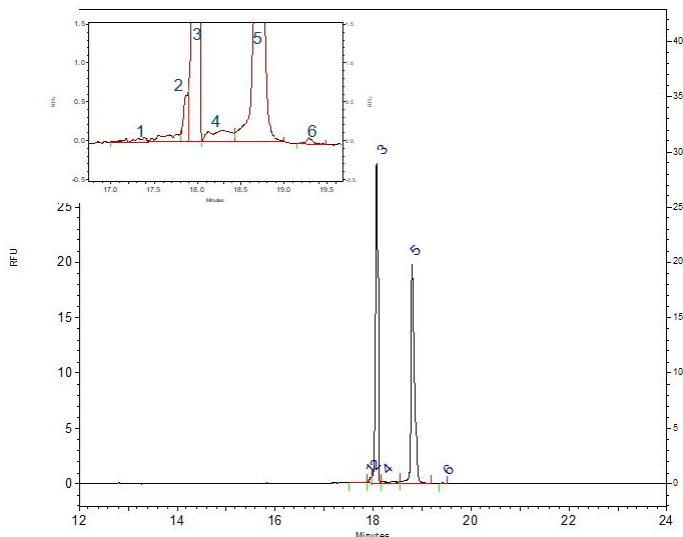


图1. 二价mRNA疫苗CGE分离结果

3.2 二价mRNA疫苗样品完整性分析

ssRNA Ladder是片段范围在0.05-9 kb的标准品，通过对不同片段长度ladder迁移时间的倒数(1/MT)与片段长度(Log MW)的对数制作标曲，用于样品中片段长度计算；本文以300 nt、500 nt、1000 nt、2000 nt、3000 nt这5个点做标准曲线， $R^2 = 0.999$ ；对比样品出峰位置确认PK#3是2230 nt主峰，计算的片段长度为2164 nt，理论片段长度与计算片段长度偏差为3.0 %；PK#5为2825 nt主峰，计算的片段长度为2729 nt，理论片段长度与计算片段长度偏差为3.3 %；两个片段计算结果均与理论值接近，表明CGE方法适合二价mRNA疫苗的分选与完整性分析。

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。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-33627-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)

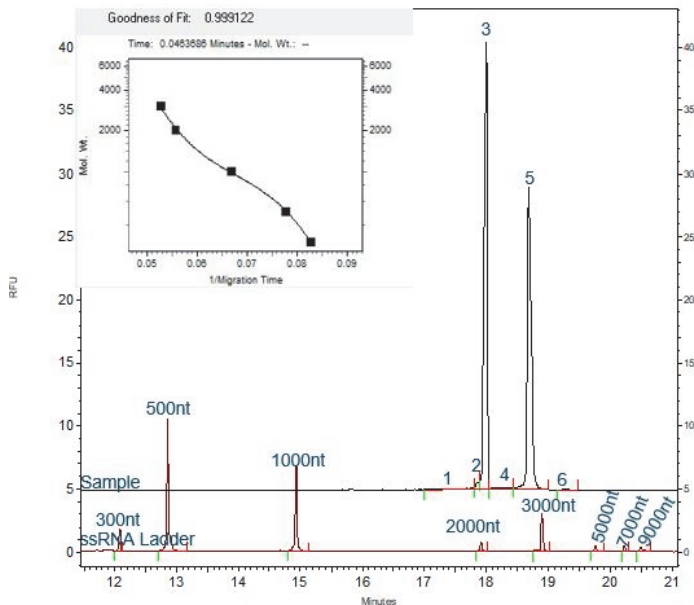


图2. 二价mRNA样品的完整性分析结果

4. 结论

本文借助于PA 800 plus生物制药分析系统以及SCIEX的RNA 9000 Purity & Integrity 试剂盒对二价mRNA疫苗完整性进行分析，主要结论如下：

1. 采用CGE方法搭配RNA 9000 Purity & Integrity 试剂盒，能够实现二价mRNA疫苗中两个关键核苷酸片段(2230 nt与2825 nt)的基线分离，并能够检测到每个片段的杂质水平。这一结果表明，SCIEX公司提供的RNA 9000 Purity & Integrity试剂盒具有很高的分离效率。
2. 通过外标法制作标准曲线，得到两个片段的理论片段长度与计算片段长度偏差均小于3.5 %，表明SCIEX的RNA 9000 Purity & Integrity 试剂盒适用于二价mRNA疫苗的分选与完整性分析。