

高灵敏度、高稳定性的CGE方法对mRNA PolyA尾巴分布的分析——使用SDS-MW试剂盒的方法

A method with high separation and good stability for mRNA PolyA tail distribution analysis

唐红梅¹, 李俊男², 陈泓序¹, 李季², 金秋恒², 罗继¹, 刘冰洁¹

Hongmei Tang¹, Junnan Li², Hongxu Chen¹, Ji Li², Qiuhe Jin², Ji Luo¹, Bingjie Liu¹

¹ SCIEX, 中国; ² 南京诺唯赞生物科技有限公司, 中国

¹ SCIEX, China; ² Nanjing Vazyme Biotechnology Co., Ltd., China

Keywords: CGE, mRNA, PolyA尾巴分布

1. 引言

mRNA疫苗是在第一代减毒/灭活疫苗和第二代亚单位疫苗基础上发展起来的第三代疫苗。mRNA疫苗保持了胞内表达蛋白的优点, 且没有整合到宿主DNA 的风险。在真核生物中, poly(A)尾巴几乎存在于每个mRNA上。mRNA的PolyA尾巴有助于维持mRNA的稳定性、运输和转译效率, 影响mRNA的半衰期, 通常PolyA尾巴的长度在几十至几百个核苷酸之间。PolyA尾巴的添加效率和分布是mRNA疫苗的质量控制参数之一, 美国药典在“mRNA疫苗和治疗药物质量分析指导”中提到mRNA原料药以及mRNA药物均需要对PolyA尾巴进行表征。Gao 等^[1]采用毛细管凝胶电泳法搭配ssDNA试剂盒对mRNA PolyA尾巴分布进行了分析, 可以实现单碱基分离效果。

本文开发了一种使用SDS-MW 试剂盒进行PolyA尾巴分析的方法, 在同样保证单碱基分离的基础上, 可提供更快的分析速度、更高的稳定性和灵敏度。通过对pd(A) 40-60 Test Mix标准品进行测试确认该方法可以实现单碱基分离效果, 然后分别测试两个不同片段长度的mRNA PolyA样品, 同样可以实现单碱基分离效果, 验证了该方法具有优异的分选性能; 同时利用30-70 nt片段PolyA样品考察方法重复性, 结果表明方法稳定性良好, 适合用于mRNA PolyA尾巴的分布分析。

2. 试剂及方法

2.1 试剂及样品

SDS-MW试剂盒包含的试剂: SDS Gel buffer (SCIEX, A30341)、pH 9.0样品缓冲液、0.1 M盐酸溶液、0.1 M氢氧化钠溶液、10kD 蛋白内标 (SCIEX, A26487)、10-225 kDa MW分子量标准品(SCIEX, A22196)、50 μ m内径熔融石英毛细管(SCIEX, 338451); 去离子水 (Millipore);

PolyA尾巴部分的酶切与纯化试剂: RNase-free-ddH₂O(Vazyme, PN P071)、RNase T1酶(Thermo, EN0541)、LiCl(Sigma-Aldrich, L116328)、Tris(Sigma-Aldrich, RDD008)、HCl(Sigma-Aldrich, 258148)、无酶水(Thermo, 4387936)、甲醇(Sigma-Aldrich, 322415)、磁力架(Thermo, 12321D)、EDTA(Sigma-Aldrich, 4008-M)、mRNA Capture Beads 2.0 (Vazyme, PN N403)。

样品: 1个已经酶切纯化后的mRNA PolyA尾巴样品由南京诺唯赞企业提供, 片段长度分别为30-70 nt, 浓度约46 ng/ μ L;

2.2 溶液制备

2.2.1 试剂及样品溶液制备

试剂制备: 按照试剂说明书进行配制;

pd(A) 40-60 Test Mix标准品溶液制备: 向 pd(A) 40-60 Test Mix瓶中添加 500 μ L 去离子水, 然后混合均匀, 可以按照15 μ L一管进行

等份体积分装，储存于-20℃；取一管分装后的Test Mix置于1.5 mL离心管中，加入去离子水稀释7.5倍；准确移取100 μL稀释后的溶液加入到装有样品管的CE专用试剂瓶中，用于上机检测；

样本溶液制备：样品不需要额外稀释，准确移取20 μL样品溶液加入到装有样品管的CE专用试剂瓶中，用于上机检测；

2.3 仪器及方法设置

仪器：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 × 200 μm；熔融石英毛细管，50 μm内径，20/30.2 cm (有效长度/总长度)；进样条件：-5 kV，20 s；分离电压：-10 kV，40 min；毛细管温度：25℃；样品室温度：15℃。

毛细管针间冲洗和胶填充：0.1 mol/L氢氧化钠溶液在70 psi压力下冲洗3 min，然后用0.1 mol/L盐酸溶液在70 psi压力下冲洗1 min，再用去离子水在70 psi压力下冲洗1 min，最后用SDS凝胶分离缓冲液在70 psi压力下冲洗10 min。

3. 结果与分析

3.1 pd(A) 40-60 Test Mix标准品分离结果

pd(A) 40-60 Test Mix标准品是一个包含40-60个A碱基的混合物，在同样进样条件下使用SDS-MW试剂盒方法样品出峰更快，灵敏度更高，并且也能实现与ssDNA试剂盒方法相同的单碱基分离效果，因此该方法可以用作mRNA PolyA尾巴分布分析，如下图1。

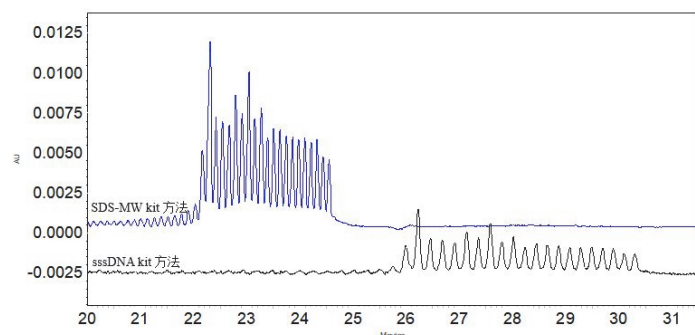


图1. pd(A) 40-60 Test Mix的分离结果

3.2 Poly A尾巴分布分析

使用SDS-MW分析试剂盒方法对30-70 nt PolyA样品进行分离，分离结果如图2，从结果谱图上看30-70 nt PolyA样品中有两部分，

每一部分片段均能实现单碱基分离，两个片段校正峰面积比例分别为36.61%和63.39%，表明该方法对实际样品的分离也能达到单碱基分离效果。

3.3 方法稳定性考察

为了进一步评估方法的稳定性，对同一管30-70 nt PolyA样品进行3次连续进样，3次结果高度一致，具体分离结果如表1。样品中30 nt和70 nt两个片段的3针迁移时间RSD值分别为0.09 %和0.10 %；30 nt和70 nt两个片段的3针校准峰面积百分比的RSD分别为1.18 %和0.69 %，结果表明该方法重复性好。

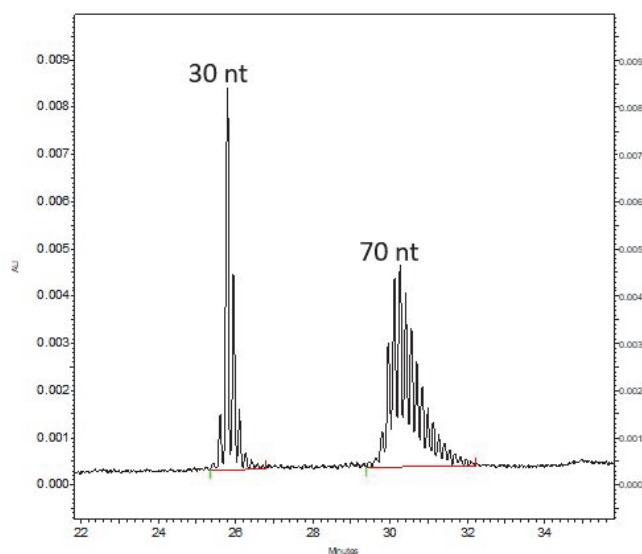


图2. 30-70 nt PolyA样品的分离结果

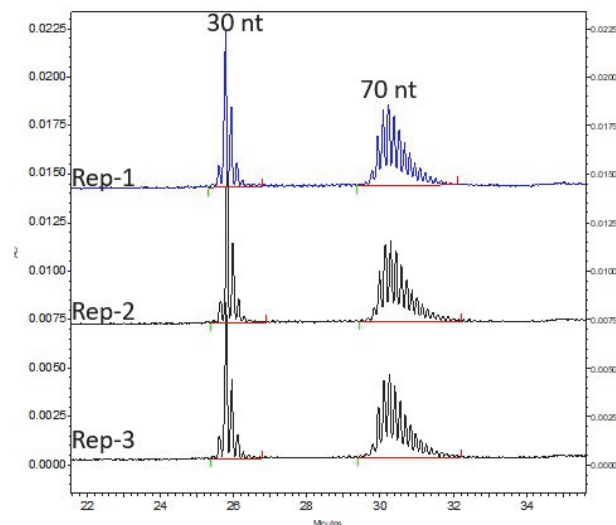


图3. 30-70 nt PolyA样品的3针重复性结果

表1. 30-70 nt PolyA样品3针重复性结果

名称	30 nt片段		70 nt片段	
	迁移时间 (min)	校准峰面积 百分比%	迁移时间 (min)	校准峰面积 百分比%
Rep-1	25.80	36.54	30.26	63.46
Rep-2	25.83	37.30	30.30	62.70
Rep-3	25.78	37.30	30.24	62.70
RSD %	0.09	1.18	0.10	0.69

4. 结论

毛细管凝胶电泳方法分离原理主要依据核酸片段大小的差异进行分离，本文采用SCIEX 成熟稳定的SDS-MW分子量分析试剂盒，可有效应用于mRNA PolyA尾巴分布分析。该方法主要表现出如下优点：

- 1) 分离度高，可实现单碱基差异分离：pd(A) 40-60 Test Mix、30-70 nt PolyA样品均可实现单碱基分离效果。
- 2) 稳定性好：30-70 nt PolyA样品中两个片段的3针迁移时间RSD值分别为0.09 %和0.10%，校准峰面积百分比的RSD分别为1.18 %和 0.69%。

5. 参考文献

- 1. 毛细管凝胶电泳法对mRNA PolyA尾巴分布的分析，SCIEX technical note, RUO-MKT-02-14117-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。

© 2025 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-34795-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](#)