

Biozen dSEC-7色谱柱分析 IVT mRNA的聚集体

陆珺

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

2020年全球首款mRNA新型冠状病毒肺炎疫苗获得紧急使用授权,并展现出了优异的安全性和保护效力, mRNA疫苗作为新一代疫苗受到广泛关注, 也重新唤起了人们对于使用mRNA表达治疗性蛋白的兴趣。相比传统蛋白药物, mRNA有成本低, 模块化生产以及序列易调整等优势, 具有广泛的应用前景, 理论上可应用于疾病预防、癌症疫苗、HIV治疗性疫苗、脱敏疗法、蛋白质替代疗法、基因编辑和再生医学等多个领域。

近期, 美国药典委员会 (USP) 发布了《mRNA疫苗和治疗产品质量分析方法-指南草案》(第三版)。该草案规范了mRNA 药物原料、mRNA 药物制剂的表征、质量放行的标准操作流程, 其中在聚集体检测中采纳了SEC-HPLC的方法。

本文展示了飞诺美最新上市的700 Å孔径SEC柱应用于四种不同长度的体外转录的mRNA (IVT mRNA) 的聚集体分析。并且通过MALS检测器对聚集体的分子量进行估算, 确证了该色谱柱对于mRNA单体和二聚/高聚体的分离能力, 进一步证明该色谱柱适合于mRNA聚集体的质量研究和放行检测。

致谢

特别感谢云舟生物科技(广州)股份有限公司提供此次样品, 云舟生物作为全球基因递送技术的创新型企业, 提供基因递送方案的设计研发与优化, 科研用载体定制(包括基因载体构建、质粒DNA制备、病毒包装、CRISPR/shRNA文库构建、稳转细胞株构建、mRNA体外转录、重组蛋白表达纯化等)全产业链服务。以其卓越的产品和服务, 为科研工作者以及相关企业提供宝贵的支持。



关键词

IVT mRNA; dSEC-7; SEC-UV; SEC-MALS;

实验部分

3.1 仪器、试剂与材料

3.1.1 主要仪器设备

仪器A: Agilent 1260 高效液相色谱仪 (UV检测器)

仪器B: Agilent 1260 高效液相色谱仪 (MALS (microDawn) + microOptilab (RI)检测器)

3.1.2 试剂材料

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、超纯水

3.1.3 样品

样品信息参加表1:

表1 IVT mRNA样品和蛋白对照品的详细信息

样品	名称	长度/分子量
1	saRNA IVT mRNA	8443 nt / 3055 kDa
2	Cas9 IVT mRNA	4486 nt / 1452 kDa
3	Luciferase IVT mRNA	1936 nt / 626 kDa
4	eGFP IVT mRNA	998 nt / 320 kDa
5	Thyroglobulin	670 kDa
6	BSA	66.5 kDa
7	Myoglobin	17 kDa
8	Uridine	0.2 kDa

3.2 色谱条件

色谱柱: Biozen dSEC-7 (4.6×300 mm, 3 μm, 700 Å) ; P/N: 00H-4789-E0

流动相A: 150 mM磷酸钠缓冲液 pH 7.0

流动相B: 50 mM磷酸钠缓冲液+250 mM氯化钠
pH 7.5



流速A: 0.25 mL/min
流速B: 0.5 mL/min
柱温A: 30℃
柱温B: 20℃
波长: 260 nm
上样量: 10 μL
梯度: 等度

3.3结果与讨论

3.3.1 SEC-HPLC的结果

我们首先按照USP收录的流动相（参见色谱条件A），分别分析了4种不同长度的IVT mRNA，以及3种蛋白和鸟苷的混标（参见图1）。

3种长度约从1,000至5,000 nt 的IVT mRNA分子均与其二聚及高聚体实现了比较好的分离。总长度接近10,000 nt的saRNA IVT mRNA没有检测到聚集体，可以观察到其洗脱的时间接近Cas9 IVT mRNA的聚集体，从侧面证明在该色谱柱上有足够的孔容量用于Cas9 IVT mRNA聚集体的分离；分子量为670 kDa的甲状腺球蛋白的峰形良好，和其聚集体也得到很好的分离。

在该色谱条件下，观察色谱柱的完全排阻体积大约在1.7 mL，而完全洗脱的体积大约是3.9 mL。

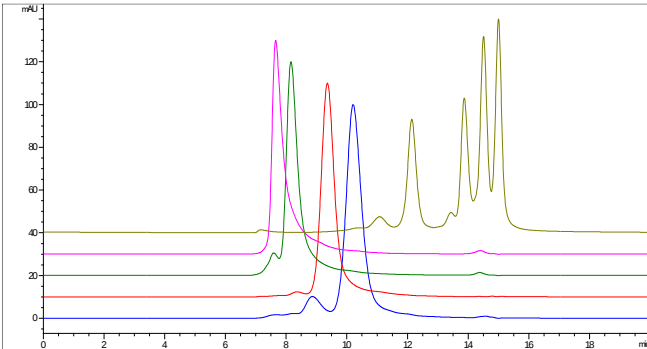


图1. 4种 IVT mRNA和4个蛋白混标的叠图
(蓝色: eGFP IVT mRNA; 红色: Luciferase IVT mRNA; 绿色: Cas9 IVT mRNA; 粉色: saRNA IVT mRNA; 淡绿色: 3种蛋白和鸟苷的混标)

表2. 8个样品和洗脱时间

样品名	主峰保留时间 (min)	聚集体 分离度
saRNA IVT mRNA	7.658	n.a.
Cas9 IVT mRNA	8.168	0.87
Luciferase IVT mRNA	9.366	1.17
eGFP IVT mRNA	10.214	1.35
Thyroglobulin	12.148	1.40
BSA	13.876	1.03
Myoglobin	14.513	n.a.

Uridine	15.005	n.a.
---------	--------	------

3.3.2 SEC-MALS的结果

MALS是一种光学技术，用于测量溶液中大分子颗粒散射光的角度分布。通过测量不同角度的散射光强度，可以计算出大分子的分子量。MALS通常与SEC联用，以实现高精度的分子量测定。基于上述SEC-HPLC的分离，我们结合MALS检测器进一步确认了3种IVT mRNA的聚集体的分子量信息（参见色谱条件B）。结果参见图2。利用MALS检测器估算的分子量表明先于主峰洗脱的确实是IVT mRNA的二聚/多聚体。

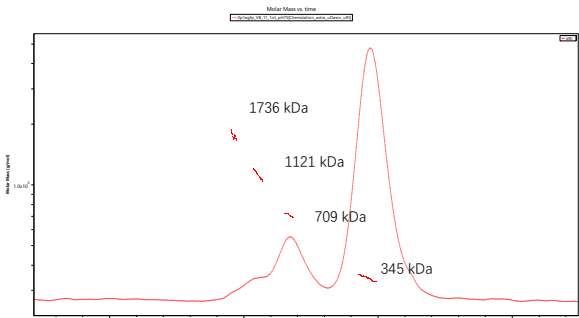


图2a. eGFP IVT mRNA的SEC-MALS谱图

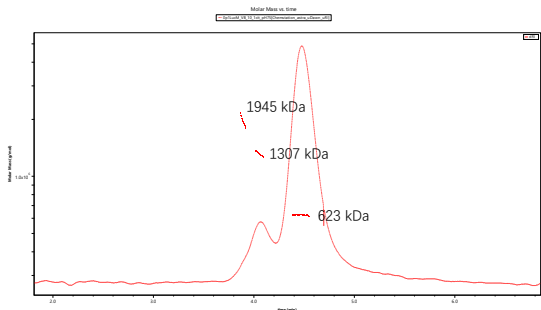


图2b. Luciferase IVT mRNA的SEC-MALS谱图

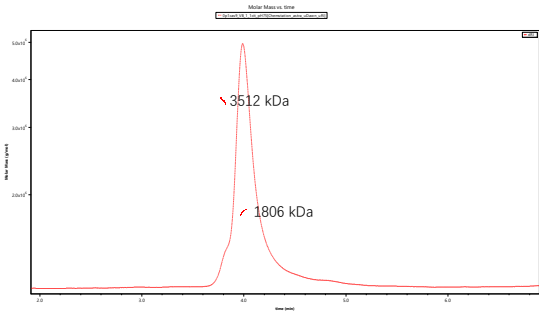


图2c: Cas9 IVT mRNA的SEC-MALS谱图

结论

随着细胞和基因治疗技术的快速发展，越来越多的分析技术开始在CGT药物研发生产全生命周期中被应用，以提高检测的效率和确保分析结果的可靠性。SEC体积排阻色谱法主要用于表征和监测生物分子的尺寸变异体，在该领域中被越来越广泛的认可和使用。飞诺美的Biozen dSEC-7是一款硅胶基质的700 Å大孔



的SEC柱，因为具有优化的孔径分布和3 μm 的粒径，使得该色谱柱拥有良好的分离能力。

通过上述实验证明该色谱柱能够应用于多种不同长度IVT mRNA分子的聚集体的分离和检测。结合MALS检测器对分子量进行了进一步确认，也证实该色谱柱的性能可以适用于MALS检测器的需求。



Xccelerator 加速服务

探索分离，使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中，抢占先机越来越多被大家提及，同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此，我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心，为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心，以色谱技术为中心，为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址：天津市开发区西区南大街179号

电话：400-606-8099

邮箱：cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址：上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话：400-606-8099

邮箱：cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址：411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的，不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题，或想要了解更多信息，请拨打400-606-8099联系我们的技术专家，我们很乐意为您提供帮助！

 **phenomenex**[®]