

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023年6月29日 (29.06.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/115495 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6806 (2018.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/141002

(22) 国际申请日: 2021年12月23日 (23.12.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 北京毅新博创生物科技有限公司(BEIJING YIXINBOCHUANG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市北京经济技术开发区永昌南路2号北京毅新博创生物科技有限公司/马庆伟, Beijing 101102 (CN)。

(72) 发明人: 张海燕(ZHANG, Haiyan); 中国北京市北京经济技术开发区永昌南路2号北京毅新博创生物科技有限公司/马庆伟, Beijing 101102 (CN)。王宇涵(WANG, Yuhan); 中国北京市北京经济技术开发区永昌南路2号北京毅新博创生物科技有限公司/马庆伟, Beijing 101102 (CN)。马庆伟(MA, Qingwei); 中国北京市北京经济技术开发区永昌南路2号北京毅新博创生物科技有限公司/马庆伟, Beijing 101102 (CN)。

发区永昌南路2号北京毅新博创生物科技有限公司/马庆伟, Beijing 101102 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(54) Title: METHOD FOR MEASURING MRNA CAPPING EFFICIENCY USING MASS SPECTROMETRY

(54) 发明名称: 质谱法检测mRNA加帽效率的方法

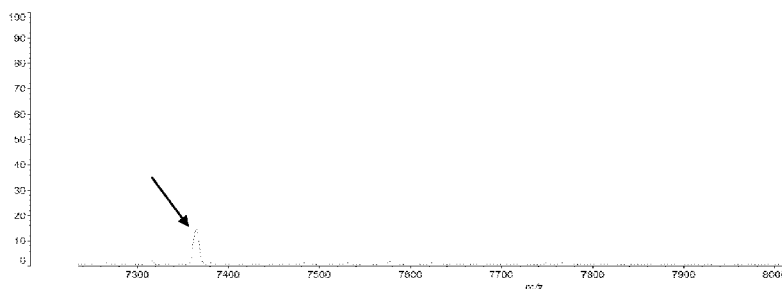


图 1

(57) Abstract: A method for rapidly measuring an mRNA capping efficiency by using a time-of-flight mass spectrometry technology, especially for in-vitro synthesized mRNA. The method comprises providing uncapped mRNA and capped mRNA, and using time-of-flight mass spectrometry technology to perform relative quantification on the capping efficiency of the mRNA. It is the first time that the use of time-of-flight mass spectrometry technology to implement a method for measuring an mRNA capping efficiency is proposed, operations are rapid and simple, and a measurement for trace samples can also be performed by means of the mass spectrometry technology, such that a relatively high measurement sensitivity can be achieved.

(57) 摘要: 一种利用飞行时间质谱技术快速检测 mRNA 加帽效率的方法, 特别是体外合成的 mRNA。方法包括提供未加帽 mRNA 和加帽 mRNA 的 mRNA, 使用飞行时间质谱技术从而对 mRNA 的加帽效率进行相对定量。首次提出利用飞行时间质谱技术实现对 mRNA 加帽效率进行检测的方法, 操作快速简便, 又可通过质谱技术检测微量样本, 具有较高的检测灵敏度。



WO 2023/115495 A1

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

质谱法检测 mRNA 加帽效率的方法

技术领域

本发明属于分子生物学检测领域，涉及一种利用飞行时间质谱技术快速检测 mRNA 加帽效率的方法。

背景技术

细胞信使 RNA（mRNA）的加工修饰包括：5'端形成帽子结构，3'端加 PolyA，剪接除去内含子和甲基化。

成熟的真核生物 mRNA 的 5'端有 m⁷GPPPN 结构，称为甲基鸟苷帽子。它是在 RNA 三磷酸酶，mRNA 鸟苷酰转移酶，mRNA（鸟嘌呤-7）甲基转移酶和 mRNA（核苷-2'）甲基转移酶催化形成的。

不同的甲基可形成 3 种帽子类型：0、1、2。鸟苷以 5'-5'三磷酸键与 RNA 的 5'端相连。当 G 第 7 位 C 被甲基化形成 m⁷GPPPN 时，此帽子结构称为“帽子 0”。存在于单细胞生物。如果 RNA 第 1 位核苷酸的 2'-O 位也甲基化，形成 m⁷GPPPNm，称为“帽子 1”，普遍存在。如果 RNA 的第 1、2 位核苷酸的 2'-O 位均甲基化（2 位必须是 A），形成 m⁷GPPPNmNm，称为“帽子 2”，次结构发生很少。真核生物帽子的复杂程度与生物进化程度密切相关。

mRNA 5'端帽子结构是翻译起始所必须的，为核糖体识别 mRNA 提供了信号，并协助核糖体与 mRNA 结合，使翻译从 AUG 开始。帽子结构可增加 mRNA 的稳定性，保护 mRNA 免遭 5'-3'核酸外切酶的攻击。

2020 年，新冠疫情的爆发点燃了药企对于 RNA 赛道的热情。随着国产新冠灭活、腺病毒及重组蛋白疫苗相继获批，mRNA 疫苗的进度成为人们关注的焦点。与此同时，后疫情时代的到来也让人们对于 RNA 疗法的未来充满无限遐想。

mRNA 疗法正成为用于治疗多种疾病的日益重要的方法。有效的 mRNA 疗法需要将 mRNA 有效递送至患者以及在患者体内有效生成由该 mRNA 编码的蛋白。为了优化 mRNA 的传递和体内蛋白的生成，通常在构建体的 5'端需要适当的加帽，其可以防止

mRNA 的降解并促进 mRNA 的翻译，因此，加帽效率的准确性对于确定 mRNA 治疗应用的质量是特别重要的。

目前常用的加帽效率检测方法有 LC-MS 法。LC-MS 法检测需要做酶切，操作繁琐。难以在临床应用领域进行推广。因此，临床应用领域迫切需要建立一种快速、准确、灵敏的 mRNA 加帽效率检测方法，为确定 mRNA 治疗应用的质量、mRNA 疫苗的质量研究提供充足的依据。

中国专利申请 CN201480010108.7“信使 RNA 加帽效率的定量评估”公开了一种利用 ELISA 测定 mRNA 加帽的方法。包括：体外合成 mRNA，提供含有加帽 RNA 和未加帽 RNA 的样品。由于该方法使用常规的处理，尽管其在一定程度上能表征该 RNA 的特征图谱，但由于其待测物中含有其它能被离子化的分子，其得到的图谱实质上是上述各种分子的图谱集合，因此既需要处理和比对的图谱信息量过大，并且因待检分子过于庞大而导致其图谱特征性偏低，只适用于某具体物质而无法推广到其他大量的物质检测中。

中国专利申请 CN201980073219“信使 RNA 纯化的方法和组合物”公开了用于纯化 mRNA 的方法，其涉及通过在包含变性盐与还原剂组合的缓冲液中沉淀体外转录过程 (IVT) 合成的 mRNA，然后捕获沉淀的 mRNA 以及将捕获的 mRNA 溶解在溶液中获得纯化的 mRNA，从通过大规模 IVT 合成的信使 RNA 制备物中去除杂质。其中，通过 HPLC/MS 方法测定最终纯化的 mRNA 产物的帽子种类。然而，该方法需要结合银染凝胶图像法、CE 电泳法进行比较分析，整个过程比较繁琐且耗时耗力。

综上所述，目前拥有测定 mRNA 产物的帽子种类和效率的方法，主要包括 ELISA 法、HPLC 色谱法、电泳法、荧光素酶法以及 RNA 斑印法等，这些方法能较好地确定帽子种类，评价加帽效率，但普遍存在过程繁琐、耗时耗力、试剂昂贵等缺陷。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, 简称 MALDI-TOF MS) 技术，是 20 世纪 80 年代末问世并迅速发展起来的一种质谱分析技术。其质量分析器是一个离子漂移管 (ion drift tube)，由离子源产生的离子首先被收集，在收集器中所有离子速度变为 0，使用一个脉冲电场加速后进入无场漂移管，并以恒定速度飞向离子接收器，离子质量越大，到达接收器所用时间越长；离子质量越小，到达接收器所用时间越短。根据这一原理，可以把不同质量的离子按质荷比大小进行分离，准确检测多肽、蛋白质、核酸、多糖等生物大

分子的分子质量和纯度，具有准确性高、灵活性强、通量大、检测周期短、性价比高的优点。

MALDI-TOF MS 检测核酸片段的技术，理论基础在于，组成遗传物质 DNA 的基本单元——四种核苷酸之间存在质量差异，如 ddAMP、ddCMP、ddGMP、ddTMP 的分子量依次为 271.2 Da、247.2 Da、287.2 Da、327.1 Da（其中 ddTMP 是经过修饰的），它们之间的最小分子量差异在 16 Da，完全可以通过质谱进行分辨。使用质谱能够对碱基突变或多态位点(SNP)、插入/缺失(InDel)、甲基化位点、基因定量、拷贝数变化(copy number variation, CNV)等多种 DNA 变化类型进行检测。

此外，基于 MALDI-TOF MS，开发的一些核酸检测方法，如美国 Agena 公司的 hME 和 iPLEX 方法，德国 Bruker 公司的 GOOD assay 方法，韩国 GeneMatrix 公司的 RFMP 方法。各公司为了提高质谱仪的分辨率，对目标位点进行检测倾向于检测分子量较小的寡核苷酸片段，如 RFMP 方法通过对含单核苷酸多态性 (SNP) 位点的多重 PCR 产物进行限制性酶切，产生 2000~4000Da 左右的寡核苷酸片段进行检测，而 GOOD assay 方法通过磷酸二酯酶 (Phosphodiesterase, PDE) 将含 SNP 位点的寡核苷酸片段切割成 1000~2000Da 左右的小片段进行检测。然而，以上方法，都不可避免地存在操作复杂，耗时长等问题。

发明内容

基于上述技术存在的缺陷或不足，本发明原理之一在于：首次提供一种利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 快速检测 mRNA 加帽效率的方法，该方法能高效针对体外合成的 mRNA 进行鉴定和分析，包括未加帽 mRNA 和加帽 mRNA，以及对 mRNA 的加帽效率进行相对定量。

本发明原理之二在于，为了解决质谱检测谱图偏移，本发明在检测过程中添加了内标，进一步对目标待测物质的分子量进行校准。

本发明原理之三在于，在质谱检测过程中，为了避免待测物质中一些离子的干扰，本发明对待测物质进行纯化，从而提高了检测准确率。

因此，本发明第一个目的是提供一种用于 MALDI TOF -MS 检测体外合成的 mRNA 片段的质谱检测试剂盒，包括 mRNA 标准样品组合物、内标、纯化试剂、质谱基质以及点样芯片

和检测软件，其中，

所述 mRNA 标准样品组合物包括：

样品名称	序列信息	理论分子量 (Da)
uncap	pppGGGAGACG CGUGUUAAAU AACAA	7364.9205
cap0	m ⁷ GpppGGGAGACG CGUGUUAAAU AACAA	7645.0256
cap1	m ⁷ GpppmGGGAGACG CGUGUUAAAU AACAA	7659.0412

所述内标的核酸序列，分子量为 8214.4Da，SEQ ID NO:1 为 5'-CTTGTAAGTTCATTACCTGTATAATTC-3'。

在一个实施方案中，其中所述基质为含有酸性成分的复合基质，该酸性成分包括但不限于甲酸、乙酸和柠檬酸。

在另一个实施方案中，所述芯片为飞行时间质谱专用微阵列芯片，其材质包括但不限于不锈钢、金刚石、单晶硅、石英晶体。

在其他实施方案中，其中所述软件是 BioExplore 软件，其版权号为软著登字第 136879 号，登记号 2009SR10700。

本发明第二个目的是提供通过上述检测试剂盒来检测 mRNA 样品加帽效率方法，包括如下步骤：

- (1) 样本制备：将样品分别稀释至合适浓度，各加入相应终浓度的分子量校正内标。
- (2) 纯化：对步骤 (1) 得到的样本进行纯化，以获得高纯的样本，避免盐离子等杂质对后续检测的影响。
- (3) 点样：将步骤 (2) 得到的纯化后的物质点在含有基质的靶片上，待测物直接与基质形成结晶混合物。
- (4) 质谱仪检测：将点好样的靶板放入质谱仪进行检测。
- (5) 数据分析：将步骤 (4) 得到的图谱，通过计算机软件与预先建立的质谱特征峰模型进行比较和分析，从而得到待测 mRNA 样品加帽效率；其中，

所述质谱特征峰模型包括未加帽 mRNA (uncap) 的目的片段所对应的特征峰 7364.9205m/z，加帽 mRNA (cap0) 的目的片段所对应的特征峰 7645.0256m/z，以及加帽 mRNA (cap1) 的目的片段所对应的特征峰：7659.0412m/z。

在一个实施方案中，步骤 (5) 的 mRNA 加帽效率计算公式为：

$$\text{Cap1 加帽率} = \text{Area}(\text{cap1}) / \text{Area}(\text{cap0} + \text{cap1} + \text{uncapped});$$

Cap0 加帽率=Area (cap0) / Area (cap0+cap1+ uncapped)。

在另一实施方案中，其中所述内标的核酸序列 (SEQ ID NO:1) 为 5'-CTTGTAAGTTCATTACCTGTATAATTC-3'

在一个实施方案中，所述基质为含有酸性成分的复合基质，该酸性成分包括但不限于甲酸、乙酸和柠檬酸。在另一个具体的实施方案中，所述芯片为飞行时间质谱专用微阵列芯片，其材质包括但不限于不锈钢、金刚石、单晶硅、石英晶体。

在另一实施方案中，步骤 (1) 中利用 NanoDrop ND-2000 核酸检测仪测量 mRNA 的浓度。

在一个具体实施方案中，所述质谱仪为 MALDI TOF MS 质谱仪。

在一个实施方案中，所述软件是发明人自行研究开发的 BioExplore 软件，其版权号为软著登字第 136879 号，登记号 2009SR10700。

在上述任一实施方案中，其中 mRNA 样品为 mRNA 疫苗，包括新冠肺炎、乙肝 mRNA 疫苗、流感 mRNA 疫苗、HPV mRNA 疫苗等。

在上述任一实施方案中，所述方法作为非诊断目的的应用，广泛用于 mRNA 检测领域，为确定 mRNA 治疗应用的质量、mRNA 疫苗的质量研究提供充足的依据。

技术效果

与现有技术相比，本发明具有以下优点：

1、本发明首次提出利用飞行时间质谱技术实现对 mRNA 加帽效率的检测，尤其是针对 mRNA 疫苗加帽效率，具有极高的生物学价值。

2、敏感：本发明使用了质谱检测等技术，因此它的检测灵敏度很高。

3、简便安全：操作简单、安全；

4、本发明所需的数据分析简单，只需观察谱图，无需复杂的生物信息学分析。

5、本发明成本低，无需荧光标记，降低了荧光化学探针加入导致的系统复杂性信号判读误差。

6、高自主化，使用自主研发的仪器、试剂、芯片和分析软件。

附图说明

图 1: 实施例 2 构建的质谱模型中, uncap 目的片段 (7364.9205Da) 所对应的特征峰: 7364.9205m/z。

图 2: 实施例 2 构建的质谱模型中, cap0 目的片段 (7645.0256Da) 所对应的特征峰: 7645.0256m/z。

图 3: 实施例 2 构建的质谱模型中, cap1 目的片段 (7659.0412Da) 所对应的特征峰: 7659.0412m/z。

图 4: 待测 mRNA 疫苗样品 N1 的加样检测质谱结果图。

图 5: 待测 mRNA 疫苗样品 N2 的加样检测质谱结果图。

图 6: 待测 mRNA 疫苗样品 N3 的加样检测质谱结果图。

图 7: 待测 mRNA 疫苗样品 N4 的加样检测质谱结果图。

原理与定义

本发明提供了一种使用质谱检测技术, 检测 mRNA 的特征图谱, 进而确定 mRNA 加帽效率的检测方案。

其原理在于:

在样本制备步骤中, 加入相应终浓度的分子量校正内标。

在质谱检测过程中, 待测物质在纯化后, 点至含基质的靶片, 并在真空环境中被激光激发, 通过飞行管至检测器。不同物质通过飞行管的时间与它们的分子量呈负相关, 即分子量越大, 飞行速度越慢, 到达检测器的时间越晚。

术语“内标”, 其作用是解决质谱检测谱图偏移, 对目标待测物质的分子量进行校准。

术语“纯化”, 指用于减少待检体系内其他物质对后续反应的影响的处理步骤。本发明的 PCR 产物纯化有两种方式: 一是分离杂质并丢弃, 二是使杂质失去活性。其中, 切胶纯化、过纯化柱等都是通过电泳、纯化柱等分离杂质, 并回收相对较纯的 PCR 产物, 可以认为是第一种纯化方式, 该方式一般耗时, 操作复杂, 特别是样本量大时; 碱性磷酸酶的作用是降解 (亦称“消化”) dNTP, 使之不能继续作为 DNA 聚合酶或单碱基延伸酶的底物参与 PCR 或单碱基延伸反应, 从而不干扰后

续反应，可以认为是第二种纯化方式。应当指出的是，单独的外切酶 ExoI 不起纯化作用，当它与碱性磷酸酶混合使用时，其作用是预先将单链 DNA（在反应完成后的 PCR 产物体系中，主要是剩余的 PCR 引物）降解成 dNTP，再由碱性磷酸酶使 dNTP 继续降解。由于 PCR 引物被降解，不会进入最后的质谱检测步骤，因此，如果计划纯化步骤中增加 ExoI 外切酶处理，那么无需使用具有保护碱基的 PCR 引物。此外，在单碱基延伸步骤之前，由于外切酶和碱性磷酸酶都通过高温失活，其不会降解在单碱基延伸步骤中加入的单链的延伸引物、ddNTP 等，因此避免对后续实验产生影响。

术语“检测窗口”，指可用于质谱检测核苷酸分子量的范围，通常涉及引物的设计参考范围。其中，在设计延伸引物时，对于不同的特定位点，根据这些位点所在 DNA 区域的序列特点，以及特定位点的基因型，可以设计出分子量不同的延伸引物和延伸产物，避免不同延伸引物及产物之间由于分子量接近而存在干扰，从而可在一个相对宽阔的检测窗口，如 4000-9000Da，实现对多个特定位点的检测。

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件实施。

需特别指出的是，尽管本发明的实施例中呈现的是 50,000Da 以下的质谱检测数据，但 50,000-100,000Da 之间的核酸物质也可检测到，因此应用本发明对 50,000-100,000Da 之间的质谱检测也包括在本发明所要求的权利范围之内。

实施例一、体外合成 mRNA

通过已知的现有方法，例如《分子克隆试验指南》（第四版）或《精编分子生物学实验指南》（第五版），或由商业化公司体外合成以下 mRNA 片段。

表 1. mRNA 片段信息表

样品名称	序列信息	理论分子量 (Da)
uncap	pppGGGAGACG CGUGUUAAAU AACA	7364.9205
cap0	m ⁷ GpppGGGAGACG CGUGUUAAAU AACA	7645.0256
cap1	m ⁷ GpppmGGGAGACG CGUGUUAAAU AACA	7659.0412

实施例二、构建质谱特征峰模型检测 mRNA 加帽效率的方法

由上海捷瑞生物工程有限公司合成用做内标的核酸序列，分子量为 8214.4Da，SEQ ID NO:1 为 5'- CTTGTAAGTTCATTACCTGTATAATTC-3'。

使用上述 mRNA 片段、内标来检测 mRNA 加帽效率方法，具体操作方法如下：

1. 样本制备

将 mRNA 样品分别稀释至合适浓度，然后各自加入相应终浓度的分子量校正内标。

2. 纯化

向每管 mRNA 样品中加入 15mg 树脂，颠倒混匀 5 分钟。

3. 点样

使用微量移液器，吸取 0.5ul 纯化产物，点样至靶片。

4. 上机检测及结果判读

将上述纯化产物通过临床飞行时间质谱 Clin-TOF- II（毅新博创生物科技有限公司生产的 MALDI-TOF MS）质谱仪进行检测。

5. 结果判读

使用本发明人研制的 Clin-TOF 型飞行时间质谱仪对点样后的靶片进行检测和结果判断。

6. 检测结果

将所述 mRNA 样品均点样至同样一张芯片上，进行核酸质谱检测。

阳性靶标所对应的目的片段分子量所代表的特征峰(m/z)，结果如图 1-3 所示。

图 1 为未加帽 mRNA (uncap)的目的片段(7364.9205Da)所对应的特征峰 7364.9205m/z;

图 2 为加帽 mRNA (cap0) 的目的片段 (7645.0256Da) 所对应的特征峰：
7645.0256m/z;

图 3 为加帽 mRNA (cap1) 的目的片段 (7659.0412Da) 所对应的特征峰：
7659.0412m/z;

此外，所有组均无明显杂峰，基线平稳；

谱图中 3000-10000Da 范围内无杂峰或<2 根杂峰。

因此，构建出质谱检出 mRNA 样品的质谱特征峰模型。

实施例三、利用质谱模型检测 mRNA 样品

根据实施例二的方法,对 4 例 mRNA 疫苗样品进行样本处理、纯化后,通过 Clin-TOF 飞行时间质谱仪对点样后的靶片进行检测和结果判断。

计算 Cap1 加帽率= $\text{Area}(\text{cap1}) / \text{Area}(\text{cap0} + \text{cap1} + \text{uncapped})$, Cap0 加帽率相应是 $=\text{Area}(\text{cap0}) / \text{Area}(\text{cap0} + \text{cap1} + \text{uncapped})$, 结果如图 4-7 所示: 质谱结果如图 4-7 所示:

样品 N1, 检测峰值 (m/z) 分别是: 7364.9205, 7645.0256, 7659.0412, 其中 uncap、cap0、cap1 的特征分子量 (Da) 分别是: 7364.9205, 7645.0256, 7659.0412, 根据实施例 2 建立的质谱模型, 因此确定检测结果为: uncap、cap0、cap1; Cap1 加帽率为 54.5%。

样品 N2, 检测峰值 (m/z) 分别是: 7364.9205, 7645.0256, 7659.0412, 其中 uncap、cap0、cap1 的特征分子量 (Da) 分别是: 7364.9205, 7645.0256, 7659.0412, 根据实施例 2 建立的质谱模型, 因此确定检测结果为: uncap、cap0、cap1; Cap1 加帽率为 73%。

样品 N3, 检测峰值 (m/z) 分别是: 7364.9205, 7645.0256, 7659.0412, 其中 uncap、cap0、cap1 的特征分子量 (Da) 分别是: 7364.9205, 7645.0256, 7659.0412, 根据实施例 2 建立的质谱模型, 因此确定检测结果为: uncap、cap0、cap1; Cap1 加帽率为 74.5%。

样品 N4, 检测峰值 (m/z) 分别是: 7364.9205, 7645.0256, 7659.0412, 其中 uncap、cap0、cap1 的特征分子量 (Da) 分别是: 7364.9205, 7645.0256, 7659.0412, 根据实施例 2 建立的质谱模型, 因此确定检测结果为: uncap、cap0、cap1; Cap1 加帽率为 75.8%。

综合各个峰面积, 最终如下表所示。

样品名称	Uncapped(7364.9205) 峰面积	Cap0(7645.0256) 峰面积	Cap1(7659.0412) 峰面积	加帽 率
N1	14470.7	1827.4	19495.3	54.5%
N2	9586.5	4527.1	38092.3	73%
N3	21071.1	87.3	61680.5	74.5%

N4	5597.9	170.2	18031.1	75.8%
----	--------	-------	---------	-------

由此可见，图 4-7 中目的特征峰基线平滑，信噪比高，相邻信号峰之间分离度高，因此本发明质谱法既能同时对 uncap、cap0、cap1mRNA 特征峰进行检测，又能快速、直观的获得检测结果，而避免了酶切等方法客观、分辨率低的缺点。针对 mRNA 疫苗加帽效率，具有极高的生物学价值。

1、一种用于 MALDI TOF -MS 检测加帽效率的 mRNA 片段组合物，其包括：

片段样品	序列信息	分子量 (Da)
uncap	pppGGGAGACG CGUGUUAAAU AACA	7364.9205
cap0	m ⁷ GpppGGGAGACG CGUGUUAAAU AACA	7645.0256
cap1	m ⁷ GpppmGGGAGACG CGUGUUAAAU AACA	7659.0412

2、一种用于权利要求 1 所述的检测加帽效率的 mRNA 片段组合物的内标序列，SEQ ID NO:1 为 5'-CTTGTAAGTTCATTACCTGTATAATTC-3'，分子量为 8214.4Da。

3、一种检测 mRNA 加帽效率方法，包括如下步骤：

(1) 样本制备：将样品分别稀释至合适浓度，各加入相应终浓度的分子量校正内标。

(2) 纯化：对步骤 (1) 得到的样本进行纯化，以获得高纯的样本，避免盐离子等杂质对后续检测的影响。

(3) 点样：将步骤 (2) 得到的纯化后的物质点在含有基质的靶片芯片上，待测物直接与基质形成结晶混合物。

(4) 质谱仪检测：将点好样的靶板放入质谱仪进行检测；

(5) 数据分析：将步骤 (4) 得到的图谱，通过计算机软件与预先建立的质谱特征峰模型进行比较和分析，从而得到待测 mRNA 样品加帽效率；其中，

所述质谱特征峰模型包括未加帽 mRNA (uncap) 的目的片段所对应的特征峰 7364.9205m/z，加帽 mRNA (cap0) 的目的片段所对应的特征峰 7645.0256m/z，以及加帽 mRNA (cap1) 的目的片段所对应的特征峰：7659.0412m/z。

4、权利要求 3 的方法，其中步骤 (5) 的 mRNA 加帽效率计算公式为：

Cap1 加帽率=Area (cap1) / Area (cap0+cap1+ uncapped)；

Cap0 加帽率=Area (cap0) / Area (cap0+cap1+ uncapped)。

5、权利要求 4 的方法，其中其中所述内标的核酸序列 (SEQ ID NO:1) 为 5'-CTTGTAAGTTCATTACCTGTATAATTC-3'。

6、权利要求 5 的方法，其中所述基质为含有酸性成分的复合基质，该酸性成分包括但不限于甲酸、乙酸和柠檬酸，所述芯片为飞行时间质谱专用微阵列芯片，其材质包括但不限于不锈钢、金刚石、单晶硅、石英晶体。

7、权利要求 6 的方法，其中步骤 (1) 中利用 NanoDrop ND-2000 核酸检测仪测量 mRNA 的浓度，所述质谱仪为 MALDI TOF MS 质谱仪。

- 8、权利要求 7 的方法，其中所述软件是 BioExplore 软件，其版权号为软著登字第 136879 号，登记号 2009SR10700。
- 9、权利要求 4-8 任一项所述的方法，其中 mRNA 样品为 mRNA 疫苗，包括新冠肺炎、乙肝 mRNA 疫苗、流感 mRNA 疫苗、HPV mRNA 疫苗等。
- 10、权利要求 3-8 任一所述方法作为非诊断目的的应用，用于检测 mRNA 治疗应用的质量、mRNA 疫苗的质量的用途。

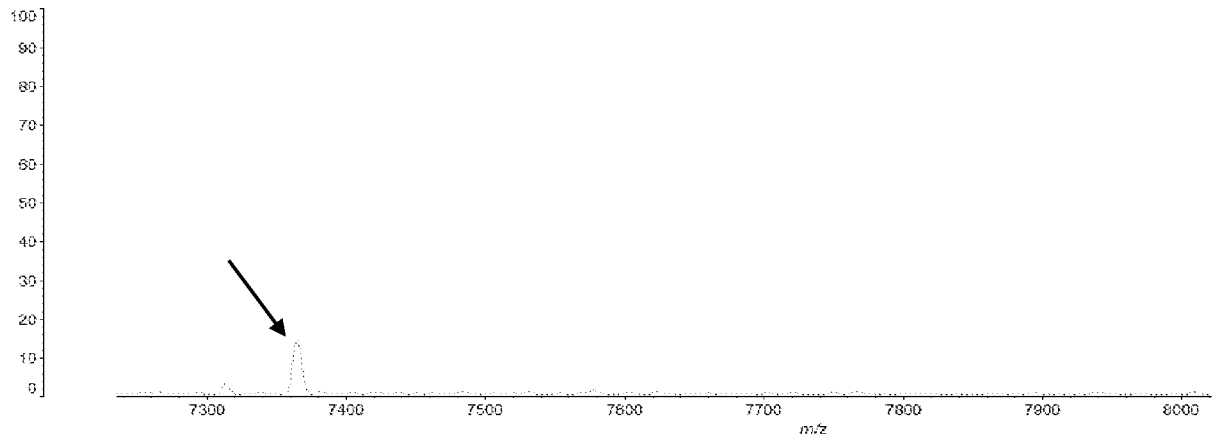


图 1

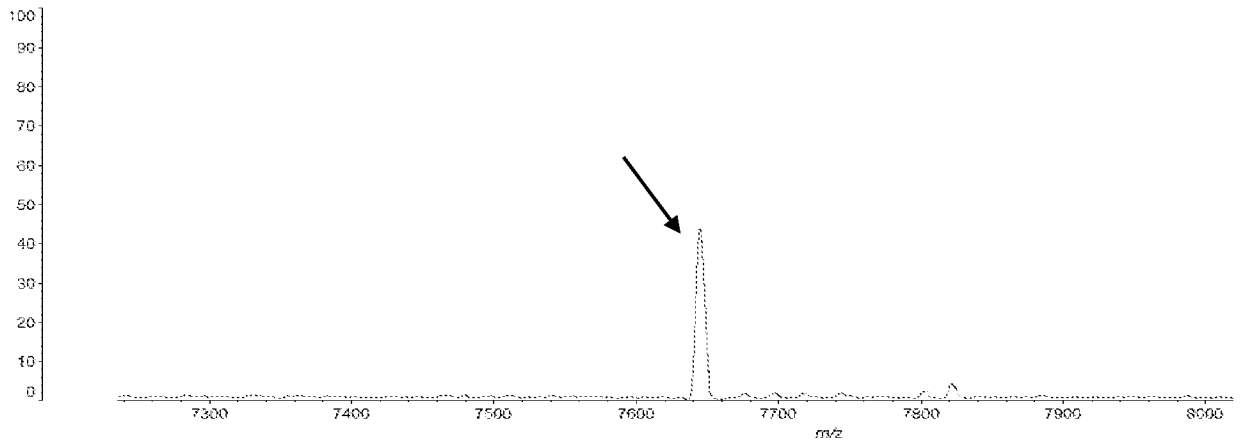


图 2

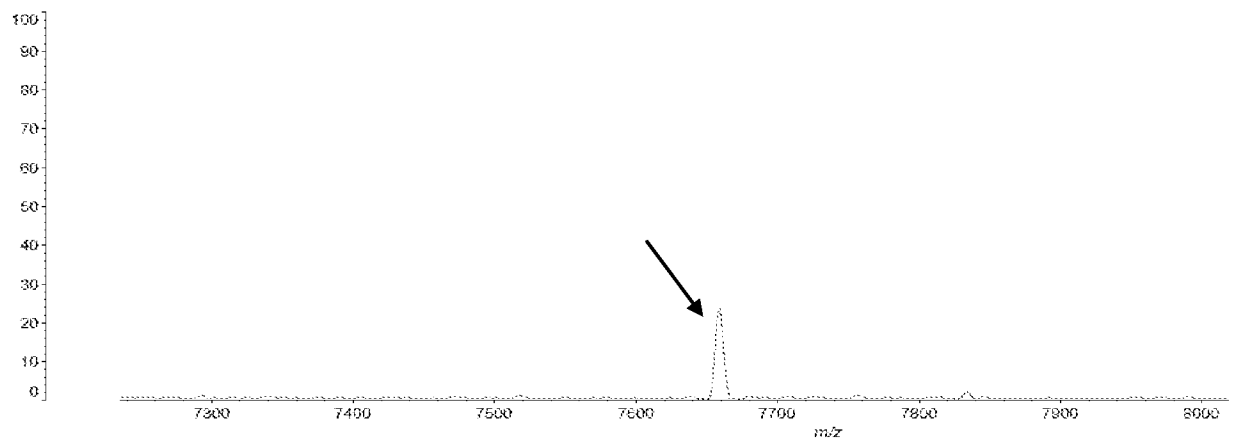


图 3

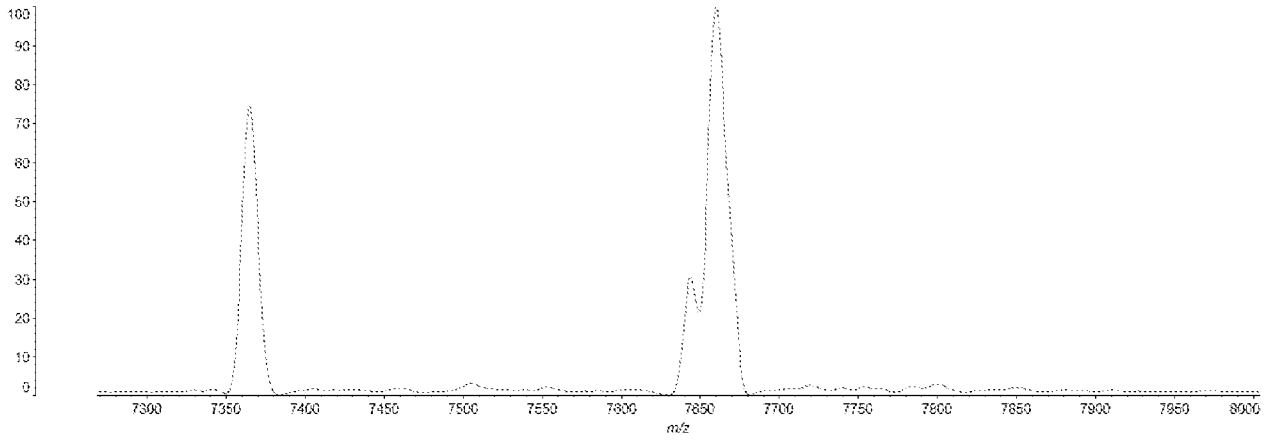


图 4

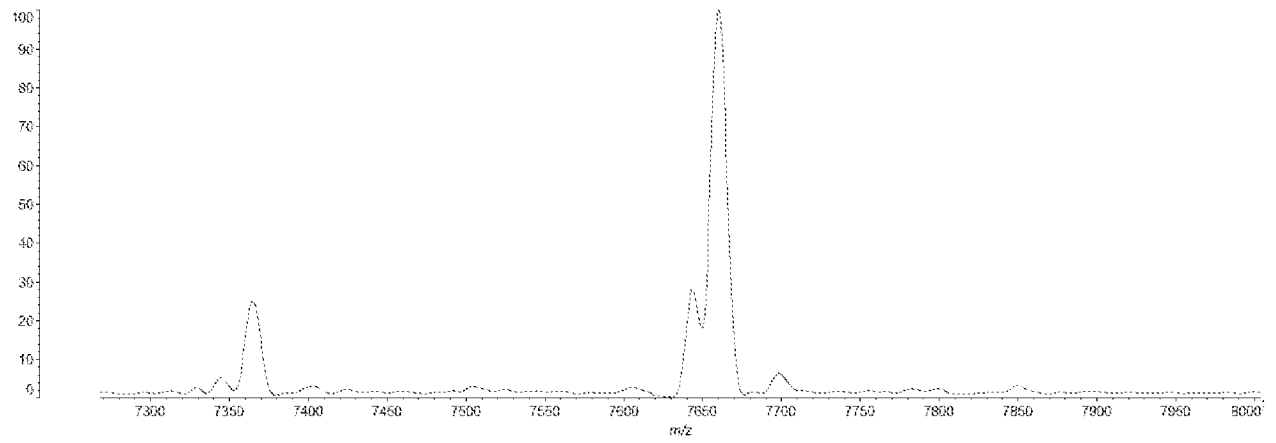


图 5

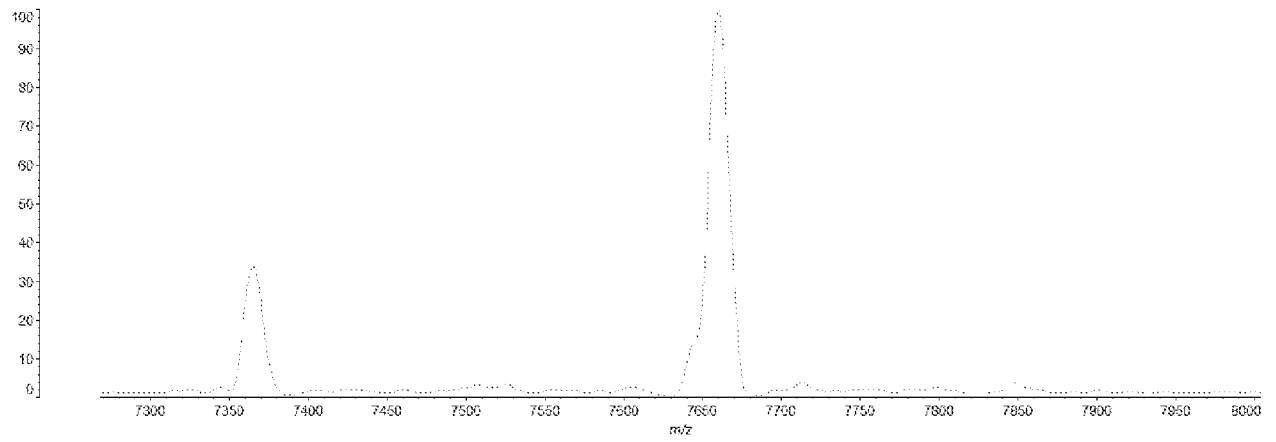


图 6

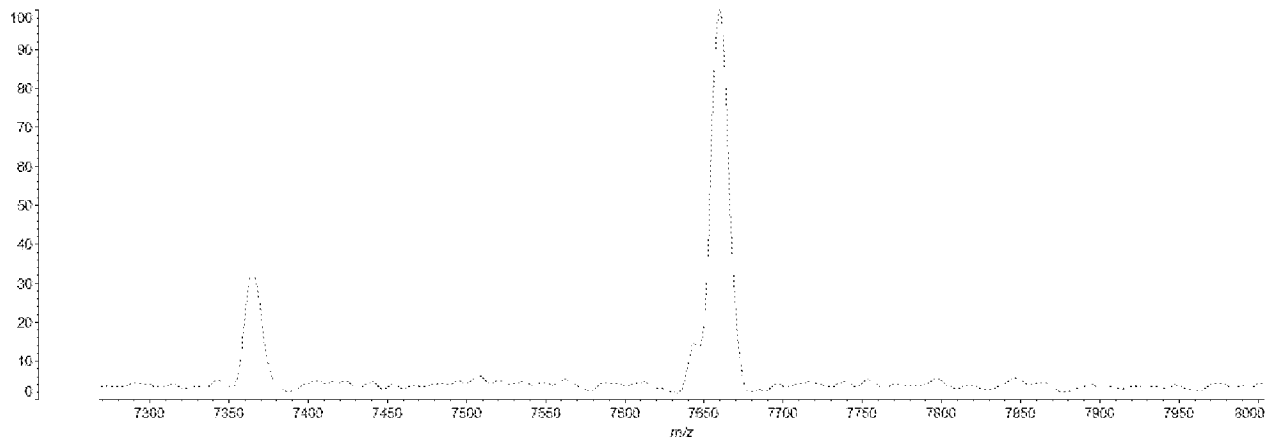


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/141002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6876(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q; ; C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; EPODOC; WPI; CNKI; STN: 北京毅新博创, mRNA, 片段, 检测, 加帽, 效率, 纯化, 样品, 质谱, fragment, detect, cap, uncap, efficiency, purified, sample, mass, spectrum		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105051213 A (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.) 11 November 2015 (2015-11-11) claims 1-20, and description, paragraphs [0140]-[0144]	1-10
A	CN 112714795 A (NEW ENGLAND BIOLABS, INC.) 27 April 2021 (2021-04-27) entire document	1-10
A	CN 109562153 A (NOVARTIS AG) 02 April 2019 (2019-04-02) entire document	1-10
A	CN 113166737 A (NEW ENGLAND BIOLABS, INC.) 23 July 2021 (2021-07-23) entire document	1-10
A	CN 112626177 A (HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 09 April 2021 (2021-04-09) entire document	1-10
A	CN 108366604 A (TRILINK BIOTECHNOLOGIES INC.) 03 August 2018 (2018-08-03) entire document	1-10
A	WO 2014144039 A1 (MODERNA THERAPEUTICS, INC.) 18 September 2014 (2014-09-18) entire document	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 August 2022		Date of mailing of the international search report 30 August 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/141002

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105051213	A	11 November 2015	WO	2014152659	A1	25 September 2014
				JP	2016514970	A	26 May 2016
				DK	2971102	T3	27 August 2018
				EA	201591283	A1	29 February 2016
				BR	112015022505	A2	24 October 2017
				ES	2680595	T3	10 September 2018
				US	2018291425	A1	11 October 2018
				MX	2015011944	A	01 December 2015
				EP	2971102	A1	20 January 2016
				CA	2903487	A1	25 September 2014
				AU	2001239250	A1	01 November 2001
				AU	2014239250	A1	27 August 2015
				TR	201811157	T4	27 August 2018
				US	2016032356	A1	04 February 2016
CN	112714795	A	27 April 2021	None			
CN	109562153	A	02 April 2019	WO	2018029586	A1	15 February 2018
				EP	3493834	A1	12 June 2019
				JP	2019528312	A	10 October 2019
				US	2021283262	A1	16 September 2021
CN	113166737	A	23 July 2021	WO	2020072914	A1	09 April 2020
				AU	2019355177	A1	06 May 2021
				EP	3861108	A1	11 August 2021
				CA	3114892	A1	09 April 2020
CN	112626177	A	09 April 2021	None			
CN	108366604	A	03 August 2018	LT	3352584	T	10 August 2021
				CA	2999274	A1	30 March 2017
				RS	62129	B1	31 August 2021
				US	2019270766	A1	05 September 2019
				EP	3954224	A1	16 February 2022
				EP	3906789	A1	10 November 2021
				JP	2021048864	A	01 April 2021
				WO	2017053297	A1	30 March 2017
				ES	2879686	T3	22 November 2021
				HR	P20211091	T1	15 October 2021
				EP	3352584	A1	01 August 2018
				KR	20180050409	A	14 May 2018
				HK	1255236	A1	09 August 2019
				AU	2016328645	A1	19 April 2018
				US	2021371452	A1	02 December 2021
				JP	2018527015	A	20 September 2018
				US	2018273576	A1	27 September 2018
				US	2021261597	A1	26 August 2021
				PL	3352584	T3	08 November 2021
				DK	3352584	T3	12 July 2021
				SI	3352584	T1	30 September 2021
				CN	113584020	A	02 November 2021
				US	2019144490	A1	16 May 2019
AU	2021206780	A1	12 August 2021				
PT	3352584	T	13 July 2021				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/141002

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)	
					EP	3954225	A1	16 February 2022	
WO	2014144039	A1	18 September 2014		US	2016032273	A1	04 February 2016	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/141002

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6876(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12Q; ; C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS; CNTXT; EPODOC; WPI; CNKI; STN:北京毅新博创, mRNA, 片段, 检测, 加帽, 效率, 纯化, 样品, 质谱, fragment, detect, cap, uncap, efficiency, purified, sample, mass, spectrum</p>																										
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 105051213 A (夏尔人类遗传性治疗公司) 2015年11月11日 (2015 - 11 - 11) 权利要求1-20、说明书第[0140]-[0144]段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 112714795 A (新英格兰生物实验室公司) 2021年4月27日 (2021 - 04 - 27) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109562153 A (诺华股份有限公司) 2019年4月2日 (2019 - 04 - 02) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 113166737 A (新英格兰生物实验室公司) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 112626177 A (华中科技大学 等) 2021年4月9日 (2021 - 04 - 09) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108366604 A (垂林克生物技术公司) 2018年8月3日 (2018 - 08 - 03) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014144039 A1 (MODERNA THERAPEUTICS, INC.) 2014年9月18日 (2014 - 09 - 18) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 105051213 A (夏尔人类遗传性治疗公司) 2015年11月11日 (2015 - 11 - 11) 权利要求1-20、说明书第[0140]-[0144]段	1-10	A	CN 112714795 A (新英格兰生物实验室公司) 2021年4月27日 (2021 - 04 - 27) 全文	1-10	A	CN 109562153 A (诺华股份有限公司) 2019年4月2日 (2019 - 04 - 02) 全文	1-10	A	CN 113166737 A (新英格兰生物实验室公司) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 全文	1-10	A	CN 112626177 A (华中科技大学 等) 2021年4月9日 (2021 - 04 - 09) 全文	1-10	A	CN 108366604 A (垂林克生物技术公司) 2018年8月3日 (2018 - 08 - 03) 全文	1-10	A	WO 2014144039 A1 (MODERNA THERAPEUTICS, INC.) 2014年9月18日 (2014 - 09 - 18) 全文	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
A	CN 105051213 A (夏尔人类遗传性治疗公司) 2015年11月11日 (2015 - 11 - 11) 权利要求1-20、说明书第[0140]-[0144]段	1-10																								
A	CN 112714795 A (新英格兰生物实验室公司) 2021年4月27日 (2021 - 04 - 27) 全文	1-10																								
A	CN 109562153 A (诺华股份有限公司) 2019年4月2日 (2019 - 04 - 02) 全文	1-10																								
A	CN 113166737 A (新英格兰生物实验室公司) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 全文	1-10																								
A	CN 112626177 A (华中科技大学 等) 2021年4月9日 (2021 - 04 - 09) 全文	1-10																								
A	CN 108366604 A (垂林克生物技术公司) 2018年8月3日 (2018 - 08 - 03) 全文	1-10																								
A	WO 2014144039 A1 (MODERNA THERAPEUTICS, INC.) 2014年9月18日 (2014 - 09 - 18) 全文	1-10																								
国际检索实际完成的日期	2022年8月19日	国际检索报告邮寄日期	2022年8月30日																							
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	授权官员	崔朝利																							
传真号 (86-10)62019451		电话号码 86-(10)-53962644																								

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/141002

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	105051213	A	2015年11月11日	WO	2014152659	A1	2014年9月25日
				JP	2016514970	A	2016年5月26日
				DK	2971102	T3	2018年8月27日
				EA	201591283	A1	2016年2月29日
				BR	112015022505	A2	2017年10月24日
				ES	2680595	T3	2018年9月10日
				US	2018291425	A1	2018年10月11日
				MX	2015011944	A	2015年12月1日
				EP	2971102	A1	2016年1月20日
				CA	2903487	A1	2014年9月25日
				AU	2001239250	A1	2001年11月1日
				AU	2014239250	A1	2015年8月27日
				TR	201811157	T4	2018年8月27日
				US	2016032356	A1	2016年2月4日
				CN	112714795	A	2021年4月27日
CN	109562153	A	2019年4月2日	WO	2018029586	A1	2018年2月15日
				EP	3493834	A1	2019年6月12日
				JP	2019528312	A	2019年10月10日
				US	2021283262	A1	2021年9月16日
CN	113166737	A	2021年7月23日	WO	2020072914	A1	2020年4月9日
				AU	2019355177	A1	2021年5月6日
				EP	3861108	A1	2021年8月11日
				CA	3114892	A1	2020年4月9日
CN	112626177	A	2021年4月9日	无			
CN	108366604	A	2018年8月3日	LT	3352584	T	2021年8月10日
				CA	2999274	A1	2017年3月30日
				RS	62129	B1	2021年8月31日
				US	2019270766	A1	2019年9月5日
				EP	3954224	A1	2022年2月16日
				EP	3906789	A1	2021年11月10日
				JP	2021048864	A	2021年4月1日
				WO	2017053297	A1	2017年3月30日
				ES	2879686	T3	2021年11月22日
				HR	P20211091	T1	2021年10月15日
				EP	3352584	A1	2018年8月1日
				KR	20180050409	A	2018年5月14日
				HK	1255236	A1	2019年8月9日
				AU	2016328645	A1	2018年4月19日
				US	2021371452	A1	2021年12月2日
				JP	2018527015	A	2018年9月20日
				US	2018273576	A1	2018年9月27日
				US	2021261597	A1	2021年8月26日
				PL	3352584	T3	2021年11月8日
				DK	3352584	T3	2021年7月12日
				SI	3352584	T1	2021年9月30日
CN	113584020	A	2021年11月2日				
US	2019144490	A1	2019年5月16日				
AU	2021206780	A1	2021年8月12日				
PT	3352584	T	2021年7月13日				

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/141002

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				EP	3954225	A1	2022年2月16日
WO	2014144039	A1	2014年9月18日	US	2016032273	A1	2016年2月4日