



(21) 申请号 202310674084.6

(22) 申请日 2023.06.08

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116426610 A

(43) 申请公布日 2023.07.14

(73) 专利权人 启辰生物科技(珠海)有限公司
地址 519040 广东省珠海市金湾区三灶镇
机场西路628号珠海国际健康港GMP厂
房11栋1层

(72) 发明人 吕能铭 张武 莫子瑶

(74) 专利代理机构 北京正元瑞驰知识产权代理
事务所(普通合伙) 16090
专利代理师 吴琼

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6813 (2018.01)

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/30 (2006.01)

G01N 30/32 (2006.01)

G01N 30/34 (2006.01)

G01N 30/74 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105051213 A, 2015.11.11

CN 111635945 A, 2020.09.08

US 2015176088 A1, 2015.06.25

US 2021108252 A1, 2021.04.15

CN 115678968 A, 2023.02.03

US 2016002705 A1, 2016.01.07

王晓凤等. 基因表达与mRNA结构的关系. 中国比较医学杂志. 2010, 第20卷(第6期), 第69-74页.

Michael Beverly等. Label-free analysis of mRNA capping efficiency using RNase H probes and LC-MS. Anal Bioanal Chem. 2016, 第408卷第3-4页方法部分, 图2-3.

注意:

申请人在申请日后补交了实验数据, 但该数据并未包含在本授权公告文档中。

审查员 谢庆宁

权利要求书1页 说明书9页 附图7页

(54) 发明名称

一种LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法

(57) 摘要

本发明公开一种LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法。该方法包括以下步骤: 使mRNA与寡核苷酸结合, 得到复合物; 使用核糖核酸内切酶切割复合物, 随后对切割产物进行纯化和回收, 得到具有5'端寡核苷酸目标物; 采用LC-MS定量mRNA加帽效率。本发明设计合成优化后的核苷酸探针, 可与mRNA样品5'端特定序列结合, 经酶切处理并分离纯化可获得5'端寡核苷酸目标物。本发明解决了核酸酶切割位点的专一性较差, 影响结果的准确性和重复性的问题。此外, 本发明在探针设计、实验流程等方面进行了方法优化, 从而大大提高检测方法的可靠性。经过优化后, 核酸酶切割位点的特异性和目标物灵敏度明显提

升。



1. 一种LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 使mRNA与寡核苷酸结合,在83-87℃保持1-3min,降温至68-72℃后梯度降温至15-18℃,降温速率为0.1-0.5℃/s,得到复合物,所述寡核苷酸具有下式结构:5'-AGTT//Y_b-3',Y选自RNA腺嘌呤A、鸟嘌呤G、胞嘧啶C和尿嘧啶U碱基,b表示RNA碱基数目,其中b为10-120之间的整数,所述寡核苷酸具有5'端生物素标记;

(2) 使用核糖核酸内切酶切割所述复合物,酶切温度为35-38℃,时间为1.5-2.5h,随后对切割产物进行纯化和回收,得到5'端寡核苷酸目标物,其中核糖核酸内切酶切割后产生且仅产生一个酶切位点,所述核糖核酸内切酶为核糖核酸酶H;

(3) 采用LC-MS测定加帽的目标物和未加帽的目标物的相对峰面积,定量mRNA加帽效率。

2. 根据权利要求1所述的LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其特征在于,步骤(2)的目标物包括未加帽的5'端寡核苷酸目标物、未完全加帽的5'端寡核苷酸目标物和加帽的5'端寡核苷酸目标物。

3. 根据权利要求1所述的LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其特征在于,纯化和回收采用磁珠法进行,所述磁珠偶联有链霉亲和素。

4. 根据权利要求1所述的LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其特征在于,步骤(3)中,质谱条件为:三乙胺、六氟异丙醇、EDTA水溶液为流动相A,甲醇为流动相B进行线性梯度洗脱,检测波长为260nm,柱温为55-65℃;流速为0.1-0.5 mL/min。

一种LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程领域,具体地涉及一种LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法。

背景技术

[0002] 作为一种治疗性或预防性的药物产品,mRNA药物必须依照法规要求进行深入的分析表征。国家药监局发布的《新型冠状病毒预防用mRNA疫苗药学研究技术指导原则》,提到对于mRNA体外合成需要进行过程和产物的控制检测,包括加帽率、加Poly (A) 尾长度等。2022年2月23日美国药典 (USP) 制定新的“mRNA疫苗质量分析方法”指南草案,支持mRNA疫苗和疗法的质量评估。2022年5月31日国家药监局药审中心 (CDE) 也发布了“体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则 (试行)”用于强化mRNA药品的质量标准。

[0003] 由于5' 端帽子结构和3' Poly (A) 尾结构在mRNA的翻译及稳定性中起着重要的调节作用,因此测定mRNA的加帽效率及3' Poly (A) 尾长度和分布是评价mRNA质量的重要指标。5' 帽子结构是mRNA在体内发挥生物学功能是必不可少的元件。简单来说,RNA帽子结构有2个最主要的功能:第一,在细胞中招募蛋白翻译机器,使得mRNA翻译表达出执行特定生物学功能的蛋白质;第二,提升mRNA稳定性,避免被细胞内的核酸内切酶降解。既然帽子结构有着如此重要的功能,那么检测mRNA加帽率毫无疑问成为mRNA生产工艺质量分析里面最关键的指标之一。

[0004] mRNA分子量一般成百上千KDa,帽子结构仅仅300Da左右。极小的帽子结构在mRNA分子面前,显得微不可辨,这就导致加帽mRNA和未加帽mRNA之间的差异极其细微,也就是一个核苷酸或者甲基的区别,常规分离分析方法难以捕捉到。

[0005] 目前常用的加帽率检测方法有凝胶电泳、液相色谱 (HPLC)、免疫学方法以及液相色谱质谱联用 (LC-MS) 等。对全长的mRNA直接进行分析往往由于分子量太大而无法得到精确表征,因此需要一个成熟的前处理方案。对于凝胶电泳,利用是否成功加帽的mRNA在凝胶中的印记不同区分加帽成功的短链和失败的短链,该方法对于样本量没有太高要求,但是在实际应用中容易受到片段大小、凝胶分辨率等许多因素的影响,导致灵敏度不佳 (如使用酶法加帽,只可确定是否加上帽结构,无法区分pppG-RNA、ppG-RNA、Gppp-RNA、m7GpppGpG-RNA、m7GpppmGpG-RNA等),且耗时比较长,通常用于早期定性研究。

[0006] HPLC液相方法是不同样本流出物的组成和含量变化转变为电信号,通过电子仪器测定,从而实现定性定量,来表征mRNA的产品纯度和完整性。但其分辨率很难将含不同帽结构的mRNA区分开来,样本量要求很高并且针对不同序列需要重新建立方法,较为繁琐,所以一般不单一使用来对mRNA的加帽进行检测。此外,HPLC无法对mRNA分子量进行测定,须通过将5' 末端不同结构的mRNA进行色谱分离,且GpppG-RNA、m7GpppGpG-RNA、m7GpppmGpG-RNA分子量差距仅大概14Da,难以实现分离。

[0007] 免疫学方法可直观的通过蛋白的表达水平来反映加帽的效率并且不受仪器设备的限制,通过将合成好的mRNA转染细胞/动物,测定蛋白的表达来进行判断,但蛋白表达受

多因素影响,数据结果重复性差。

[0008] LC-MS可以精准的进行定量,对加帽的不同类型(pppG-RNA、GpppG-RNA, m7GpppGpG-RNA, m7GpppmGpG-RNA及其他杂质)进行精准测定,但其局限性也很明显,通常需要专人操作且价格十分昂贵,在对mRNA表征方面,比较适合前端进行高准确率验证。

发明内容

[0009] 针对现有技术中存在的至少部分问题,发明人进行了深入研究,提出一种LC-MS法准确定量测试mRNA加帽效率的方法,根据碱基互补配对原则,设计合成经过优化后的生物素化的核苷酸探针与mRNA 5'端目标序列碱基结合,再加入RNase H进行切割与探针结合的DNA-RNA链特定区域位点,再利用该探针3'端的生物素与链霉亲和素偶联的磁珠结合,通过磁力吸附分离纯化获得5'端寡核苷酸目标物,最后进行LC-MS分析5'端寡核苷酸目标物分子量大小,计算其比例分析得到mRNA的加帽效率。具体地,本发明包括以下内容。

[0010] 本发明的第一方面,提供一种LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其包括以下步骤:

[0011] (1) 使mRNA与寡核苷酸结合,得到复合物;

[0012] (2) 使用核糖核酸内切酶切割所述复合物,随后对切割产物进行纯化和回收,得到具有5'端寡核苷酸目标物,其中核糖核酸内切酶切割后产生且仅产生一个酶切位点;

[0013] (3) 采用LC-MS定量mRNA加帽效率。

[0014] 在某些实施方案中,根据本发明所述的LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其中,步骤(1)的所述寡核苷酸具有下式结构:5'-X₁X₂X₃X₄//Y_b-3',其中X₁-X₄相同或不同,且各自独立地为DNA腺嘌呤A、胸腺嘧啶T、鸟嘌呤G、胞嘧啶C碱基中的任意一种;Y选自RNA腺嘌呤A、鸟嘌呤G、胞嘧啶C和尿嘧啶U碱基,b表示RNA碱基数目,其中b为10-120之间的整数。

[0015] 在某些实施方案中,根据本发明所述的LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其中,所述核糖核酸内切酶为核糖核酸酶H。

[0016] 在某些实施方案中,根据本发明所述的LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其中,步骤(2)的目标物包括未加帽的5'端寡核苷酸目标物、未完全加帽的5'端寡核苷酸目标物和加帽的5'端寡核苷酸目标物。

[0017] 在某些实施方案中,根据本发明所述的LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其中,步骤(1)的所述寡核苷酸具有5'端生物素标记。

[0018] 在某些实施方案中,根据本发明所述的LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其中,纯化和回收采用磁珠法进行,所述磁珠偶联有链霉亲和素。

[0019] 在某些实施方案中,根据本发明所述的LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其中,步骤(1)中,mRNA与寡核苷酸结合的退火程序为:80-90℃,1-5min,降温至65-75℃后梯度降温至10-20℃。

[0020] 在某些实施方案中,根据本发明所述的LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其中,步骤(3)中,质谱条件为:三乙胺、六氟异丙醇、EDTA水溶液为流动相A,甲醇为流动相B进行线性梯度洗脱,检测波长为260nm,柱温为55-65℃;流速为0.1-0.5 mL/min。

[0021] 在某些实施方案中,根据本发明所述的LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其中,步骤(3)包括测定加帽的目标物和未加帽的目标物的相对峰面积。

[0022] 本发明的第二方面,提供一种用于检测mRNA药物质量的试剂盒,其中,所述试剂盒能够定量mRNA加帽效率,所述试剂盒包括:

[0023] I. 核糖核酸内切酶;

[0024] II. 探针,所述探针具有下式结构:5'-X₁X₂X₃X₄//Y_b-3',其中X₁-X₄相同或不同,且各自独立地为DNA腺嘌呤A、胸腺嘧啶T、鸟嘌呤G、胞嘧啶C碱基中的任意一种;Y选自RNA腺嘌呤A、鸟嘌呤G、胞嘧啶C和尿嘧啶U碱基,b表示RNA碱基数目,其中b为10-120之间的整数。

[0025] 在某些实施方案中,根据本发明所述的试剂盒,其中,所述mRNA药物包括mRNA疫苗。

[0026] 本发明的优异技术效果包括但不限于:

[0027] 本发明设计合成优化后的核苷酸探针,可与mRNA样品5'端特定序列结合,经酶切处理并分离纯化可获得5'端寡核苷酸目标物,包括了未加帽的5'端寡核苷酸目标物、未完全加帽的5'端寡核苷酸目标物及加帽的5'端寡核苷酸目标物。

[0028] 基于RNase H切割得到的5'末端序列,RNase H切割位点的专一性较差,影响结果的准确性和重复性。本发明在探针设计、实验流程等方面进行了方法优化,从而大大提高检测方法的可靠性。经过优化后,RNase H切割位点的特异性和目标物灵敏度明显提升。

附图说明

[0029] 图1示出了根据本发明的方法进行基于RNase H酶酶切的加帽率检测流程。

[0030] 图2-8示出了根据本发明的方法进行基于RNase H酶酶切的加帽率检测图谱。

[0031] 图9为比较例1检测图谱。

[0032] 图10为比较例2检测图谱。

[0033] 图11-12为比较例3检测图谱。

具体实施方式

[0034] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式,该详细说明不应认为是对本发明的限制,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0035] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为具体公开了该范围的上限和下限以及它们之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0036] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入,用以公开和描述与本发明相关的方法和/或材料。在与任何并入的文献冲突时,以本说明书的内容为准。

[0037] LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法

[0038] 本发明的一个方面,提供一种基于LC-MS法准确定量mRNA加帽效率的方法,其包括步骤(1)-(3): (1) 使mRNA与寡核苷酸结合,得到复合物; (2) 使用核糖核酸内切酶切割所

述复合物,随后对切割产物进行纯化和回收,得到具有5'端寡核苷酸目标物,其中核糖核酸内切酶切割后产生且仅产生一个酶切位点;(3)采用LC-MS定量mRNA加帽效率。下面进行详细说明。

[0039] 在本发明的步骤(1)中,使mRNA与寡核苷酸结合,得到复合物。mRNA不特别限定,可以是体外合成的mRNA。本领域技术人员可以理解,mRNA还包括体外转录的mRNA、分离的真核mRNA和病毒RNA。

[0040] 本发明中,mRNA与寡核苷酸(探针)的结合通过退火或杂交程序实现,术语“退火”、“杂交”指由Watson-Crick碱基互补配对的核苷酸序列之间形成复合物(双链体或杂交体)。本文所用术语“互补”指在特定条件下与其互补序列形成稳定双链体的核酸分子。如果所有核酸碱基匹配,则两个核酸分子之间的互补性称为“完全”或“全部”,否则称为“部分”。

[0041] 在一些实施方案中,术语“寡核苷酸”在本文用于指包括约5至约120个核苷酸,例如约10至约100个核苷酸、约10至约70个核苷酸、或约20至约50个核苷酸的多核苷酸。本文中,寡核苷酸由字母(例如选自四种碱基字母:A、C、G和T)序列表示时,核苷酸从左到右表示5'至3'的顺序。

[0042] 术语“3'”指来自相同寡核苷酸的另一区域或位置的多核苷酸或寡核苷酸3'末端(即,下游)中的区域或位置。术语“5'”指来自相同多核苷酸或寡核苷酸的另一区域或位置的多核苷酸或寡核苷酸5'末端(即,上游)中的区域或位置。本文涉及核酸分子使用的术语“3'末端”或“3'端”指包含与末端戊糖的3'碳连接的游离羟基的核酸末端。本文涉及核酸分子使用的术语“5'末端”和“5'端”指包含与末端戊糖的5'碳连接的游离羟基或磷酸基团的核酸分子末端。

[0043] 本发明中,寡核苷酸探针为经过特殊设计的探针,与现有技术设计思路不同的是,本发明将寡核苷酸5'端前4位的碱基设置为用于引导RNase H切割的4个DNA序列,同时探针3'端并非BioTEG设计,而是“3'-Biotin”。这样设计的原因在于,在实际定量mRNA加帽效率过程中,一方面由于核酸酶切割的专一性不稳定降低了加帽率准确性,另一方面,如果将寡核苷酸5'端前4位的碱基设置为多于4个DNA序列,例如5、6、7、8、9、10或更多时,酶切之后的图谱将产生超过1个切割位点的杂峰,从而影响结果的准确性。以6个DNA碱基的序列为例,酶切之后的图谱将会产生除探针峰外的另外的2个切割位点的杂峰。而本发明设计的探针,用于酶切后只产生1个酶切位点,切割位点的特异性强,寡核苷酸目标物响应度明显提高。

[0044] 优选地,寡核苷酸具有下式结构:5'-X₁X₂X₃X₄//Y_b-3',其中X₁-X₄相同或不同,且各自独立地为DNA腺嘌呤A、胸腺嘧啶T、鸟嘌呤G、胞嘧啶C碱基中的任意一种;Y选自RNA腺嘌呤A、鸟嘌呤G、胞嘧啶C和尿嘧啶U碱基中的至少一种或其组合,b表示RNA碱基数目,其中b为10-120之间的整数。在具体实施方案中,寡核苷酸探针序列为5'-AGTT//rG/rU/rG/rU/***/rA/rA/rU/rG/rU/rC/rC/rC//3'-Biotin(其中“r”的碱基是RNA,无小写前缀的碱基是DNA。因此,酶切后产生的mRNA 5'寡核苷酸目标物序列如下:

[0045] cap1:m7GpppmGGACAUU***ACACAACU,理论分子量为8245.1Da;

[0046] cap0:m7GpppGGACAUU***ACACAACU,理论分子量为8231.0Da;

[0047] G-cap:GpppGGACAUU***ACACAACU,理论分子量为8217.0Da;

[0048] Uncapped Diphos:ppGGACAUU***ACACAACU,理论分子量为7871.8Da。

[0049] 需要说明的是,虽然本发明示例性地示出了寡核苷酸探针序列以及酶切后产生的

mRNA 5' 寡核苷酸目标物序列,但这不应视为是对本发明方法或者序列的任何限制,本领域技术人员可以根据任何已知的含有任何类型加帽的mRNA序列进行设计并合成相关序列。

[0050] 步骤(1)中,退火程序为:80-90℃,1-5min,降温至65-75℃后梯度降温至10-20℃。优选地,退火程序为:83-87℃,1-3min,降温至68-72℃后梯度降温至15-18℃。降温速率不特别限定,可以是例如0.1-0.5℃/s。mRNA与探针的浓度比为1:1-2,还优选为1:1-1.5,进一步优选为1:1。

[0051] 本发明中,步骤(2)为酶切、纯化和回收步骤,本发明对进行的顺序以及反应条件进行了优化,尤其是退火处理后直接进行酶切、纯化和回收步骤,能够提高定量mRNA加帽效率的准确性。酶切步骤中,除了添加核糖核酸酶H外,还包括其他试剂,其他试剂包括但不限于:10×RNase H buffer和RNA酶抑制剂,RNase H buffer和RNA酶抑制剂可通过市售获得。酶切温度优选为32-40℃,时间为1-3h。进一步优选地,酶切温度优选为35-38℃,时间为1.5-2.5h。

[0052] 酶切后进行纯化和回收步骤,术语“纯化和回收”是指用于减少待测体系内其他物质对后续反应的影响的处理步骤,优选通过磁珠法进行纯化和回收。首先进行磁珠清洗步骤,例如使用已知的磁珠清洗液进行清洗,本发明的磁珠清洗液为50-150mM NaCl溶液,优选80-120 mM NaCl溶液。随后将酶切的mRNA与磁珠混合,加入2×结合缓冲液。本发明中,2×结合缓冲液包括5-20mM Tris Hcl,1-2.5 M NaCl,优选地,2×结合缓冲液包括5-12mM Tris Hcl(例如可以是5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM)、1.5-2.2 M NaCl(例如可以是1.5M、1.6M、1.7M、1.8M、1.9M、2.0M、2.1M、2.2M)。在室温下使磁珠与探针充分结合。

[0053] 在孵育20-60min后,使用磁分离器进行分离,弃上清后加入50-150 mM的清洗液,该步骤中的清洗液包含50-150 mM的乙酸铵,优选地,所述乙酸铵可以是50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM、150mM。清洗次数可以多于1次,例如清洗2、3、4次等。

[0054] 随后进入洗脱程序,洗脱采用醇溶液,优选甲醇溶液,还优选1%甲醇溶液。洗脱的温度为不低于70℃的温度,例如75-85℃(如75℃、78℃、80℃、82℃、85℃等)。将收集的含有目标物的上清离心,离心步骤不特别限定,优选使用冷冻离心机在4℃以10000-25000rpm离心5-20min,优选以15000-20000rpm离心10-15min。

[0055] 本发明的步骤(3)为采用色谱法,特别是采用LC-MS定量mRNA加帽效率步骤,本发明采用的色谱柱为Agilent AdvanceBio Oligonucleotides HPH-C18,2.7μm,2.1mmx50mm。

[0056] 步骤(3)中,质谱条件为:三乙胺、六氟异丙醇、EDTA水溶液为流动相A,甲醇为流动相B进行线性梯度洗脱,检测波长为260nm,柱温为55-65℃;流速为0.1-0.5 mL/min。优选地,质谱条件为:5-12 mmol/L三乙胺,150-250 mmol/L的六氟异丙醇水溶液为流动相A,甲醇为流动相B进行线性梯度洗脱,检测波长为260nm,柱温为58-62℃;流速为0.2-0.4 mL/min。

[0057] 步骤(3)中,检测器为飞行时间质谱,鞘气温度为300-380℃,雾化气压力为30-40 psi,鞘气流速为10-15 L/min,喷嘴电压为800-1400 V,毛细管电压为3000-4000 V,干燥气流速为5-15 L/min,干燥气温度为300-350℃;空白样品、寡核苷酸样品及加帽样品进样体积均为10-20 μl。优选地,检测器为飞行时间质谱,鞘气温度为340-360℃,雾化气压力为34-36 psi,鞘气流速为11-13 L/min,喷嘴电压为900-1200 V,毛细管电压为3400-3600 V,

干燥气流速为6-10 L/min,干燥气温度为310-330℃;空白样品、寡核苷酸样品及加帽样品进样体积均为10-20 μl。本发明中,空白样品为1%甲醇。

[0058] 本发明的方法进一步包括图谱分析步骤,其中,空白样品(1%甲醇)中无探针峰及mRNA样品峰出现。探针样品仅有探针峰,无mRNA样品峰出现。对5' cap mRNA和uncapped mRNA的峰面积进行分析。计算5' cap mRNA的百分比:结果= $[A_c / (A_u + A_c)] \times 100$,式中: A_u =解卷积质谱图中uncapped mRNA的峰面积; A_c =解卷积质谱图中5' cap mRNA的峰面积。

[0059] 试剂盒

[0060] 本发明的另一方面,提供一种用于检测mRNA药物质量的试剂盒,其中,所述试剂盒能够定量mRNA加帽效率,所述试剂盒包括:

[0061] I. 核糖核酸内切酶;

[0062] II. 探针,所述探针为上文提到的探针,在此不再赘述;以及可选的磁珠缓冲液、清洗液、结合液和进行LC-MS所必需的试剂等。

[0063] 除了上述组分之外,本发明的试剂盒还可包括与调控制造、使用或销售诊断试剂盒相关的注意事项。另外,本发明的试剂盒还可提供有使用、储存和故障排除的详细说明书。试剂盒还可任选地设置在适合的优选用于以高通量设置的机器人操作的装置中。

[0064] 在某些实施方案中,本发明的试剂盒的组分(例如,寡核苷酸和酶)可设置于容器中。容器通常会包括至少一种小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器和/或其它容器手段,其中可选等分地放置溶剂。试剂盒还可包括用于包含无菌、药学上可接受的缓冲液和/或其它溶剂的第二容器的手段。

[0065] 在某些实施方案中,本发明的试剂盒的组分可以溶液形式提供,例如水溶液的形式提供。在以水溶液状态存在的情况下,这些成分的含量是本领域技术人员能够根据不同需求而方便地确定的。例如,用于储存的目的时,例如寡核苷酸的浓度可以较高的形式存在,当处于工作状态或使用,可通过例如稀释上述较高浓度的溶液来将浓度降低至工作浓度。

[0066] 在试剂盒中存在超过一种组分的情况下,该试剂盒还通常会包含可单独放置另外的组分的第二、第三或其它另外的容器。另外,可在容器中包含各多种组分的组合。本文所述的任何组合或试剂可为试剂盒中的组分。

[0067] 应用

[0068] 本发明进一步提供根据本发明所述的试剂盒在检测mRNA药物质量中的应用,优选地,所述mRNA药物包括但不限于mRNA疫苗。

实施例

[0069] 图1示出了根据本发明的方法进行基于RNase H酶酶切的加帽率检测流程。

[0070] 1. 试剂准备

[0071] 100mM/L乙酸铵配制:将5M乙酸铵溶液与Nuclease-Free water按照1:49的比例配制成100mM乙酸铵溶液。

[0072] 100mM/L NaCl配制:将5M NaCl溶液与Nuclease-Free water按照1:49的比例配制成100mM NaCl溶液。

[0073] 2×结合缓冲液配制(10mM Tris HCl、2M NaCl):将1M Tris HCl溶液、5M NaCl溶

液与Nuclease-Free water按照1:40:59的比例配制成含10mM Tris HCl, 2M NaCl的2×结合缓冲液。

[0074] 1%甲醇溶液配制:根据样品量计算所需溶液体积,将甲醇与Nuclease-Free water按照1:99的比例配制成1%甲醇溶液。

[0075] 100mM/L EDTA配制:称取 $0.29\text{g} \pm 0.01\text{g}$ EDTA于1ml离心管中,加入5000 μl Nuclease-Free water和300 μl 氨水,充分溶解,再加入Nuclease-Free water至10ml,混匀。实际配制可等体积比扩大或缩小。

[0076] 流动相配制:取1000ml量瓶,加入500ml去离子水,移取21.1ml六氟异丙醇至量瓶中,混匀后再缓慢加入1.1ml三乙胺,边加入边搅拌,再加入10 μl 100mM EDTA,最后加入去离子水至1000ml刻度,混匀后为流动相A;取1000ml量瓶,加入甲醇至刻度,为流动相B。将流动相置于超声仪中超声脱气20min,备用。流动相配制量可根据样本分析所需量等比例放大或缩小。

[0077] 2. 操作过程

[0078] 2.1探针与mRNA结合:取浓缩后的mRNA 200pmol与复溶后探针300pmol于PCR管中混匀。

[0079] 2.2探针与mRNA结合退火程序:使用基因扩增仪运行退火程序使mRNA与探针特异性结合,程序设定为85 $^{\circ}\text{C}$,保持2min,降温至70 $^{\circ}\text{C}$ 后以0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 的降温速率降温至16 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0080] 2.3 RNase H酶切:退火后样品加入RNase H 2 μl 、10×RNase H buffer 10 μl 、RNA酶抑制剂1 μl ,补加Nuclease-Free water至终体积为100 μl 。混匀将液体离心至管底,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴孵育2h。

[0081] 3. 磁珠清洗

[0082] 3.1将磁珠漩涡混合均匀,取100 μl 磁珠加入新的EP管中。放置在磁分离器上,待溶液变澄清后,用移液器吸弃保护液。

[0083] 3.2将EP管从磁分离器上取下,加入100 μl 100mM NaCl溶液,用移液枪吹打清洗,放置在磁分离器上,收集磁珠,用移液器吸弃清洗液。重复洗涤2次。

[0084] 4. mRNA与磁珠结合

[0085] 4.1 加入酶切后mRNA样品溶液与磁珠混匀,并加入等体积的2×结合缓冲液,用移液枪轻柔吹打充分混匀。

[0086] 4.2 室温孵育30min,使磁珠与探针充分结合。

[0087] 4.3 孵育后样品置于磁分离器上,待液体澄清后,吸弃上清液。加入100 μl 100mM 乙酸铵溶液轻柔吹打清洗磁珠,置于磁分离器上,待磁珠全部吸附后,吸弃上清液。重复清洗至少3次。

[0088] 5. 样本洗脱

[0089] 5.1加入80 μl 加热至80 $^{\circ}\text{C}$ 的1%甲醇溶液,吹打混匀磁珠后将样品置于80 $^{\circ}\text{C}$ 保持5min,使mRNA从磁珠上洗脱下来。

[0090] 5.2将离心管置于磁力架上吸附30s,待液体澄清后,将上清液收集至新的1.5ml离心管中。

[0091] 5.3离心收集上清液:收集的样品于4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻离心机中20000rpm离心15min,将上清液转移至液相小瓶内插管中,待上机分析。

[0092] 6. LC-MS分析

[0093] 6.1色谱柱:Agilent AdvanceBio Oligonucleotides HPH-C18,2.7 μ m, 2.1mmx50mm

[0094] 6.2质谱条件:以含8 mmol/L三乙胺,200 mmol/L六氟异丙醇,1 μ M EDTA水溶液为流动相A,甲醇为流动相B,按下表进行线性梯度洗脱;检测波长为260nm;柱温为60 $^{\circ}$ C;流速为0.3mL/min;检测器为飞行时间质谱,鞘气温度为350 $^{\circ}$ C,雾化气压力为35psi,鞘气流速为12L/min,喷嘴电压为1000V,毛细管电压为3500V,干燥气流速为8L/min,干燥气温度为325 $^{\circ}$ C;空白样品(1%甲醇)、探针样品及加帽样品进样体积均为10~20 μ l。

时间(分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
2.00	85.00	15.00
10.30	80.00	20.00
11.00	60.00	40.00
12.00	10.00	90.00
13.00	10.00	90.00
13.30	85.00	15.00
15.00	85.00	15.00

[0096] 6.3数据处理:使用BioConfirm 10.0软件对质谱数据进行解卷积分析目标物,解卷积主要参数设置见下表。

参数	设置值
Deconvolution algorithm	Maximum Entropy
Mass range	3000-20000 Daltons
Mass step	1 Daltons
use limited m/z range	根据图谱 m/z 范围设定
Adduct	Proton loss
Isotope width	Automatic

[0098] 7. 实验结果

[0099] 对解卷积质谱图中5' cap mRNA和uncapped mRNA的峰面积进行分析。计算5' cap mRNA的百分比:结果= $[A_c / (A_u + A_c)] \times 100$ 。

[0100] 式中:

[0101] A_u =解卷积质谱图中uncapped mRNA的峰面积;

[0102] A_c =解卷积质谱图中5' cap mRNA的峰面积。

[0103] 结果如图2-8以及下表所示。

样本信息	M01L01P31 mRNA				
Name	TheoreticalMass	ObservedMass	Area	%Quant (Area)	
[0104] diphos	11237.3	11236.4466	93311	0.79%	uncapped
triphos	11316.3	11316.5643	364948	3.09%	
G-cap	11581.3	Not observed	0	0.00%	capped
cap0	11595.3	Not observed	0	0.00%	
cap1	11609.3	11609.7647	9480748	96.11%	
cap1+Na	11631.3	11631.4339	1854663		

[0105] 样品中的uncapped和capped成分均可被准确分析出来,并依据其含量在谱图中以相应的峰面积展示,最后结果分析中,提取各成分对应的峰面积进行样品中uncapped和capped成分的占比计算。

[0106] 比较例1

[0107] 本比较例为探针优化过程,其中,探针类型为ACTA,结果如图9所示,结果发现,探针类型ACTA获得多个位点的酶切序列,对所设计目标序列分析存在较大干扰,影响分析结果准确度。

[0108] 比较例2

[0109] 本比较例为探针优化过程,其中,探针类型为CATT,结果如图10所示,结果发现,探针CATT获得序列与探针本身分子量大小过于接近,当样品中存在更多uncapped成分或者capped成分时,峰图无法获得更好的分离,这不利于后续结果分析。

[0110] 比较例3

[0111] 本比较例示出了mRNA与探针结合过程的优化:

[0112] 1、探针与mRNA浓度比例的优化

[0113] 当探针与mRNA浓度比例为1:2时,分析仅得到探针峰;将探针与mRNA浓度调整为2:1时,得到了mRNA 5' 寡核苷酸目标物峰图,如图11所示。

[0114] 2、探针与mRNA结合孵育程序的优化

[0115] 探针与mRNA按比例混匀,与PCR仪中85℃保持2min,随后降温至25℃,得到较低响应的mRNA 5' 寡核苷酸目标物峰图;将孵育程序改为85℃,保持2min,降温至70℃后以0.1℃/s的降温速率降温至16℃,mRNA 5' 寡核苷酸目标物明显得到了更高的响应,如图12所示。

[0116] 在不背离本发明的范围或精神的情况下,可对本发明说明书的具体实施方式做多种改进和变化,这对本领域技术人员而言是显而易见的。由本发明的说明书得到的其他实施方式对技术人员而言是显而易见的。本申请说明书和实施例仅是示例性的。

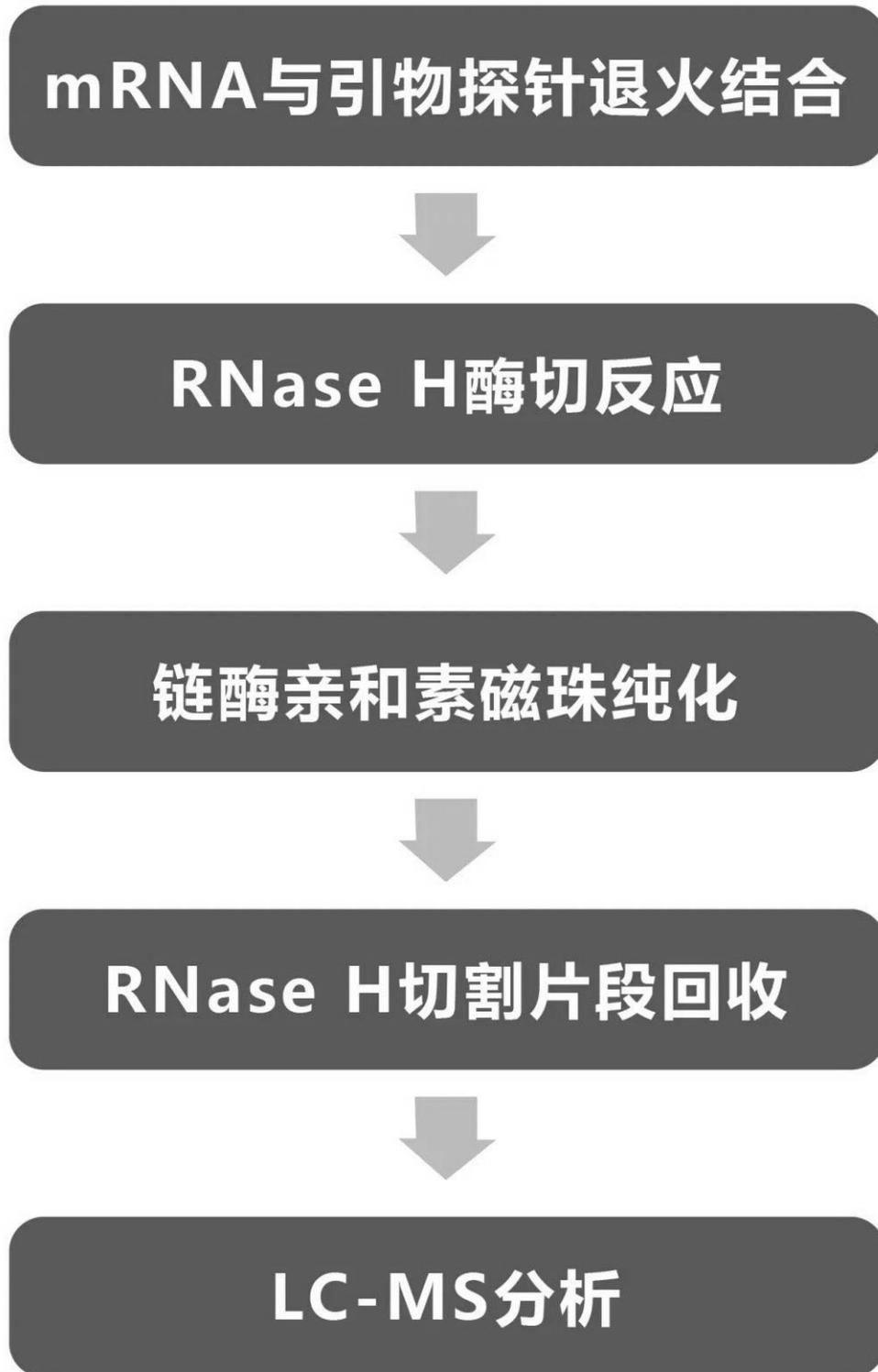


图 1

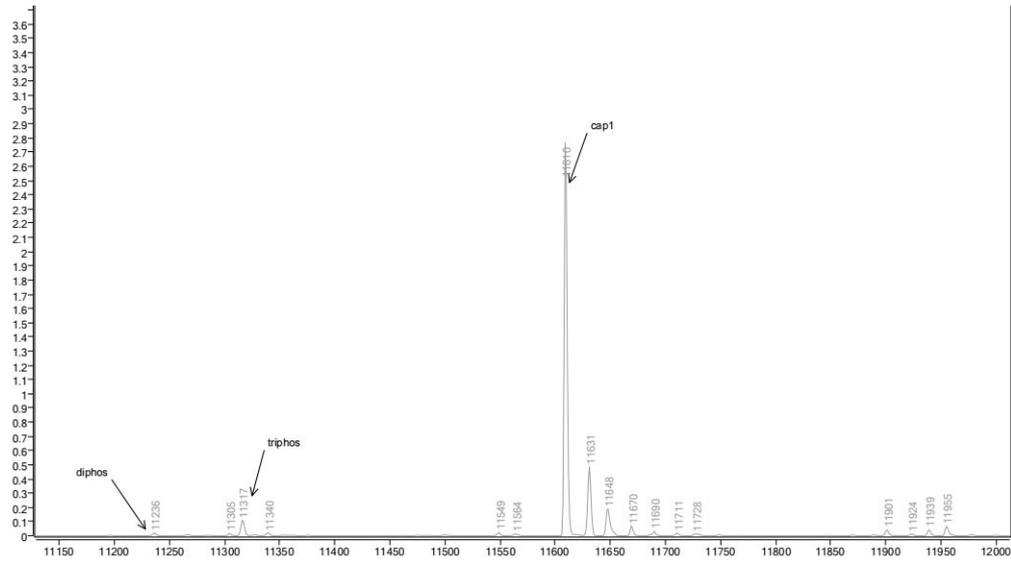


图 2

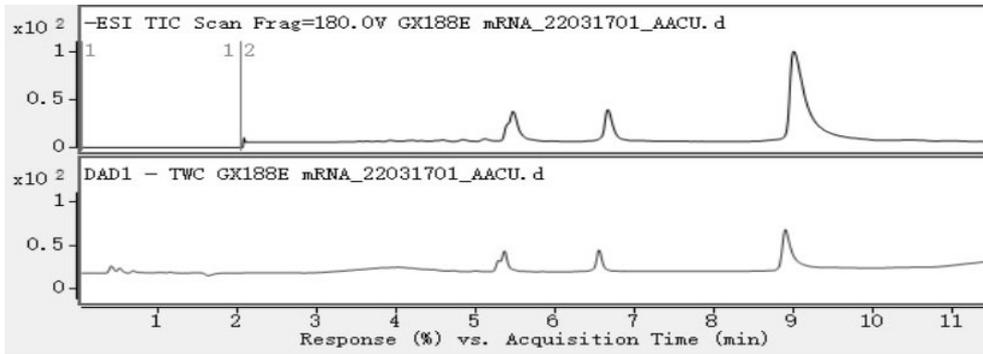


图 3

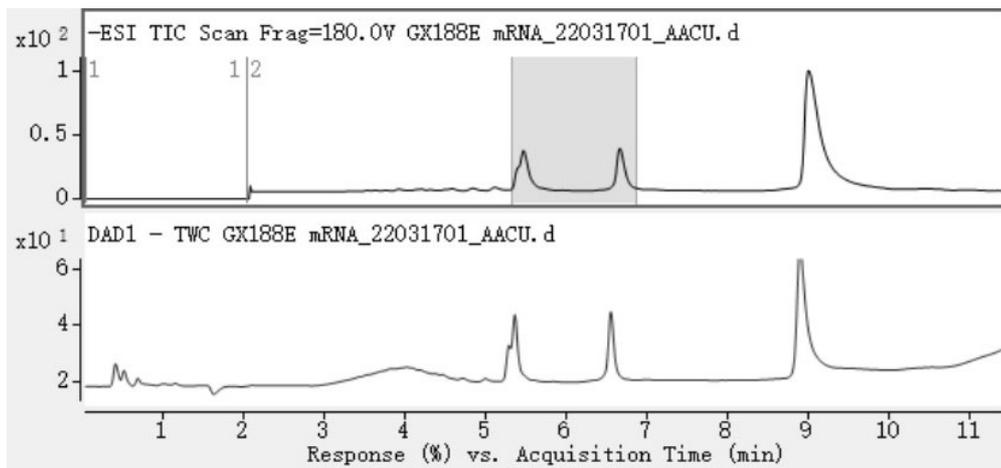


图 4

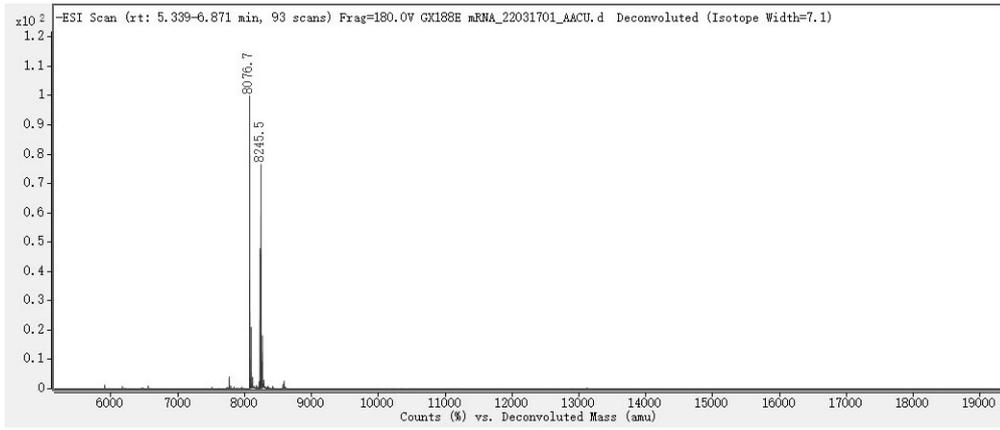


图 5

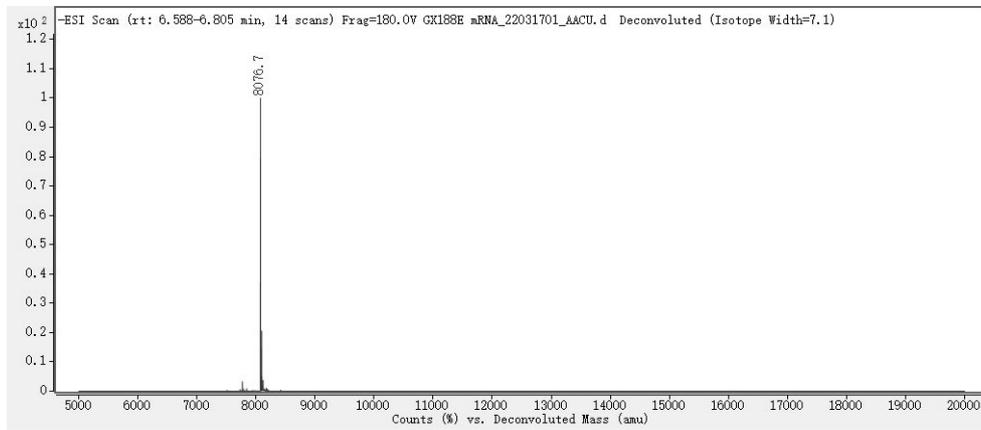


图 6

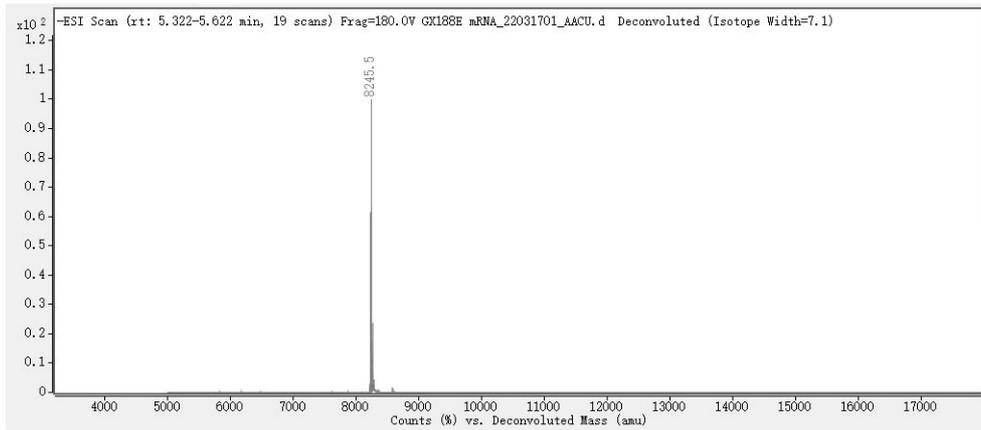


图 7

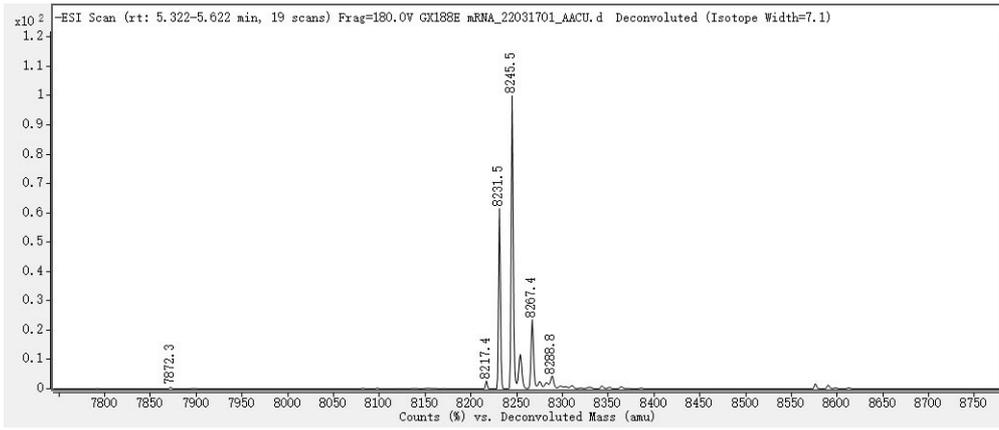


图 8

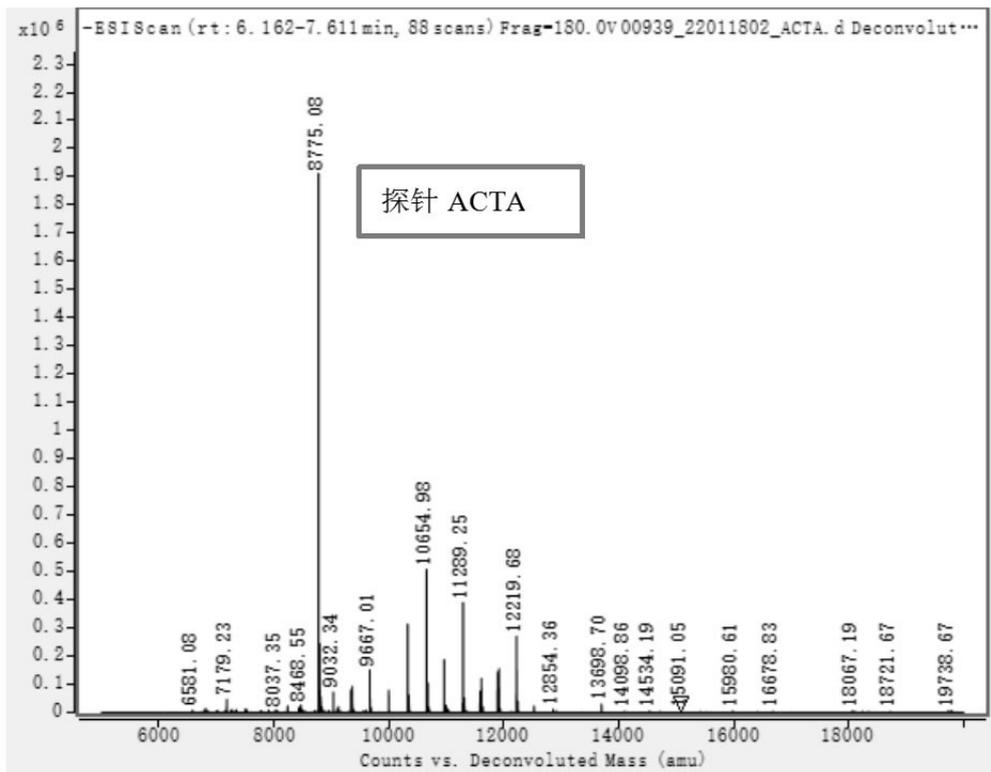


图 9

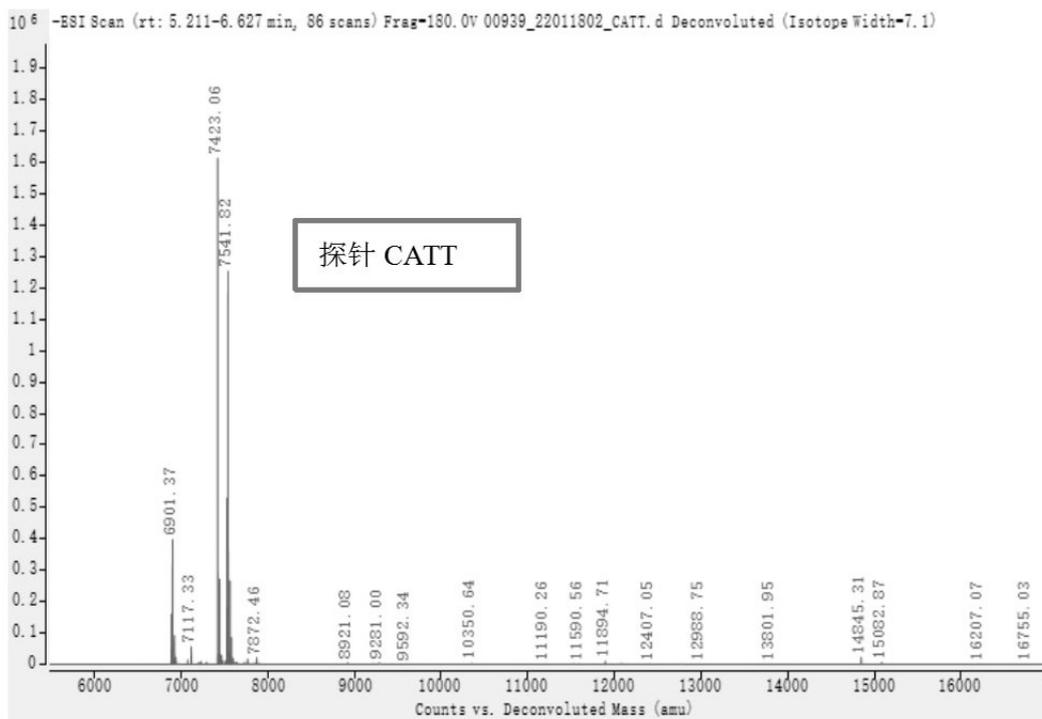


图 10

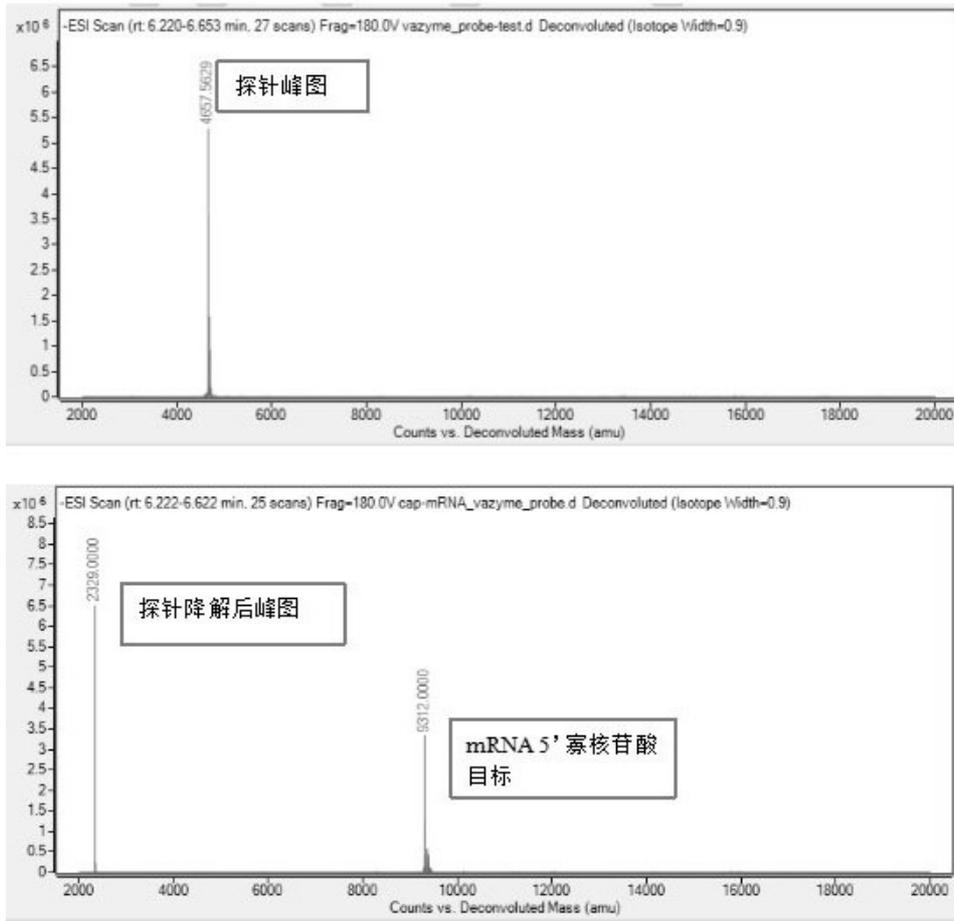


图 11

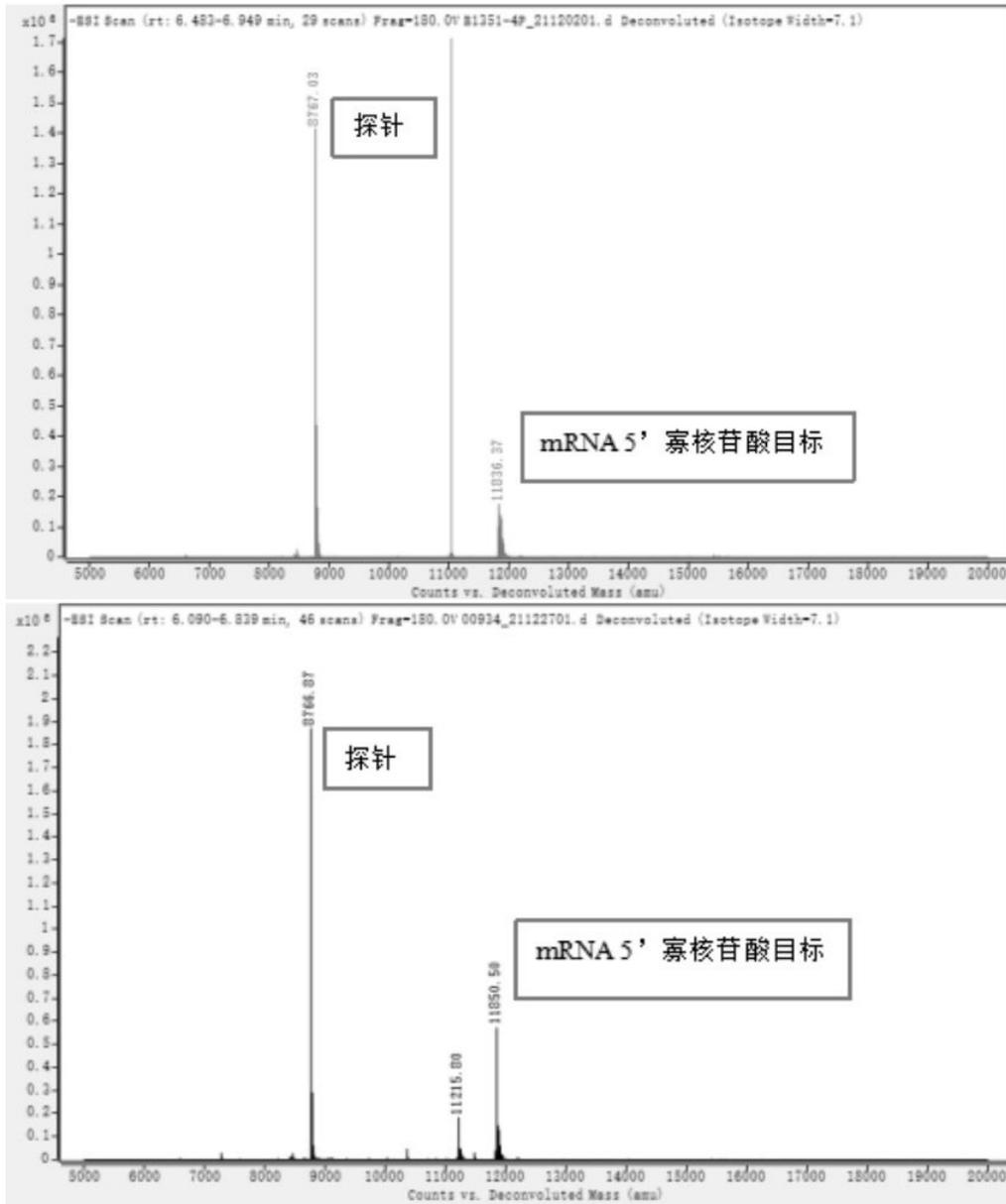


图 12