

高灵敏度CE-SDS-LIF方法用于T7 RNA聚合酶纯度分析

Highly sensitive CE-SDS-LIF purity analysis of T7 RNA polymerase

张晓霞, 唐红梅, 陈泓序, 罗继, 郭立海

Xiaoxia Zhang, Hongmei Tang, Hongxu Chen, Ji Luo, Lihai Guo

SCIEX, 中国;

SCIEX, China;

Keywords: CE-SDS-LIF, mRNA vaccine, T7 RNA polymerase, Purity

1、前言

mRNA疫苗的研发与生产需要一系列酶的参与: mRNA T7 RNA聚合酶、无机焦磷酸酶、RnaseInhibitor、加帽酶以及2' O-甲基转移酶、Poly(A)聚合酶和DNAase等7种酶。酶的纯度影响着体外转录的合成效率, 从而影响终产品mRNA疫苗的纯度与活性。因此, 需要一种分辨率高且检测灵敏度高的酶纯度检测方法, 用于酶的质量控制, 从而进一步获得高产量, 高纯度的mRNA。

然而, RNA合成过程使用的酶的浓度往往都比较低, 通常只有0.1-0.5 mg/ml左右, 且盐浓度较高, 利用传统的CE-SDS-UV蛋白纯度检测方法时灵敏度不足, 本文以T7 RNA聚合酶为例, 比较了UV和LIF两种检测器用于RNA酶纯度检测, UV检测器只能勉强检测到一个主峰, 无法检测到杂质峰, LIF检测器可获得更高的检测灵敏度, 能清晰地分离和检测到T7 RNA聚合酶中的杂质峰。同时, P503染料标记蛋白操作简单, 无需换液操作, 因此, 非常适合用于酶纯度的检测。

2、试剂及方法

2.1 试剂及样品

试剂:

pH 9.0样品缓冲液 (SCIEX IgG purity kit, A10663); 巯基乙醇 (Sigma, PN 97622); 碘乙酰胺 (Sigma, PN 11149); 0.1 mol/L 氢氧化钠 (SCIEX)、0.1 mol/L 盐酸 (SCIEX); Gel buffer凝胶缓冲

液 (SCIEX, PN A30341); P503染料 (Sigma, 30693); 去离子水 (Millipore)。

样品: mRNA T7 RNA聚合酶, 由某疫苗企业提供, 浓度50U/μL。

2.2 样品前处理

CE-SDS-UV条件下样品制备: 取蛋白样品10 μL, 加入85 μL的样品缓冲溶液, 再加入2-巯基乙醇5 μL, 涡旋混匀; 70℃孵育10 min; 冷却至室温后6000 rpm离心1 min。取90 μL转移至PCR样品管中。

CE-SDS-LIF条件下样品制备: 取蛋白样品10 μL, 加入10 μL的样品缓冲溶液, 再加入2-巯基乙醇2 μL, 加入1 μL的P503染料, 涡旋混匀, 70℃孵育10 min; 冷却至室温, 加入77 μL的去离子水, 涡旋混匀后取90 μL转移至PCR样品管中。

2.3 仪器及方法设置

采用SCIEX PA 800 Plus药物分析系统, 匹配UV和LIF检测器, UV检测器(214 nm), 窗口狭缝: 2; LIF检测器 (激发波长488 nm, 发射波长600 nm); 采集频率: 4 Hz; 毛细管: 熔融石英毛细管, 50 μm内径, 20/30.2 cm (有效/总长度); 毛细管温度: 25℃; 样品室温度: 25℃; 进样条件: 电压进样, -10 kV, 40 s; 分离条件: -15 kV, 40 min。

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、实验及结果

3.1 CE-SDS-UV与CE-SDS-LIF比较

比较了两种检测方法（CE-SDS-UV和CE-SDS-LIF）对T7 RNA聚合酶纯度检测结果，如图1。在相同的进样条件下，CE-SDS-UV方法仅能检测到一个主峰，计算纯度100%，无法对其纯度进行评估，而CE-SDS-LIF方法能清晰地检测到不同的杂质峰，计算酶纯度结果为97.53%。考虑到在mRNA疫苗合成过程中使用的几种酶浓度均比较低且盐浓度较高，UV检测器灵敏度无法满足杂质检测。因此，推荐使用CE-SDS-LIF方法进行酶纯度分析。

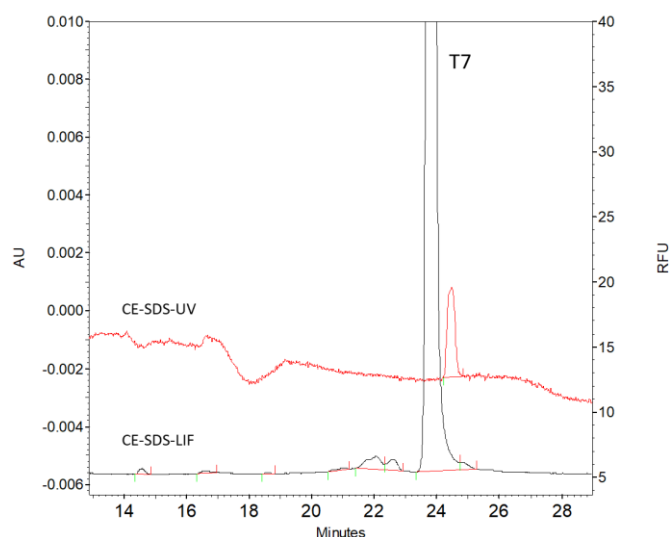


图1. T7 RNA聚合酶纯度电泳图。红色电泳图是CE-SDS-UV结果，响应值对应左侧Y轴；黑色电泳图是CE-SDS-LIF结果，响应对应右侧Y轴。

3.2 CE-SDS-LIF方法的重复性

对T7 RNA聚合酶连续3针重复进样，CE-SDS-LIF结果如下图2示；主峰的迁移时间重复性RSD值为0.07%，校正峰面积百分比的RSD值为0.62%；

结果表明，该方法的重复性好，适用于mRNA疫苗合成过程中原料酶的纯度分析。

3.3 CE-SDS-LIF方法的线性范围及检测灵敏度

将T7 RNA聚合酶样品3倍逐级稀释后再按照CE-SDS-LIF的样品处理条件处理样品，线性及灵敏度结果如图3，从图3可看出T7 RNA聚合酶的主峰校准峰面积与浓度具有良好的线性关系（ $R^2 > 0.999$ ），线性范围宽，覆盖3个数量级（0.023-50U/μL），检出限LOD为0.023U/μL，S/N为8.0。结果表明，该方法线性范围广，检测灵敏度高，可用于多种酶的纯度检测。

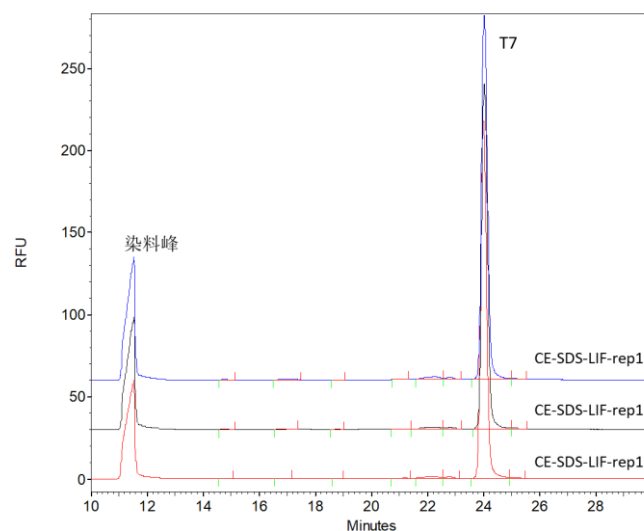


图2. mRNA T7 RNA聚合酶重复性结果（n=3）

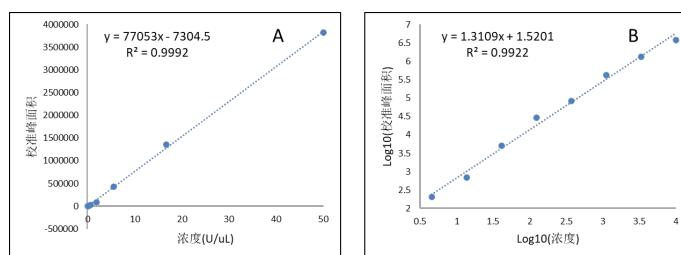


图3. T7 RNA聚合酶的线性图谱。图A为浓度和校准峰面积的线性关系，图B是对横纵坐标取对数log10的结果

4、结论

在mRNA疫苗合成过程中需要添加多种酶，但是这些酶的浓度较低且盐浓度较高，本文采用CE-SDS-LIF方式搭配P503染料，对T7 RNA聚合酶的纯度进行检测，同时考察了该方法的重复性，线性和检测灵敏度。

该方法重复性好，迁移时间重复性RSD值和校准峰面积重复性RSD值分别为0.07%和0.62%；线性范围广(0.023-50 U/ μ L)，跨3个数量级；检测灵敏度高，LOD为0.023 U/ μ L。P503染料标记简单，只需两步即可完成样品前处理，无需脱盐和换液等多种操作。可作为平台方法用于多种RNA酶的纯度检测。

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。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15437-ZH-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](#)