



# YAOHAIBIO 耀海生物

# CircRNA

C R O 服 务 平 台



江苏耀海生物制药有限公司

# CONTENTS

01	关于耀海	01-02
----	------	-------

02	CircRNA创新疗法CRO服务概述	03-08
----	--------------------	-------

03	CircRNA序列设计与优化服务	09-12
----	------------------	-------

04	CircRNA转录模版质粒服务	13-15
----	-----------------	-------

05	CircRNA体外转录与体外环化服务	16-18
----	--------------------	-------

06	CircRNA纯化服务	19-21
----	-------------	-------

A grayscale background image showing various pieces of laboratory equipment, including a multi-well plate with circular wells, a test tube rack, and some blurred glassware in the background.  
**07** CircRNA冻干服务 **22-24**

**08** CircRNA-LNP 服务 **25-28**

**09** CircRNA 质量分析与控制服务 **29-30**

**10** CircRNA 体外表达验证服务 **31-32**

**11** CircRNA 平台设备 **33-34**



# ABOUT YAOHAI BIO-PHARMA

## 关于耀海

江苏耀海生物制药有限公司成立于2010年8月,立足于江苏泰州中国医药城园区。2012年获得《药品生产许可证》,国家高新技术企业。是一家专注微生物表达体系CRDMO服务提供商,业务聚焦在“重组蛋白/多肽、纳米抗体、重组新型疫苗、重组质粒及RNA药物”等领域,致力于打造CRO/CDMO/MAH开放式、一体化的产研服务平台。业务涵盖工程菌构建、菌种库建立、小试工艺开发优化、中试工艺放大生产、临床样品制备、质量标准建立、分析方法开发验证、合规化生产(GMP)、注册申报等CMC一站式服务。

公司秉承“用心服务、共创未来”的服务理念  
以“打造全球标准,助推新药进程,成就健康生活”为使命,  
持续赋能全球新药创制。



# 端到端的微生物表达体系

## CRDMO / MAH

一站式服务平台



## CircRNA 应用领域

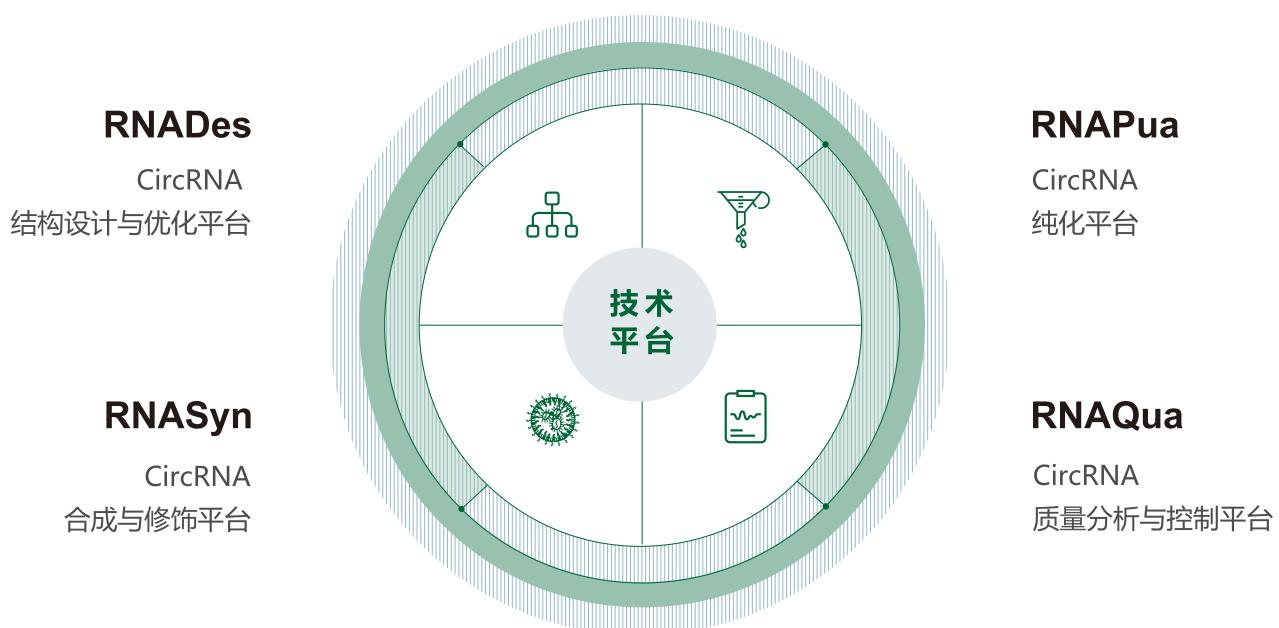
mRNA新冠疫苗的成功开发,使位于中心法则的信息传递者RNA跃居药物研究的前沿。与线性mRNA相比,环状RNA(CircRNA)结构更稳定,是当前核酸药物研究中的一大热点。



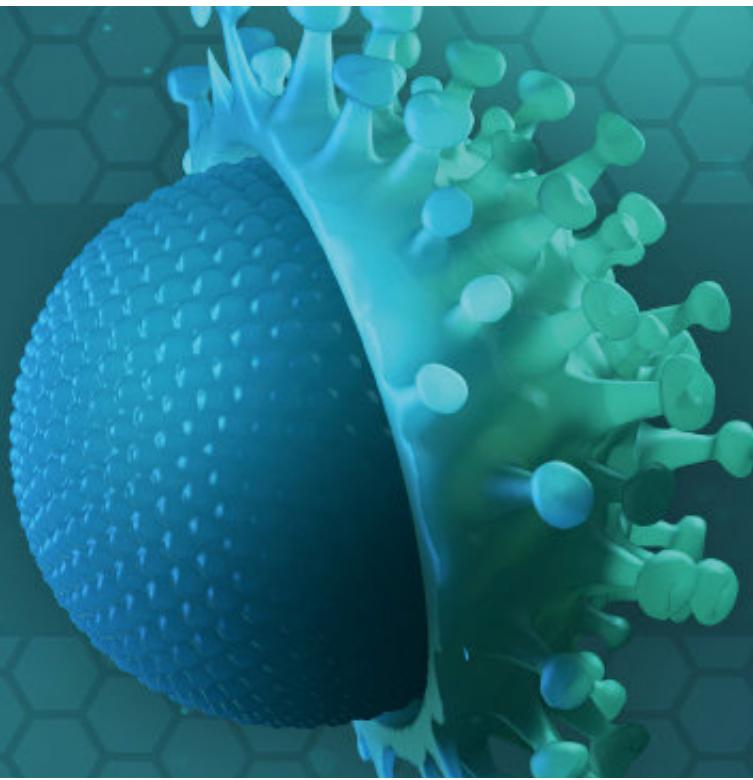
# CircRNA

## 创新疗法CRO服务平台

### 技术平台



mRNA新冠疫苗的成功开发，使位于中心法则的信息传递者RNA跃居药物研究的前沿。与线性mRNA相比，环状RNA(CircRNA)结构更稳定，是当前核酸药物研究中的一大热点。



## 平台特色

### 结构设计与优化平台

前沿“PIE”成环技术，高效内含子、外显子组合  
CDS、IRES优化设计

### CircRNA 合成与修饰平台

CircRNA模板质粒设计及构建  
成环率>80%的CircRNA 合成方案

### CircRNA 纯化平台

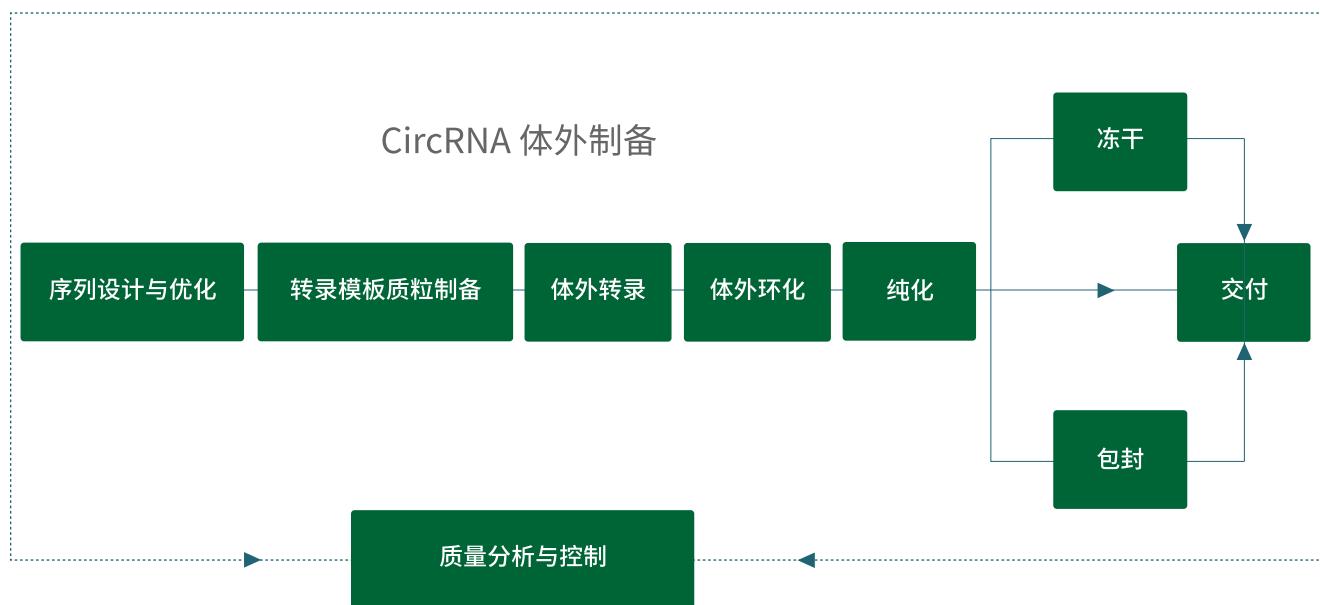
常规实验级纯化方案  
自研层析柱纯化工艺

### CircRNA 质量分析与控制平台

多种纯度检测方案  
高效成环率检测方案



## 工艺开发流程



## 服务详情

服务项目	可选项目	服务详情	交付周期(天)	交付内容	
<b>CircRNA 序列设计与优化</b>	编码序列的设计与优化	CDS 密码子优化	1-3	序列文件	
	非编码序列的设计与优化	IRES, intron 的设计与优化			
<b>CircRNA 转录模板质粒服务</b>	质粒 DNA 制备	基因合成	7-10	序列文件	
		质粒扩增和提取	4		
		质粒线性化和纯化			
<b>CircRNA 体外转录与环化</b>	体外转录	体外转录 (IVT)	2-3	N/A	
	体外环化	基于 PIE 系统的 RNA 环化			
		circRNA 富集			
<b>CircRNA 纯化</b>	常规纯化方案	氯化锂沉淀	1	circRNA 原液	
		磁珠纯化			
	自研纯化方案	自研纯化方案	1-2		
	溶液置换	超滤换液	1		
<b>CircRNA 冻干</b>	冷冻干燥	预冻	2-3	circRNA 冻干粉	
		一次升华			
		二次升华			
<b>CircRNA 包封</b>	LNP 包封	LNP 包封	2-3	circRNA-LNP 制剂	
		浓缩换液与过滤			
<b>CircRNA 质量分析</b>	circRNA 原液 / 冻干粉	浓度、纯度	1	CoA 文件	
		环化率	2-3		
	circRNA-LNP 制剂	包封率	1		
		粒径及分布检测			
		表面电荷检测			
		细胞铺板			
<b>CircRNA 表达验证</b>	293T 细胞评价	细胞瞬时转染	4	CoA 文件	
		荧光信号观察	1-3		
		Western blot/ELISA			

## 预制品目录

产品名称	实验用途	交付样式	产品规格
circRNA_eGFP			
circRNA_mCherry	• 对照品	• 冻干粉	• 100 µg
circRNA_Luciferase			• 1 mg
circRNA_OVA	• 体外或体内实验	• 原液(500ng/µl)	• 10 mg
circRNA_IL-2			
circRNA_Cas9			

## 服务优势

### 工艺强

可实现长度为 50-4000 nt  
RNA 的环化；

### 稳定性

严谨的质控方法，预制产品均  
可在体外细胞中成功表达；



### 全方位

从前端序列设计至后端  
circRNA 环化、纯化、质量控  
制与表达验证；

### 高效性

经验证，环化率达 80% 以上；

### 灵活性

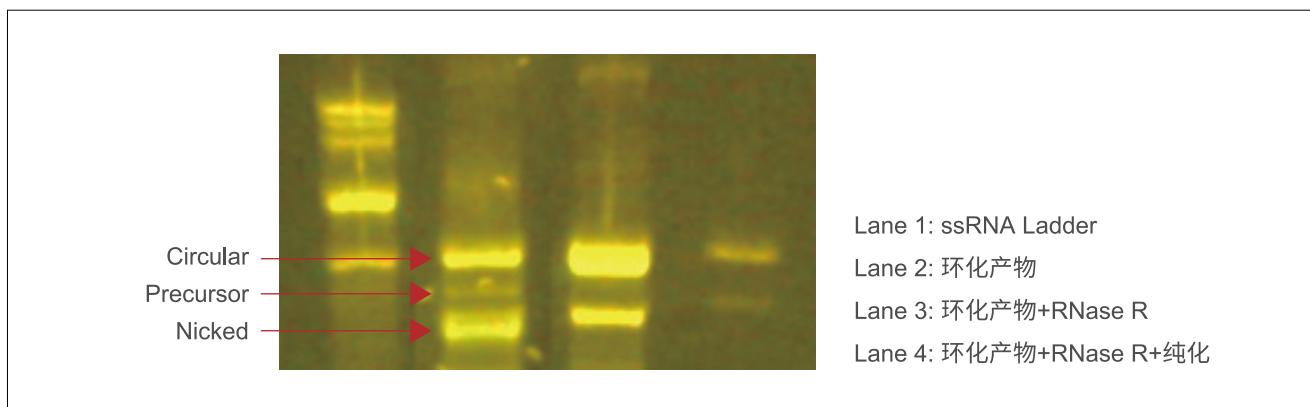
多元化纯化方式，满足不同  
的下游实验需求；

## 案例展示

### CircRNA的富集与纯化

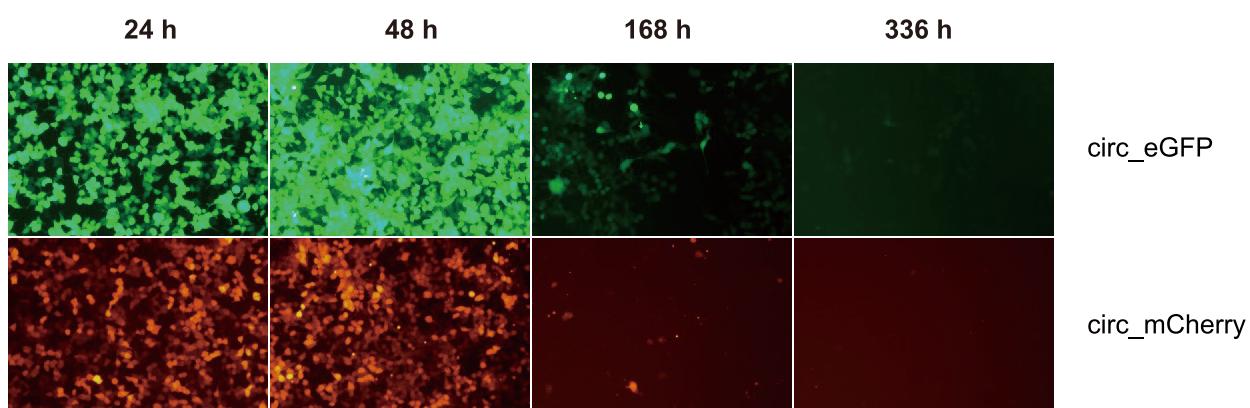
为富集CircRNA，使用RNaseR处理PIE环化产物，电泳结果显示，线性RNA前体被消化；  
经进一步纯化后\*，可去除多数的nicked circRNA。

\*纯化方案为耀海生物circRNA平台自研。



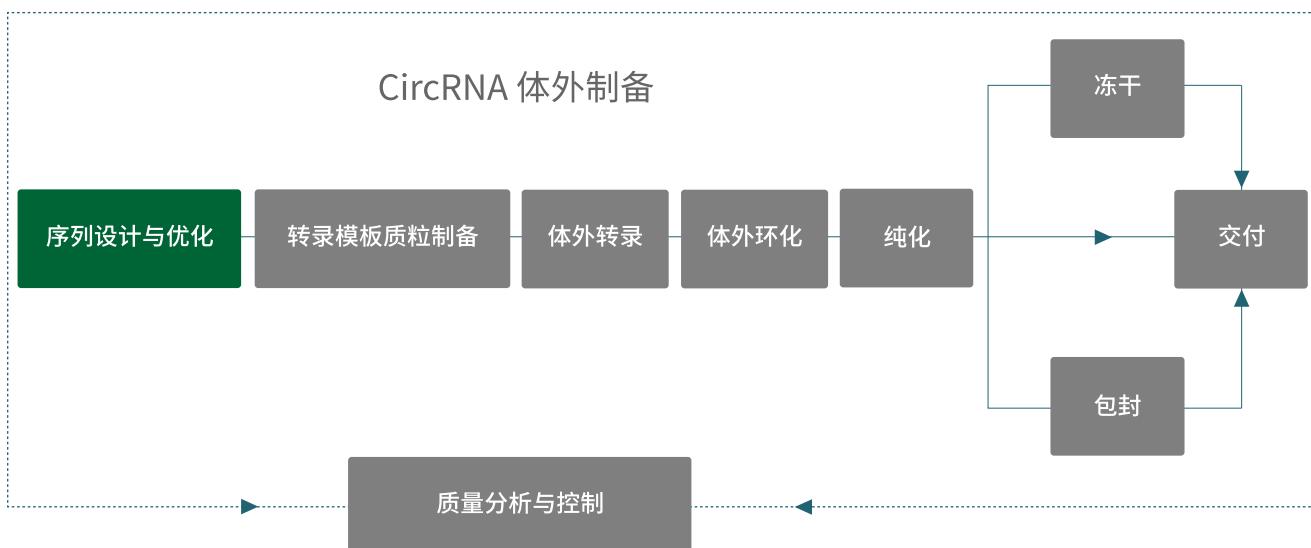
### CircRNA的表达验证

将纯化后的CircRNA\_eGFP与circRNA\_mCherry转染至293T细胞，24h后观察到荧光信号，48 h后荧光信号持续增强；转染7天后、14天后仍可观察到荧光信号。



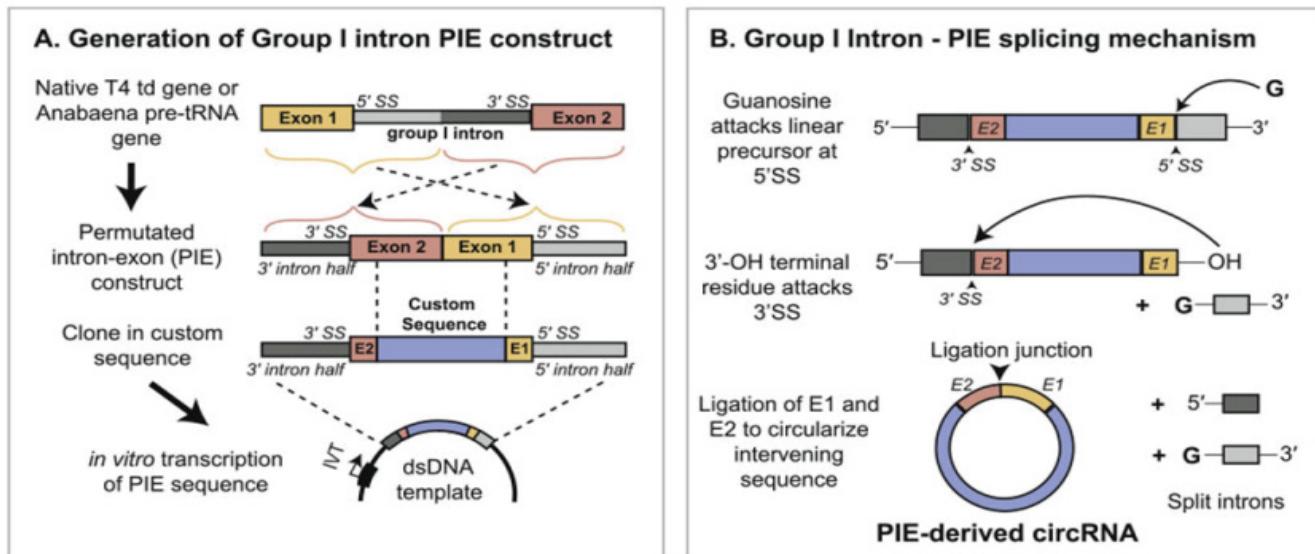
# CircRNA

## 序列设计与优化服务



耀海生物基于PIE系统（排列外显子和内含子）制备CircRNA，依赖I型含子的自剪接功能实现RNA的环化。利用T4 td基因或鱼腥藻tRNA前体基因设计PIE结构，排列方式为：将RNA内含子与辅助外显子片段分为前后两部分（5' 端和3' 端），其中5' 端序列转移到目标序列的尾部，3' 段序列插入目标序列的前端，中间插入目标基因序列。

在GTP催化下，PIE结构会导致除内含子外序列的环化，结合合理的环化率提升策略，耀海生物可实现长达4 kb序列的环化，环化率达80%以上。



CircRNA各组成元件的功能与设计策略参考如下：

CircRNA 元件	生物学功能	设计策略
两端内含子与外显子序列	在 GTP 催化下内含子自剪接，实现内含子以外序列的环化。	根据 T4 td 基因或鱼腥藻 tRNA 前体基因设计。
编码类	IRES	内部核糖体识别位点，调控circRNA 的翻译。
	CDS	蛋白编码区，抗原、抗体或其他功能性蛋白的编码序列。
非编码类	非编码序列	靶向 miRNA 或蛋白，发挥基因或蛋白调控作用。

[1] Chen X, Lu Y. Front Bioeng Biotechnol. 2021 Nov 30;9:787881..

## 服务详情

服务项目	可选项目	详细步骤	交付周期(天)
CircRNA 序列设计与优化	编码序列的设计与优化	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CDS 序列比对</li> <li>• CDS 密码子优化</li> </ul>	1
	非编码序列的设计与优化	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 内含子与外显子序列设计与优化</li> <li>• 同源臂序列设计与优化</li> <li>• 间隔序列设计与优化</li> </ul>	1-2

## 服务优势



### 01. 优化的 PIE 环化系统

结合合理优化策略，实现环化率达80%以上；

### 02. 前沿的 CDS 优化团队

与专业AI算法团队合作，完成CDS区密码子的优化；

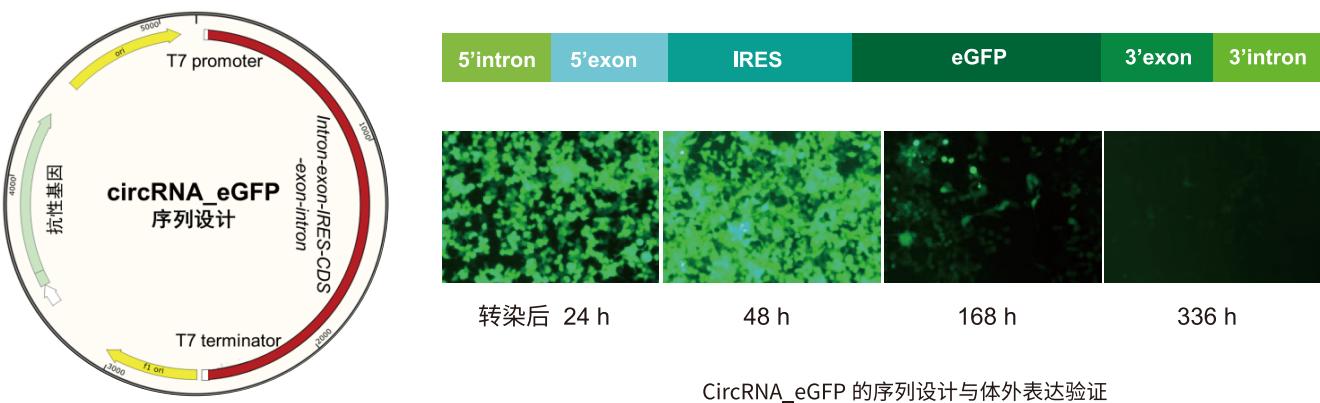
### 03. 成熟完善的工艺流程

可实现circRNA的高成环率、高稳定性和高翻译效率。



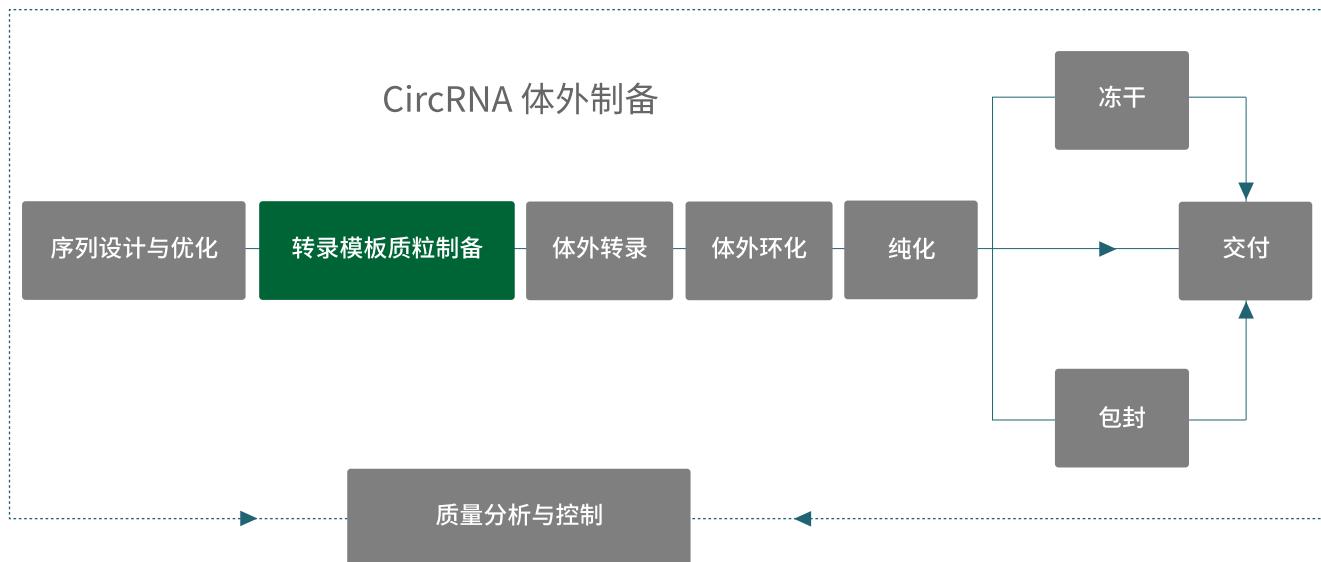
## 案例展示

耀海生物推出对照品CircRNA\_eGFP，基于PIE系统实现了RNA的环化。使用一种常规的转染试剂，将CircRNA\_eGFP转染293T细胞，24h后可检测到eGFP(绿色)荧光信号，48h后信号增强，转染7天后、14天后仍可检测到荧光信号。



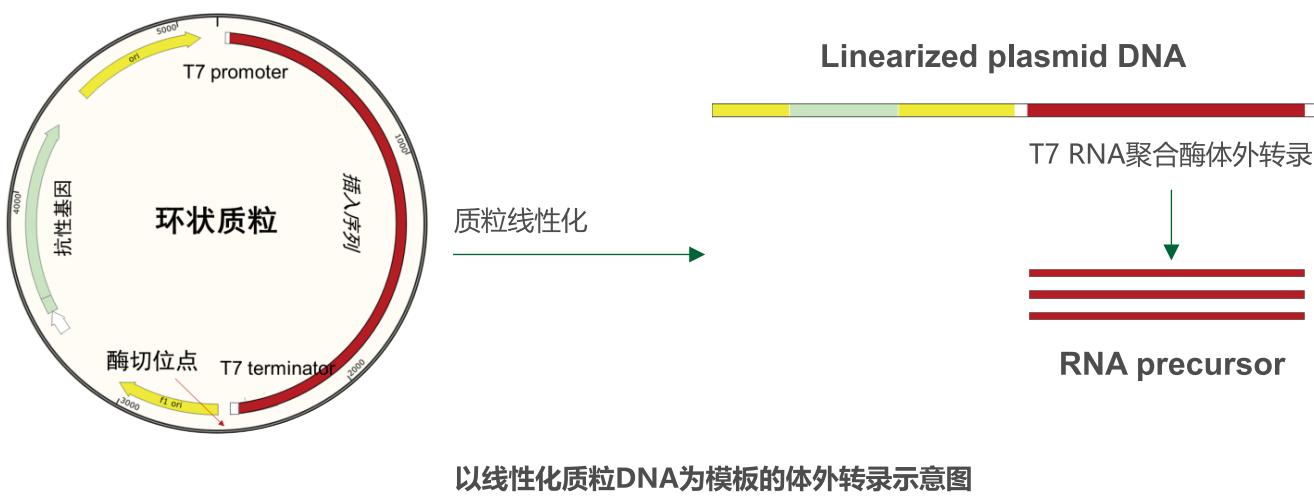
# CircRNA

## 转录模板质粒服务



CircRNA的制备需要线性RNA为前体物质(RNA precursor)进行环化，其中RNA precursor的制备通常以线性化的质粒DNA为转录模板，借助T7 RNA聚合酶进行体外转录。

高质量的质粒DNA对于下游的体外转录(IVT)至关重要。基于成熟的质粒制备服务平台，耀海生物可提供高纯度、高标准的线性化质粒DNA制备服务，以保证下游IVT产物的完整性。



## 服务详情

服务项目	可选服务	服务详情	交付周期 (天)
<b>环状质粒制备</b>	基因合成	基因合成 (委外)	7-10
	质粒扩增	质粒扩增 质粒提取	2
<b>线性化质粒制备</b>	质粒线性化与纯化	质粒线性化	1
		线性化产物纯化	
<b>质粒 DNA 质量控制</b>	浓度纯度	紫外分光光度法 (UV)	1-2
	质粒构象	琼脂糖凝胶电泳 (AGE)	
		毛细管电泳 (CE)- 可选	
	质粒完整性	限制酶酶切鉴定 (AGE)	

## 服务优势

### FreeCut 模板质粒

灵活选择线性化方式

### 高回收率

持续优化DNA提取及纯化方法，实现高回收率。

### 严格质量控制

严格的过程控制标准，科研用质粒样品超螺旋构象大于80%。

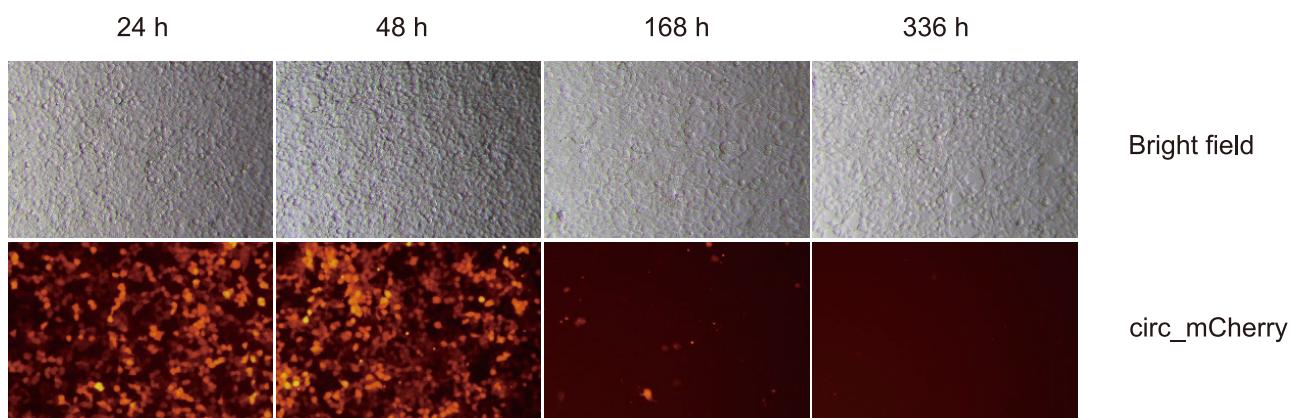
### 平台工艺成熟

高标准、高效率的质粒制备和质量控制服务，满足下游实验需求。

## 案例展示

以耀海生物预制品CircRNA\_mCherry为例，转录模板质粒样品（科研级）超螺旋比例超过70%，线性化比例接近100%。

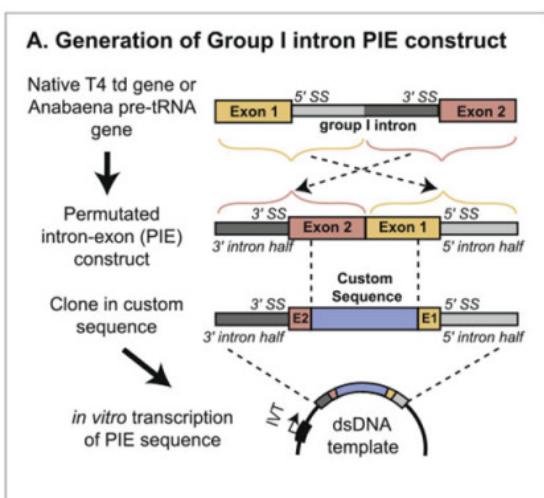
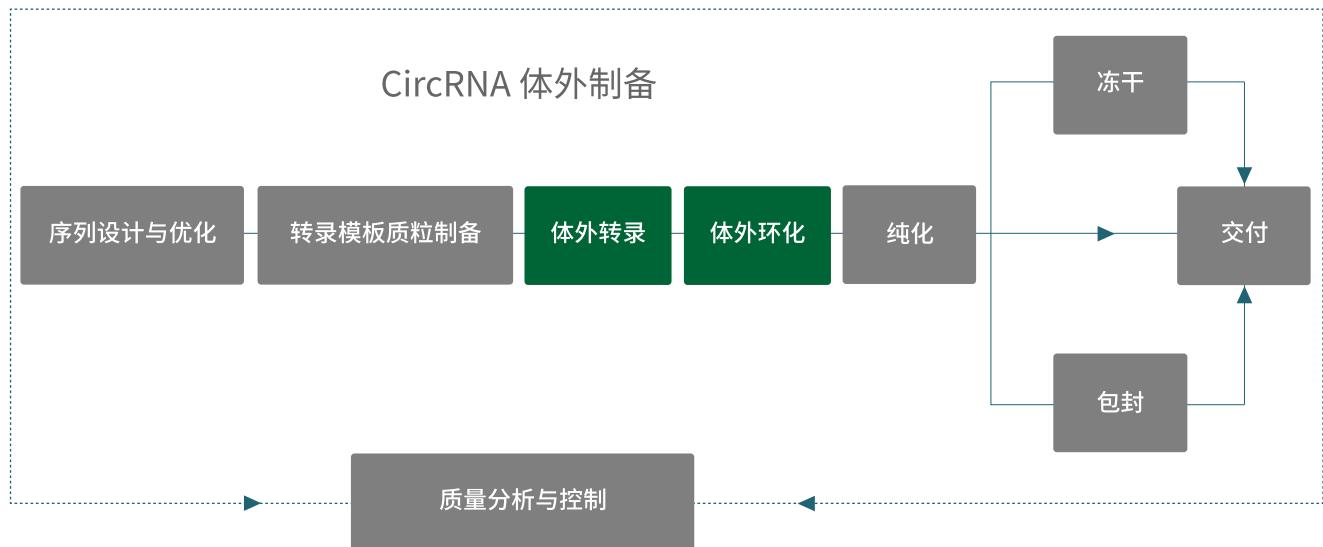
以线性化质粒为模板制备得到CircRNA\_mCherry，将其转染293T细胞，转染24小时后检测到高水平的荧光表达(红色荧光)，48小时后信号持续增强，转染7天、14天后仍可检测到荧光信号，mCherry蛋白稳定且高效表达，转录模板纯度可满足高质量CircRNA的制备需求。



CircRNA-mCherry 体外表达验证

# CircRNA

## 体外转录与体外环化服务



图示: PIE序列示意图

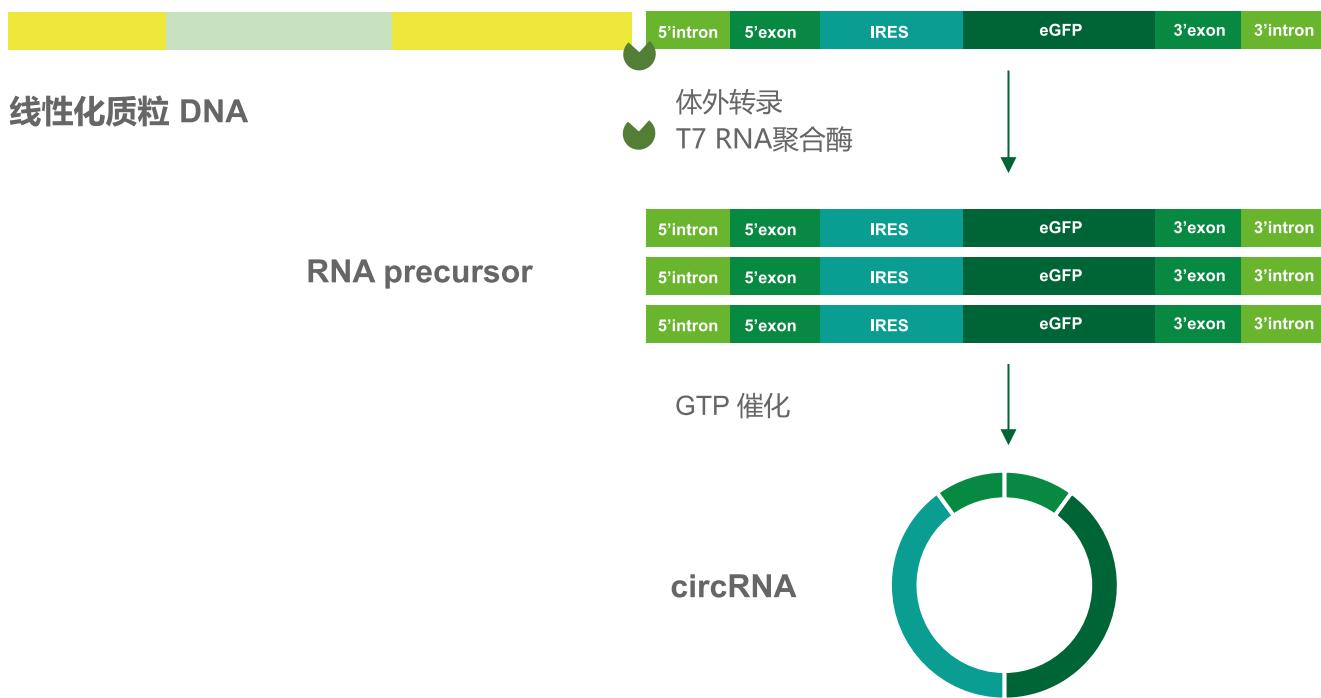
关于RNA precursor的批量制备，常用的方法是体外转录 (IVT, *In Vitro* Transcription)。IVT反应以含T7启动子的线性化质粒DNA为模板，在T7 RNA聚合酶作用下，以三磷酸核苷(NTPs)为底物合成RNA precursor。

体外环化方法包括化学连接法、酶法连接和PIE核酶法。化学连接和酶法连接适用于较短RNA的环化，片段大于100nt时，环化率会大幅降低，而基于PIE系统的核酶法，可实现5kb序列的环化。

在GTP催化下，PIE结构会发生内含子外序列的环化，结合合理的环化率提升策略，耀海生物可实现长达3 kb序列的环化，环化率达80%以上。

## RNA的体外环化反应流程如下：

经体外转录合成RNA precursor，在GTP催化下，PIE元件完成自剪接，形成CircRNA。



## 服务详情

服务项目	详细步骤	交付周期(天)
CircRNA 体外转录与 体外环化	反应体系确认	
	体外转录与环化反应	1-2
	RNase R富集	
条件优化	反应体系设计与优化	2-5

## 服务优势

可实现长达4 kb RNA环化。

**严谨的实验设计与优化**

通过合理的序列优化策略，可实现80%以上的环化率。

**高环化效率**

通过对实验环境与耗材严格控酶，有效防止RNA的降解。

**严格控酶标准**

## 案例展示

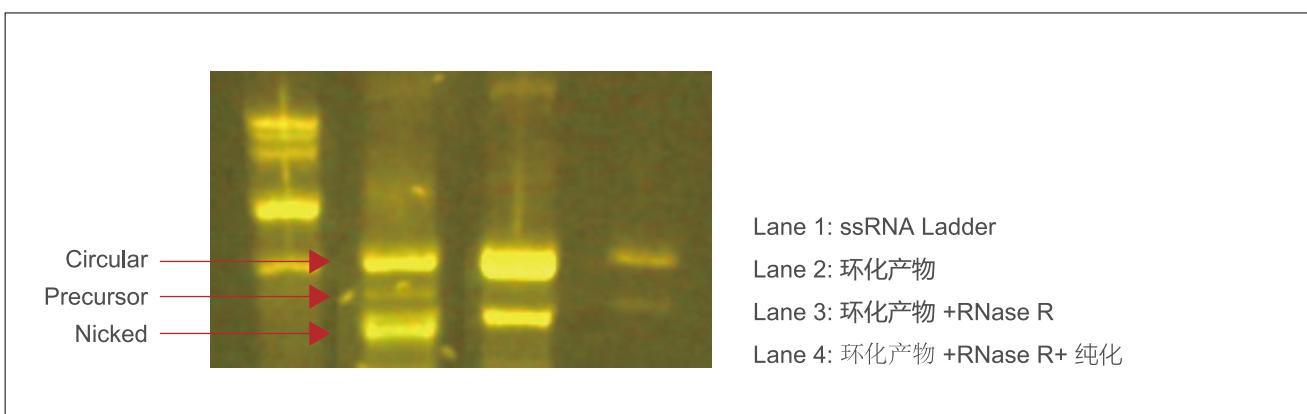
### CircRNA的体外环化与富集

耀海生物基于PIE系统，对CircRNA进行了序列优化，琼脂糖凝胶电泳检测环化率在80%以上。

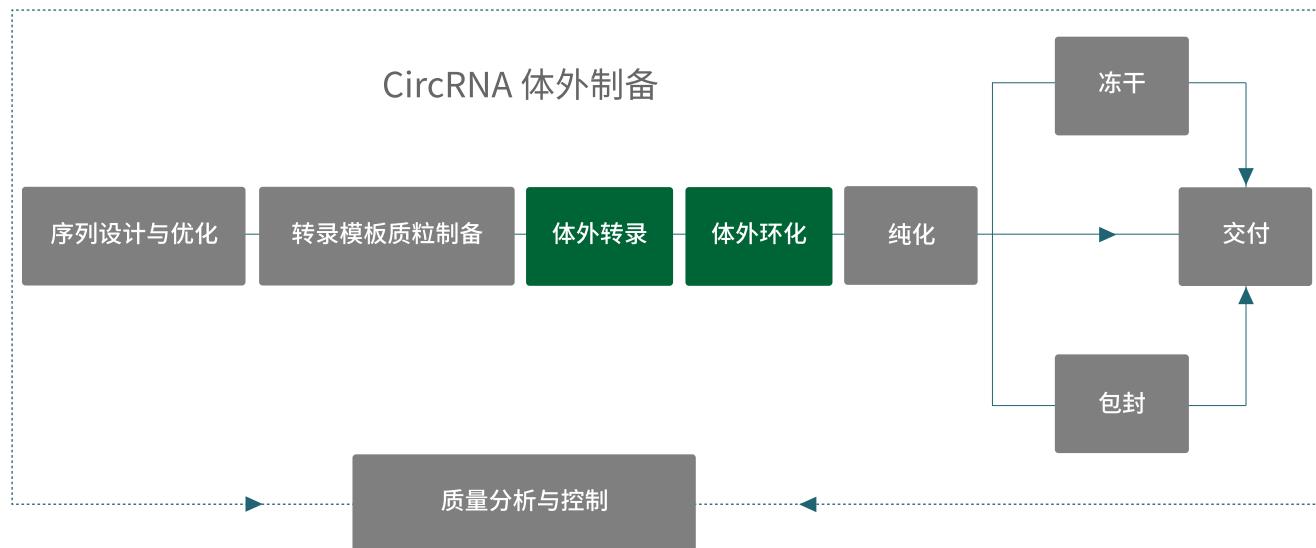
使用RNase R富集circRNA，E-gel电泳结果显示，线性RNA前体被消化；

经进一步精纯后\*，可去除多数的nicked circRNA。

\*纯化方案为耀海生物circRNA平台自研。



# CircRNA 纯化服务



经体外环化、RNase R富集得到的产物，需进一步去除IVT、环化反应中未消耗的底物、反应副产物及nicked RNA，以满足下游实验需求。

耀海生物拥有成熟的LiCl沉淀、磁珠纯化、自研纯化等多样化纯化解决方案，可有效去除多种杂质，制备高纯度的CircRNA。



## LiCl 沉淀法

小量CircRNA简易纯化方案，可用于细胞转染、部分动物实验。



## 磁珠纯化法

小量CircRNA纯化方案，可用于细胞转染、部分动物实验。



## 耀海自研纯化方案

满足质量要求更高的下游应用场景；  
纯化工艺稳定、可放大，满足下游GMP生产需求 ☆☆☆☆☆

## 服务详情

服务项目	可选项目	详细步骤	交付周期(天)	交付	
circRNA 纯化	常规纯化方案	氯化锂沉淀	1	circRNA 原液	
		磁珠纯化			
	高纯度纯化方案	耀海自研纯化方案	1-2		
		超滤换液			
circRNA 质量控制	浓度检测	紫外分光光度法 (UV)	0.5	CoA 文件	
	纯度检测	琼脂糖凝胶电泳 (AGE/E-gel)			
		HPLC- 可选	1		

专利来源:左涛, 等. 一种基于RP-HPLC分析体外转录产物成分circRNA的方法与流程. 202310115359.2[P]. 2023-06-06.

## 服务优势

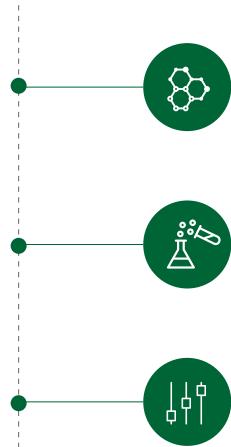
多种可选的纯化方案，满足不同的下游应用场景；

### 高纯度

CircRNA纯度达90%以上；

### 严格控酶标准

对实验环境与耗材严格控酶，有效防止circRNA的降解。

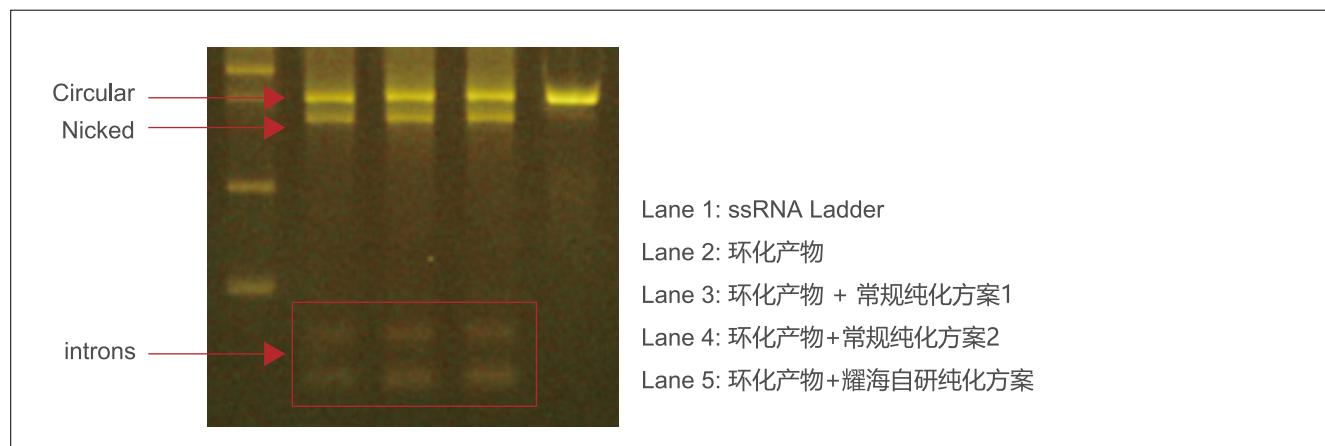


## 案例展示

耀海生物建立了成熟的CircRNA纯化解决方案，可有效去除各种工艺相关杂质。

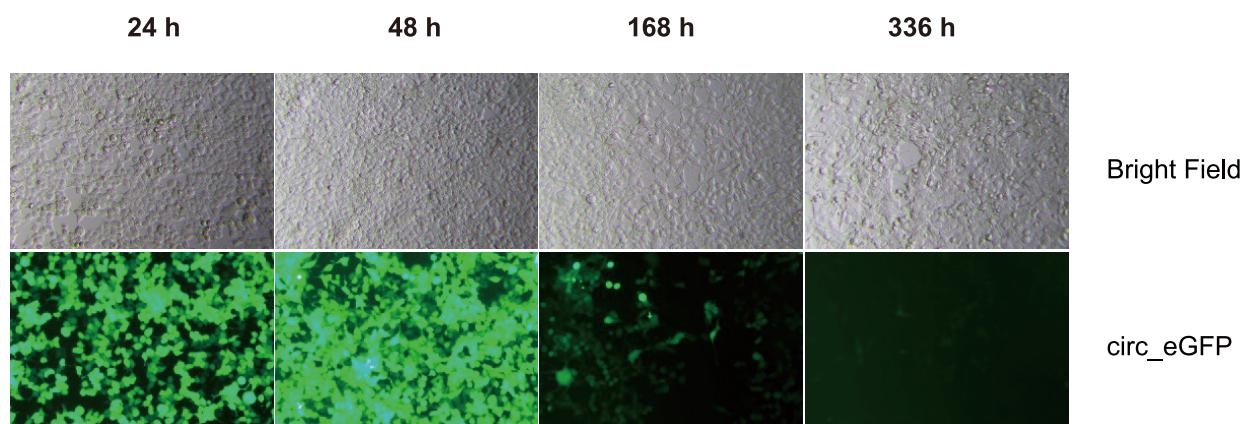
经常规方案纯化得到的环状RNA产物中，仍明显混有nicked RNA、 introns；

经耀海生物自研纯化方案后，可成功去除各种线性RNA杂质，如nicked RNA、 introns。



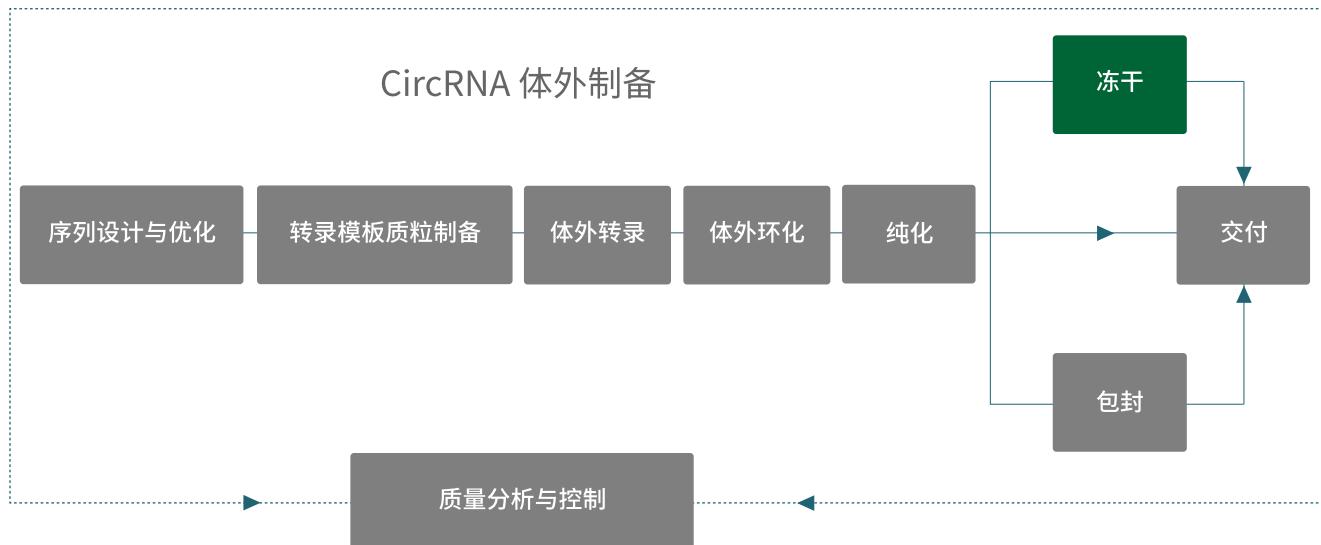
## CircRNA的表达验证

使用一款常规的脂质体，将纯化后的CircRNA\_eGFP转染至293T细胞，24 h后观察到荧光信号，48 h时荧光信号持续增强；转染7天、14天后仍可检测到荧光信号。



# CircRNA

## 冻干服务



为提高CircRNA的稳定性，避免存储及运输中的损耗，耀海生物可提供CircRNA冻干服务，  
将CircRNA原液进行冷冻干燥，以冻干粉形式保存或运输，  
大幅降低减少存储和运输过程中CircRNA的降解和损耗。

样品分装

»

预冻

»

一次升华

»

二次升华

## 服务详情

服务项目	可选项目	详细步骤	交付周期(天)	交付	
circRNA 冻干	样品分装	分装	2-3	circRNA 冻干粉	
	冷冻干燥	预冻			
		一次升华			
		二次升华			
circRNA 质量控制	冻干粉复溶	复溶 / 重悬	-	CoA 交付	
	冻干粉溶解性	外观检测	-		
	浓度检测	紫外分光光度法 (UV)	0.5		
		琼脂糖凝胶电泳 (AGE/E-gel)			
	完整性和纯度检测	HPLC- 可选	1		

## 服务优势



### 冻干工艺成熟

冻干前与冻干后样品质量指标一致，样品重复结果较好。



### 质量属性均一

冻干前后的CircRNA样品均成功表达目标蛋白。

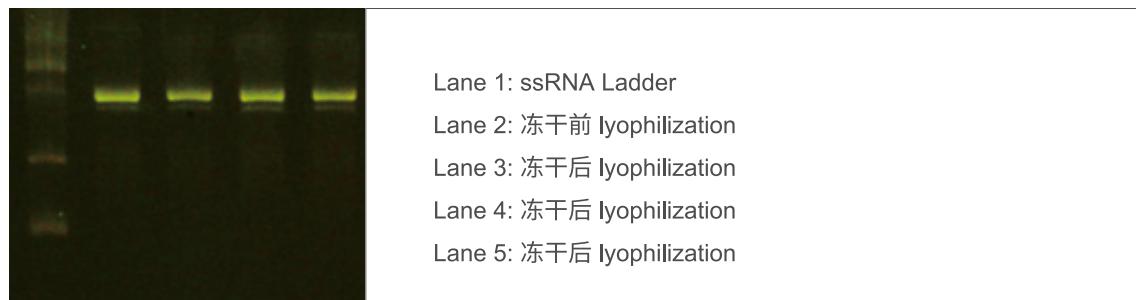


### 高稳定性

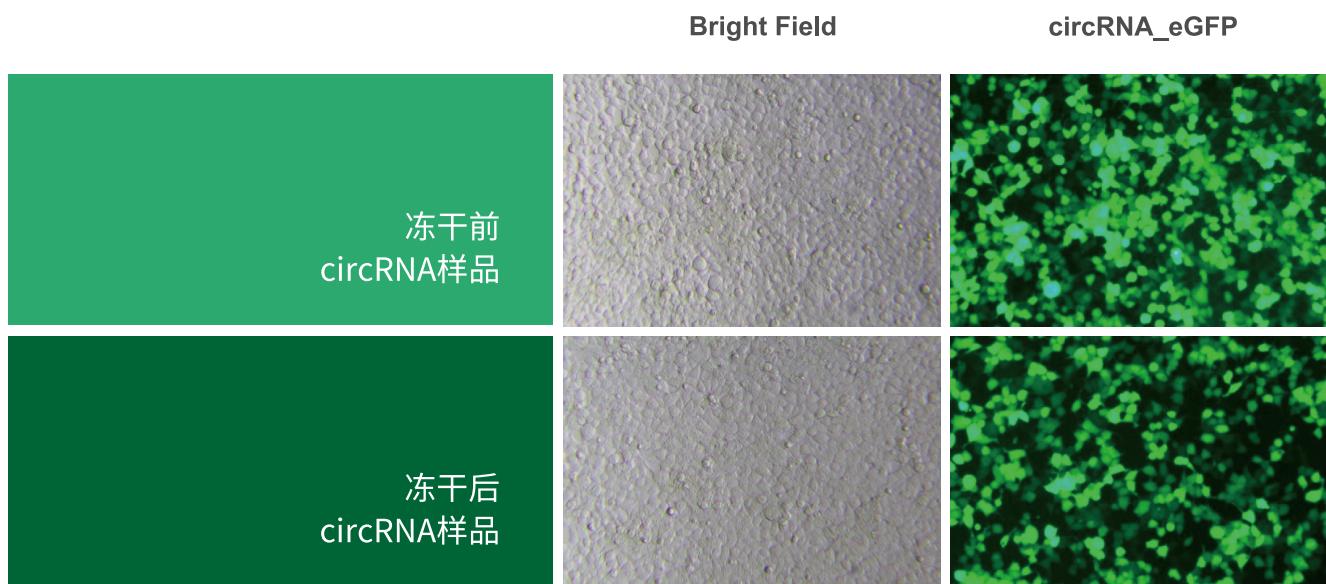
CircRNA冻干粉易于储存和运输。

## 案例展示

公司针对冻干前、及冻干后复溶的CircRNA分别进行E-gel电泳检测，分析其完整性和纯度。结果显示，冻干前后的CircRNA条带无明显差异，冻干后样品的检测结果具有很好的重复性。

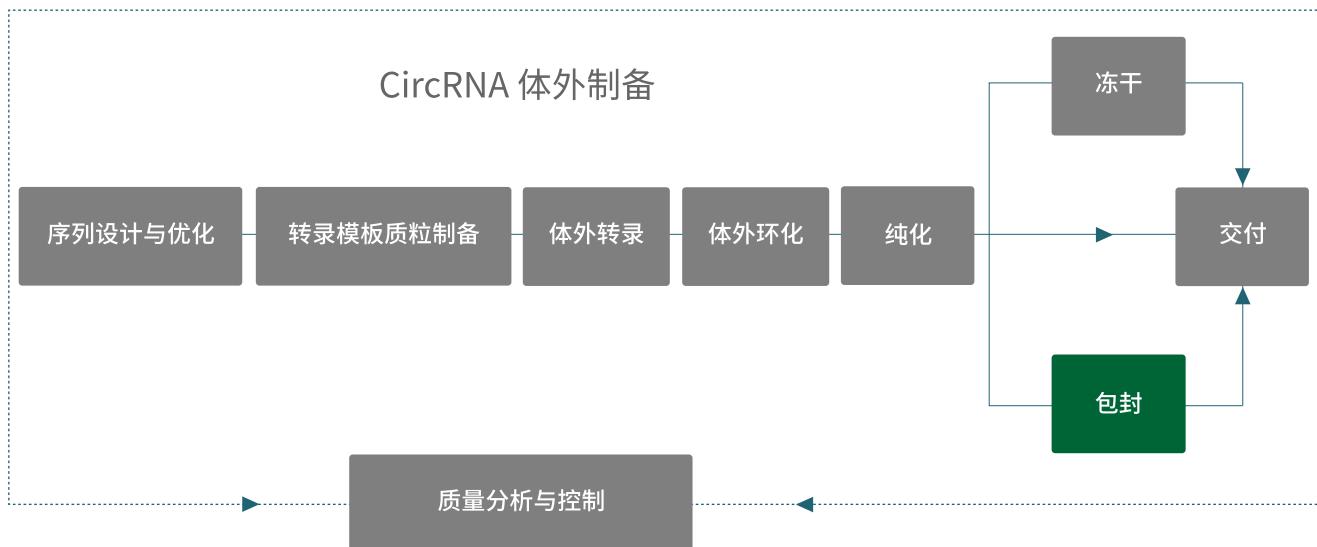


对冻干前与冻干后的circRNA样品进行293T细胞评价，结果显示，预制品CircRNA\_eGFP冻干前后样品均观察到强荧光信号，在体外高效表达目标蛋白。



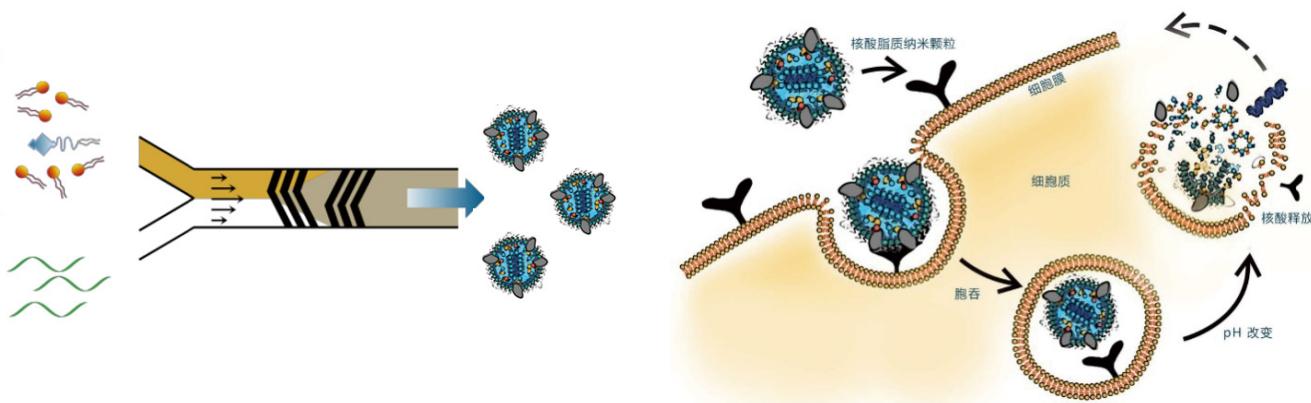
# CircRNA-LNP

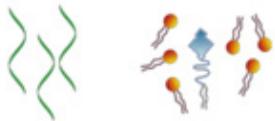
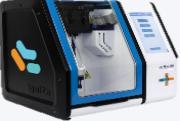
## 包封服务



包封的基础是递送系统的设计开发。良好设计的递送系统才能使circRNA分子进入人体后避免被RNA酶降解，继而被有效递送至靶点、穿过细胞膜并在胞内释放。脂质纳米颗粒（LNP）是目前最佳的递送系统，与其他递送系统相比，其包封效果、体内外表达效果、体内安全性等方面都更具优势。带有核酸片段的脂质纳米粒容易被吞进细胞内，形成胞内体。一旦进入细胞后，胞内体的酸性环境使电离脂质的头部质子化并带正电荷，从而与胞内体的内膜融合，释放目标核酸到细胞中发挥作用。

耀海生物CircRNA服务内容持续完善，可提供CircRNA-LNP包封服务，优化相关关键工艺参数，提高CircRNA药物生产的一致性和重现性。



料液预处理	微流控	切向流过滤	除菌过滤
 <p>两股料液的准备： 一股是处于水性缓冲液的circRNA，一股是溶解在乙醇中的脂质。</p>	 <p>使用微流控设备快速混合脂类、circRNA两相溶液，从而实现均匀的LNP和高效率包封。</p>	 <p>采用切向流技术将料液浓缩至目标制剂浓度，并将缓冲液置换为中性储存溶液，去除未包封的circRNA、多余的脂类和乙酸。</p>	 <p>符合药物无菌性法规要求，选择终端除菌过滤并且需通过细菌挑战实验验证。</p>

## 服务详情

服务项目	详细步骤	交付周期(天)	交付	
circRNA-LNP 包封	料液预处理	2	circRNA-LNP 制剂	
	微流控设备混合			
	切向流过滤	1		
	除菌过滤			
circRNA 质量控制	包封率	1	CoA 文件	
	粒径及分布检测			
	表面电荷检测			

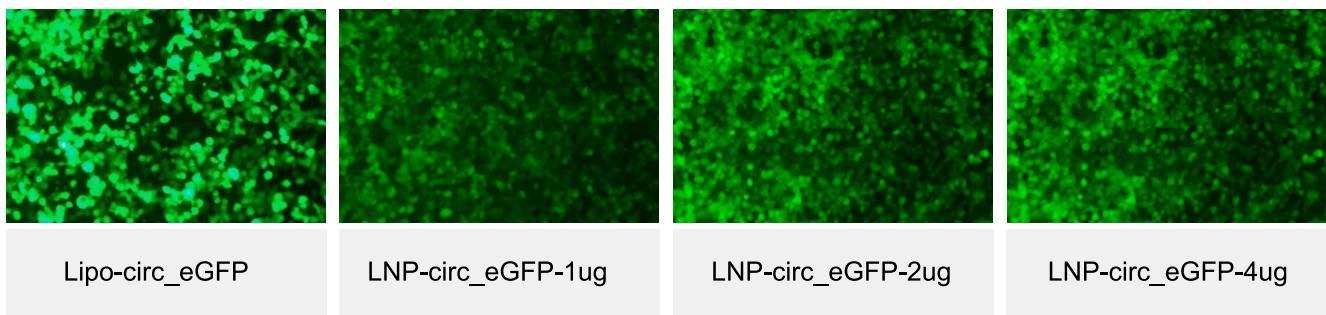
## 服务优势

-  **制剂配方筛选**  
 合成速度快，研发效率高，预先优化方案；
-  **包封率高**  
 包封效果可达90%以上；
-  **粒径适中**  
 通过改变流体注入速率和比率，可以控制脂质纳米粒径的大小。
-  **高效表达**  
 circRNA-LNP预制品经体外细胞表达验证，可高效表达目的蛋白。

## 案例展示

我们制备了不同含量的LNP-circRNA\_eGFP样品（1ug-2ug-4ug），直接转染293T细胞，以验证其是否可以表达目的蛋白。转染48h后，可观察到明显的荧光信号，且荧光强度存在剂量递增效应。

【注：Lipo-circ\_eGFP为脂质体+无包封的circRNA\_eGFP，作为转染对照】



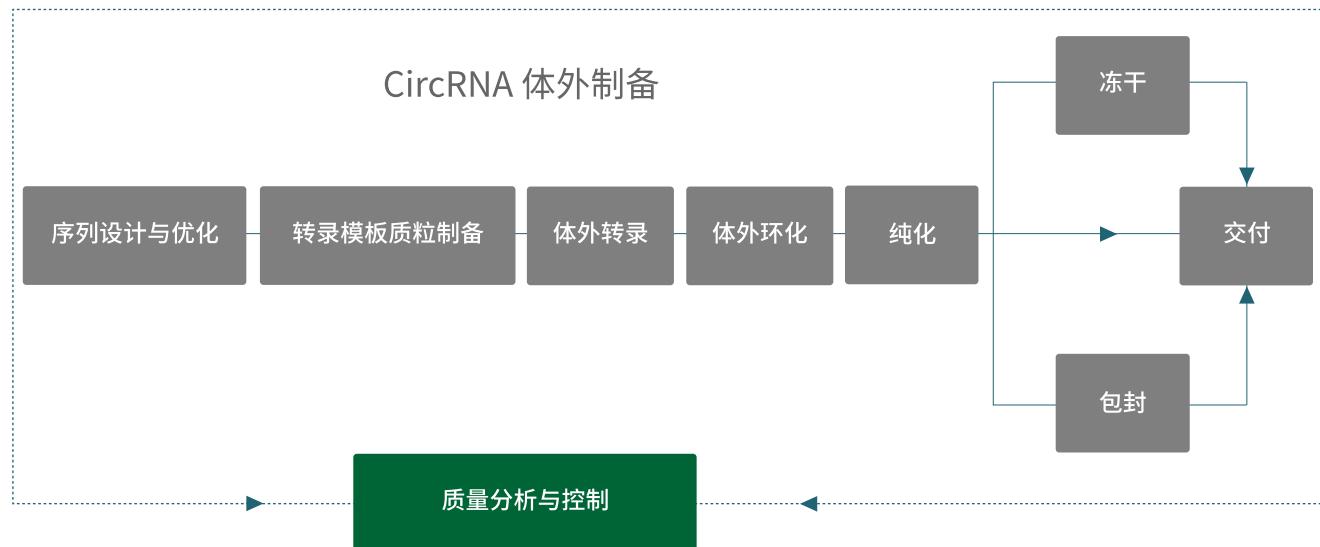
## 其他服务

circRNA序列设计与优化	转录模板质粒制备	线性RNA体外转录
circRNA体外环化	circRNA纯化	circRNA-LNP包封
circRNA冻干	cricRNA质量分析与控制	circRNA体外表达验证



# CircRNA

## 质量分析与控制服务



结合mRNA质量分析指导原则要求，耀海生物制定了CircRNA制备的质量标准，可提供环状和线性化质粒模板、CircRNA原液及CircRNA-LNP成品的质量分析服务，服务详细如下所示：

## 服务详情

样品	检测项目	检测方法	交付周期 (天)	交付内容
<b>环状质粒 DNA</b>	浓度和纯度	紫外分光光度法 (UV)	N/A	
	超螺旋比例	琼脂糖凝胶电泳 (AGE)	0.5	
		毛细管电泳 (CE)	1	
<b>线性化质粒 DNA</b>	浓度和纯度	紫外分光光度法 (UV)	N/A	
	线性化比例	琼脂糖凝胶电泳	0.5	
		毛细管电泳 (CE)	1	
<b>circRNA 原液</b>	浓度	紫外分光光度法 (UV)	N/A	
	纯度	琼脂糖凝胶电泳 (AGE/E-gel)	0.5	CoA 文件
		HPLC	1	
	环化率	HPLC、qPCR	1-2	
<b>circRNA-LNP 制剂</b>	包封率	RiboGreen 法	1	
	粒径及分布	粒度仪	1	
	表面电荷	粒度仪	1	
<b>Validation of circRNA expression</b>	293T 细胞评价	细胞转染	4	
		荧光观察		1-3
		Western Blot/ELISA		

# CircRNA

## 体外表达验证服务

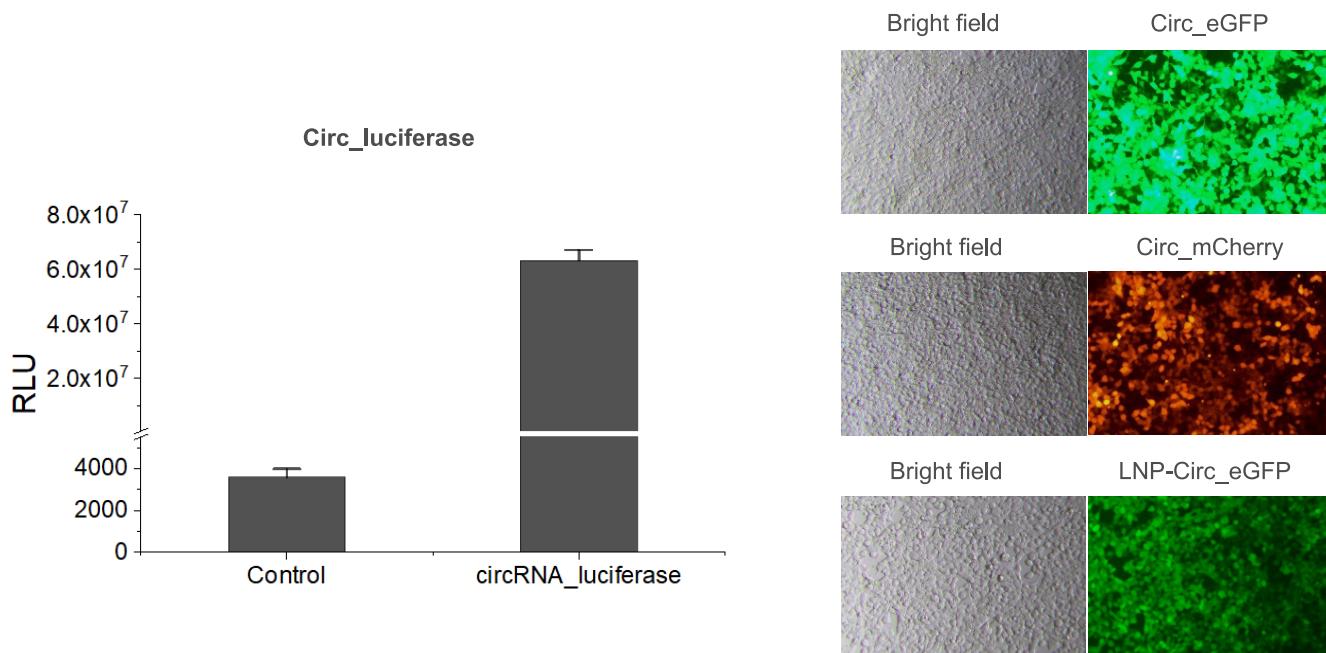
除CircRNA相关质量属性外，耀海生物基于完善的细胞培养平台，可为客户提供CircRNA细胞转染和目的蛋白特异性检测服务。通过将CircRNA瞬时转染293T细胞，验证CircRNA是否可以在体外细胞中成功表达目的蛋白。可检测样品范围包括CircRNA原液和成品CircRNA-LNP。



样品	检测项目	检测方法	交付周期(天)	交付内容	
circRNA 表达验证	293T 细胞评价	细胞铺板	4	CoA 文件	
		细胞瞬时转染			
		荧光信号观察	1-3		
		Western blot (WB)			
		ELISA			

## 案例展示

耀海生物搭建了成熟的细胞转染平台，转染样品包括CircRNA原液和成品CircRNA-LNP，  
基于荧光信号、酶-底物反应，可检测到目标蛋白的强特异性信号。



# CircRNA

## 平台设备



荧光显微镜



Bio-Rad PCR仪



Thermo 全波长酶标仪



Bio-Rad 凝胶成像仪



Thermo qPCR 仪



Waters HPLC



PNI 微流控纳米颗粒制备系统



SCIEX 毛细管电泳仪



Cytiva AKTA 纯化系统

# SERVE WITH HEART & CREATE THE FUTURE TOGETHER

联系我们  
CONTACT US

WWW.YAOHAI-BIO.COM

咨询热线: 0523-8628-5566

企业邮箱: SALES@YAOHAIBIO.CN

总部地址: 江苏省泰州市健康大道 801 号 29 幢



微信公众号



官方客服