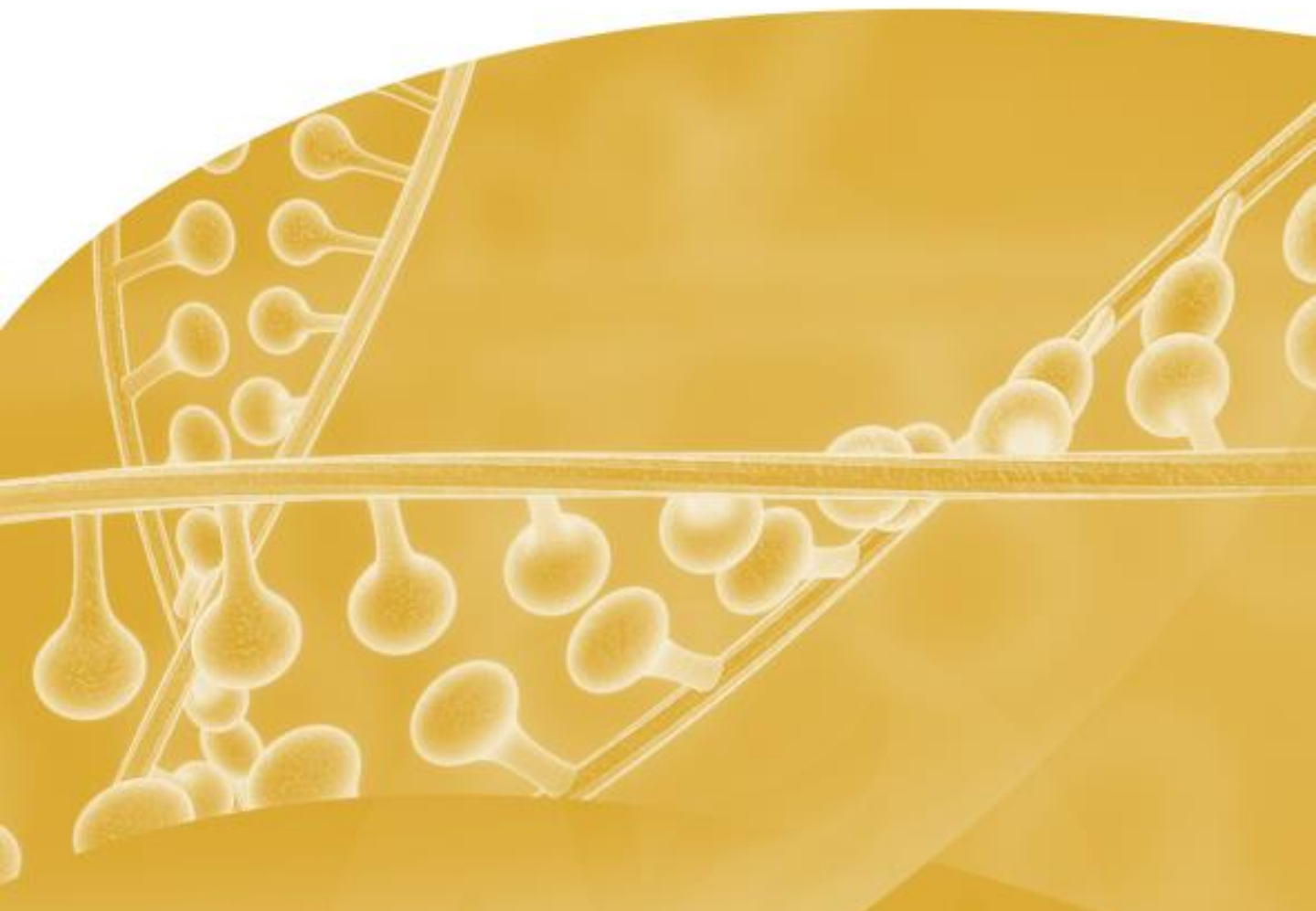


# mRNA分析与检测 服务手册



咨询电话：133 8033 2910  
耀海生物技术(北京)有限公司

扫码关注



## mRNA分析与检测服务

根据世界卫生组织（WHO）、美国药典（USP）和中国国家药品监督管理局（NMPA）发布的 mRNA 疫苗药学研究指南，建议对质粒 DNA 模板、mRNA 原液和 mRNA-脂质纳米颗粒（mRNA-LNP）制剂进行质量控制（QC）。

耀海生物“RNAQua”平台可为科研人员与工业界客户提供超螺旋质粒、线性化质粒、mRNA 原液和 LNP-mRNA 成品定制化质量解决方案，涵盖外观、鉴别、浓度、纯度、特定杂质、安全性、活性等质量属性的分析方法开发、过程样品检测放行和终产品检测放行。为符合监管需求，我们严格遵守 ICH 质量指南、中美药典、各国监管指南（ICH、FDA 和 EMA）和 GMP/GLP 实践指南。

**样品类型：超螺旋质粒、线性化质粒、mRNA 原液和 LNP-mRNA 成品**

### 法规支持



### 设备平台

SCIEX 毛细管电泳仪



Thermo Fisher 高分辨质谱



Waters HPLC



Thermo Fisher CAD 检测器



## 质粒DNA分析与检测

| 质控类别   | 关键质量属性          | 检测方法                      | 科研样品 | 临床样品 |
|--------|-----------------|---------------------------|------|------|
| 鉴别     | 外观, 可见异物        | 目视 (USP <790>, CHP2020)   | √    | √    |
|        | pH              | USP <791>, CHP2020        | √    | √    |
|        | 限制性内切酶图谱        | 限制性酶切与琼脂糖凝胶电泳 (AGE)       | √    | √    |
|        | DNA序列确认         | Sanger测序                  | --   | √    |
| 含量     | DNA浓度 (A260)    | 紫外光谱法 (UV)                | √    | √    |
| 纯度及杂质  | 质粒纯度 (A260/280) | 紫外光谱法 (UV)                | √    | √    |
|        | 质粒超螺旋比例         | 琼脂糖凝胶电泳 (AGE)             | √    | √    |
|        |                 | 毛细管电泳 (CE)                | --   | √    |
|        |                 | 高效液相色谱法 (HPLC)            | --   | √    |
|        | 质粒线性化比例         | 琼脂糖凝胶电泳 (AGE)             | √    | √    |
|        |                 | 毛细管电泳 (CE)                | --   | √    |
|        |                 | 高效液相色谱法 (HPLC)            | --   | √    |
|        | 宿主DNA残留         | 定量聚合酶链式反应 (qPCR)          | --   | √    |
|        | 宿主RNA残留         | 定量聚合酶链式反应 (qPCR)          | --   | √    |
|        | 宿主蛋白残留          | 酶联免疫吸附 (ELISA)            | --   | √    |
| 卡那霉素残留 | ELISA           | --                        | √    |      |
| 安全性    | 细菌内毒素残留         | 凝胶法(USP <85>, CHP2020)    | --   | √    |
|        |                 | 动态显色法 (USP <85>, CHP2020) | √    | --   |
|        | 微生物限度           | 微生物计数法(USP <61>, CHP2020) | --   | √    |
|        | 无菌              | 薄膜过滤法 (USP <71>, CHP2020) | --   | √    |

“√”: 推荐检测项, “--”: 可选检测项.

## mRNA原液分析与检测

| 质控类别           | 关键质量属性             | 检测方法                       | 科研样品 | 临床样品 |
|----------------|--------------------|----------------------------|------|------|
| 鉴别             | 外观, 可见异物           | 目视 (USP <790>, CHP2020)    | √    | √    |
|                | pH                 | USP <791>, CHP2020         | √    | √    |
|                | mRNA序列确认           | 测序                         | --   | √    |
| 含量             | mRNA浓度 (A260)      | 紫外光谱法 (UV)                 | √    | √    |
| 完整性            | mRNA完整性            | 琼脂糖凝胶电泳 (AGE)              | √    | √    |
|                |                    | 毛细管电泳 (CE)                 | --   | √    |
|                |                    | 毛细管凝胶电泳 (CGE)              | --   | √    |
|                | mRNA加帽率            | 5'端酶切与毛细管凝胶电泳 (CGE)        | --   | √    |
|                |                    | 5'端酶切与反向液相色谱-质谱 (RP-LC-MS) | --   | √    |
|                | mRNA poly(A)尾分布    | 3'端酶切与毛细管电泳 (CE)           | --   | √    |
|                |                    | 3'端酶切与液相色谱-质谱 (LC-MS)      | --   | √    |
| 产物相关杂质-RNA截短片段 | 反向高效液相色谱 (RP-HPLC) | --                         | √    |      |
| 纯度及杂质          | RNA纯度 (A260/280)   | 紫外光谱法 (UV)                 | √    | √    |
|                | 产物相关杂质-RNA聚集体      | 体积排阻高效液相色谱 (SEC-HPLC)      | --   | √    |
|                | 双链RNA (dsRNA) 残留   | 酶联免疫吸附 (ELISA)             | --   | √    |
|                | 宿主DNA残留            | 定量聚合酶链式反应 (qPCR)           | --   | √    |
|                | DNA模板残留            | 荧光法或定量聚合酶链式反应 (qPCR)       | --   | √    |
|                | 工艺相关酶残留            | 酶联免疫吸附 (ELISA)             | --   | √    |
|                | 总蛋白残留              | SDS-PAGE或BCA               | --   | √    |
| 安全性            | 细菌内毒素              | USP <85>, CHP2020          | √    | √    |

“√”: 推荐检测项, “--”: 可选检测项.

## mRNA-LNP成品分析与检测

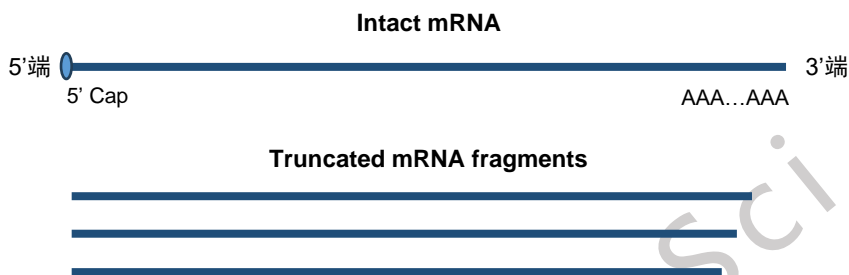
| 质控类别   | 关键质量属性         | 检测方法                       | 科研样品 | 临床样品 |
|--------|----------------|----------------------------|------|------|
| 鉴别     | 外观, 可见异物       | 目视 (USP <790>, CHP2020)    | √    | √    |
|        | pH             | USP <791>, CHP2020         | √    | √    |
|        | mRNA序列         | 测序                         | --   | √    |
|        | LNP组分鉴别        | 高效液相色谱-电雾式检测器 (HPLC-CAD)   | --   | √    |
| 含量     | LNP组分含量        | HPLC-CAD                   | --   | √    |
| 浓度     | 封装率            | 荧光法                        | √    | √    |
| 浓度     | 封装率/空壳率        | 纳米流式                       | --   | --   |
| 纯度     | 产物相关杂质-RNA聚集体  | 体积排阻高效液相色谱 (SEC-HPLC)      | --   | √    |
|        | 产物相关杂质-RNA截短片段 | 离子对反向高效液相色谱 (IP-RP-HPLC)   | --   | √    |
| 一般理化性质 | 渗透压            | USP <785>, CHP2020         | √    | √    |
|        | Zeta电位         | 马尔文粒度仪                     | √    | √    |
|        | mRNA-LNP粒度分析   | 动态光散射法 (DLS)               | √    | √    |
|        | 分散系数 (PDI)     | 马尔文粒度仪                     | √    | √    |
| 安全性    | 细菌内毒素          | USP <85>, CHP2020          | √    | √    |
|        | 微生物限度          | 微生物计数法 (USP <61>, CHP2020) | --   | √    |
|        | 无菌             | 薄膜过滤法 (USP <71>, CHP2020)  | --   | √    |
|        | 异常毒性           | 豚鼠法                        | --   | √    |

“√”: 推荐检测项, “--”: 可选检测项

## mRNA完整性检测

通常情况下，mRNA结构不稳定，在外部影响下容易发生降解或断裂。在体外转录(IVT)和纯化过程中，无处不在的RNA酶与剪切力等因素对mRNA的完整性造成了挑战。评估mRNA的完整性对mRNA疫苗和药物的开发至关重要，确保产品的安全性和可用性。

耀海生物“RNAQua”平台提供合规的mRNA完整性检测服务，我们能够定制化设计mRNA完整性检测方法，包括琼脂糖凝胶电泳(AGE)、毛细管凝胶电泳(CGE)等，以满足mRNA样品的不同使用场景，如用于科学研究或临床试验。



### 法规支持

根据世界卫生组织（WHO）、美国药典（USP）、中国国家药品监督管理局药品评审中心（CDE, NMPA）等发布的mRNA药学相关指南/指导原则，mRNA结构的完整性被认为是mRNA中间样品和终产品放行的关键质量属性。因此，控制mRNA的完整性、完整mRNA的百分比、mRNA片的百分比是至关重要的。

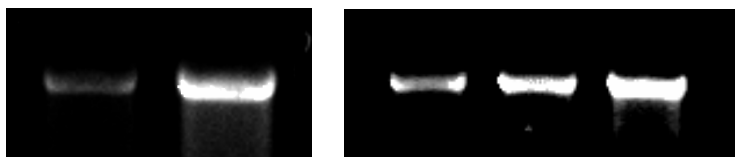


## mRNA完整性检测原理

非完整mRNA主要为mRNA发生降解产生的截短片段，在长度上小于结构完整的mRNA（全长mRNA）。基于其长度和分子大小的差异，琼脂糖凝胶电泳、毛细管电泳等方法可用于区分完整mRNA与mRNA截短片段。

**琼脂糖凝胶电泳**（AGE, Agarose Gel Electrophoresis）是评估RNA完整性的常用方法，不同长度的RNA样品迁移速度不同，最终呈现出不同的条带。

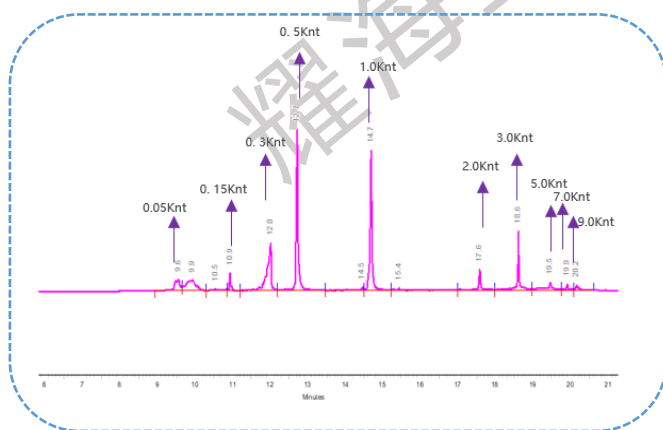
琼脂糖凝胶电泳是实验室阶段常用的mRNA完整性检测方法，操作简单、能够快速获得实验结果。



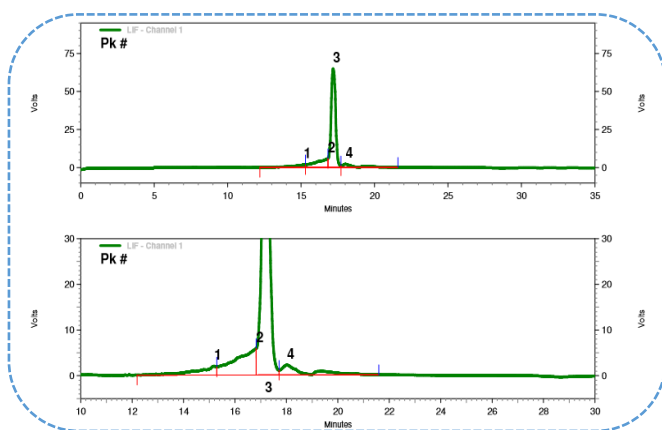
基于琼脂糖凝胶电泳（AGE）检测mRNA的完整性

**毛细管凝胶电泳**（CGE, Capillary Gel Electrophoresis）结合紫外检测器（UV）或光诱导荧光检测器（LIF）是一种高分辨率的RNA完整性分析方法，常用于临床研究样品等其他高质量标准mRNA疫苗/药物的分析检测。CGE同样基于RNA长度进行物质分离，较短的RNA出峰时间更早。基于CGE的检测对于mRNA工艺优化和产品质量保证具有重要意义。

毛细管凝胶电泳能够精确分离全长mRNA与mRNA截短片段，高分辨率下表征mRNA的完整性，因此适用于检测更高质量标准的mRNA样品。



Ladder分离效果



mRNA样品分离与检测结果

基于毛细管凝胶电泳（CGE）检测高纯度mRNA的完整性



## mRNA加帽率检测

对于体外合成的mRNA，其帽结构（Cap）主要发挥以下功能：

① 保护mRNA免受降解：mRNA的帽结构通过三磷酸键与第一位核苷酸连接，不同于RNA间的磷酸二酯键；

② 在真核细胞内，mRNA的帽结构可被帽结合蛋白识别，促进mRNA的翻译。

根据世界卫生组织（WHO）、美国药典（USP）、中国国家药品监督管理局药品评审中心（CDE, NMPA）发布的mRNA药学相关指南/指导原则，加帽率是mRNA的关键质量属性（CQA）。因此，我们需建立合适的分析方法对mRNA加帽率进行表征，以满足临床前或临床用mRNA的质量要求。



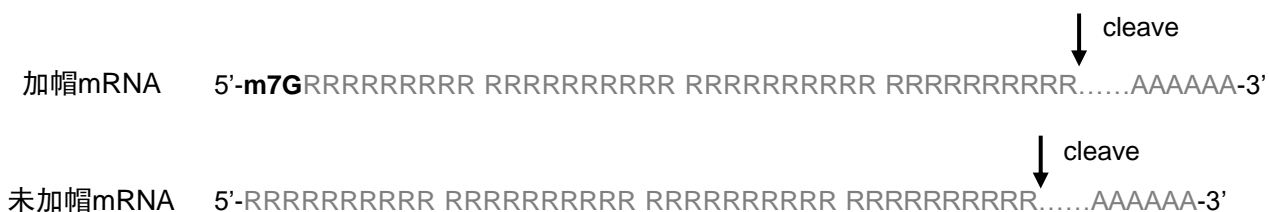
耀海生物“RNAQua”平台提供全流程的mRNA加帽率检测方案，包括寡核苷酸夹板（即探针）设计、RNase H切割、离子对反相色谱-质谱（IP-RP-LC-MS）和数据分析。

|     | 样品类型              | 耀海定制化服务                     |
|-----|-------------------|-----------------------------|
| 场景1 | 客户提供全长mRNA样品      | 探针设计+RNase H切割+LC-MS谱图+数据分析 |
| 场景2 | 客户提供全长mRNA样品和探针   | RNase H切割+LC-MS谱图+数据分析      |
| 场景3 | 客户提供酶切后的5'端寡核苷酸片段 | LC-MS谱图+数据分析                |

## mRNA加帽率检测原理

长链编码RNA通常由成千上万个核苷酸（nt）组成，而加帽与未加帽的mRNA仅相差一个甲基化鸟苷（m7G），这一微小的差异导致其在全长mRNA中难以区分。

当前加帽率的检测思路为：通过酶切获得5'端RNA片段（长度约几十个核苷酸），随后通过液相色谱（HPLC）或液质联用（LC-MS）等方法分离不同长度的5'端寡核苷酸片段，从而定量评估mRNA的加帽率。



注：R为任意核糖核苷酸（A, U, C, G）

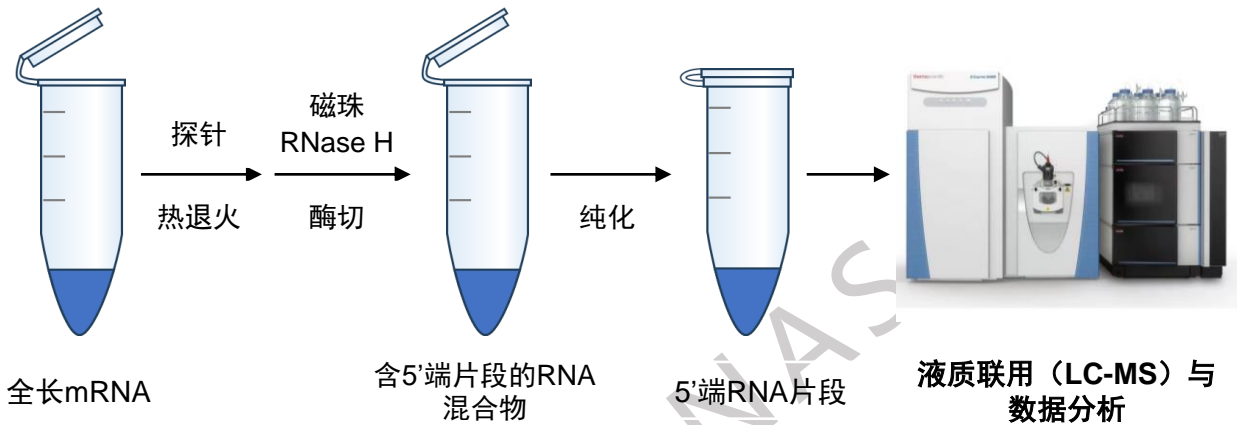


## 案例：mRNA加帽率检测

耀海生物质量研究平台建立了完善的mRNA加帽率分析方法，涵盖探针设计、RNase H酶切处理、液质联用（LC-MS）检测 and 数据处理。

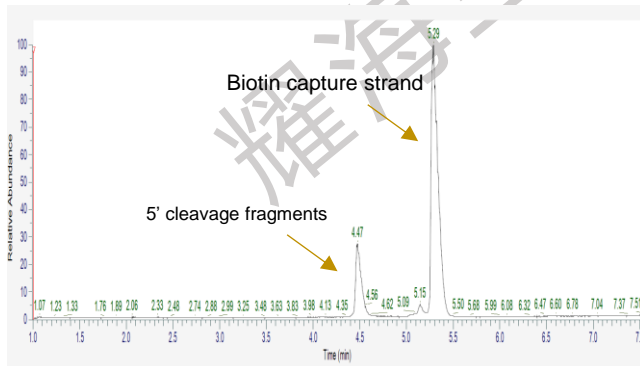
我们制备了编码荧光素酶的mRNA（luciferase mRNA）并对其进行了加帽率检测，对LC-MS目标峰的解卷积分析显示，mRNA加帽率大于90%。

### 检测流程

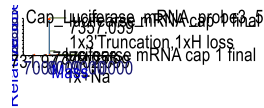


### 检测结果

5'端RNA片段总离子色谱图 (TIC)



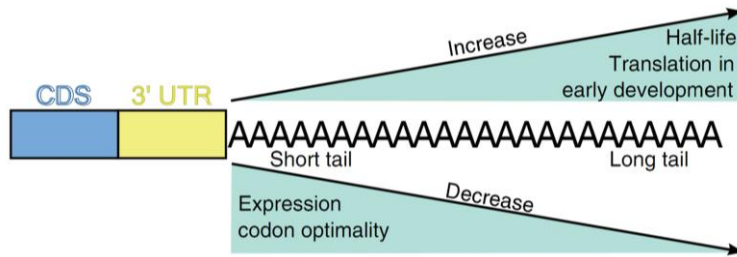
目标峰解卷积质谱图



# mRNA poly(A)长度分布检测

与5'端帽结构 (Cap) 类似，3'端多聚腺苷酸 [poly(A)] 尾也是维持mRNA生物学功能的重要元件。poly(A)主要发挥以下作用：保护mRNA不被降解，并与polyA结合蛋白、5' cap和翻译起始因子蛋白协同作用，启动蛋白质的翻译。

有研究报道，mRNA的有无和长度影响mRNA的稳定性和翻译效率。因此，mRNA poly(A)的长度分布是一种关键质量属性 (CQA)。我们需建立合适的分析方法对mRNA poly(A)进行表征，以满足临床前或临床用mRNA的质量要求。



Poly(A)长度与蛋白翻译效率的关系 [Wiley Interdiscip Rev RNA. 2023 Jan;14(1):e1737]

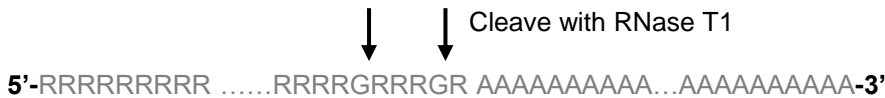
耀海生物“RNAQua”平台提供全流程的mRNA poly(A)长度分布检测服务，包括前处理 (RNase T1切割)、离子对液相色谱-质谱 (LC-MS) 和数据分析。

| 样品类型                     | 耀海定制化服务                 |
|--------------------------|-------------------------|
| 场景1 客户提供全长mRNA样品         | RNase T1切割+LC-MS谱图+数据分析 |
| 场景2 客户提供酶切后的3'端poly(A)片段 | LC-MS谱图+数据分析            |

## mRNA poly(A)长度分布检测原理

对于由成千上万个核苷酸 (nt) 组成的长链编码RNA，很难精确分离长度相差1 nt的RNA片段。为实现1 nt的分辨率，poly(A)的检测策略与加帽率检测类似：

首先使用RNase T1处理mRNA，获得3'端poly(A)片段 (长度约为100个核苷酸)，随后通过液质联用 (LC-MS) 的方法获得3'端poly(A)片段的解卷积质谱图，从而定量评估mRNA的长度分布。



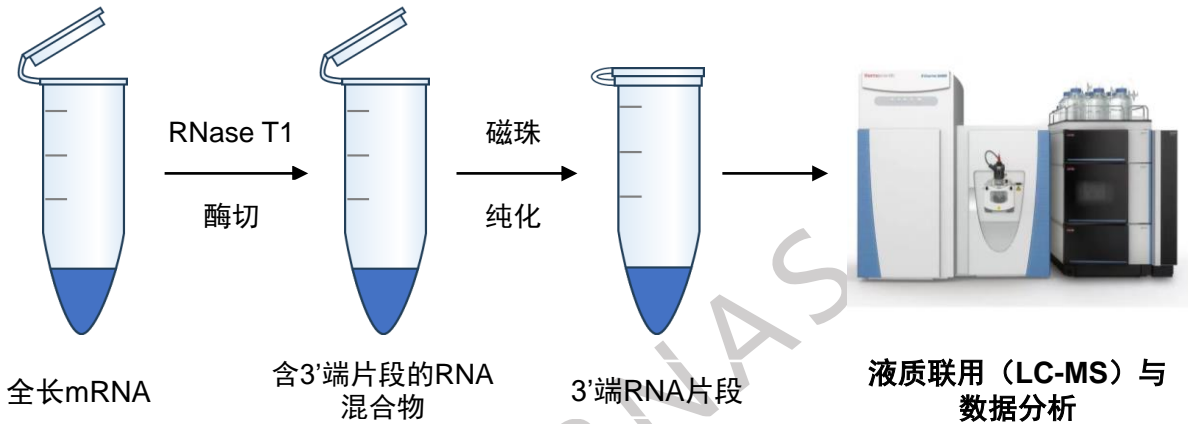
注：R为任意核糖核苷酸 (A, U, C, G)

## 案例：mRNA poly(A)长度分布检测

耀海生物“RNAQua”平台建立了完善的mRNA poly(A)长度分布分析方法，涵盖RNase T1酶切处理、oligo dT磁珠纯化、液质联用（LC-MS）检测和数据处理。

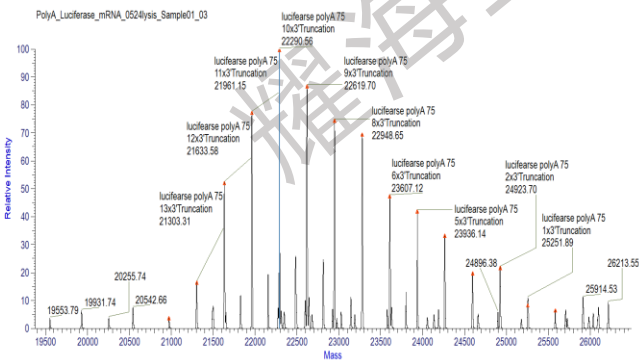
我们体外制备了编码荧光素酶的mRNA（luciferase mRNA）并进行了poly(A)长度分布检测。其3'端poly(A)片段的LC-MS图谱显示，我们成功分离相差仅1个核苷酸的多聚腺苷酸片段。

### 检测流程

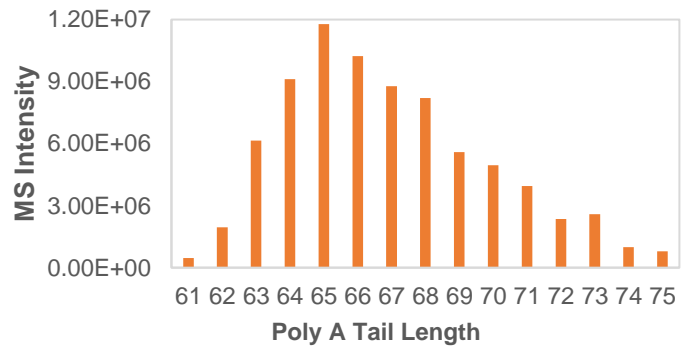


### 检测结果

#### 3'端RNA片段质谱图



#### Poly(A)长度与质谱强度关系图



# LNP脂质组分检测

脂质纳米颗粒（LNP）是当前最先进的RNA递送系统，其安全性和有效性已在大规模人群中得到验证。当前获批的几种LNP处方均包含四种脂质组分：可电离阳离子脂质、中性磷脂、胆固醇、聚乙二醇（PEG）脂质，LNP配方中的单一脂质成分和含量影响LNP的包封率、递送效果和安全性。根据世界卫生组织（WHO）、美国药典（USP）发布的mRNA药学相关指南/指导原则，脂质是RNA-LNP成品的重要组成部分，应对mRNA-LNP制剂中的脂质组分进行鉴别和含量检测。



耀海生物“RNAQua”平台提供定制化的LNP组分检测服务，包括样品前处理、高效液相色谱-带电气溶胶（HPLC-CAD）和数据处理。

|     | 样品类型          | 耀海定制化服务           |
|-----|---------------|-------------------|
| 场景1 | 客户提供RNA-LNP成品 | 前处理+HPLC-CAD+数据分析 |
| 场景2 | 客户提供脂质混合物     | HPLC-CAD+数据分析     |

## 检测原理

### LNP脂质组分检测思路：

开发适用的液相分离条件使LNP中各脂质完全分离，并借助电雾式检测器（CAD）捕获的信号将各脂质定量，由此实现各脂质的鉴别和定量。

### HPLC-CAD设备工作原理

高效液相色谱（HPLC）是药物分析中常用的现代分析技术。由于其高效率、高速度、灵敏度和自动化，被广泛用于药物分析。HPLC结合不同的检测器，能够满足多种物质的检测需求。

电雾式检测器（CAD），也称带电气溶胶检测器，是一种新型通用探测器。CAD特性包括与梯度洗脱的兼容性，不依赖于物质的结构特性和电离效率的响应值，以及具备检测非挥发性和半挥发性物质的能力。由于CAD的高度灵敏性，已广泛用于检测脂质的鉴别和含量检测。

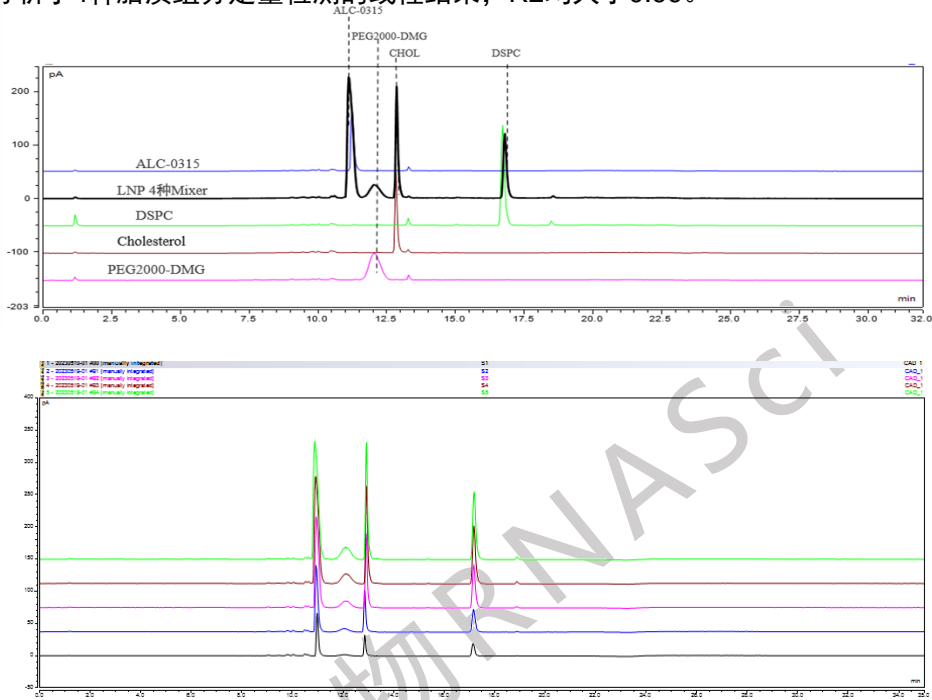


Vanquish Charged Aerosol Detector

## 案例：LNP脂质组分检测

耀海生物“RNAQua”平台结合超高效液相色谱（UHPLC）与带电气溶胶检测器（CAD），建立了LNP脂质分离和检测方法。我们开发了适用的色谱条件，成功实现4种LNP组分的基线分离。该方法具有很好的重复性。

此外，我们分析了4种脂质组分定量检测的线性结果，R2均大于0.99。



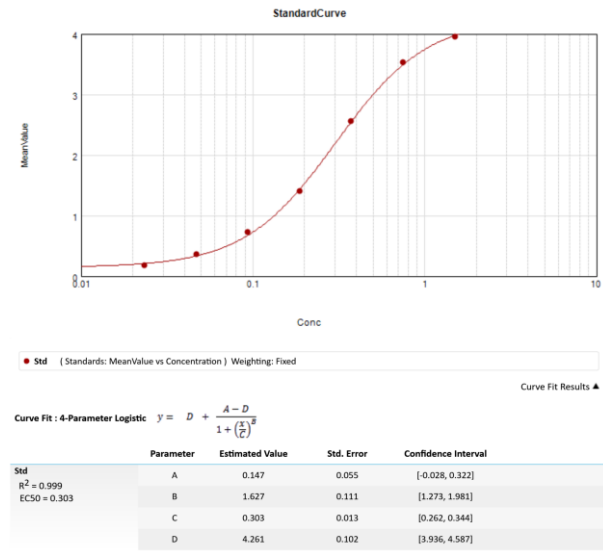
耀海质量“RNAQua”平台建立了适用的色谱方法，4种LNP组分实现基线分离。

我们利用HPLC检测LNP脂质组分，方法具有线性和重复性

# 杂质残留检测

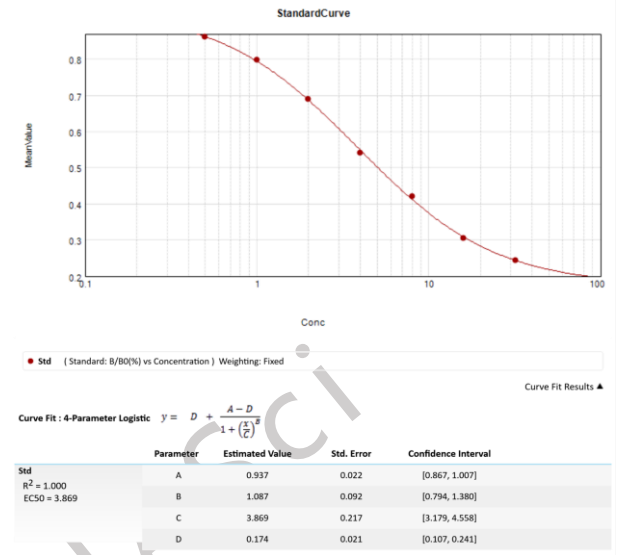
## dsRNA残留 (ELISA试剂盒)

拟合标曲R<sup>2</sup>= 0.999, QC回收率=105.5%



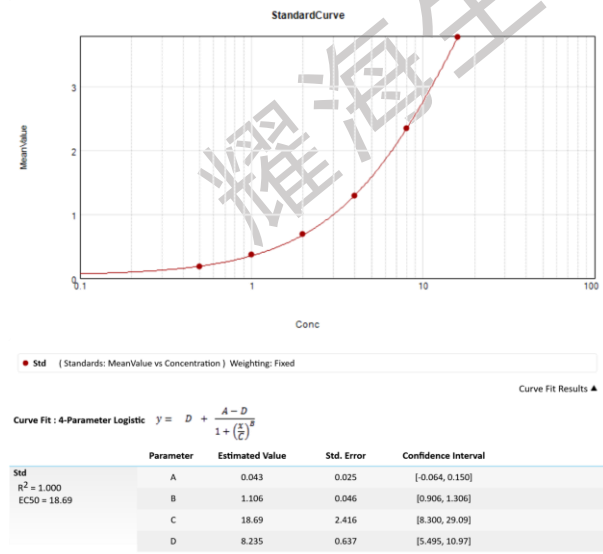
## 卡那霉素残留 (ELISA试剂盒)

拟合标曲R<sup>2</sup>= 1.000, QC回收率=104.8%



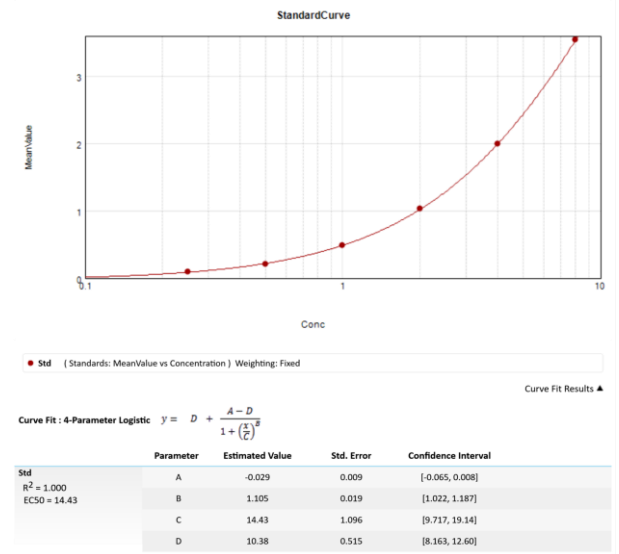
## T7 RNA聚合酶残留 (ELISA试剂盒)

拟合标曲R<sup>2</sup>=1.000, QC回收率=107.9%



## DNAase I残留 (ELISA试剂盒)

拟合标曲R<sup>2</sup>=1.000, QC回收率=92.7%

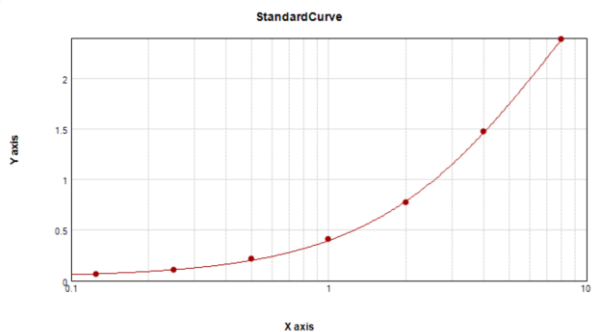


## 牛痘病毒加帽酶残留 (ELISA试剂盒)

拟合标曲R<sup>2</sup>=1.000, QC回收率=92%

## 2-O-甲基转移酶残留 (ELISA试剂盒)

拟合标曲R<sup>2</sup>=1.000, QC回收率=95.1%

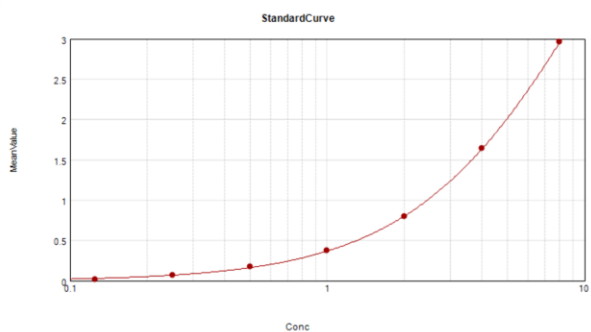


Plot1 (Standards@BasicFP: MeanValue vs Concentration) Weighting: Fixed

Curve Fit Results ▲

Curve Fit : 4-Parameter Logistic  $y = D + \frac{A-D}{1 + (\frac{x}{C})^B}$

|                        | Parameter | Estimated Value | Std. Error | Confidence Interval |
|------------------------|-----------|-----------------|------------|---------------------|
| Plot1                  | A         | 0.035           | 0.016      | [-0.015, 0.086]     |
| R <sup>2</sup> = 1.000 | B         | 1.196           | 0.064      | [0.992, 1.400]      |
| EC50 = 7.933           | C         | 7.933           | 1.190      | [4.144, 11.72]      |
|                        | D         | 4.716           | 0.439      | [3.318, 6.113]      |



Std (Standards: MeanValue vs Concentration) Weighting: Fixed

Curve Fit Results ▲

Curve Fit : 4-Parameter Logistic  $y = D + \frac{A-D}{1 + (\frac{x}{C})^B}$

|                        | Parameter | Estimated Value | Std. Error | Confidence Interval |
|------------------------|-----------|-----------------|------------|---------------------|
| Std                    | A         | -0.003          | 0.011      | [-0.038, 0.031]     |
| R <sup>2</sup> = 1.000 | B         | 1.208           | 0.041      | [1.077, 1.340]      |
| EC50 = 11.73           | C         | 11.73           | 1.541      | [6.820, 16.63]      |
|                        | D         | 7.661           | 0.694      | [5.452, 9.871]      |

耀海生物 RND



## IVT RNA & LNP 系列 · 服务手册



## IVT RNA & LNP 系列 · 基础知识手册



### 联系方式

电话: 133 8033 2910

邮箱: CRO@yaohaibio.cn

网站: [www.yaohaibio-pharma.com](http://www.yaohaibio-pharma.com)

地址: 北京市大兴区生物医药基地好景象科技园C座4楼

