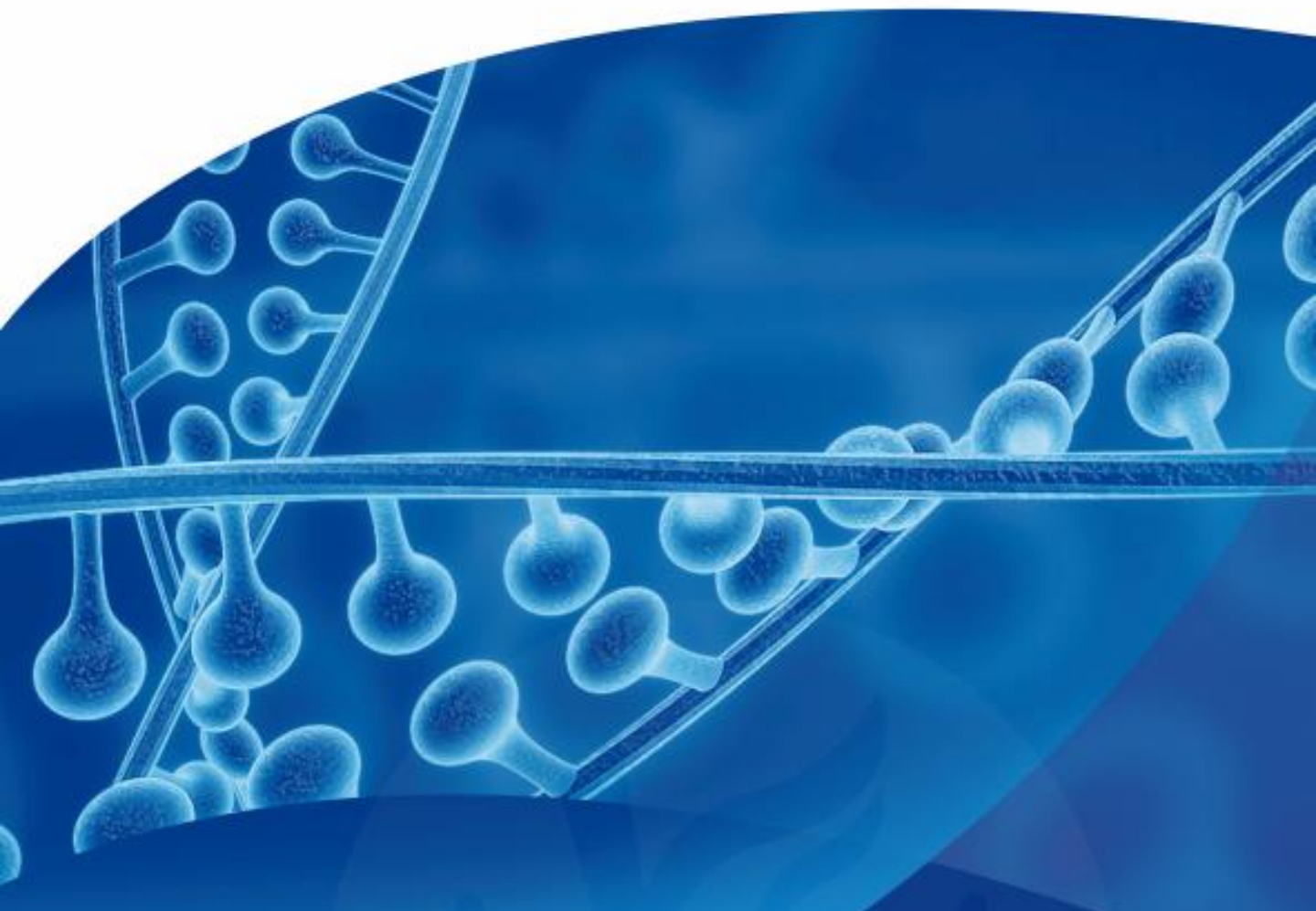


体外转录mRNA 基础知识手册



咨询电话：133 8033 2910
耀海生物技术(北京)有限公司

扫码关注



目录

IVT RNA应用领域

IVT RNA类型

- 常规mRNA
- 自复制mRNA (saRNA)
- 反式扩增mRNA (taRNA)
- 环状mRNA (circRNA)

IVT RNA制备流程

- 质粒模板设计和制备
- 体外转录
- 核苷酸修饰
- 加帽方法 (线性mRNA)
- 加尾方法 (线性mRNA)
- 线性mRNA的纯化方法
- 体外环化 (环状RNA)
- 环状mRNA的纯化方法

LNP-RNA包封流程

- LNP包封方法介绍
- 脂质组分用量计算
- mRNA浓度计算
- 微流控包封流程

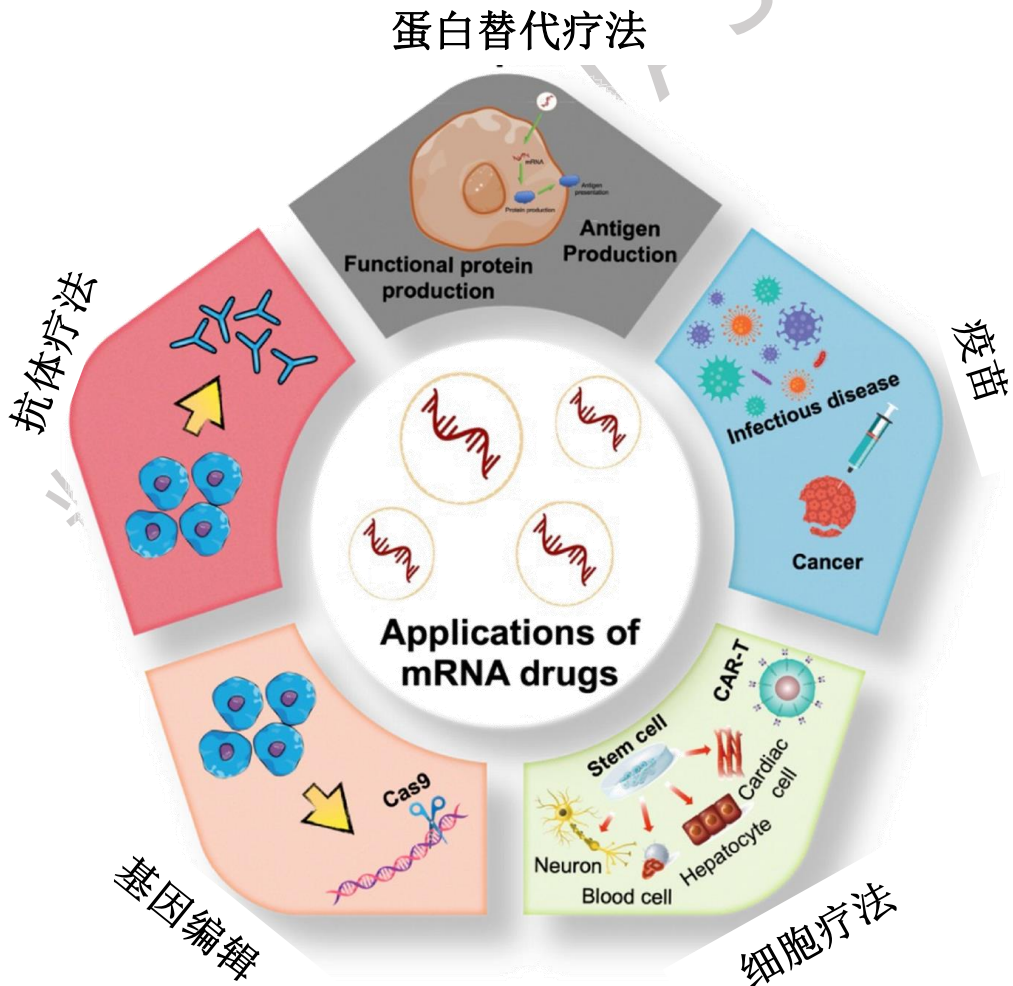
抗体偶联LNP (Ab-LNP) 平台

质量控制

- 质粒DNA的质量属性
- 线性mRNA的质量属性
- 环状mRNA的质量属性
- LNP-RNA的质量属性

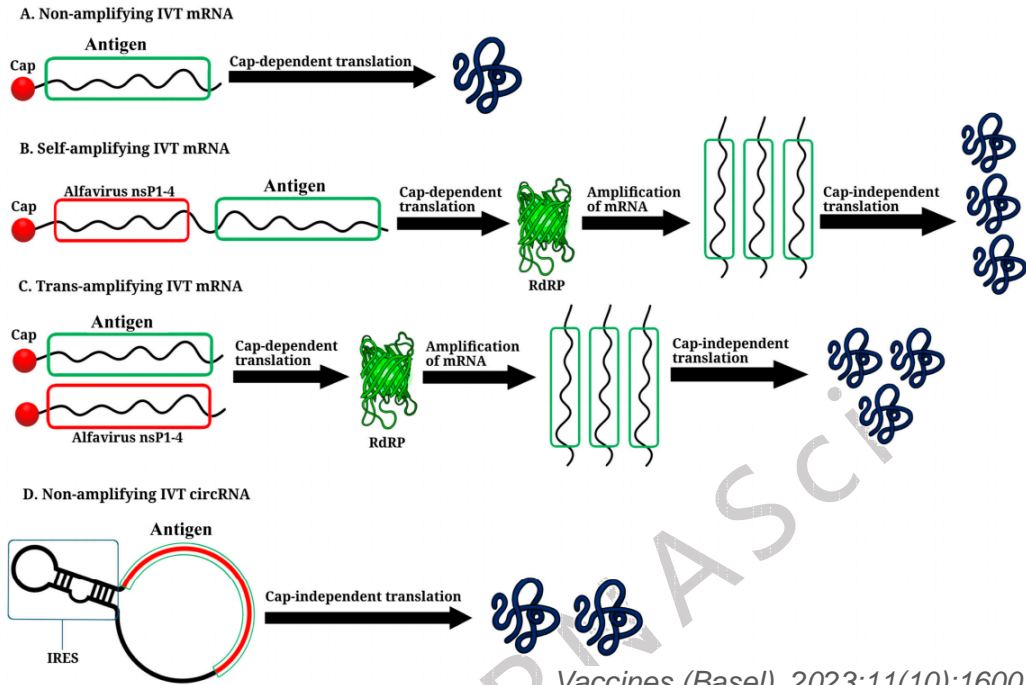
IVT RNA的应用领域

IVT RNA应用领域	细分领域	编码蛋白类型
疫苗	传染病疫苗 肿瘤疫苗	病毒、细菌、寄生虫等病原体抗原 肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)
蛋白替代疗法	代谢疾病/罕见病 肿瘤免疫治疗	功能性酶、细胞因子等功能性蛋白
抗体疗法	肿瘤等免疫疾病	单克隆抗体、双特异性抗体、抗体片段等
基因编辑疗法	体内基因编辑疗法	CRISPR/Cas蛋白、gRNA
细胞疗法	体内CAR-T疗法 体内干细胞疗法	针对特定靶点的嵌合抗原受体 转录因子、生长因子、促凋亡因子等



体外转录 (IVT) mRNA类型

不同IVT RNA的结构特征



Vaccines (Basel). 2023;11(10):1600.

图示: 常规mRNA、自复制mRNA、反式扩增mRNA与环状RNA的比较

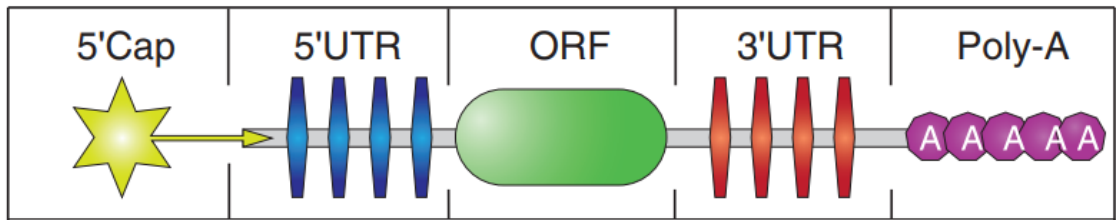
不同IVT RNA的表达特征

IVT RNA类型	常规mRNA	自复制mRNA	反式扩增mRNA	环状mRNA
结构特征	线性RNA 含5' UTR、目的基因、3' UTR和poly(A)	线性RNA 含5' UTR, 复制酶基因、目的基因、3' UTR和poly(A)	由2条常规的线性mRNA组成, 分别编码复制酶和目标蛋白	环状RNA 含IRES, 目的基因
蛋白翻译机制	帽结构与poly A尾巴	帽结构与poly A尾巴	帽结构与poly A尾巴	内部核糖体结合位点 (IRES)
帽结构	Cap 1	Cap 1	Cap 1	无
Poly (A)	100 ~ 150 nt	100 ~ 150 nt		无
mRNA 长度 (nt)	1000 ~ 10,000	9000 ~ 12,000	1000 ~ 10,000	1000 ~ 5000
RNA半衰期	较短	较长	较长	中等
蛋白表达水平	较低	较高	较高	中等
免疫原性	较低	较高	较高	较低

常规mRNA

根据中心法则，信使RNA(mRNA)是遗传物质从DNA传递至蛋白质的桥梁。mRNA通过在体内编码蛋白发挥生物学作用。

成熟的mRNA包括5个组成元件：5' Cap（帽结构）、5' UTR（非编码区域）、ORF（开放性阅读框）、3' UTR和3' polyA尾（多聚腺苷酸尾）。

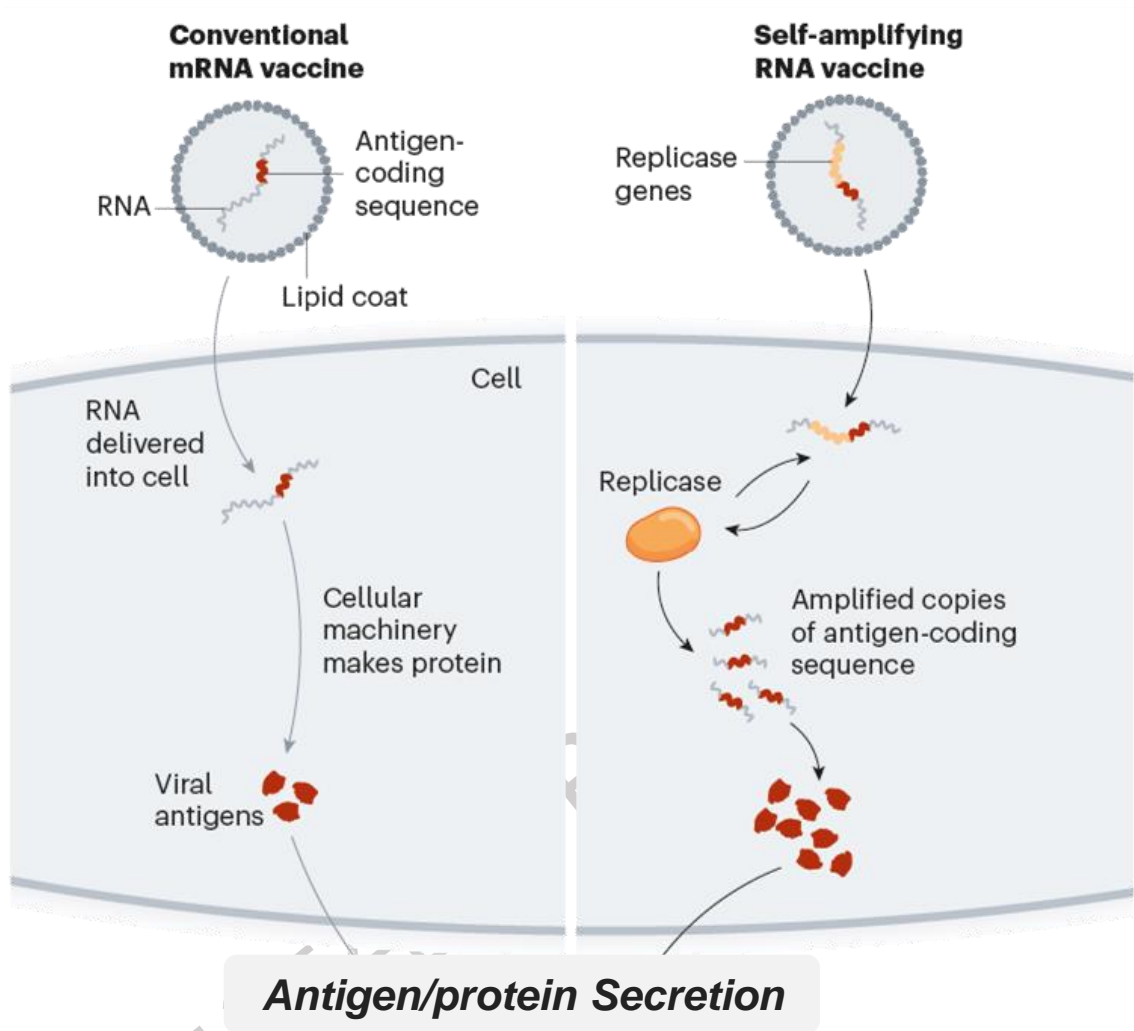


常规mRNA结构示意图 (Trends Mol Med. 2020;26(3):311-323.)

mRNA各组成元件的功能与优化策略参考如下：

mRNA元件	生物学功能	优化策略
5' Cap	保护mRNA不被外切酶降解，与3'端的polyA尾、polyA结合蛋白和翻译起始因子蛋白协同作用，启动蛋白质的翻译。	天然的Cap1结构可避免模式受体识别，从而降低天然免疫反应，可通过一步法共转录加帽或两步法酶法加实现
5' UTR	可被核糖体识别，调控mRNA的翻译、影响mRNA的稳定性。	包含Kozak序列，不存在非常稳定的二级结构。高表达基因的天然UTR是合成mRNA的首选，如 α -和 β -珠蛋白基因来源。
CDS	蛋白编码区，抗原、抗体或其他功能性蛋白的编码序列。	密码子优化可增加翻译水平，注意某些非最佳密码子可能在蛋白折叠中发挥作用。
3' UTR	调控mRNA的翻译和稳定性。	高表达基因的天然UTR是合成mRNA的首选，如 α -和 β -珠蛋白基因来源。
3' polyA	调控蛋白的表达、保护帽结构不被降解。	需足够的长度(100-150 bp)；在转录模板质粒上编码poly(A)尾可确保产生较为确定的polyA尾长度。

自复制mRNA (saRNA)



Nature 614, 22-25 (2023)

自复制mRNA的复制原理

1. 脂质纳米颗粒 (LNP) 等递送系统将自复制mRNA运送至细胞质;
2. 自复制mRNA在细胞内翻译产生复制酶复合体;
3. 复制酶以RNA正义链为模板合成互补的负义链RNA, 然后以负义RNA作为模板, 从基因组启动子序列转录完整RNA或从亚基因组启动子转录目标蛋白mRNA;
4. 扩增后的正义链RNA继续翻译复制酶并持续RNA的自扩增过程, 亚基因组RNA作为转录本翻译产生目标蛋白质, 如抗原等;
5. 基于少量自复制mRNA产生的大量蛋白质被分泌到胞外, 发挥预期的生物学功能。

自复制RNA (saRNA) 序列设计

自复制骨架来源

甲病毒 (Alphavirus)

委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV, Venezuelan equine encephalitis virus)

辛德比斯病毒 (SINV, Sindbis virus)

塞姆利基森林病毒 (SFV, Semliki Forest virus)

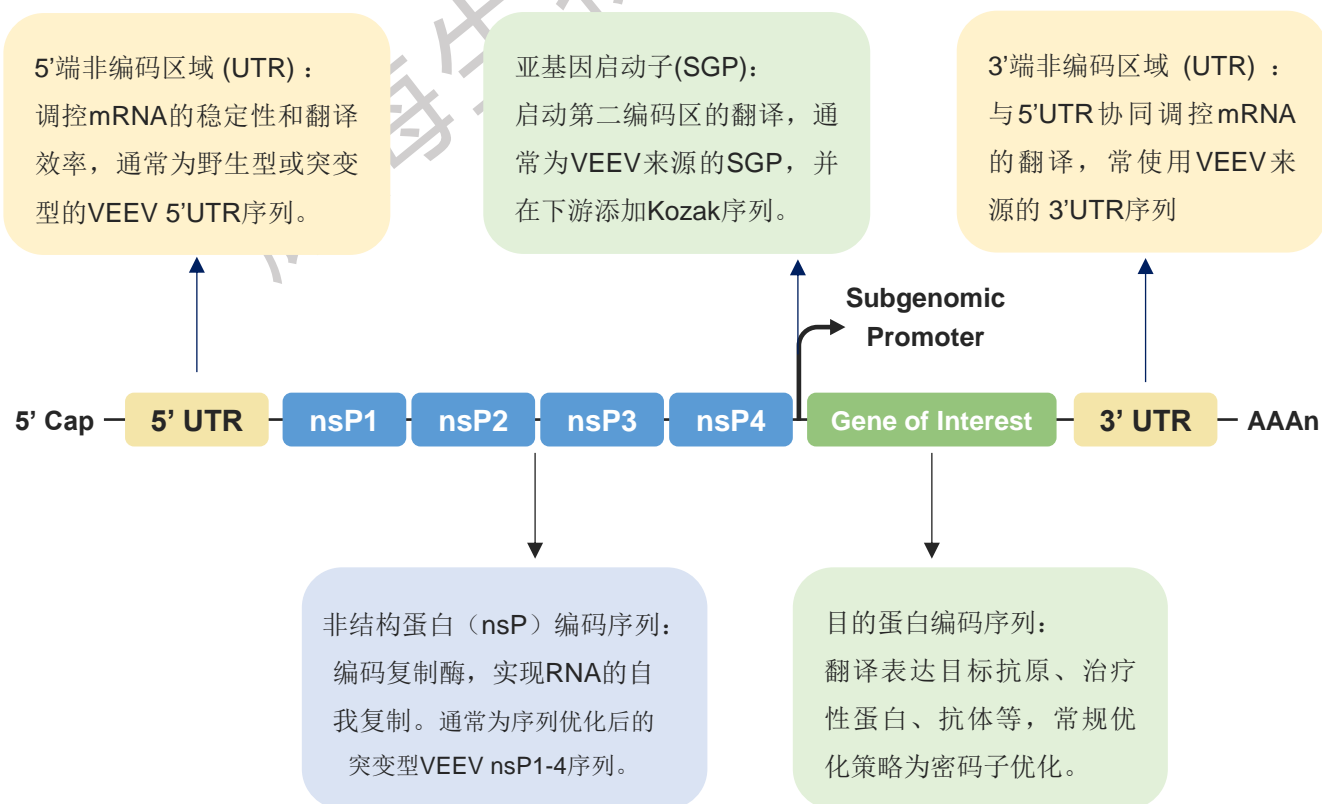
基孔肯雅病毒 (CHIKV, Chikungunya virus)

VEEV-SINV嵌合序列

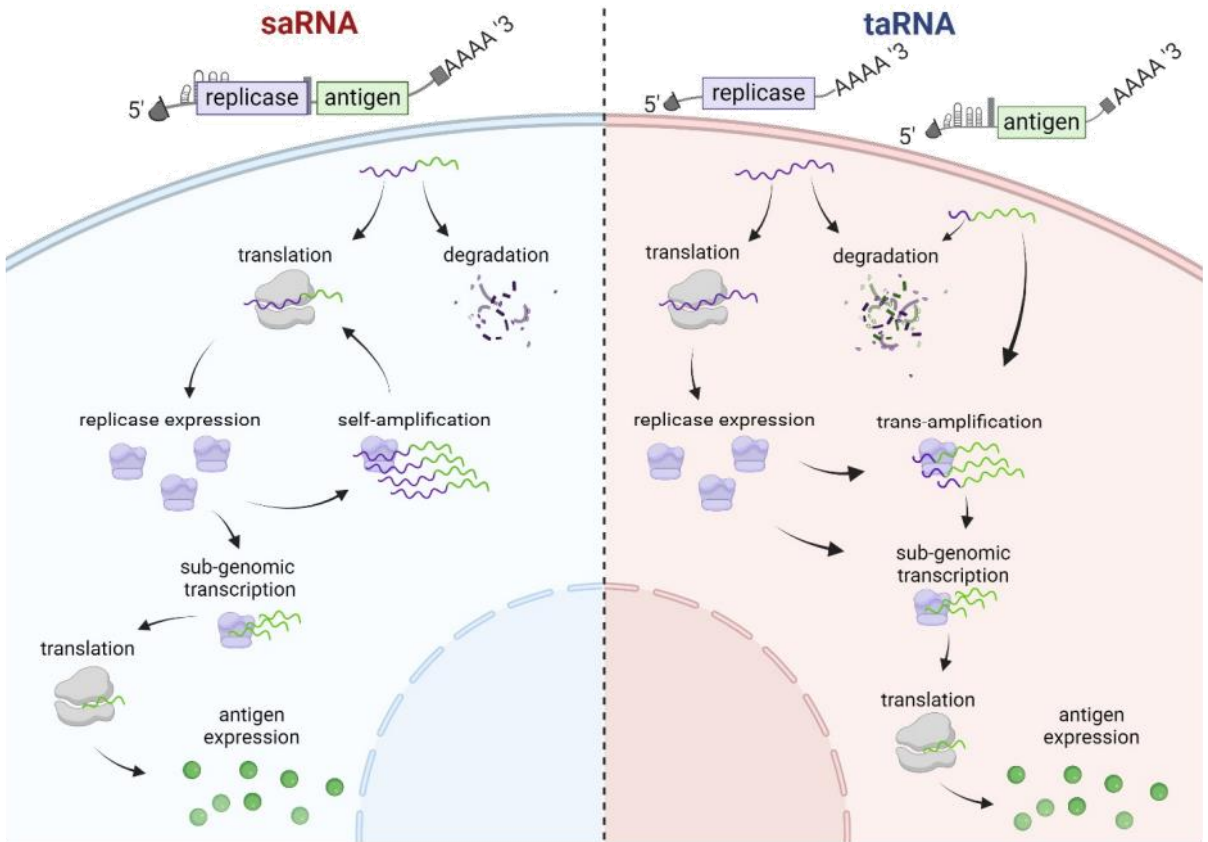
黄病毒 (Flavivirus)

经典猪瘟病毒 (CSFV, Classical swine fever virus)

委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV) 是最常用的自复制mRNA骨架。首款在法规市场上市的自复制mRNA疫苗ARCT-154是由VEEV骨架设计而来，已于2023年获日本药监局PMDA批准上市。



反式扩增mRNA (taRNA)



Viruses. Mar 25;16(4):503.

反式扩增mRNA的复制原理

1. 与saRNA相似，taRNA同样包括复制酶（即非结构蛋白nsP）和目标蛋白编码序列。但在taRNA中，这两个元件被分配到了2条mRNA序列中；
2. 脂质纳米颗粒（LNP）等递送系统将2条mRNA运送至细胞质；
3. 编码复制酶的mRNA翻译产生复制酶复合体；
4. 编码目的蛋白的mRNA被复制酶识别、结合、并导致其反式扩增；编码复制酶的mRNA由于缺乏CSE序列而无法复制；
5. 基于少量taRNA产生大量目的蛋白编码mRNA，随后翻译生成蛋白质。

反式扩增RNA (taRNA) 序列设计

第一代taRNA序列设计

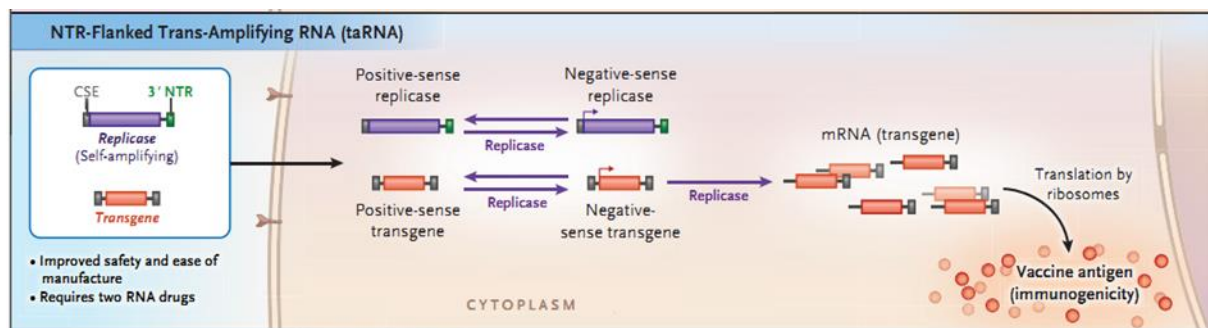
序列1: 复制酶编码序列

5' Cap、5' CSE、复制酶编码序列、3' UTR、3' poly(A)

序列2: 目的蛋白编码序列

5' Cap、5' CSE、SGP、目的蛋白编码区域、3' CSE、3' poly(A)

特征: 序列1和序列2均能在体内复制



第二代taRNA序列设计

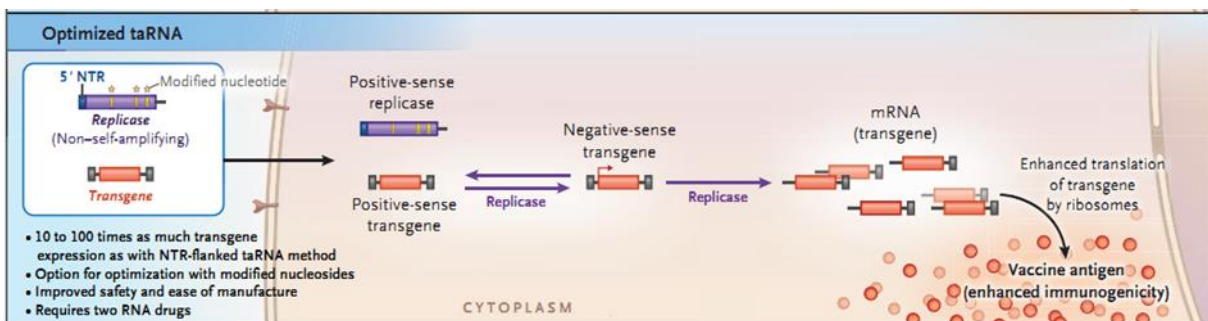
序列1: 对第一代中的复制酶编码序列进行了优化

5' Cap、5' UTR、复制酶编码序列、3' UTR、3' poly(A)

序列2: 目的蛋白编码序列

5' Cap、5' CSE、(含或不含SGP)、目的蛋白编码区域、3' CSE、3' poly(A)

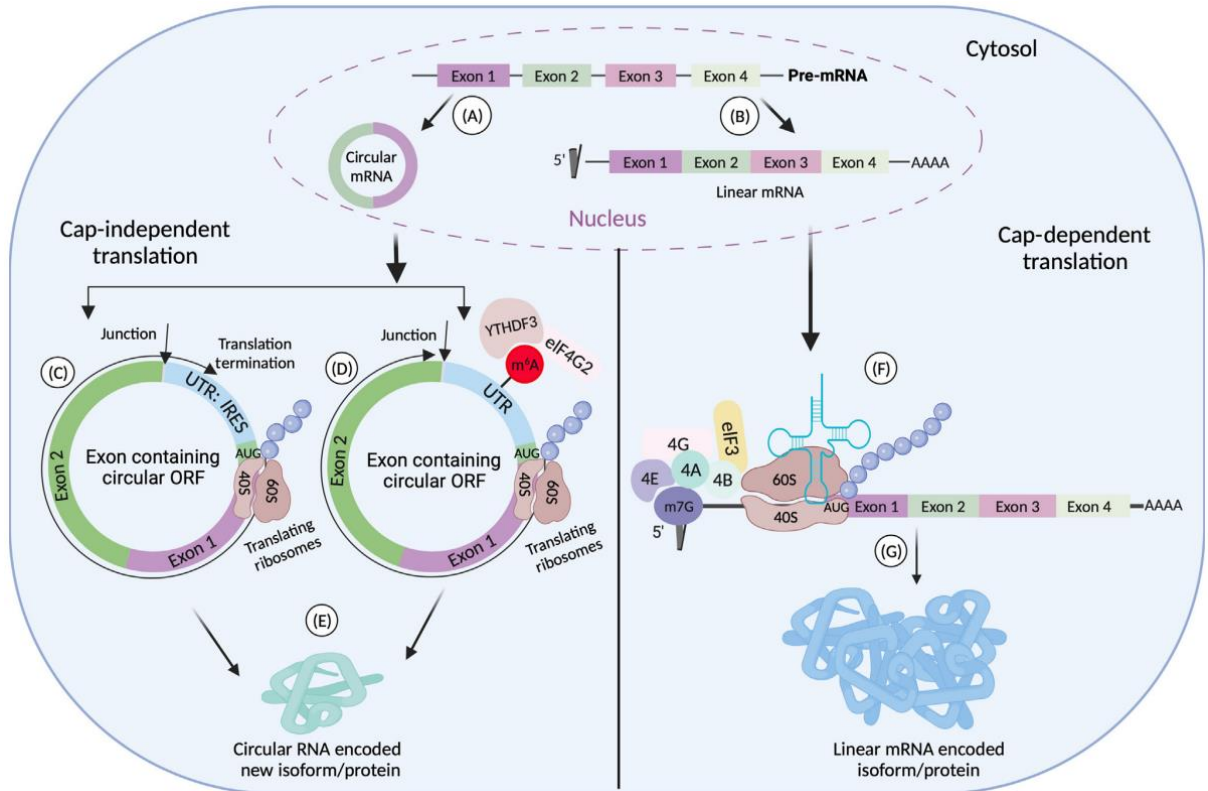
特征: 仅目的蛋白编码序列 (序列2) 能在体内复制



N Engl J Med: 382(25):2469-2471.

【缩略语】CSE: 病毒复制子来源的保守序列元件; SGP: 亚基因组启动子; UTR: 非编码区域

环状mRNA (circRNA)



Trends Mol Med. 2022 May;28(5):405-420.

IRES介导的蛋白翻译

1. circRNA的翻译不同于经典的帽结构依赖性翻译机制。circRNA缺乏帽结构，以内部核糖体进入位点（IRES）等结构元件实现蛋白的翻译；
2. IRES是RNA病毒5' UTR的组成部分，能够以帽独立的方式将40S核糖体招募到5' UTR来促进RNA的翻译；
3. 核糖体招募：IRES与标准的翻译起始因子（eIF）或IRES反式作用因子（ITAF）结合，完成核糖体的招募；
4. 起始密码子识别：IRES与40S核糖体亚基结合后，进一步识别并结合起始密码子，启动蛋白质的翻译。

环状RNA (circRNA) 序列设计

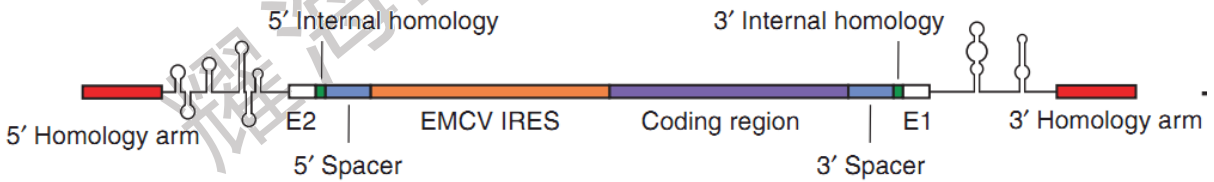
circRNA元件	生物学功能	设计策略
IRES	内部核糖体识别位点，调控circRNA的翻译。	筛选不同病毒来源的IRES序列，如EMCV、CVB3。
CDS	蛋白编码区，抗原、抗体或其他功能性蛋白的编码序列。	密码子优化可增加翻译水平，注意某些非最佳密码子可能在蛋白折叠中发挥作用。
内含子与外显子序列	在GTP催化下内含子自剪接，实现内含子以外序列的环化。	根据T4噬菌体胸苷酸合酶 (td)、鱼腥藻或四膜虫tRNA前体基因设计。
同源臂序列	提高RNA环化效率	在线性RNA前体两端添加同源臂序列 (~20 nt)

T4噬菌体PIE系统



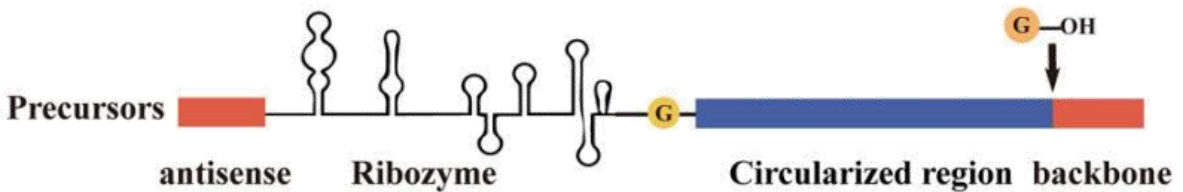
Nucleic Acids Res. 2021 Apr 6;49(6):e35.

鱼腥藻PIE系统



Nat Commun. 2018 Jul 6;9(1):2629.

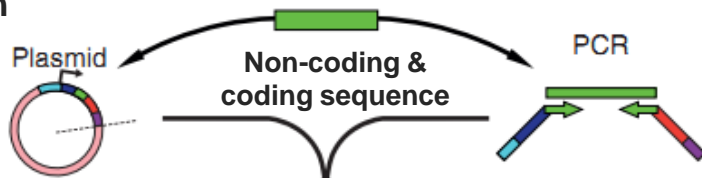
四膜虫PIE系统



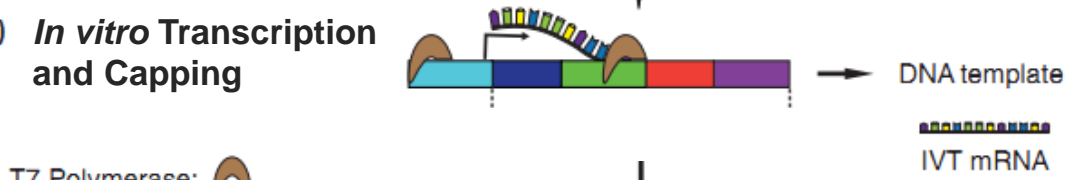
Nucleic Acids Res. 2023 Aug 11;51(14):e78.



IVT RNA的制备流程

(A) Sequence Design



(B) *In vitro* Transcription and Capping

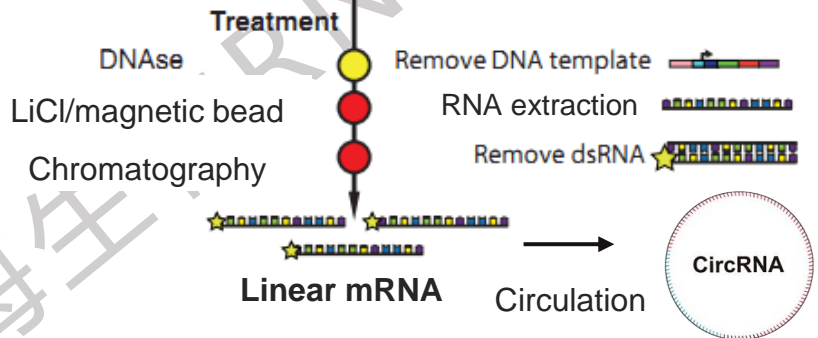


T7 Polymerase: 
T7 Promoter: 

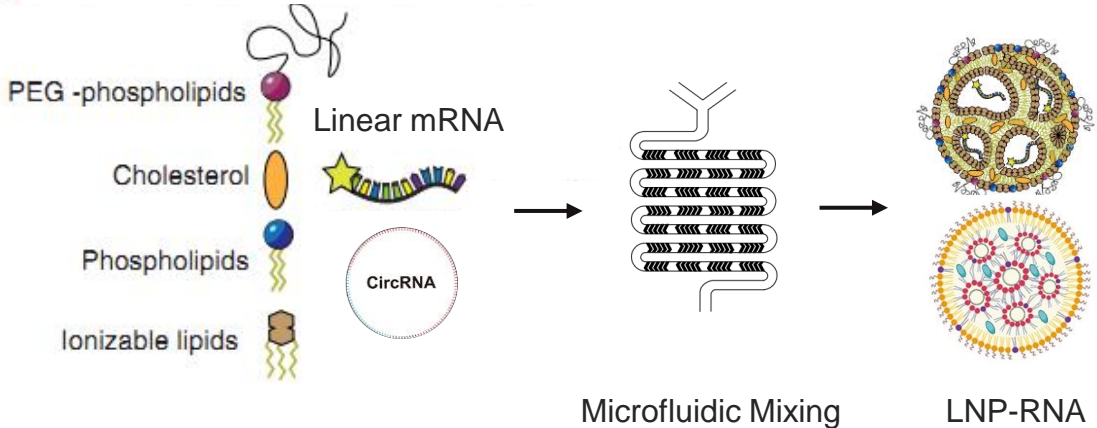


(C) Purification

Unwanted product: 
Avoid PRR recognition: 



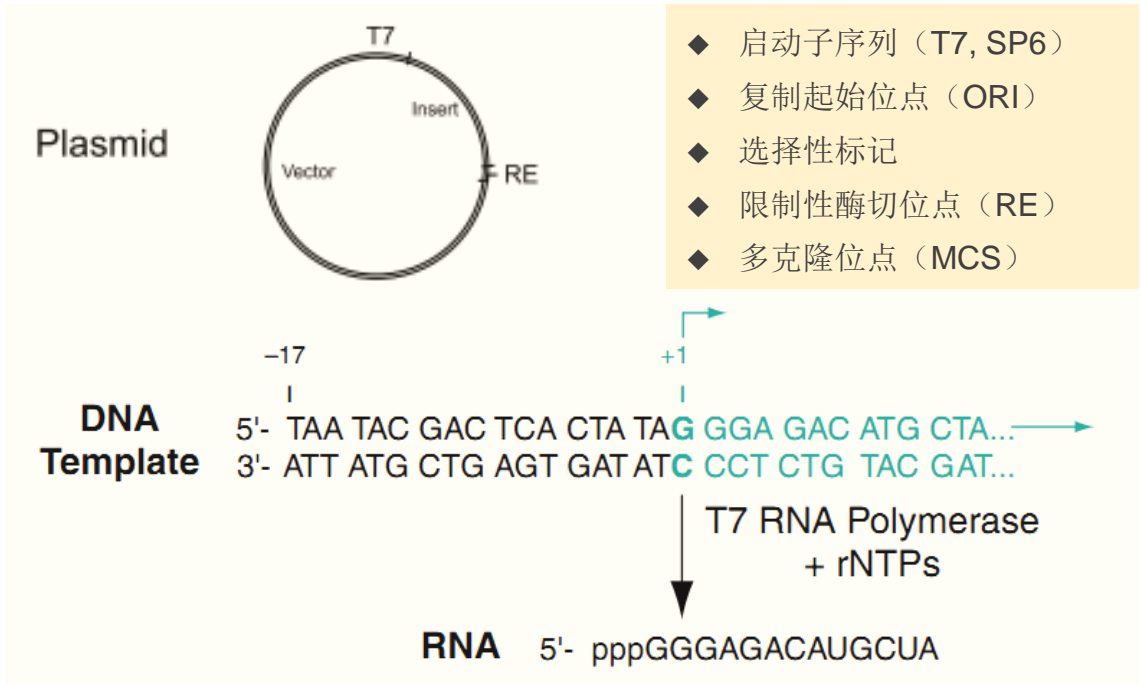
(D) LNP-RNA Encapsulation



Modified from <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.10.002>.

质粒模板设计和制备

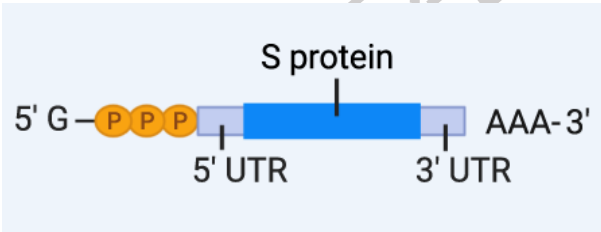
质粒载体必要元件



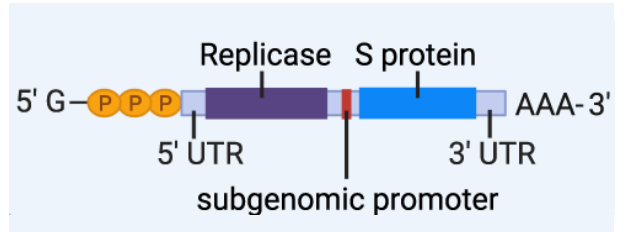
RNA Methods and Protocols.

不同IVT RNA序列元件

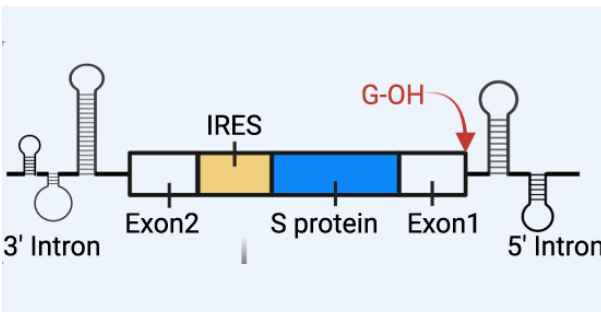
常规mRNA



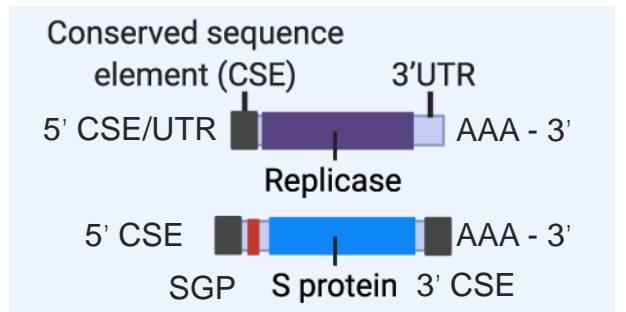
自复制mRNA (saRNA)



环状mRNA (circRNA)



反式扩增mRNA (taRNA)



Signal Transduct Target Ther. 7(1):94.

体外转录 (IVT)

体外转录反应组分

当前的体外转录 (IVT) 通常适用于常规mRNA (1000~4000 nt) 的制备, 未必适用于自复制mRNA (>9000 nt)。用于合成自复制mRNA的IVT反应体系需进行定制化开发和优化。

反应体系	各组分介绍
DNA模板	通常为带有相应启动子序列的线性化质粒或PCR产物, 溶解在RNase-free H ₂ O中。
二硫苏糖醇 (DTT)	DTT是一种还原剂, 在转录过程中维持酶的活性。
RNase抑制剂	抑制RNase的活性, 维持mRNA的稳定性。
T7 RNA聚合酶	与启动子序列对应的RNA聚合酶 (T7, SP6等), 催化DNA转录形成RNA。
Mg ²⁺	Mg ²⁺ 是RNA聚合酶的辅因子, 浓度过低会降低转录效率, 浓度过高导致RNA降解。
NTP	NTP作为底物, 是组成RNA的基本单元。
亚精胺	亚精胺能够稳定DNA-酶复合物, 刺激转录反应; 但过高浓度时存在抑制作用。
无机焦磷酸酶 (PPase)	IVT反应中加入PPase能够避免无机焦磷酸离子 (PPi) 的累积, 避免其与Mg ²⁺ 螯合形成沉淀, 从而保证一定的游离Mg ²⁺ 。

体外转录反应体系

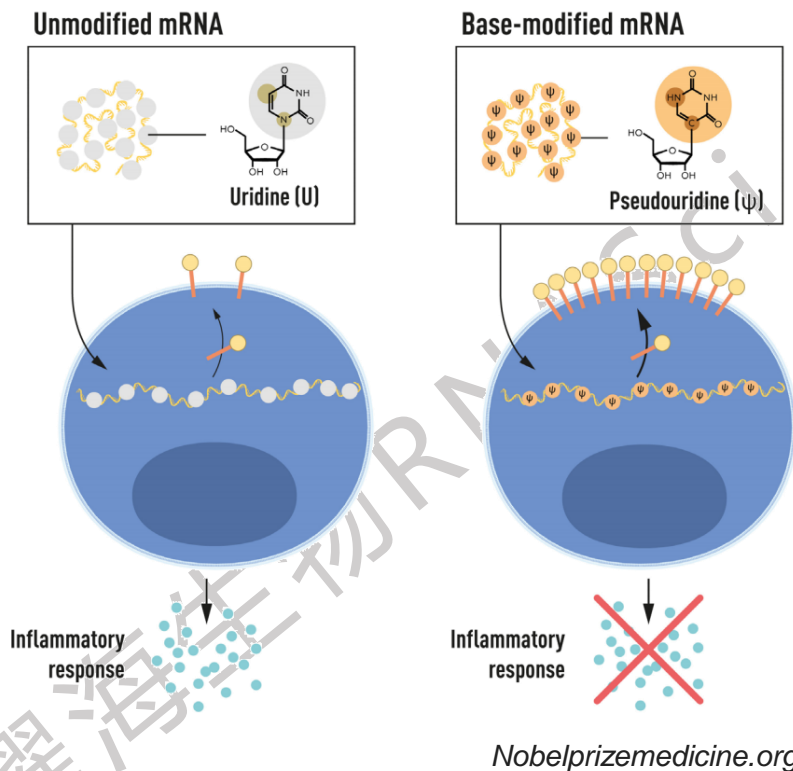
反应体系	推荐浓度 ^a	推荐浓度 ^b	推荐浓度 ^c	推荐浓度 ^d	推荐浓度 ^e
DNA模板	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg
HEPES	40 mM	-	-	-	-
TRIS-HCl	-	40 mM pH 7.0	40 mM pH 7.0	40 mM pH 7.41	40 mM pH 7.0
二硫苏糖醇 (DTT)	40 mM	10 mM	40 mM	40 mM	10 mM
RNase抑制剂	4 U	1 U/ µL	1 U/ µL	1 U/ µL	1 U/ µL
无机焦磷酸酶 (PPase)	-	0.002 U/µL	0.002 U/µL	0.002 U/µL	0.002 U/µL
T7 RNA聚合酶	100 U	4 U/µL	4 U/µL	4 U/µL	4 U/µL
醋酸钠 (NaOAc)	10 mM	-	-	-	-
Mg ²⁺	75 mM	46.8 mM	10 mM	10 mM	50.97 mM
NTP	10 mM	7.78 mM	7.78 mM	7.78 mM	7.78 mM
DMSO	-	10%	0	10%	10%
亚精胺	0.2 mM	2 mM	4 mM	2.27 mM	2 mM

a: Robin J Shattock等优化了IVT体系, 适用于高产量和高质量saRNA的合成; b-e: A.K. Blakney等开发的IVT体系, 适用于高产量(b), 高质量(c), 低dsRNA(d), 兼具产量和质量(e)的saRNA合成。

核苷酸修饰

2005年，Karikó和Weissman在*Cell*子刊*Immunity*上发表了关于核苷酸修饰mRNA的突破性成果。他们发现将假尿苷添加到mRNA中，有助于mRNA逃逸免疫系统攻击。2008年和2010年他们再次发表研究结果：与未经修饰的mRNA相比，碱基修饰的mRNA能显著提高蛋白的水平。

2023年10月2日，两位科学家被授予诺贝尔生理学或医学奖，以表彰他们在核苷碱基修饰方面的发现，从而开发出有效的mRNA疫苗来对抗COVID-19。



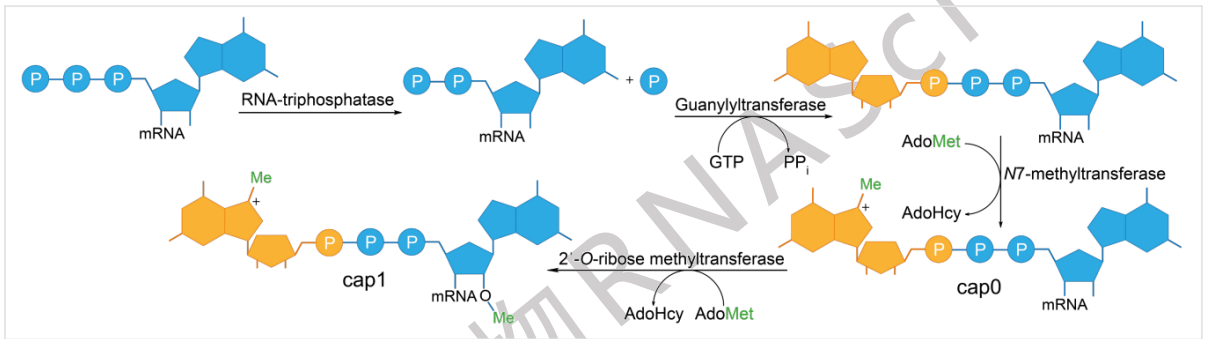
在常规mRNA的制备过程中，通常掺入修饰核苷来降低免疫原性、提高蛋白表达水平。目前常用的修饰核苷包括假尿嘧啶(ψ)、N1-甲基假尿嘧啶(m1ψ)、5-甲基胞嘧啶(m5C)等。

天然核苷	修饰核苷
UTP	假尿嘧啶(ψ), N1-甲基假尿嘧啶(m1ψ), 2-氧甲基化假尿嘧啶, 5-甲基尿嘧啶(m5U), 5-甲氧基尿嘧啶(5moU), 2-硫尿嘧啶(s2U), 5-羟基尿嘧啶(5-hoUTP), 5-羟甲基尿嘧啶(5-hmUTP), 5-羧基尿嘧啶(5-caUTP), 5-甲酰基尿嘧啶(5-FoUTP), Cy5荧光标记UTP(Cy5-UTP).
CTP	5-甲基胞嘧啶(m5C), 5-甲氧基胞嘧啶(5moC), 5-羟基胞嘧啶(5-hoCTP), 5-羟甲基胞嘧啶(5-hmCTP), 5-甲酰基胞嘧啶(5-FoCTP), 5-羧基胞嘧啶(5-caCTP)
ATP	6-甲基腺嘌呤(m6A), 1-甲基腺嘌呤(m1A)
GTP	1-甲基鸟嘌呤(m1G), 7-甲基鸟嘌呤(m7G), 噻吩鸟嘌呤(Thieno-GTP)

加帽方法（线性mRNA）

真核生物mRNA加帽过程

- ◆ 在RNA三磷酸酶作用下，mRNA 5'-端γ-磷酸基团被去除，生成5'-二磷酸RNA；
- ◆ 在鸟苷酸转移酶作用下，GTP中的GMP基团与5'-二磷酸 RNA连接；
- ◆ 在鸟嘌呤N-7甲基转移酶作用下，鸟嘌呤的N7位发生甲基化（甲基供体为S-腺苷甲硫氨酸 [SAM]），形成帽结构Cap 0（m7GpppNpNp）。
- ◆ 在2'-O-甲基转移酶作用下，mRNA第一个核苷酸的2'-O位发生甲基化，形成帽结构Cap 1（m7Gpppm2'NpNp）；mRNA第一个和第二个核苷酸的2'-O位均发生甲基化，形成帽结构Cap 2（m7Gpppm2'Npm2'Np）。



Beilstein J Org Chem. Dec 20:13:2819-2832.

酶法加帽（两步法）

酶法加帽，又称为两步法加帽，在体外转录后利用牛痘病毒加帽酶和2'-O-甲基转移酶完成。

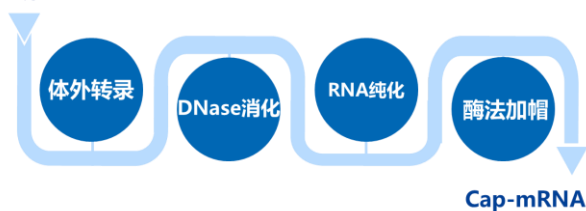
牛痘病毒加帽酶具有三种酶活性，包括RNA三磷酸酶、鸟苷酸转移酶和鸟嘌呤N-7甲基转移酶；在2'-O-甲基转移酶的催化下，可进一步形成帽结构Cap 1或Cap 2。

共转录加帽（一步法）

共转录加帽，又称为一步法加帽，在体外转录中添加帽类似物直接生成带帽结构的mRNA。

帽类似物的结构优化经历了三代变革，第二代帽类似物ARCA解决了反向加帽的问题；第三代帽类似物CleanCap可直接引入Cap 1，加帽率可达到90%以上。

线性化DNA



线性化DNA



加尾方法（线性mRNA）

酶法加尾（两步法）

酶法加尾，又称为两步法加尾，是在体外转录反应完成后，通过poly(A)聚合酶介导的酶促多聚腺苷酸化反应，在mRNA 3'末端添加poly(A)尾巴，这一过程以ATP为底物。

酶法加尾无法精确控制poly(A)的长度，形成的poly(A)尾均一性较差，这一缺陷限制了酶法加尾的广泛应用。

共转录加尾（一步法）

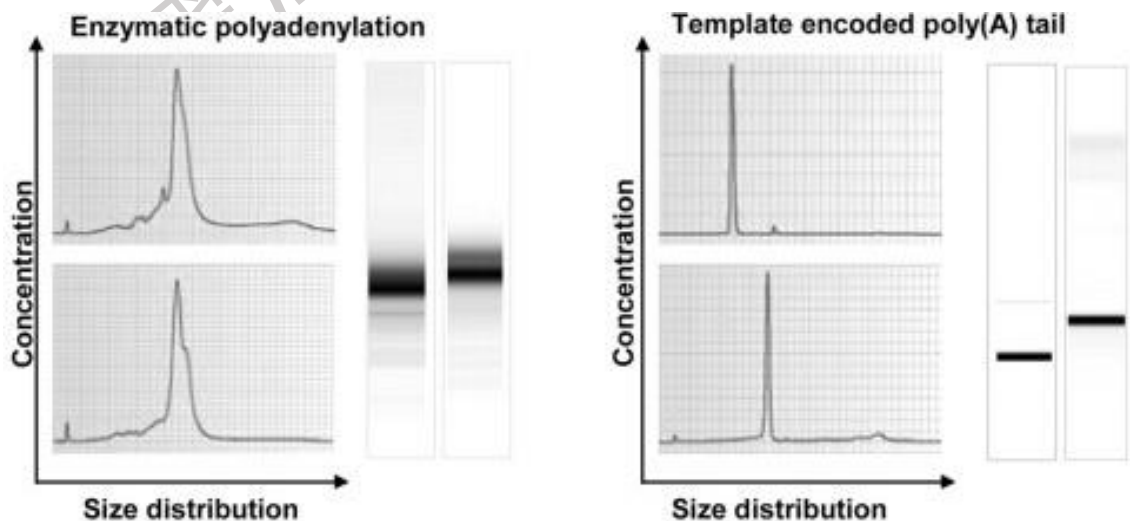
共转录加尾，是通过在质粒模板中添加一定长度的T序列（或分段式polyA编码序列），通过体外转录反应直接生成含poly(A)尾的mRNA。

共转录加尾产生的mRNA长度更可控。

酶法加尾和共转录加尾的比较

一项研究通过酶法加尾、共转录加尾的方法制备了mRNA，比较了两种方法对mRNA/poly(A)尾长度和均一性的影响。

结果显示，酶法加尾生成的mRNA表现出峰型模糊和条带拖尾的信号（左图：生物分析仪电泳图和凝胶电泳图）；而共转录加尾生成的mRNA峰型陡峭（右图：生物分析仪电泳图），条带也清晰可见，无弥散拖尾现象（右图：凝胶电泳图）。



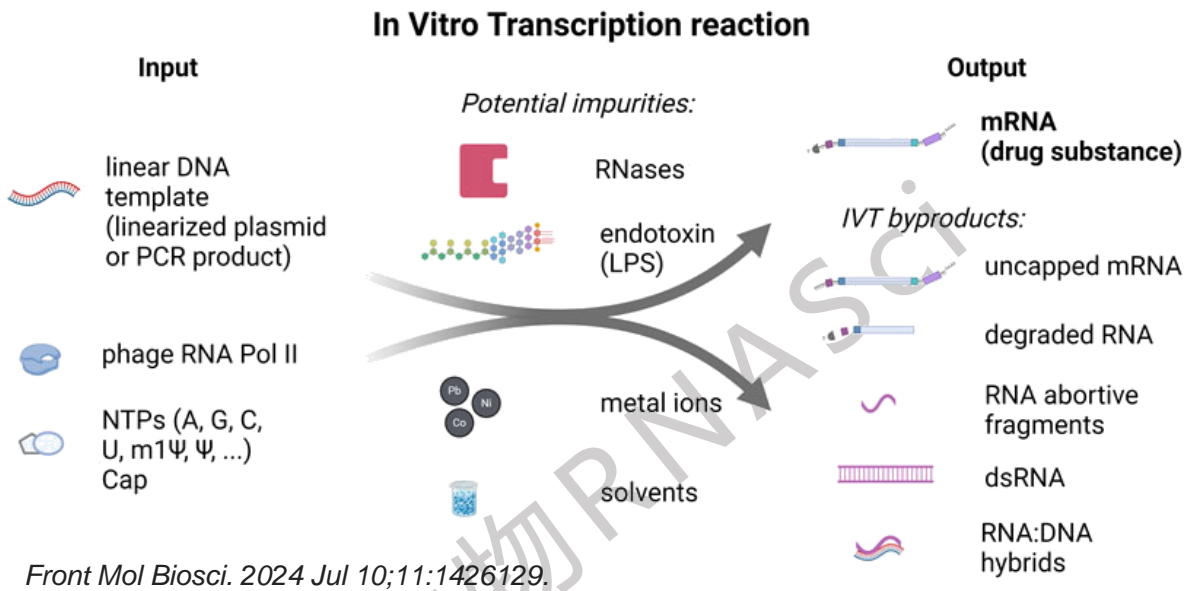
Blood. 2006 Dec 15;108(13):4009-17.

线性mRNA的纯化方法

IVT mRNA杂质

体外转录（IVT）是合成mRNA、自复制mRNA和反式扩增mRNA的优选方法。IVT反应体系中除含有所需的mRNA外，还包含模板DNA、NTP、酶、金属离子等未完全消耗的底物、以及IVT反应过程形成的副产物，如双链RNA（dsRNA）和截断的RNA片段等杂质。

选择合适的纯化方法制备高纯度的mRNA是保证样品质量和安全性的关键。



IVT mRNA纯化方法

氯化锂（LiCl）沉淀法

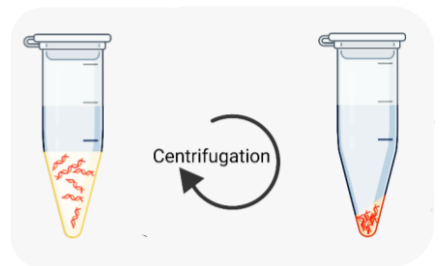
纯化原理：

在一定的pH条件下，锂离子能降低RNA分子间的同电相斥，实现RNA的聚集沉淀。沉淀后的RNA可以通过离心的方式分离，随后溶解得到纯的RNA。

氯化锂沉淀法能够去除蛋白、盐、NTP等杂质，纯化后的RNA样品可用于加帽/加尾反应、细胞转染等实验。

操作步骤：

- 1) 取IVT产物加入LiCl溶液，使得 mRNA溶液中LiCl最终浓度达到2.5M；
- 2) 将反应在-20°C下冷却30min；
- 3) 在离心机中以最高速度离心 15min，弃去上清液；
- 4) 用预冷的70%乙醇洗涤沉淀，以除去残留的盐；离心去除乙醇，开盖静置使乙醇完全挥发；
- 5) 将mRNA沉淀重悬于RNase-free溶剂中，注意不要让沉淀完全干燥，否则会变得难以重悬。

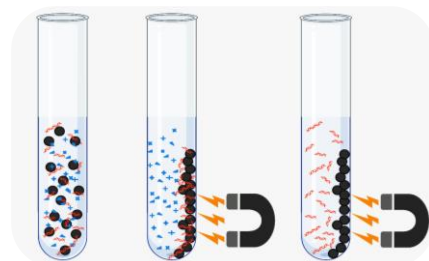


磁珠纯化法

纯化原理:

将羧基、oligo dT等功能性基团连接至磁珠，能够利用mRNA与羧基、oligo dT的结合特性富集mRNA。其中羧基基团能够与mRNA通过静电作用结合，oligo dT通过亲和特性与mRNA结合。

磁珠法能够去除蛋白、盐、NTP等杂质，纯化后的RNA样品可用于加帽/加尾反应、细胞转染实验。



色谱纯化法

纯化原理:

色谱法包括亲和层析、离子交换层析、体积排阻层析、疏水层析等，通过mRNA体积大小、或功能基团与mRNA或杂质间的亲和、电荷、疏水作用差异纯化mRNA。色谱纯化被认为是高纯度mRNA制备的金标准。

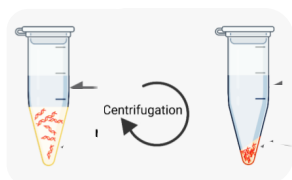
色谱法能够去除dsRNA、截断的RNA片段等影响mRNA免疫原性的杂质。色谱法是GMP级、高纯度mRNA样品纯化的首选方案。色谱纯化的mRNA样品可用于动物研究。

操作步骤:

- 1) 氯化锂沉淀法富集体外转录的mRNA产物，并将粗纯的mRNA样品以1: 9比例加入高盐上样缓冲液（10 mM TE, 0.5 M NaCl）中；
- 2) 亲和层析二次纯化mRNA：将mRNA样品上样至Oligo dT层析柱，采用0.5 M NaCl、0.1 M NaCl逐级梯度洗脱，最后经10 mM TE缓冲液洗脱mRNA，获得含mRNA的样品；
- 3) 离子交换层析三次纯化mRNA：将亲和层析收集的mRNA样品上样至DEAE阴离子柱，通过淋洗液（50 mM Tris, 3 M NaCl, 20 mM EDTA）洗去未结合的杂质，然后经洗脱液（20 mM Tris, 20 mM BTP, 50 mM NaCl, 20 mM甘氨酸）进行pH梯度洗脱，所述pH梯度为pH 7.2-pH 11，进一步去除mRNA中的dsRNA杂质，收集高度纯化的mRNA样品。

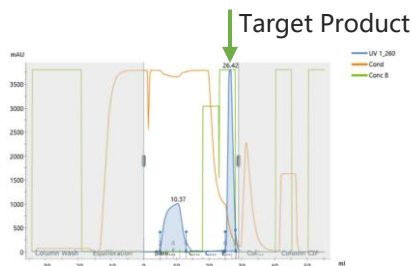
Step1:

LiCl Precipitation



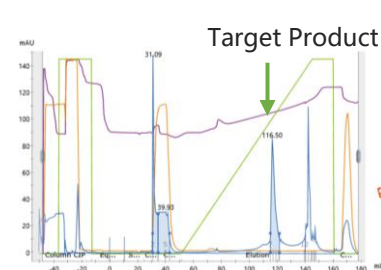
Step2:

Oligo dT Chromatography



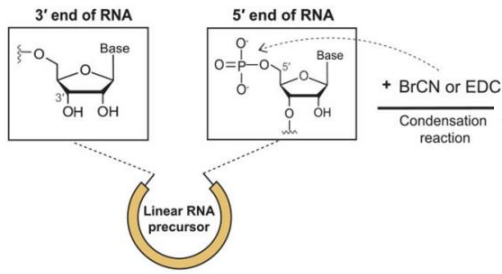
Step3:

Ion-exchange Chromatography

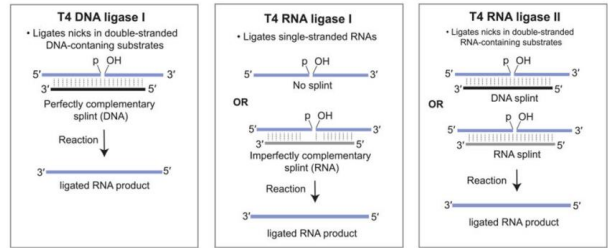


体外环化（环状RNA）

化学连接法

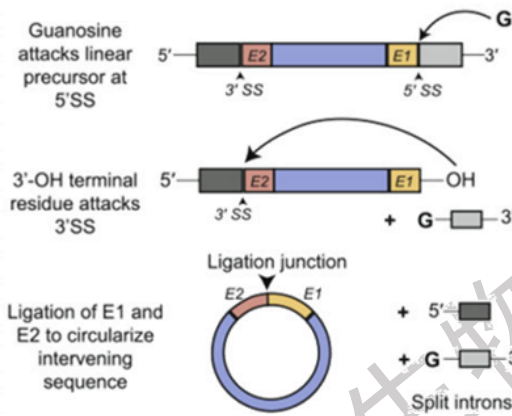


酶法连接

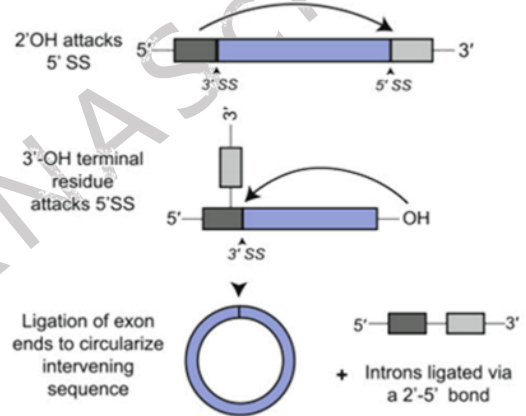


排列内含子-外显子（PIE法/核酶法）

I 型内含子



II 型内含子



Methods. 2021 Dec;196:85-103.

不同环化方法的比较

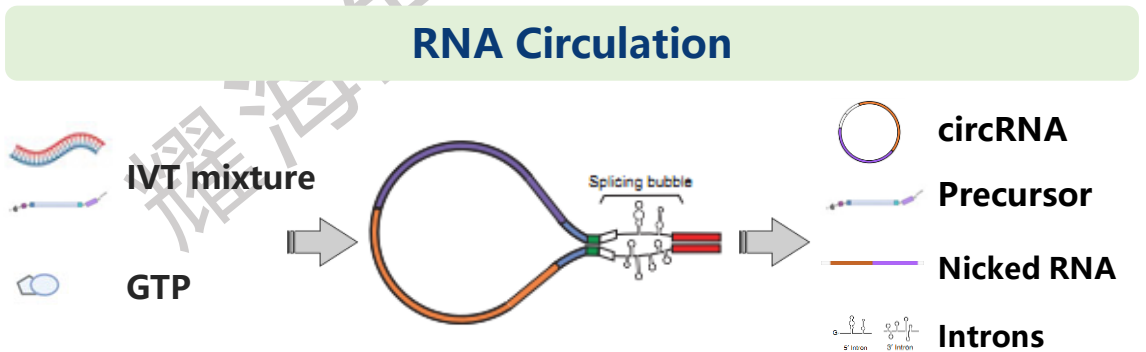
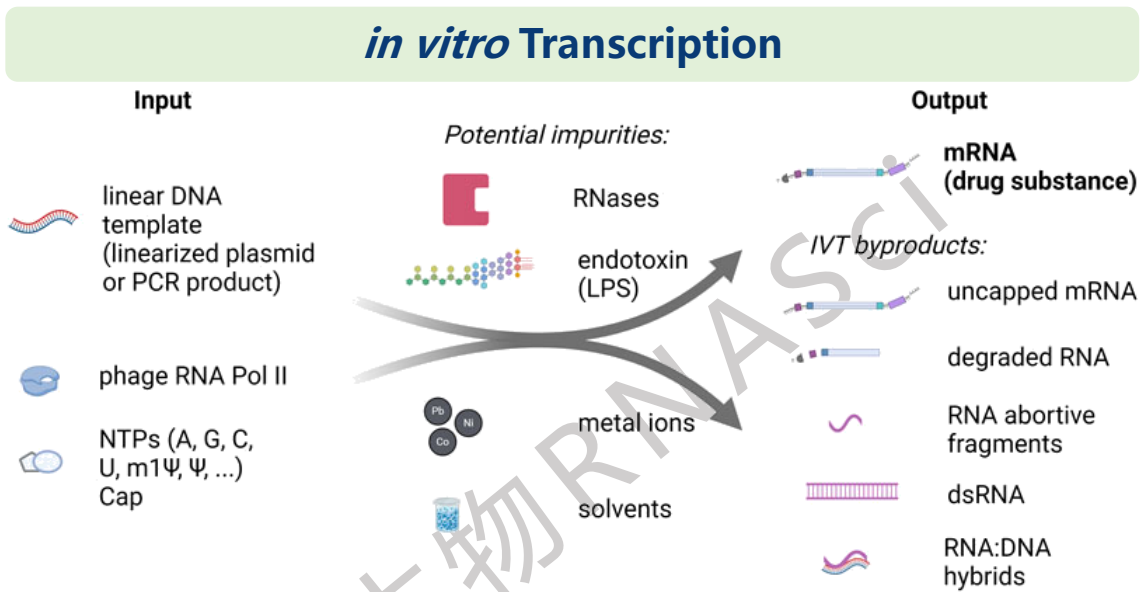
RNA环化方法	优势	劣势
化学连接法	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 无外源序列引入 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 反应步骤复杂 ◆ 环化效率低，不适合较长RNA ◆ 存在潜在毒性
酶法连接	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 无外源序列引入 ◆ 低免疫原性 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 反应步骤复杂 ◆ 需借助DNA或RNA夹板 ◆ 需借助连接酶 ◆ 较低的环化效率
PIE法（核酶法）	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 流程简单 ◆ 适用于较长的RNA ◆ 环化效率高 ◆ 低免疫原性 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 基于I型内含子的外源序列瘢痕

环状mRNA的纯化方法

环状RNA相关杂质

基于PIE系统制备环状RNA (circRNA) 的流程包括：以线性化DNA为模板，通过体外转录 (IVT) 合成线性mRNA前体，然后在GTP的催化下，I型内含子自剪接形成circRNA。

circRNA中的杂质包括IVT相关杂质（如模板DNA、NTP、酶、金属离子等未完全消耗的底物、以及IVT反应过程形成的副产物）、环化相关副产物（如线性RNA前体、nicked RNA、内含子序列）。

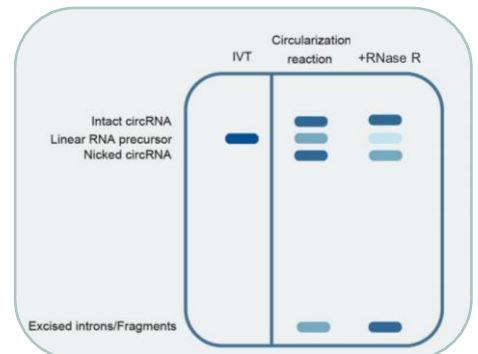


环状mRNA纯化方法

RNase R消化法

RNase R是一种核酸外切酶，从3'-5'方向水解线性RNA。circRNA的闭合结构可以抵抗RNase R的消化。

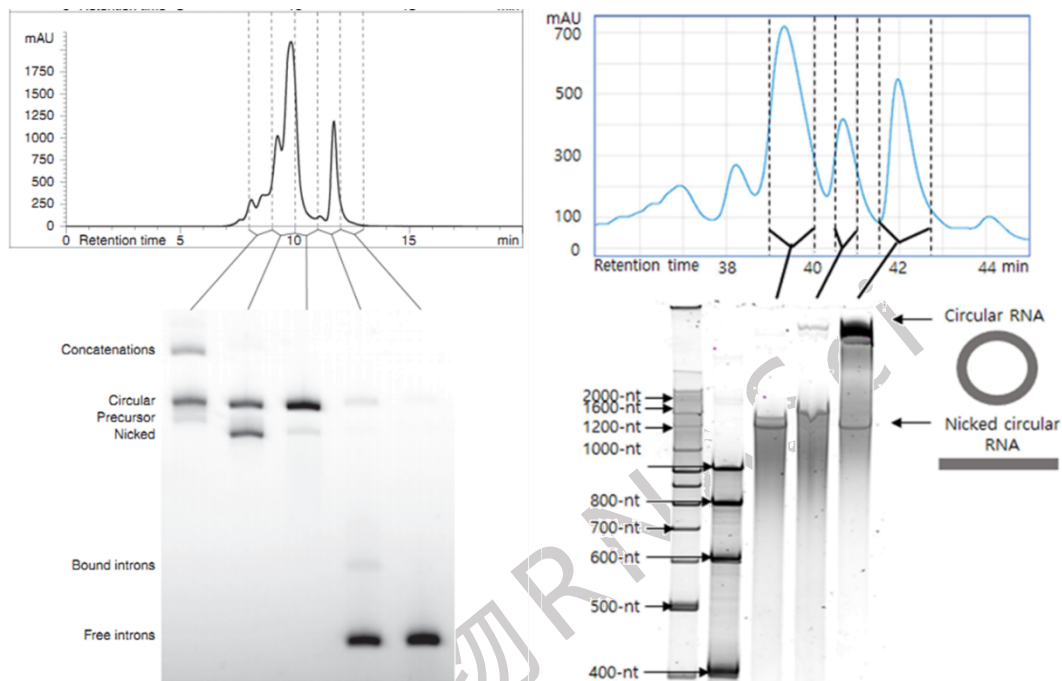
RNase R去除线性RNA的能力有限，通常和其他纯化方法结合使用。



高效液相色谱法

高效液相色谱（HPLC）能够基于RNA分子大小、极性等差异，高效快速分离环状RNA及相关杂质。HPLC具有高灵敏度、高精密度、工艺可放大等特点。

SEC-HPLC 和 RP-HPLC 均已成功应用于PIE circRNA的纯化。



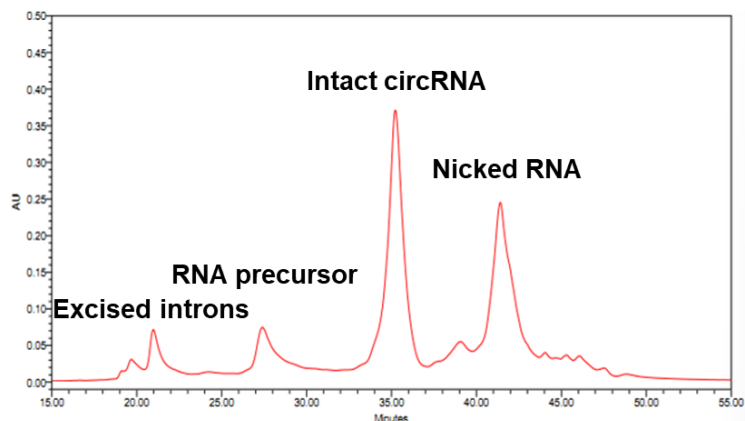
Nat Commun. 9(1):2629. *Mol Ther Nucleic Acids.* 33:587-598.

图示 基于SEC-HPLC (左) 和RP-HPLC (右) 纯化circRNA

耀海生物circRNA纯化平台

与SEC-HPLC相比，RP-HPLC对circRNA与杂质的分离度更高。

耀海生物基于RP-HPLC建立了稳健、可放大的circRNA分析和纯化条件，能有效分离circRNA、线性RNA前体和nicked RNA。我们实现了纯度达90%以上的circRNA的快速制备。



LNP-RNA的包封方法

脂质纳米颗粒（LNP）是目前领先的非病毒递送载体，作为COVID-19 mRNA疫苗的一部分，LNP在临床转化方面取得诸多令人兴奋的进展。LNP具有体积小、生物相容性和降解性等特征，可有效助力mRNA在癌症疫苗、传染病疫苗、蛋白质替代疗法、基因编辑和罕见病治疗等方面的广阔前景。

LNP-RNA包封方法

目前实验室主流的制备LNP的方法包括乙醇稀释法、手动混合法、T型混合法和微流控法。

手动混合法

手动混合法，也成为移液器混合法，是实验室制备小批量LNP的最常用方法。手动混合法操作简单、成本低，通常适用于~6/18至~30/90（ $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ ，乙醇/水溶液）规模。手动混合法制备的LNP-RNA可用于体外实验。

操作步骤:

- 1) 脂质和mRNA样品的制备：将脂质组分溶解于乙醇中，mRNA溶解于酸性水溶液中；
- 2) 使用移液器将mRNA缓冲液快速加入脂质混合溶液中，立即上下快速吹打20~30 s，完成手动混合操作；
- 3) 透析去除乙醇、并换液至PBS缓冲液中。



涡旋混合法

涡旋混合法，是在强烈的涡旋作用下快速混合mRNA与脂质溶液以形成纳米颗粒。相比手动混合法，涡旋混合法适用于稍大批量LNP的包封，适用于~20/60至~40/120($\mu\text{L}/\mu\text{L}$ ，乙醇/水溶液)规模。涡旋混合法常用于体外研究样品的制备。

操作步骤:

- 1) 脂质和mRNA样品的制备：将脂质组分溶解于乙醇中，mRNA溶解于酸性水溶液中；
- 2) 将含mRNA的水相在旋涡混合器上以中速旋转，然后将含脂质-乙醇混合液添加到涡旋中的水相中，将混合液继续旋转20~30s；
- 3) 透析去除乙醇、并换液至PBS缓冲液中。



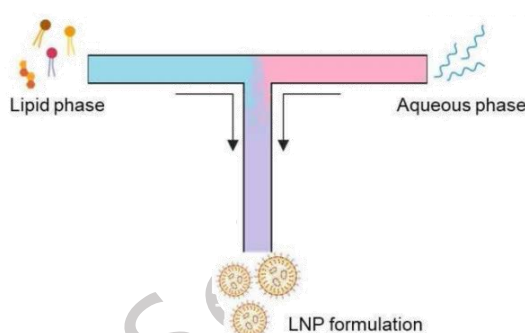
T型混合法

相比实验室常用的移液器混合和涡旋混合法，T型混合器更适合较大规模的LNP-RNA包封。T型混合器可以稳定控制脂质相和水相的流速，工艺流程较为可控。

然而，T型混合器通道较短，混合时间短，易形成不均匀的纳米颗粒脂质和脂质聚集体。

操作步骤：

- 1) 制备含脂质组分的乙醇、含mRNA的水相；
- 2) 将两相溶液连接至单一蠕动泵的双泵头；
- 3) 设置泵流速，将两相溶液按一定比例泵入T型混合器的入口；
- 4) 收集的样品经透析去除乙醇，最终保存在PBS缓冲液中。



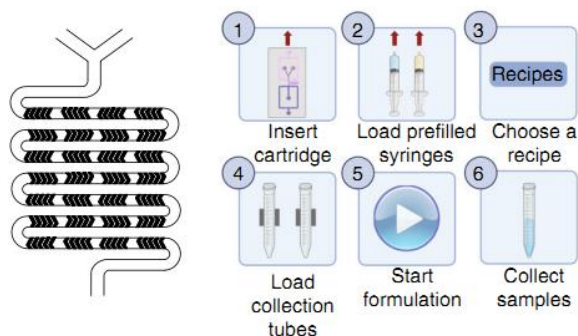
微流控混合法

实验室通常使用自制的定制微流控混合装置或商业混合系统（如NanoAssemblr）。有机相和水相被泵入两个入口，由人字形结构引起的混沌湍流导致两相快速混合，从而产生具有高度均匀的纳米颗粒。

微流控包封适用于1-20mL（如NanoAssemblr Ignite）至0.01-1L（如NanoAssemblr Blaze）的实验室规模以及中试生产规模。使用微流控制备LNP的最大优势为质量可控、且重现性高。微流控制备的LNP-RNA样品适用于动物体内研究和临床研究。

操作步骤：

- 1) 制备含脂质组分的乙醇、含mRNA的水相；
- 2) 将两相溶液分别转移至注射器中，去除气泡后接通至微流控设备；
- 3) 设置微流控参数：总进样量、乙醇相和水相的流速、排废体积；
- 4) 收集的样品经透析去除乙醇，最终保存在PBS缓冲液中。



不同LNP-RNA包封方法的比较

包封方法	优势	劣势
乙醇稀释法 (移液器或涡旋混合)	<ul style="list-style-type: none">◆ 操作简单◆ 成本低	<ul style="list-style-type: none">◆ 重复性差◆ 包封效率较低◆ 粒径不可控◆ 仅适合实验室规模
T型混合器	<ul style="list-style-type: none">◆ 重复性较高◆ 包封效率较高◆ 粒径相对可控	<ul style="list-style-type: none">◆ 流速高混合时间短◆ 不适合实验室规模◆ 粒径分布适中
微流控混合	<ul style="list-style-type: none">◆ 重复性较高◆ 包封效率较高◆ 粒径相对可控◆ 分散系数低◆ 适用于实验室和工业化规模	<ul style="list-style-type: none">◆ 成本较高

耀海生

脂质组分用量计算

脂质纳米颗粒（LNP）的成功是RNA药物开发的重大突破，LNP主要组分包括可电离阳离子脂质、PEG脂质、磷脂和胆固醇。

当前获批上市的RNA-LNP产品包括：治疗转甲状腺素蛋白淀粉样变性（hATTR）的小干扰RNA药物Onpattro（patisiran）、COVID-19 mRNA疫苗（以辉瑞和Moderna为代表）、以及Moderna的呼吸道合胞病毒（RSV）疫苗mRNA-1345、Arcturus/CSL开发的1款自复制RNA（saRNA）疫苗。

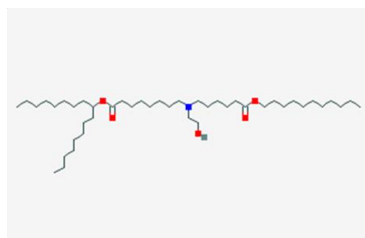
热门RNA-LNP产品的LNP组分如下：

RNA Product	mRNA-1273	BNT162b2	ARCT-154	Patisiran
Drug class	mRNA vaccine	mRNA vaccine	Self-amplifying RNA vaccine	RNA Interference (RNAi)
Brand name	Spikevax	Comirnaty	Kostaive	Onpattro
Company	Moderna	BioNTech/Pfizer	CSL/Arcturus/M eiji	Alnylam
Ionized lipid	SM-102	ALC-0315	ATX-126	DLin-MC3-DMA
Phospholipid	DSPC	DSPC	DSPC	DSPC
Cholesterol	Cholesterol	Cholesterol	Cholesterol	Cholesterol
PEG-lipid	PEG2000-DMG	ALC-0159	PEG2000-DMG	PEG2000-DMG
Molar ratio	50:10:38.5:1.5	46.3:9.4:42.7:1.6	50:7:40:3	50:10:38.5:1.5

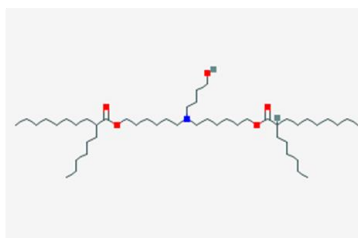
可电离阳离子脂质（Ionizable Cationic Lipid）是LNP的关键组分之一，通过静电作用与带负电荷的RNA结合，形成稳定的复合物。同时，可电离阳离子脂质可以促进LNP释放RNA到细胞质。

阳离子脂质是LNP中占比最大的组分（摩尔比约50%），也是企业关于LNP的主要创新点。几款热门RNA-LNP产品中的阳离子脂质结构如下：

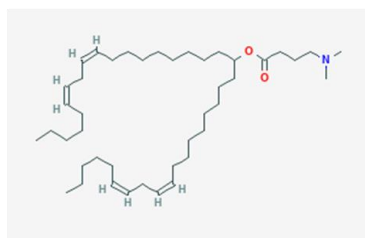
SM-102



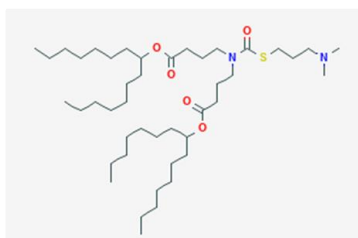
ALC-0315



DLin-MC3-DMA



ATX



脂质-乙醇溶液配制

阳离子脂质 ALC-0315 (BioNTech BNT-162b2)

名称	摩尔比%	分子量	1 mM投放量 (mg/L)
ALC-0315	46.3	766.3	354.80
DSPC	9	790.1	71.11
Cholesterol	42.7	386.7	165.12
ALC-0159	1.6	2464.2	39.43
无水乙醇		1000 ml*	

阳离子脂质 SM-102 (Moderna mRNA-1273)

名称	摩尔比%	分子量	1 mM投放量 (mg/L)
SM-102	50	710.2	355.10
DSPC	10	790.1	79.01
Cholesterol	38.5	386.7	148.86
PEG2000	1.5	2509.2	37.64
无水乙醇		1000 ml*	

阳离子脂质 D-LIN-MC3 (Alynam Onpattro)

名称	摩尔比%	分子量	1 mM投放量 (mg/L)
D-LIN-MC3	50	642.1	321.05
DSPC	10	790.1	79.01
Cholesterol	38.5	386.7	148.86
PEG2000	1.5	2509.2	37.64
无水乙醇		1000 ml*	

备注: * 总体积1000ml供参考, 通常实验室实际配液体积较少, 现用现配【阳离子脂质易氧化, 建议分装后冻存, 现用现配。其它脂质可用乙醇配置为高浓度母液, 保存在4°C或者-20°C】。

LNP封装常用的脂质浓度为8 mM、12 mM和16 mM。

RNA浓度计算

氮磷比（N/P）是RNA-LNP包封中的常用参数，用来计算核酸和脂质的浓度比。

- ◆ 每个碱基含有一个磷酸根，1 mol的核糖核苷酸包含1 mol的磷酸基团。核糖核苷酸的平均分子量为339.5，形成RNA脱水聚合后计算均值为320.5 g/mol。
- ◆ 脂质中以可电离脂质比例计算氮原子数，每个可电离脂质包含1个氮原子（D-LIN-MC3、ALC-0315、SM-102）。以可电离脂质占比50%计算，每摩尔总脂质中包含0.5 mol的氮原子。

$$N/P = \frac{0.5 \times \text{脂质摩尔数}}{\text{RNA摩尔数}}$$

N/P=6

每摩尔（mol）总脂质包封的RNA量为： $\frac{0.5 \times 1}{6} \times 320.5 = 26.71 \text{ g}$

每毫摩尔（mmol）总脂质包封的RNA量为：26.71 mg

考虑到水相与乙醇相的流速比为3:1，每mM总脂质对应使用的RNA浓度为： $\frac{26.71}{3} \text{ mg/l} = 8.90 \text{ ng/}\mu\text{l}$ ；

根据实际使用的脂质浓度（mM）即可换算得到对应的RNA浓度。

常用的脂质-RNA浓度表

碳氮比（N/P）		6			8	
脂质浓度（mM）	8	12	16	8	12	16
流速比	3	3	3	3	3	3
RNA浓度（ng/μl）	71.23	106.84	142.45	53.42	80.12	106.83

微流控包封流程

我们以Ignit为例描述LNP-RNA包封的详细流程，Ignit是Precision NanoSystems（PNI）的Nanoassembler平台推出的微流控混合仪，适用于LNP、脂质体等纳米药物的制备。

PNI微流控设备可以实现纳米颗粒组分在纳升水平以毫秒混合，高效保证混合效果。通过结合优化、精确的泵送和独特的微流体混合特性，能够快速制备纳米药物。



耀海生物RNASci平台微流控包封设备

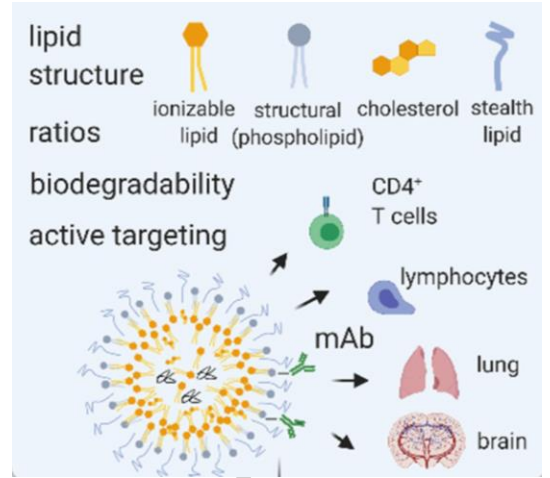
微流控包封流程：

- 1) 料液准备：按一定用量配置水相和有机相；水相包含缓冲液和RNA，有机相为一定比例的脂质混合物：阳离子脂质、中性脂质、胆固醇和PEG 脂质；
- 2) 分别将水相溶液和有机相溶液吸入3 ml注射器中，并排出注射器中的空气。将注射器出口和样品导入管连接，并固定在注射泵上；
- 3) 仪器设置，设置总流速（TFR）、总体积、水相/有机相流速比（FRR）、排废体积；
- 4) 运行仪器，并用收集管收集样品；
- 5) 通过超滤或透析经LNP-RNA换液至特定缓冲液。

抗体偶联LNP (Ab-LNP) 平台

信使RNA (mRNA) 在疫苗和蛋白质替代疗法等领域成为新的治疗方案，但基于脂质纳米颗粒 (LNP) 的mRNA递送系统具有肝脏偏好性。而对于治疗性mRNA来讲，实现其靶向递送是首要目的。

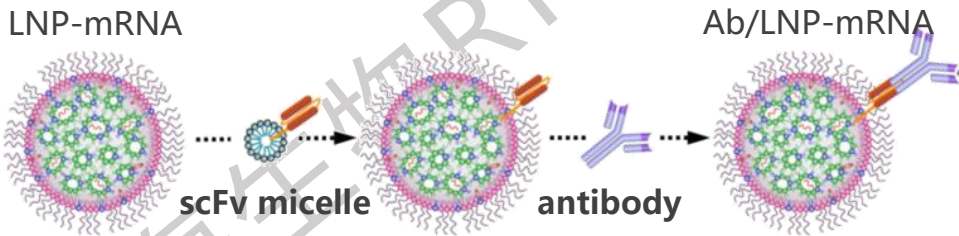
近两年研究表明，通过单克隆抗体偶联LNP (Ab-LNP) 的策略能够将mRNA成功递送至靶细胞。在这一领域，美国宾夕法尼亚大学Drew Weissman (诺奖得主)、Michael J Mitchell 和 Hamideh Parhiz等发表多篇高质量文章。



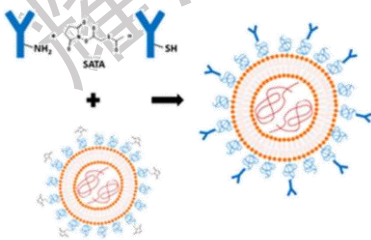
Biomedicines 2021, 9(5), 530.

Ab-LNP偶联方式

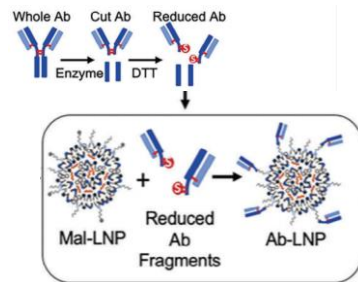
ASSET (锚定二抗scFv靶向平台)



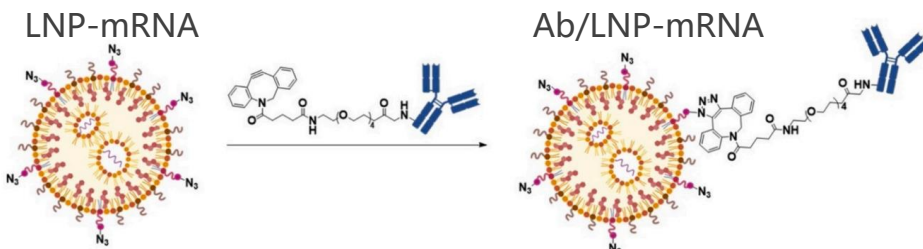
SATA-马来酰亚胺偶联法



巯基-马来酰亚胺偶联法



SPAAC点击化学法



质粒模板的质量属性

质控类别	检测项目	检测方法	科研级	临床级
鉴别	外观	灯检	√	√
	PH	电位法	√	√
	DNA序列确认	Sanger测序	--	√
	限制性内切酶图谱	琼脂糖凝胶电泳	√	√
浓度	DNA浓度	UV260	√	√
纯度及杂质		CE-LIF	--	√
	质粒超螺旋比例	AEX-HPLC	--	√
		琼脂糖凝胶电泳	√	√
	质粒纯度	A260/280	√	√
	宿主DNA残留	qPCR	--	√
	宿主RNA残留	逆转录-qPCR	--	√
	宿主蛋白残留	ELISA	--	√
	卡那霉素残留	ELISA	--	√
安全性	细菌内毒素检查	凝胶法	--	√
		动态显色法	√	--
	微生物限度	计数法	--	√
	无菌	薄膜过滤法	--	√

线性mRNA的质量属性

质控类别	检测项目	检测方法	科研级	临床级
鉴别	mRNA序列	NGS	--	√
	Poly(A)尾产物长度	CE-LIF	--	√
		酶切、LC-MS	--	√
浓度	mRNA浓度	UV260/280	√	√
完整性	mRNA完整性	毛细管电泳	--	√
		毛细管凝胶电泳	--	√
		琼脂糖凝胶电泳	√	√
	产物相关杂质-聚集体	SEC-HPLC	--	√
	产物相关杂质-RNA片段	RP-HPLC	--	√
纯度及杂质	mRNA加帽率	酶切、CGE	--	√
		酶切、RP-LC-MS/MS	--	√
	双链RNA残留	ELISA	--	√
	宿主DNA残留	qPCR	--	√
	宿主蛋白残留	ELISA	--	√
安全性	细菌内毒素	凝胶法	√	√

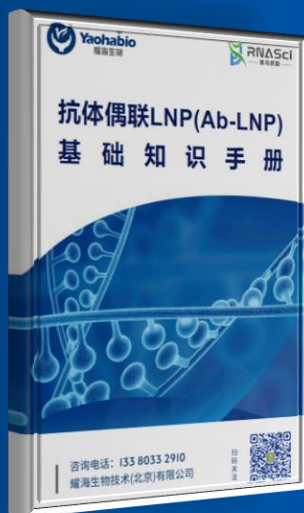
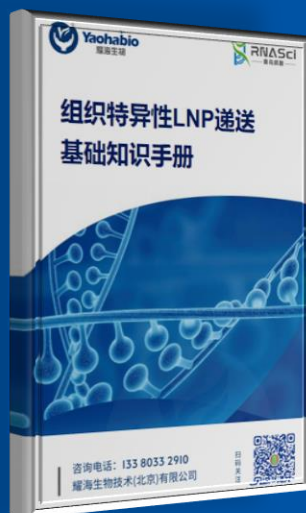
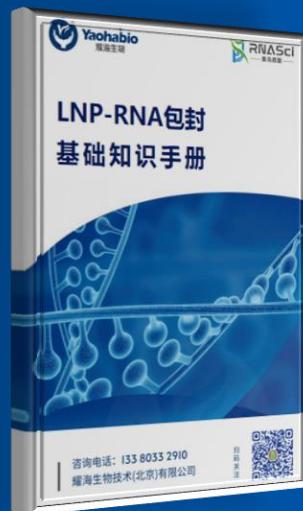
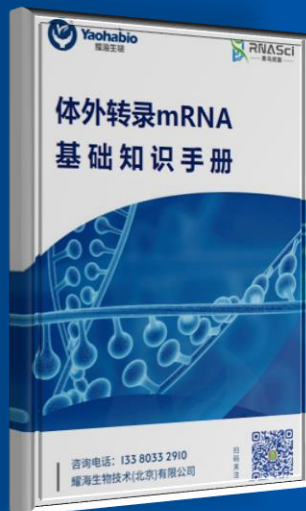
环状mRNA的质量属性

质控类别	检测项目	检测方法	科研级	临床级
	外观	灯检	√	√
	pH	电位法	√	√
	circRNA序列	Sanger测序	--	√
鉴别	circRNA环化位点	Sanger测序, RT-PCR	--	√
	RNase R耐受性	RNase R消化	√	√
浓度	circRNA浓度	A260	√	√
		A260/A280	√	√
	circRNA纯度	毛细管凝胶电泳	--	√
纯度及杂质		HPLC	--	√
		琼脂糖凝胶电泳	√	√
	产物相关杂质-nicked RNA, 线性RNA前体, 内含子	HPLC	--	√
	双链RNA残留	ELISA	--	√
	DNA模板残留	qPCR	--	√
安全性	细菌内毒素	凝胶法	√	√

LNP-RNA的质量属性

质控类别	检测项目	检测方法	科研级	临床级
RNA相关鉴别与纯度		参考【线性mRNA或circRNA质控部分】		
鉴别	LNP组分鉴别	CAD-HPLC	--	√
含量	LNP组分含量	CAD-HPLC	--	√
浓度	包封率	荧光法	√	√
	渗透压	--	√	√
	PH	--	√	√
一般理化性质	Zeta 电位	马尔文粒度仪	√	√
	LNP-mRNA粒径	DLS	√	√
	多分散系数 (PDI)	马尔文粒度仪	√	√
安全性	细菌内毒素	凝胶法	√	√
	异常毒性	豚鼠法	--	√

IVT RNA & LNP 系列手册



联系方式

电话：133 8033 2910

邮箱：CRO@yaohaibio.cn

网站：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

