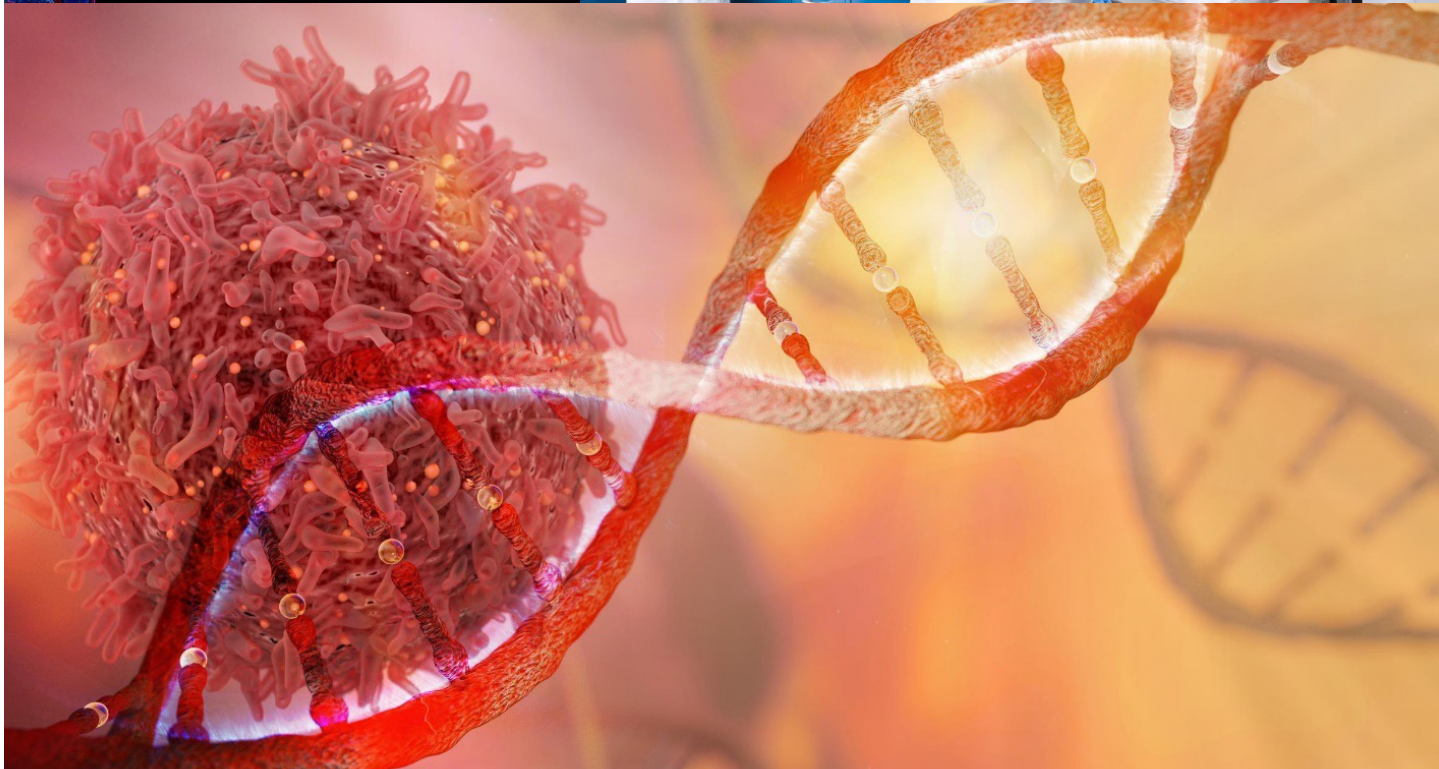
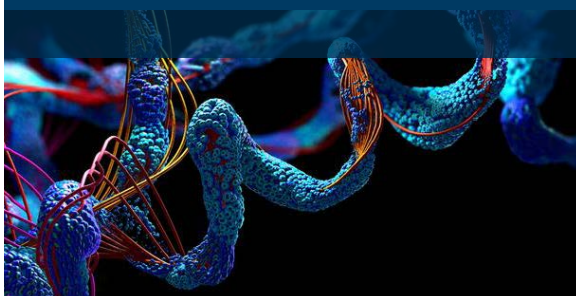


寡核苷酸工作流程资源指南



用于短链核酸和 mRNA 分析的 端到端工作流程解决方案

从研发到 QC / 生产



短链合成寡核苷酸（如小干扰 RNA、反义寡核苷酸、适配体和 CRISPR 向导）作为基因治疗中的一种新型药物获得了广泛的关注，并迅速发展。在过去三年中，COVID-19 mRNA 疫苗的成功引起了学术和制药行业的极大关注。因此，在这些核酸和 mRNA 疫苗产品的开发和表征中，对稳定的分析 QC 方法的需求日益增长，机会也越来越多。常见属性包括核酸样品的分子量、纯度和解链温度 (Tm)。此外，mRNA 的 5' 端二核苷酸修饰（加帽）、3' 端 poly(A) 尾及其序列对转录过程都非常关键，应充分表征。

通过毛细管电泳 (CE) 进行核酸（短链）分析

众所周知，多种小（短链）RNA 类型，如 microRNA (miRNA)、小干扰 RNA (siRNA) 和 piwi 相互作用 RNA (piRNA) 参与基因沉默，以及其他潜在的基因调控机制。因此，准确测量这些样品的质量可帮助确保下游应用的成功，并可用于优化小 RNA 的分离和纯化方案。

安捷伦片段分析仪系统是平行毛细管电泳仪器，设计用于可靠、准确的核酸样品评估（图 1）。提供多种应用试剂盒。它们关注小 RNA 和 miRNA 质量控制，集中于 200 个核苷酸 (nt) 及以下的窄范围，可实现小 RNA 的高分离度分离。

Agilent Oligo Pro II 系统是一款自动化平行 CE 仪器，专为单链 DNA (ssDNA) 和 RNA 寡核苷酸的高通量分离和纯度分析而设计。Oligo Pro II 系统使用变性凝胶，使单链核酸样品可通过毛细管迁移并按分子量分离，为寡核苷酸提供高分辨率的直接检测。紫外吸收光谱用于实现样品的无染料检测。该系统可以适应各种通量，可互换的不同规格阵列能够同时分析 12、24 或 96 份样品。最多可上样并分析三块 96 孔板，无需用户干预。



工作流程 1：通过毛细管电泳进行核酸（短链）分析

通过毛细管电泳（安捷伦片段分析仪和 Agilent TapeStation）和 UV-Vis（Agilent Cary 3500 紫外-可见分光光度计）进行 mRNA 纯度分析

体外转录 (IVT) 产生的 mRNA 可用于多种应用，包括疫苗、基因治疗、癌症治疗、慢性感染的治疗和自身免疫性疾病的治疗。精确且准确的质量控制 (QC) 分析是 IVT mRNA 工作流程的关键部分 (图 2)。

安捷伦片段分析仪系统可用于 mRNA 疫苗开发过程中不同检查点的多个 QC 步骤，提供准确且精确的分子量测定和纯度分析。这些 QC 步骤用于测定线性化质粒的质量和分子量、IVT mRNA 的分子量和纯度、poly(A) 尾的长度以及最终 mRNA 疫苗产品的纯度。

同样，Agilent TapeStation 系统可以测量 PCR 扩增 DNA 模板和 IVT mRNA 中间产物的分子量。DNA 模板的 QC 可确保在 IVT 反应中使用适当的模板，从而节省时间和成本。片段分析仪和 TapeStation 系统可在 DNA 和 RNA 分

析之间轻松切换，从而进行快速可靠的质量检查，并测定 DNA 和 IVT mRNA 产品的分子量，帮助优化工作流程，确保为下游应用提供优质的最终产品。

紫外-可见分光光度计利用核酸在 260 nm 处有最大吸光度的特点，被广泛应用于核酸样品的定量和产品的 QC 中。除了确定 mRNA 样品的浓度外，UV-Vis 测量还可以提示样品中是否存在任何污染物。由于紫外-可见分光光度计可以简单、稳定地实现这一目的，因此在 QC 中得到了广泛的应用。Agilent Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计是快速地以高准确度测量小体积核酸样品的理想选择，该仪器具有宽度小于 1.5 mm 的高度聚焦光束，可测量多达 7 个样品，必要时可使用 4 个独立的控温模块实现准确的温度控制。Agilent Cary UV Workstation 软件能够报告样品浓度。

使用 Agilent BioTek 微孔板检测仪进行高通量 mRNA 定量分析和纯度评估

Agilent BioTek Synergy H1 多功能微孔板检测仪是一款模块化多功能微孔板检测仪，提供多种检测模式，包括紫外-可见吸收光、荧光和发光。该系统可使用基于可调谐单色器的光学系统测量 230–999 nm 的紫外-可见吸收光。核酸定量和纯度测定可在 UV 透明微孔板以及 Agilent BioTek Take3 微量检测板中进行。Take3 微量检测板能够检测极

小体积 (2 μ L) 核酸和比色皿中的核酸，并评估其纯度。还可以使用配备嵌入核酸染料的 Synergy H1 对核酸进行荧光测量。微孔板检测仪形式的优势包括可实现高通量测量 (高达 384 孔微孔板)。基于微孔板的形式还能够使用标准的自动化微孔板加载平台实现核酸定量工作流程的自动化。

片段分析仪
(< 9000 nt)



片段分析仪



ProSize

TapeStation
(< 6000 nt)



4200 TapeStation



TapeStation 分析软件

Cary 3500
(基于比色皿的 UV)
或 BioTek
(基于微孔板的
UV 和荧光)



Cary 3500



Synergy H1 多功能
微孔板检测仪



Cary UV Workstation



BioTek Gen6 软件

工作流程 2: 通过毛细管电泳或 UV-Vis 进行 mRNA 纯度分析

mRNA 5' 端加帽效率和 3' 端 Poly-A 序列工作流程

mRNA 3' 端 poly(A) 尾和 5' 端加帽对翻译过程非常重要。成功加帽材料的百分比、加帽结构的类型和 poly(A) 尾的长度都被证明会影响翻译效率和 mRNA 降解速度。因此，

5' 端加帽和 3' 端 poly(A) 序列是应该进行全面表征和监测的关键质量属性 (CQA) (图 3)。



图 3. 典型的人类蛋白质编码 mRNA 的结构

样品前处理

分离

检测

分析

5' 端加帽寡核苷酸

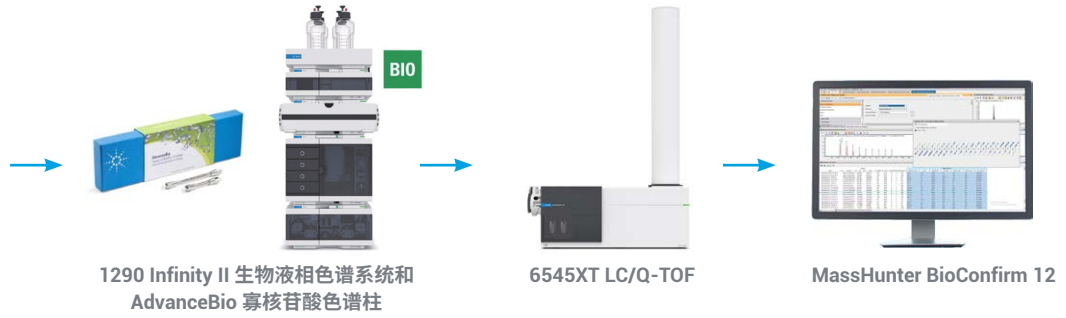
LC/MS

- 定点
- RNA 酶 H 裂解
- 样品净化

3' 端 Poly-A 序列

LC/MS

- RNA 酶 T1 酶解
- 通过 oligo-dT 磁珠进行 Poly-A 样品富集



片段分析仪



图 4. 工作流程 3: mRNA 5' 端加帽效率和 3' 端 Poly-A 序列工作流程

参考文献

通过 CE 进行短链核酸分析

- 1) Comparison of Small RNA Analysis using the Agilent Bioanalyzer and Agilent Fragment Analyzer Systems (比较安捷伦生物分析仪和安捷伦片段分析仪系统的小 RNA 分析), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 [5994-4860EN](#), 2022
- 2) Agilent Oligo Pro II 系统的性能特征, 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 [5994-3667ZHCHN](#), 2021
- 3) Nucleic Acid Analysis for Sample Quality Assessment Using the Agilent Fragment Analyzer Systems (使用安捷伦片段分析仪系统进行核酸分析以评估样品质量), 安捷伦科技公司应用文集, 出版号 [5994-2813EN](#), 2022
- 4) 使用 Agilent 5200 片段分析仪系统进行单向导 RNA 质量评估, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-0523ZHCHN](#), 2019
- 5) 准确评估寡核苷酸纯度, 安捷伦科技公司产品样本, 出版号 [5994-0421ZHCHN](#), 2021

mRNA 纯度分析

- 1) Best Practices for Analysis of IVT mRNA Using the Agilent Fragment Analyzer Systems (使用安捷伦片段分析仪系统进行 IVT mRNA 分析的最佳操作规程), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 [5994-6568EN](#), 2023
- 2) Best Practices for Analysis of IVT mRNA Using the Agilent Fragment Analyzer Systems (使用安捷伦片段分析仪系统进行体外转录 (IVT) mRNA 分析的最佳操作规程), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 [5994-5927EN](#), 2023
- 3) Quality Control in IVT RNA Workflow using Agilent TapeStation Systems (使用 Agilent TapeStation 系统的 IVT RNA 工作流程中的质量控制), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 [5994-4882EN](#), 2022
- 4) 使用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计进行核酸热稳定性测量的最佳操作规程, 安捷伦科技公司白皮书, 出版号 [5994-4028ZHCHN](#), 2022
- 5) Assessment of Long IVT mRNA Fragments with the Agilent 5200 Fragment Analyzer system (使用 Agilent 5200 片段分析仪系统评估长 IVT mRNA 片段), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-0878EN](#), 2019
- 6) Benefits of Quality Control in the IVT RNA Workflow Using the Agilent 5200 Fragment Analyzer System (使用 Agilent 5200 片段分析仪系统在 IVT RNA 工作流程中进行质量控制的优点), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-0512EN](#), 2023
- 7) TekTalk 通讯: [核酸定量分析](#)

mRNA 5' 端加帽效率和 3' 端 Poly-A 序列工作流程




- 1) Best Practices for Analysis of IVT mRNA Using the Agilent Fragment Analyzer Systems (使用安捷伦片段分析仪系统进行体外转录 (IVT) mRNA 分析的最佳操作规程), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 [5994-5927EN](#), 2023
- 2) Analyzing Poly(A) Tails of In Vitro Transcribed RNA with the Agilent Fragment Analyzer System (使用安捷伦片段分析仪系统分析体外转录 RNA 的 poly(A) 尾), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-5325EN](#), 2022
- 3) 使用高分辨率 LC/MS 快速分析 mRNA 5' 端加帽, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5991-3984ZHCHN](#), 2021
- 4) 使用高分辨 LC/MS 分析 mRNA Poly-A 序列变异体, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 [5994-3005ZHCHN](#), 2021

优化的工作流程：配置和订购信息








工作流程 1：通过毛细管电泳进行短链核酸分析

套装	片段分析仪		Oligo Pro II	
仪器		<p>5400 片段分析仪 (M5312AA)</p> <p>5300 片段分析仪 (M5311AA)</p> <p>5200 片段分析仪 (M5310AA)</p>		<p>Oligo Pro II (M5340AA)</p> <p>Oligo Pro II 12 毛细管阵列, 长型 (A2500-1275-5580)</p> <p>Oligo Pro II 24 毛细管阵列, 长型 (A2500-2475-5580)</p> <p>Oligo Pro II 96 毛细管阵列, 长型 (A2500-9675-5580)</p>
软件		ProSize		Oligo Pro II 软件
试剂	小 RNA 试剂盒	DNF-470-0275		<p>毛细管活化溶液 (DN-475-1000)</p> <p>Oligo ssDNA 凝胶 (DN-415-0250)</p> <p>ssDNA Oligel 缓冲液 (DN-465-1000)</p>

工作流程 2：mRNA 纯度分析

套装	片段分析仪	TapeStation	Cary 3500 (UV-Vis) (基于比色皿的 UV)	BioTek (基于微孔板的 UV 和荧光)
仪器	 <p>5400 片段分析仪 (M5312AA)</p> <p>5300 片段分析仪 (M5311AA)</p> <p>5200 片段分析仪 (M5310AA)</p>	 <p>4200 TapeStation (G2991BA)</p>	 <p>Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计 (G9874A #001)</p> <p>选项: G9874A #002: 吹扫套件</p>	<p>BioTek Take3 微量检测板 (TAKE3-SN)</p> <p>BioTek Synergy H1 多功能微孔板检测仪 (UV-Vis 和 荧光) (SH1M-SN)</p> <p>选项: BioTek Epoch 2 微孔板分光光度计 (UV-Vis) (EPOCH2NS-SN)</p>
软件	 <p>ProSize</p>	 <p>TapeStation 分析软件</p>	 <p>Cary UV Workstation 软件</p> <p>G5194AA: Cary UV Workstation Plus, 不带 PC</p> <p>G5195AA: Cary UV Workstation Plus, 带 PC</p> <p>G6894AA: Cary 紫外网络化工作站软件, 不带 PC</p> <p>G6896AA: Cary 紫外网络化工作站软件, 带 PC</p>	 <p>BioTek Gen6 软件 (GEN6)</p>
试剂	RNA 试剂盒 (15 nt)	<p>RNA ScreenTape DNF-471-0500 或 DNF-471-1000</p> <p>RNA ScreenTape 样品缓冲液</p> <p>RNA ScreenTape 分子量标准品</p>	<p>5067-5576</p> <p>5067-5577</p> <p>5067-5578</p>	

工作流程 3: mRNA 5' 端加帽效率和 3' 端 Poly-A 序列工作流程

套装	LC/Q-TOF (5' 端加帽)	LC/Q-TOF (3' 端 Poly-A)	片段分析仪 (3' 端 Poly-A)
色谱柱	 <p>AdvanceBio 寡核苷酸 (659750-702)</p>	 <p>InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18 (699675-702) Agilent PLRP-S (PL1912-1502)</p>	
LC	 <p>1290 Infinity II 生物液相色谱系统 必需: G7131A 或 G7123A、G7137A、 和 G7116B 可选: G7114B (VWD) 或 G7117B (DAD)</p>		 <p>5400 片段分析仪 (M5312AA) 5300 片段分析仪 (M5311AA) 5200 片段分析仪 (M5310AA)</p>
MS	 <p>6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6549AA)</p>		
软件	 <p>BioConfirm 12 (M6025AA) 单一工作站: M6026AA 或 M6027AA 网络化工作站: M6025AA、M6026AA 或 M6027AA</p>		 <p>ProSize</p>

了解更多信息：

www.agilent.com/oligonucleotides

如需获取技术问题的答案和安捷伦社区的资源，
请访问：

community.agilent.com

安捷伦客户服务中心：

免费专线：800-820-3278

400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

DE40332016

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2023，2024
2024年1月23日，中国出版
5994-6933ZH-CN

