

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学号: 220520201

脑胶质母细胞瘤 survivin mRNA 制备条件优化与
质量控制

Optimization of Preparation Conditions and Quality
Control of Survivin mRNA in Glioblastoma Multiforme

学生姓名: 张昭祥
指导教师: 堵国成(教授)、陶玉贵(教授)
校外教师: 张海龙
专 业: 生物与医药
研究方向: 生物制药工程

论文答辩日期: 2025 年 05 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确和隐含的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学术论文作者签名：

张昭祥

日期：2025 年 05 月 15 日

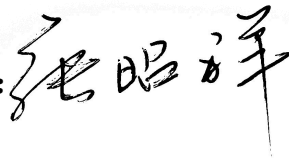
安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名： 指导教师签名：

日期：2025 年 05 月 15 日

日期：2025 年 05 月 15 日

脑胶质母细胞瘤 survivin mRNA 制备条件优化与质量控制

摘 要

IVT (In Vitro Transcription, 体外转录) mRNA 是指以质粒 DNA 为模板, 由 RNA 聚合酶在无细胞体系下催化转录出的 mRNA。mRNA 疫苗的工业生产主要分为上游生产、下游纯化以及包装三大步骤。上游生产重要是从含有目的基因的质粒中体外转录出 mRNA; 然后通过下游纯化的多种步骤将 mRNA 分离纯化, 去除外转录反应后混合物中的各类杂质; 最终包装到各类递送系统中高效地穿透细胞膜, 提高 mRNA 疫苗的效率。整个生产过程相关的酶通过常规的纯化手段不易获得, 相关制剂的价格较为昂贵, 制约着国内的研究, 也对国内医药公司低成本、高效率地大规模生产 mRNA 疫苗有一定的阻碍。

本研究聚焦于脑胶质母细胞瘤 survivin mRNA 原液的制备条件优化与质量控制, 旨在解决当前 survivin mRNA 生产技术面临的产量低、纯度不足、成本高昂等问题, 推动 mRNA 疫苗和治疗药物的商业化进程。研究采用单因素实验和正交实验相结合的方法, 对 survivin mRNA 原液的制备与纯化工艺进行了全面优化。

在 survivin mRNA 原液制备工艺优化方面, 针对模板制备、体外转录等关键步骤的多个参数展开研究。确定了质粒线性化反应的最佳酶体积为 0.5 μ l/20 μ l、反应时间为 3h; 转录反应体系中, 线性化质粒模板量为 800ng/20 μ l 转录体系、转录时间为 3h 时, 可在保证产量的同时降低成本并提高效率。在纯化工艺优化中, 通过对氯化锂沉淀离

心转速及时间的正交研究，明确了最佳参数为 $20000\times g$ 、15min，有效提升了纯化效果。

质量控制及稳定性研究方面，依据相关标准对优化后的 survivin mRNA 原液进行全面质量研究，涵盖 pH 值、外观、含量、纯度、无菌、细菌内毒素、mRNA 完整性、mRNA 活性等多项指标检测，多批次检测结果均符合严格质量标准。稳定性研究通过反复冻融实验、加速实验、强制实验和长期稳定性实验，确定 survivin mRNA 原液可反复冻融 3 次，在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 能保存 1 个月， 37°C 下可保存 1 天，在 $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ 的贮藏条件下，有效期暂定 9 个月。成本分析显示，优化后的工艺使物料成本、设备折旧和人力成本降低，总成本降低了 27.27%，显著提高了经济效益。本研究成果为脑胶质母细胞瘤 survivin mRNA 的临床应用和大规模生产提供了重要的技术支撑与经济可行性依据。

关键词：survivin mRNA 原液，工艺优化，纯化优化，质量研究，成本分析

OPTIMIZATION OF PREPARATION CONDITIONS AND QUALITY CONTROL OF SURVIVIN MRNA IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME

ABSTRACT

IVT(In Vitro Transcription) mRNA refers to the mRNA that is transcribed in a cell-free system by RNA polymerase using DNA as a template. This study focuses on the optimization of preparation conditions and quality control of survivin mRNA for glioblastoma multiforme, aiming to address the problems of low yield, insufficient purity, and high costs in current survivin mRNA production technologies, and to promote the commercialization of mRNA vaccines and therapeutic drugs. The research comprehensively optimized the preparation and purification processes of survivin mRNA bulk solution by combining single-factor experiments and orthogonal experiments.

In the aspect of preparation process optimization, multiple parameters of key steps such as template preparation and in vitro

transcription were studied. The optimal enzyme volume for plasmid linearization reaction was determined to be 0.5 μ l/20 μ l, and the reaction time was 3h. In the transcription reaction system, when the linearized plasmid template amount was 800ng/20 μ l transcription system and the transcription time was 3h, it could ensure the yield while reducing costs and improving efficiency. In the purification process optimization, through the orthogonal study of the centrifugal speed and time of lithium chloride precipitation, the optimal parameters were determined to be 20000 $\times$ g and 15min, effectively improving the purification effect.

In terms of quality control and stability research, the optimized survivin mRNA bulk solution was comprehensively studied according to relevant standards. It covered the detection of multiple indicators such as pH value, appearance, content, purity, sterility, bacterial endotoxin, mRNA integrity, and mRNA activity. The detection results of multiple batches met strict quality standards. The stability research was carried out through repeated freeze-thaw tests, accelerated tests, forced tests, and long-term stability tests. It was determined that the survivin mRNA bulk solution could be repeatedly freeze-thawed 3 times, stored at 2~8 $^{\circ}$ C for 1 month, stored at 37 $^{\circ}$ C for 1 day, and under the storage condition of -80 $\pm$ 10 $^{\circ}$ C, the validity period was tentatively set as 9 months. The total cost was reduced by 27.27%, significantly improving the economic benefits. The research results provide important technical support and

economic feasibility basis for the clinical application and large-scale production of survivin mRNA for glioblastoma multiforme.

Zhaoxiang Zhang (Biology and Pharmaceutical Sciences)

Supervised by_Yugui Tao, Guocheng DU

KEY WORDS: survivin mRNA bulk solution, process optimization, purification optimization, quality research, cost analysis

目录

摘 要	III
ABSTRACT	V
第 1 章 绪论	4
1.1 研究背景与目的	4
1.1.1 研究背景	4
1.1.2 研究目的	6
1.2 研究意义	10
1.2.1 推动 mRNA 技术在生物医药领域的创新发展	10
1.2.2 促进生物医药产业的可持续发展	11
1.2.3 为脑胶质母细胞瘤的临床治疗提供有力支持	12
1.2.4 助力生物医药行业技术标准的完善	13
1.3 国内外研究现状	15
第 2 章 Survivin mRNA 制备条件优化	20
2.1 实验材料	20
2.1.1 实验试剂与耗材	20
2.1.2 实验仪器	21
2.2 制备方法	22
2.2.1 质粒 DNA 模板制备方法	22
2.2.2 线性化质粒 DNA 模板回收方法	23
2.2.3 体外转录方法	23
2.2.4 纯化方法	24
2.3 Survivin mRNA 制备条件优化	25
2.3.1 Survivin mRNA 原液的制备工艺优化	25
2.3.2 Survivin mRNA 纯化条件优化	27
2.3.3 制备条件优化结果与分析	28
2.3.4 Survivin mRNA 纯化条件优化结果与分析	35
2.3.5 制备条件优化实验结论	38

第 3 章 Survivin mRNA 质量控制及工艺放大与成本分析	40
3.1 实验材料	40
3.1.1 实验试剂与耗材	40
3.1.2 实验仪器	41
3.2 Survivin mRNA 质量控制方法	42
3.2.1 外观检查	42
3.2.2 pH 值	42
3.2.3 含量与纯度 (OD_{260}/OD_{280})	43
3.2.4 无菌检查	43
3.2.5 细菌内毒素检查	44
3.2.6 蛋白残留检测	44
3.2.7 质粒残留检测	45
3.2.8 mRNA 完整性检测	45
3.2.9 mRNA 完整性比例检测	46
3.2.10 金属元素 Li 残留检测	47
3.2.11 乙醇残留检测	47
3.2.12 异丙醇残留检测	47
3.2.13 mRNA 活性表征检测	47
3.2.14 BSA 残留检测	48
3.3 Survivin mRNA 稳定性研究实验	49
3.3.1 反复冻融稳定性研究实验	50
3.3.2 加速稳定性研究实验	50
3.3.3 强制条件稳定性研究实验	51
3.3.4 长期稳定性研究实验	51
3.4 Survivin mRNA 稳定性研究实验结果与分析	51
3.4.1 反复冻融稳定性研究实验结果与分析	51
3.4.2 加速稳定性研究实验结果与分析	54
3.4.3 强制条件稳定性研究实验结果与分析	57
3.4.4 长期稳定性研究实验结果与分析	60
3.5 Survivin mRNA 稳定性研究实验结论	65
3.5.1 反复冻融稳定性研究实验结论	65

3.5.2 加速稳定性研究实验结论	65
3.5.3 强制条件稳定性研究实验结论	65
3.5.4 长期稳定性研究实验结论	66
3.5.5 稳定性研究实验结论	66
3.6 工艺放大与成本分析	66
3.6.1 工艺放大与成本分析结果	66
第 4 章 结论与展望	67
4.1 研究结论	67
4.2 未来展望	67
参考文献	69
致谢	77

第 1 章 绪论

1.1 研究背景与目的

1.1.1 研究背景

在生物医药领域，mRNA 技术是一项极具潜力的前沿技术，其发展历程见证了生命科学领域的重大突破，也为现代医学的进步带来了新的曙光。从早期对 mRNA 基础功能的初步认知，到如今在疫苗、治疗药物等多领域的广泛探索，mRNA 技术经历了漫长而曲折的发展过程，凝聚着众多科研人员的智慧与不懈努力。

早期，mRNA 的发现源于科学家对遗传信息传递机制的深入探究。20 世纪 60 年代，Marshall Nirenberg 和 Heinrich Matthaei 成功破译遗传密码，这一里程碑式的成果揭示了 mRNA 在蛋白质合成过程中的关键作用，它作为遗传信息的传递者，能够将 DNA 携带的遗传指令准确地转化为蛋白质^[1-3,5-10]。这一发现为后续 mRNA 技术的发展奠定了坚实的理论基础，使得人们开始聚焦于如何利用 mRNA 来实现特定蛋白质的合成，从而为疾病治疗和预防开辟新途径。

随着分子生物学技术的逐步发展，科学家们对 mRNA 的结构和功能有了更深入的了解。mRNA 的结构包括 5'端帽子结构、非翻译区（UTR）、编码区和 3'端 poly (A) 尾等重要组成部分。5'端帽子结构在 mRNA 的稳定性、翻译起始以及避免核酸外切酶降解等方面发挥着关键作用；UTR 区域则参与调控 mRNA 的翻译效率和定位；编码区携带了合成特定蛋白质的遗传信息；3'端 poly (A) 尾不仅有助于 mRNA 的稳定，还能影响其翻译过程。对这些结构的深入研究，为后续对 mRNA 进行人工改造和优化提供了理论依据。

20 世纪 90 年代，基因工程技术的兴起为 mRNA 的体外合成创造了条件^[13-15,20]。科学家们开始尝试在体外通过转录反应合成 mRNA，这一突破使得 mRNA 的生产不再依赖于生物体内复杂的生理过程，为大规模应用 mRNA 提供了可能。然而，初期的体外转录技术面临诸多挑战。转录效率低下，使得 mRNA 的产量难以满足实际需求；同时，mRNA 的稳定性较差，在体外环境中极易被

核酸酶降解，这严重限制了其在实际应用中的有效性。

进入 21 世纪，mRNA 技术迎来了关键的发展阶段。随着对 mRNA 结构与功能关系的深入理解，以及化学合成和修饰技术的不断进步，mRNA 技术取得了重大突破^[2,5,17,20]。在化学修饰方面，研究发现对 mRNA 进行特定的化学修饰，如假尿苷修饰，能够显著降低其免疫原性，同时提高稳定性和翻译效率。这种修饰后的 mRNA 在体内能够更有效地逃避机体免疫系统的识别，延长其在体内的存在时间，从而增强其表达蛋白质的能力。这一发现为 mRNA 在疫苗和治疗药物领域的应用提供了重要的技术支撑。

与此同时，递送技术的发展成为推动 mRNA 技术临床应用的关键因素。脂质纳米颗粒（LNP）等递送系统的出现，极大地改善了 mRNA 的递送效率。LNP 能够有效地包裹 mRNA，保护其免受核酸酶的降解，并帮助 mRNA 顺利穿透细胞膜进入细胞内部。这种高效的递送系统使得 mRNA 能够精准地递送至目标细胞，提高了 mRNA 在体内的转染效率，为 mRNA 技术的临床应用奠定了坚实的基础。

近年来，mRNA 技术在多个领域取得了令人瞩目的成果，尤其在疫苗领域表现突出。传统疫苗的研发过程通常较为漫长，涉及病原体的培养、灭活或减毒等复杂步骤，且对生产条件要求苛刻，从研发到上市往往需要数年甚至数十年的时间。而 mRNA 疫苗凭借其独特的优势，能够快速响应病原体的变异^[1,6,9,10,12]。以新冠疫情为例，在新冠病毒爆发后，基于 mRNA 技术的疫苗研发迅速展开。Moderna 的 mRNA-1273 疫苗和辉瑞/BioNTech 的 BNT162b2 疫苗在短时间内完成研发并投入临床实验，最终在预防新冠病毒感染方面展现出了较高的有效性^[1,6,9]。这些 mRNA 疫苗通过将编码新冠病毒刺突蛋白的 mRNA 递送至人体细胞内，利用人体自身的细胞机制合成刺突蛋白，进而诱导免疫系统产生针对该病毒的免疫反应，为全球抗击新冠疫情提供了有力的支持。

在癌症治疗领域，mRNA 技术为攻克这一难题带来了全新的思路和方法。肿瘤细胞具有高度异质性，每个患者的肿瘤细胞都可能存在独特的抗原表达谱，这使得传统的治疗手段难以实现精准治疗。而 mRNA 技术能够根据肿瘤细胞的特异性抗原信息，量身定制 mRNA 疫苗^[3,10,11,18]。这些疫苗可以将编码肿瘤抗原的 mRNA 递送至抗原呈递细胞（如树突状细胞）内，抗原呈递细胞加工处理抗

原后，将其呈递给 T 细胞，激活机体的特异性免疫反应，从而实现对肿瘤细胞的精准打击。

目前，针对多种癌症的 mRNA 疫苗研究正在积极开展。例如，在黑色素瘤的治疗中，通过分析黑色素瘤细胞表面特异性表达的抗原，设计相应的 mRNA 疫苗，能够有效激活患者体内的 T 细胞，增强免疫系统对肿瘤细胞的识别和杀伤能力。临床研究显示，部分接受 mRNA 疫苗治疗的黑色素瘤患者，其肿瘤生长得到了有效抑制，生存期显著延长^[3,11]。在肺癌治疗方面，也有研究尝试利用 mRNA 技术开发个性化疫苗，通过针对肺癌细胞特定的基因突变或异常表达的蛋白，制备相应的 mRNA 疫苗，激发机体的免疫反应，为肺癌患者提供了新的治疗选择。

除了作为疫苗，mRNA 技术在基因治疗领域也具有广阔的应用前景。许多遗传性疾病是由于基因突变导致蛋白质功能缺失或异常引起的。传统的基因治疗方法，如基因编辑技术，虽然能够对突变基因进行修正，但存在着脱靶效应等潜在风险。而 mRNA 技术通过向患者体内递送编码正确蛋白质的 mRNA，可以绕过基因编辑的复杂过程，直接在细胞内合成具有正常功能的蛋白质，从而达到治疗疾病的目的^[2,10,15,17]。与传统基因治疗方法相比，mRNA 技术不会整合到基因组中，避免了插入突变等风险，安全性更高。

例如，对于囊性纤维化这种常见的遗传性疾病，其病因是囊性纤维化跨膜传导调节因子（CFTR）基因发生突变，导致 CFTR 蛋白功能异常，进而影响肺部和其他器官的正常功能。利用 mRNA 技术，可以设计合成编码正常 CFTR 蛋白的 mRNA，并通过合适的递送系统将其递送至患者的肺部细胞，使细胞能够合成正常的 CFTR 蛋白，从而改善患者的症状^[2,15]。目前，针对囊性纤维化的 mRNA 基因治疗研究正在进行中，已取得了一些令人鼓舞的阶段性成果。

1.1.2 研究目的

尽管 mRNA 技术在多个领域取得了显著进展，但在实际应用中仍面临着诸多挑战。其中，mRNA 原液的制备工艺复杂且成本高昂，成为制约其广泛应用的关键因素之一^[14,15,20]。在制备过程中，转录效率低是一个亟待解决的问题。转录反应需要精确控制各种反应条件，包括模板 DNA 的质量和浓度、RNA 聚合酶的活性、核苷酸的比例等，但目前的技术难以实现高效、稳定的转录，导致 mRNA 产

量较低。同时，mRNA的易降解性也是一个突出问题^[14,15,20]。mRNA在体外环境中极易受到核酸酶的攻击而降解，这不仅影响了其产量，还对其质量和稳定性造成了严重影响。在纯化过程中，由于mRNA与杂质的性质相近，使得分离纯化难度较大，难以获得高纯度的mRNA产品^[14,20]。

此外，mRNA在体内的递送效率和靶向性仍然有待提高。虽然脂质纳米颗粒（LNP）等递送系统在一定程度上解决了mRNA的递送问题，但仍存在一些不足。LNP的靶向性相对有限，难以确保mRNA精准地递送至特定的细胞或组织，这可能导致在非目标部位产生不必要的免疫反应或副作用。而且，LNP的制备工艺较为复杂，成本较高，限制了其大规模生产和应用^[5,17,20]。在质量控制方面，由于mRNA的结构和功能较为复杂，目前缺乏统一、完善的质量控制标准和检测方法^[1,22,23]。现有的检测技术难以全面、准确地评估mRNA的质量，包括其完整性、纯度、修饰程度以及生物活性等，这给mRNA产品的质量保障带来了困难。

在靶向脑胶质母细胞瘤DC治疗性疫苗产品中，survivin mRNA原液作为关键原材料，其质量更是直接影响疫苗的效果。脑胶质母细胞瘤是一种恶性程度极高的原发性脑肿瘤，具有侵袭性强、易复发、预后差等特点。目前的标准治疗方案，包括手术切除、放疗和化疗，虽然在一定程度上能够缓解病情，但患者的总体生存率仍然较低，5年生存率仅为5%~10%左右。

基于mRNA的免疫治疗为脑胶质母细胞瘤的治疗提供了新的希望。Survivin是一种肿瘤特异性抗原，在脑胶质母细胞瘤细胞中高表达，而在正常组织中表达水平极低或不表达。将survivin mRNA负载到树突状细胞（DC）上制备成治疗性疫苗，有望激活机体的抗肿瘤免疫反应，为患者带来新的治疗选择。然而，目前survivin mRNA原液的制备面临诸多问题，严重阻碍了这一治疗策略的有效实施。

首先，现有制备工艺下survivin mRNA的产量难以满足临床需求。脑胶质母细胞瘤患者数量众多，且临床实验及未来大规模治疗都需要大量的survivin mRNA原液。但当前转录过程效率低下，使得每批次生产所得的mRNA数量有限，不仅增加了生产成本，还可能导致治疗的延迟，影响患者的及时救治。例如，在一些早期临床实验中，由于mRNA产量不足，无法招募足够数量的患者进行

实验，限制了对疫苗疗效的全面评估。

其次，纯度问题也是一大挑战。低纯度的 survivin mRNA 原液中可能含有杂质，如未完全转录的片段、残留的 DNA 模板、蛋白质以及其他核酸污染物等。这些杂质可能引发机体的免疫反应，干扰疫苗的正常作用，甚至对患者产生潜在的危害。而且，杂质的存在也会影响 mRNA 的稳定性和翻译效率，降低疫苗的有效性。在质量检测中发现，部分低纯度的 mRNA 样本在体外实验中，其翻译生成的 survivin 蛋白量明显低于预期，且存在翻译错误的情况，这极大地影响了疫苗的质量和安全性。

再者，高昂的生产成本使得基于 survivin mRNA 的 DC 治疗性疫苗难以广泛应用。mRNA 原液制备过程中，需要使用昂贵的原材料，如高质量的模板 DNA、特定的酶以及先进的反应缓冲液等。同时，复杂的生产设备和严格的生产环境要求，进一步增加了成本。这使得疫苗价格居高不下，许多患者难以承受，限制了其在临床实践中的推广。

因此，优化 survivin mRNA 原液的制备工艺迫在眉睫。本研究旨在通过系统地优化 survivin mRNA 原液的制备与纯化工艺，全面解决当前面临的产量低、纯度不足、成本高昂等问题。具体而言，将深入研究制备过程中的各个关键环节，包括模板制备、体外转录、纯化等步骤，通过单因素实验和正交实验相结合的方法，精准优化各项工艺参数。例如，在模板制备环节，探索更高效的质粒构建和线性化方法，提高模板的质量和数量；在体外转录过程中，优化反应条件，如温度、时间、酶浓度等，以提高转录效率和 mRNA 的产量；在纯化工艺中，开发更有效的分离方法，提高 mRNA 的纯度，减少杂质残留。

同时，本研究还将对优化后的 survivin mRNA 原液进行全面的质量研究，建立完善的质量控制体系。通过对 mRNA 的完整性、稳定性、免疫原性等多方面的检测，确保优化后的产品质量符合严格的标准。此外，进行工艺放大实验，验证优化后的工艺在大规模生产中的可行性和稳定性，并进行详细的成本分析，评估各项成本的变化情况，进一步降低生产成本，提高经济效益。

最终，本研究期望通过这些努力，为脑胶质母细胞瘤 survivin mRNA 的临床应用和大规模生产提供坚实的技术支撑与可靠的经济可行性依据。推动基于 mRNA 的免疫治疗在脑胶质母细胞瘤治疗领域的广泛应用，提高患者的生存率

和生活质量，为攻克这一恶性肿瘤带来新的希望。同时，研究成果也将为 mRNA 技术在其他疾病治疗中的应用提供宝贵的经验和借鉴，促进整个生物医药产业的发展。

靶向脑胶质母细胞瘤 DC 治疗性疫苗产品，其将带有目的抗原 survivin 的 mRNA 原液负载在树突状细胞（Dendritic Cell, DC）上制备成细胞注射液（治疗性疫苗产品），DC 细胞是脑胶质母细胞瘤患者自体单个核细胞（Mononuclear Cells, MNC）经体外分离纯化、诱导、抗原负载、细胞成熟等步骤制备而成。细胞制备主要包括以下内容：1）患者自体单个核细胞（MNC）采集；2）贴壁法分离单核细胞（monocyte）；3）单核细胞体外诱导分化为树突状细胞（Dendritic Cell, DC）；4）将带有目的肿瘤抗原 survivin 的 mRNA 经电转方法转入 DC 细胞；5）体外经细胞因子诱导 DC 成熟。制备过程包括抗原 survivin mRNA 的制备及 DC 细胞终产品的制备两大生产环节。其中抗原 mRNA 的制备包括抗原 mRNA 表达质粒载体制备和 mRNA 制备工艺过程，因此，抗原表达质粒、抗原 mRNA 原液和 MNC 为细胞制剂生产的原材料。

DC 治疗性疫苗产品生产制备严格参考《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则（试行）》、《基因转导与修饰系统药学研究与评价技术指导原则（征求意见稿）》、《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则（征求意见稿）》、《CAR-T 细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点》、《中国药典》等指导原则，完成质粒、survivin mRNA 和 DC 细胞三项原材料的生产工艺开发及工艺确认、质量研究、稳定性研究等工作，产品的生产工艺稳定、质量可控、生产规模可满足 I 期临床用药需求。为便于全面理解 DC 细胞生产和质量控制策略，现将 DC 细胞、survivin mRNA 原液和质粒原液三部分的生产工艺研究内容分别进行描述。本文主要介绍 survivin mRNA 原液制备工艺优化及质量研究。Survivin mRNA 原液及 DC 细胞制备流程图见图 1-1：

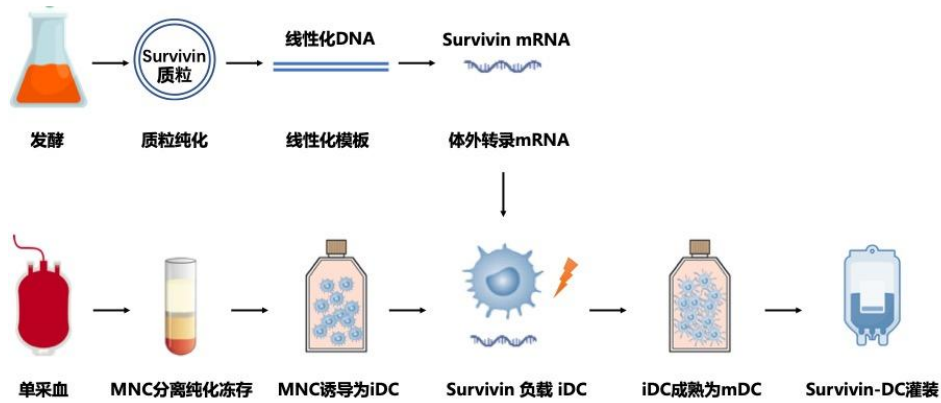


图 1-1 脑胶质母细胞瘤 survivin mRNA 注射液制备流程图

Figure 1-1 Flow Chart of the Preparation of Survivin mRNA Injection for Glioblastoma
Multiforme in the Brain

1.2 研究意义

本研究围绕脑胶质母细胞瘤 survivin mRNA 展开，在制备条件优化、质量控制等方面的成果，对 mRNA 技术发展、生物医药产业以及临床应用等层面均有着不可忽视的重要意义。

1.2.1 推动 mRNA 技术在生物医药领域的创新发展

mRNA 技术在生物医药领域前景广阔，但面临诸多技术难题。本研究针对 survivin mRNA 原液制备与纯化工艺进行优化，有效提高了 mRNA 的产量、纯度和稳定性，为 survivin mRNA 在脑胶质母细胞瘤治疗中的应用提供了高质量原材料，也为其他 mRNA 产品的研发提供了可借鉴的技术方案，加速 mRNA 技术在疫苗开发、基因治疗和癌症治疗等领域的应用进程^[1-3,5,10,11,15,17,20]。

在疫苗开发领域，mRNA 技术可快速响应病原体变异。以流感疫苗为例，每年流感病毒都会发生变异，传统疫苗难以快速适应这些变化，而 mRNA 流感疫苗能够根据病毒变异情况迅速调整 mRNA 序列，快速生产出匹配的疫苗。本研究中优化的 survivin mRNA 制备工艺，包括对转录效率、加帽效率以及纯化过程的改进，可应用于 mRNA 流感疫苗的生产^[10,11,15,17,20]。通过提高转录效率，能够在更短的时间内生产出大量的 mRNA 疫苗，满足疫情防控的紧急需求；优化的纯化工艺则可有效去除杂质，提高疫苗的纯度和安全性，增强疫苗的免疫效果。

在基因治疗领域，许多罕见病是由于基因突变导致蛋白质功能缺失或异常引起的，目前针对这些罕见病的有效治疗手段非常有限。mRNA 技术为罕见病的基因治疗带来了新的希望，通过向患者体内递送编码正确蛋白质的 mRNA，可

以补充缺失的蛋白质，从而达到治疗疾病的目的。例如，对于囊性纤维化这种常见的遗传性疾病，可利用 mRNA 技术设计合成编码正常 CFTR 蛋白的 mRNA，并递送至患者肺部细胞，改善患者症状^[2,10,15,17]。本研究在 survivin mRNA 制备工艺优化过程中积累的经验，如对反应条件的精确控制、对杂质的有效去除等，可应用于其他罕见病相关 mRNA 的制备^[14,15,17]，推动基因治疗领域的发展。

在癌症治疗领域，肿瘤细胞具有高度异质性，传统治疗手段难以实现精准治疗。mRNA 技术能够根据肿瘤细胞的特异性抗原信息，量身定制 mRNA 疫苗，激活机体的特异性免疫反应，实现对肿瘤细胞的精准打击。例如，在黑色素瘤的治疗中，通过分析黑色素瘤细胞表面特异性表达的抗原，设计相应的 mRNA 疫苗，能够有效激活患者体内的 T 细胞，增强免疫系统对肿瘤细胞的识别和杀伤能力。本研究优化的 survivin mRNA 制备工艺，有助于提高肿瘤相关抗原 mRNA 疫苗的质量和产量^[3,10,11,18]，为癌症患者提供更有效的治疗选择，推动肿瘤免疫治疗领域的创新发展。

1.2.2 促进生物医药产业的可持续发展

优化 survivin mRNA 原液工艺后，生产成本显著降低，这使得 mRNA 基产品在市场上更具经济竞争力，对生物医药产业的可持续发展具有重要意义。

从产业规模角度看，成本降低会吸引更多企业投身于 mRNA 技术相关产业。企业数量增加将加剧市场竞争，促使企业不断提高自身技术水平和生产效率，推动产业规模化发展。在此过程中，上下游产业链之间的协同创新将得到加强。上游原材料供应商会加大对质粒、酶等关键原材料的研发投入，开发更优质、高效的产品，同时优化生产工艺，提高原材料质量稳定性；中游 mRNA 生产企业将积极引进先进生产设备和技术，优化生产流程，加强质量监控，提高产品合格率；下游应用企业，如疫苗生产厂商和基因治疗公司，将受益于成本降低和质量提升的 mRNA 产品，降低研发和生产成本，提高产品市场竞争力，进而扩大市场需求，促进产业发展。

从公共卫生角度而言，mRNA 产品成本的降低具有重大意义。在全球范围内，许多传染病和罕见病严重威胁着人们的健康，尤其是在发展中国家和贫困地区，由于医疗资源有限和治疗成本高昂，许多患者无法及时获得有效的治疗。mRNA 技术的发展和成本降低，使得疫苗和治疗药物的可及性大大提高。例如，

在一些疟疾、结核病等传染病高发地区，低成本的 mRNA 疫苗可以更广泛地推广和应用，提高疫苗的接种率，有效预防疾病的传播，减少疾病的发病率和死亡率，改善当地的公共卫生状况。对于罕见病患者来说，降低成本的 mRNA 基因治疗药物使他们有机会接受有效的治疗，提高生活质量，延长生命。这将有助于缩小不同地区之间的医疗差距，实现全球公共卫生的公平性和可持续发展。

从国际竞争层面来看，本研究成果有助于提升我国生物医药产业在国际市场上的竞争力。目前，欧美等发达国家在 mRNA 技术领域处于领先地位，拥有先进技术和成熟产业体系。通过优化 survivin mRNA 原液工艺，降低生产成本，提高产品质量，我国生物医药企业能够在国际市场上以更具竞争力的价格提供高质量的 mRNA 产品和相关技术服务，拓展国际市场份额，吸引国际合作伙伴，加强国际间技术交流与合作，推动我国从生物医药大国向生物医药强国迈进，为全球 mRNA 技术的发展做出更大贡献。

1.2.3 为脑胶质母细胞瘤的临床治疗提供有力支持

脑胶质母细胞瘤是一种恶性程度极高的原发性脑肿瘤，目前的治疗手段包括手术、放疗和化疗等，但患者的预后仍然很差，5 年生存率较低。Survivin mRNA 作为靶向脑胶质母细胞瘤 DC 治疗性疫苗的关键原料，其质量直接影响疫苗的疗效。

本研究优化后的 survivin mRNA 原液质量稳定且生物活性良好，为脑胶质母细胞瘤的免疫治疗提供了更可靠的保障。通过提高 mRNA 的产量和纯度，能够制备出更多高质量的 DC 治疗性疫苗，满足临床需求。在临床实验中，足够数量的高质量疫苗可以确保研究结果的准确性和可靠性，为疫苗的进一步研发和应用提供坚实基础。同时，稳定性研究确定的保存条件和有效期，为疫苗的储存、运输和临床使用提供了科学依据，确保疫苗在整个过程中的质量稳定，维持其有效性和安全性。

稳定的质量保证了疫苗在不同环节的有效性，减少了因储存和运输条件不当导致的疫苗失效问题，提高了资源利用效率，降低了医疗成本。从医院角度来看，明确的有效期和储存条件便于医院进行库存管理，合理安排疫苗采购和使用计划，避免因过期或保存不当造成的浪费。对于患者而言，稳定的疫苗质量意味着他们能够获得更有效的治疗，减少因疫苗质量问题带来的治疗风险和不确定性。

Survivin mRNA 质量的提升也有助于增强免疫治疗的效果。高质量的 mRNA 能够更有效地在 DC 细胞内表达 survivin 抗原,进而更高效地激活机体的免疫系统,增强免疫细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤能力。这不仅可以提高患者的生存率,还可能改善患者的生活质量,减轻因肿瘤带来的痛苦和不适。例如,通过增强免疫反应,可能减少肿瘤的复发和转移,降低患者对传统治疗手段(如手术、化疗和放疗)的依赖,减少这些治疗带来的副作用,使患者能够更好地回归正常生活。

此外,本研究成果还为脑胶质母细胞瘤的联合治疗提供了更多可能。目前,单一的治疗手段往往难以取得理想的治疗效果,联合治疗已成为趋势。优化后的 survivin mRNA 疫苗可以与其他治疗方法,如免疫检查点抑制剂、靶向治疗药物或传统的放化疗相结合。survivin mRNA 疫苗激活的免疫系统可以与其他治疗手段协同作用,增强对肿瘤细胞的杀伤效果。例如,免疫检查点抑制剂可以解除肿瘤细胞对免疫系统的抑制,使 survivin mRNA 疫苗激发的免疫反应更有效地发挥作用;靶向治疗药物可以特异性地作用于肿瘤细胞的特定靶点,与疫苗的免疫治疗相互补充,提高治疗的精准性和有效性。这种联合治疗策略有望为脑胶质母细胞瘤患者带来更好的治疗前景,为临床医生提供更多的治疗选择和方案。

从临床研究的角度来看,稳定且高质量的 survivin mRNA 原液有助于开展更深入的研究。研究人员可以基于此进一步探索疫苗的最佳使用剂量、治疗周期以及不同患者群体的最佳治疗方案。通过对大量临床数据的分析,能够更好地了解疫苗的作用机制和疗效影响因素,为个性化医疗提供依据。例如,针对不同年龄、性别、肿瘤分期和基因突变类型的患者,可以研究他们对 survivin mRNA 疫苗的反应差异,从而制定更加精准的治疗方案,提高治疗的针对性和有效性,推动脑胶质母细胞瘤免疫治疗从传统的经验性治疗向精准医疗转变,进一步提高临床治疗水平。

1.2.4 助力生物医药行业技术标准的完善

目前,mRNA 技术相关的行业标准尚在不断完善中。本研究在 survivin mRNA 制备、纯化及质量控制方面进行了系统研究,建立了全面的质量控制体系和稳定性评价方法,这些研究成果可以为 mRNA 技术行业标准的制定和完善提供重要的参考依据,有助于规范 mRNA 产品的研发、生产和质量控制,促进整个生物医药行业的健康发展^[1,22,23]。

在制备工艺方面,本研究详细探讨了质粒线性化、体外转录、纯化等各个环节的最佳参数和操作条件^[14,15,20]。例如,确定了质粒线性化反应的最佳酶体积和反应时间,以及转录反应体系中线性化质粒模板量、转录时间等关键参数。这些参数的确定为其他 mRNA 产品的制备提供了重要的参考范例,有助于统一行业内的制备工艺标准,减少不同实验室和生产企业之间的差异,提高产品的一致性和可重复性。通过规范制备工艺,可以降低生产过程中的不确定性,提高生产效率,保证产品质量的稳定性,从而为大规模工业化生产奠定基础。

在纯化工艺方面,研究明确了氯化锂沉淀离心转速及时间的最佳参数,有效提升了 mRNA 的纯化效果^[14,20]。这一成果对于制定 mRNA 纯化的行业标准具有重要意义。标准化的纯化工艺可以确保去除 mRNA 产品中的杂质,如残留的 DNA、蛋白质、未反应的核苷酸等,提高产品纯度,保障其安全性和有效性。统一的纯化标准有助于规范生产流程,减少因工艺差异导致的产品质量波动,增强不同批次产品之间的一致性,使 mRNA 产品在市场上更具可靠性和可追溯性,提升整个行业的信誉度。

从质量控制角度来看,本研究对优化后的 survivin mRNA 原液进行了全面的质量检测,涵盖 pH 值、外观、含量、纯度、无菌、细菌内毒素、mRNA 完整性、mRNA 活性等多项指标,并制定了相应的质量标准^[1,22,23]。这些指标和标准的建立为 mRNA 产品的质量控制提供了明确的依据,使生产企业和监管部门在质量评估时有章可循。例如,规定了 mRNA 完整性比例需 $\geq 70\%$,这一量化标准有助于准确判断产品质量是否合格,能够及时发现生产过程中的问题并加以改进。同时,多批次检测结果均符合严格质量标准的研究成果,也为行业标准的可行性提供了实际验证,增强了标准的可信度和实用性。

稳定性研究是 mRNA 技术中至关重要的一环,本研究通过反复冻融实验、加速实验、强制实验和长期稳定性实验,确定了 survivin mRNA 原液在不同条件下的稳定性特征,包括可反复冻融 3 次,在 2~8℃能保存 1 个月,37℃下可保存 1 天,在-80 $\pm$ 10℃的贮藏条件下有效期暂定 9 个月等^[23]。这些数据为 mRNA 产品的储存、运输和使用提供了科学的指导,对于制定相关的行业标准具有关键价值。例如,在运输环节,物流企业可以根据这些稳定性数据,合理选择运输方式和温度控制条件,确保 mRNA 产品在运输过程中的质量不受影响;在医疗机构

储存和使用 mRNA 产品时，也能够依据这些标准，合理安排库存管理和使用计划，避免因过期或不当保存导致产品失效。

在助力行业技术标准完善的过程中，本研究成果还能够促进不同企业和研究机构之间的技术交流与合作。统一的技术标准使各方在 mRNA 技术的研发、生产和质量控制方面有了共同的语言和规范，便于分享经验和成果，加速技术的创新和进步。例如，企业在改进自身生产工艺时，可以参考本研究的标准和方法，减少重复研究，提高研发效率；研究机构在开展 mRNA 相关研究时，也能够依据这些标准进行实验设计和结果评估，使研究成果更具可比性和通用性。这种技术交流与合作的加强，有助于整合行业资源，形成合力，推动整个 mRNA 技术领域的快速发展。

此外，随着 mRNA 技术在生物医药领域的应用越来越广泛，相关的国际合作也日益增多。本研究建立的质量控制体系和稳定性评价方法，不仅适用于国内，也能够为国际 mRNA 技术行业标准的制定提供中国方案和智慧。在国际竞争与合作中，我国凭借在 survivin mRNA 研究方面的成果，能够更积极地参与国际标准的制定，提升我国在全球生物医药领域的话语权和影响力，促进我国生物医药产业更好地融入全球市场，推动全球 mRNA 技术的协同发展，为人类健康事业做出更大的贡献。

1.3 国内外研究现状

近年来，随着 mRNA 疫苗与治疗技术的快速发展，其核心原料——mRNA 原液的制备工艺优化与质量研究已成为全球生物制药领域的焦点^[1-21,24-90]。国内外科研机构与企业在该领域的技术创新呈现出多维度突破与差异化竞争格局，从上游质粒制备到下游纯化分析，各环节均展现出显著进展^[1-21,24-90]。

在质粒 DNA (pDNA) 制备环节，国际领先企业通过基因工程与发酵工艺的协同创新实现了质的飞跃^[20]。例如，Moderna 和 CureVac 采用高拷贝质粒设计技术，通过优化大肠杆菌复制起始点（如 pUC ori），使单个细胞的质粒拷贝数达到 500~700（2022 年数据）。这一技术突破的背后，是对质粒复制分子机制的深入理解。大肠杆菌的复制起始点如同一个“开关”，控制着质粒在细胞内的复制进程^[20]。通过对其进行精准改造，能够增强质粒复制的效率，进而大幅提升单个细胞内的质粒拷贝数。而 BioNTech 开发的高密度发酵技术结合动态补料策略，

将质粒产量提升至 1g/L 以上^[20]。高密度发酵技术依赖于对发酵条件的精细调控，包括温度、pH 值、溶氧等参数，为大肠杆菌生长提供最适宜的环境，使其能够在有限的空间内大量繁殖；动态补料策略则是根据细胞生长的不同阶段，精确补充所需的营养物质，确保细胞持续高效地合成质粒^[20]。相比之下，国内团队在质粒制备领域也取得重要突破，斯微生物开发的 RNA 干扰替代抗生素筛选系统已获得专利授权，该系统利用 RNA 干扰的特异性，精准抑制不含目标质粒的细胞生长，从而高效筛选出含有目的质粒的细胞，不仅提高了筛选效率，还减少了抗生素使用带来的潜在风险^[20,36,37]。浙江大学研发的梯度碱裂解法可将超螺旋 DNA 占比稳定控制在 95%以上，超螺旋结构的质粒 DNA 具有更高的转染活性，这一技术的应用有助于提升后续 mRNA 制备的质量。然而，整体工艺在质粒产率与规模化生产设备方面仍依赖进口技术支撑。国内在质粒发酵过程的自动化控制、大规模发酵罐的设计与制造等方面，与国际先进水平存在差距，限制了质粒的大规模、高质量生产^[20]。

体外转录（IVT）工艺的优化成为提升 mRNA 产率与质量的核心战场^[21-22]。国际企业通过酶工程改造与反应器创新实现了双重突破。T7 RNA 聚合酶突变体（如 Y639F/H784A）的应用使转录效率提升 40%。这一突变体的研发基于对 T7 RNA 聚合酶结构与功能关系的深入解析^[20]。通过定点突变技术改变特定氨基酸残基，优化了酶与底物、模板的相互作用，从而加速了转录进程^[20]。NEB 的 CleanCap® AG 共转录加帽技术将加帽效率推高至 95%以上。mRNA 的加帽修饰对于其稳定性、翻译起始以及逃避核酸酶降解至关重要^[20]。传统加帽方法效率较低且容易产生杂质，而共转录加帽技术在转录过程中同步完成加帽，极大地提高了加帽效率和 mRNA 质量^[20]。在反应条件控制方面，CureVac 开发的微流控连续流反应器通过实时监测 NTP 浓度，将传统批次反应的 6h 流程压缩至 2h，同时降低副产物生成。微流控连续流反应器利用微通道的特殊物理性质，实现了反应物的快速混合与精确控制，为转录反应提供了更稳定、高效的环境。

国内艾博生物通过建立镁离子动态调控模型，在 20mM 梯度浓度变化下使全长 mRNA 产率提升 30%^[22,36-37]。镁离子作为 RNA 聚合酶的辅助因子，对转录反应的进行起着关键作用。通过精确调控镁离子浓度，能够优化 RNA 聚合酶的活性，提高转录的准确性和效率。但在关键酶原料（如 RNA 聚合酶）的自主生

产能力上仍存在短板。国内在 RNA 聚合酶的生产工艺、质量控制等方面尚未成熟，导致关键酶的供应不稳定且成本较高。值得关注的是，国产 IVT 试剂盒的转录产率已从早期的 1~2mg/mL 提升至 3~5mg/mL，接近 BioNTech 标准工艺的 5~8mg/mL 水平，但工艺稳定性和批间差异仍需进一步优化^[33-34]。工艺稳定性和批间差异问题反映出国内在 IVT 工艺的标准化、自动化方面还有待加强，缺乏对生产过程中微小变化的有效监测与控制手段^[21,22]。

纯化技术的革新直接决定了 mRNA 产品的最终纯度与安全性^[23-26,27-28]。国际层面，复合模式层析介质（如 Capto TMA）的应用可同步去除 dsRNA、残留酶及 DNA 片段，这种复合模式层析介质结合了多种层析原理，能够更全面地去除杂质，提高 mRNA 的纯度。BioNTech 采用的反相高压液相色谱（RP-HPLC）技术能够特异性分离 5'-UTR 变异体，使产品纯度达到 99.9%。RP-HPLC 技术利用不同分子在固定相和流动相之间的分配差异，实现对特定 mRNA 变异体的精准分离。与此同时，物理纯化新方法不断涌现，瑞士团队开发的石墨烯氧化物吸附法通过特异性结合 dsRNA 实现高效去除，相关成果发表于《自然·通讯》。石墨烯氧化物具有独特的二维结构和表面化学性质，能够与 dsRNA 发生特异性相互作用，从而实现对 dsRNA 的高效吸附去除。国内企业目前仍以切向流过滤结合阴离子交换层析为主流工艺，信诺维医药开发的 pH 梯度洗脱法将回收率提升至 85%，但在 dsRNA 残留控制方面（普遍 0.5~1%）与国际先进水平（<0.1%）仍存在代际差距。这主要是由于国内在新型纯化介质研发、工艺优化以及质量控制体系建设等方面相对滞后。上海交通大学团队近期研发的仿生磷酸钙层析填料在实验室阶段展现出优异的 dsRNA 吸附性能，为国产纯化介质突破提供了新方向。仿生磷酸钙层析填料模拟了生物体内的矿物质结构，利用其特殊的表面性质实现对 dsRNA 的高效吸附，具有潜在的应用价值。

在质量研究体系构建方面，关键质量属性（CQA）的分析技术正朝着超灵敏、高分辨率方向发展^[29-33]。国际领先机构已建立毛细管电泳（1bp 分辨率）与 LC-MS/MS 联用技术，可精准定量 Cap0/Cap1/Cap2 结构并检测 0.001%级别的残留 pDNA。毛细管电泳能够根据核酸分子的大小和电荷差异进行分离，结合 LC-MS/MS 的高灵敏度检测，实现对 mRNA 关键结构和微量杂质的精确分析。美国 NIST 通过小角 X 射线散射（SAXS）揭示了 mRNA 在 -20℃ 储存时因双链结

构形成导致的降解机制,这一发现推动了稳定性研究从经验性测试向机理解析转变。SAXS 技术能够在纳米尺度上对 mRNA 的结构进行无损检测,为深入理解 mRNA 的稳定性提供了有力工具。国内科研团队则聚焦于检测方法的实用化创新:中国药检院开发的微流控芯片电泳法将完整性检测时间缩短至 10min,中科院团队利用 CRISPR-Cas12a 开发的 dsRNA 荧光检测法灵敏度达到 0.01ng/ μ g^[27,28]。然而,在质谱级分析设备与单分子测序技术的应用上,国内仍高度依赖进口仪器与试剂。这不仅增加了研究成本,还限制了国内在 mRNA 质量研究领域的深入发展,反映出国内在高端科研仪器研发制造方面的不足。

从产业化进程来看,国内外技术差距集中体现在工艺整合度与核心原料自主化层面。国际企业已实现从质粒制备到 LNP 包封的全封闭连续生产(如 Cytiva KUBio 系统),这种全封闭连续生产模式减少了人为操作带来的污染风险,提高了生产效率和产品质量的一致性。而国内 80%的生产设备需要进口,关键酶制剂(如 T7 RNA 聚合酶)的国产化率不足 30%。这使得国内在 mRNA 产业化过程中面临成本高、供应链不稳定等问题,制约了 mRNA 技术的大规模应用和商业化发展。监管科学方面,美国药典(USP)于 2023 年 6 月发布全球首个 mRNA 质量通则草案^[8],我国 CDE 同期发布的指导原则征求意见稿正加速技术标准体系建设^{[22][32]}。这表明国内外都在积极推动 mRNA 技术的规范化发展,但国内在标准制定的精细化、与国际标准的接轨等方面仍需进一步努力。值得肯定的是,国内高校与企业的联合攻关模式正在缩小技术代差:清华大学与艾博生物合作开发的 AI 驱动过程控制模型,可将 IVT 反应参数优化效率提升 5 倍;苏州艾博研发的两性离子聚合物冻干制剂使 mRNA 在常温下的稳定性突破 18 个月,技术水平与国际专利产品持平^[22]。这些成果展示了国内在 mRNA 技术研发方面的创新能力和潜力,为未来的发展奠定了良好基础。

展望未来, mRNA 原液制备工艺将朝着智能化、连续化方向深度演进。AI 驱动的降解预测模型(如 MIT 的 mRNA Degradomics 算法)与植物源性生产系统的探索,可能颠覆现有技术框架。AI 技术能够整合大量实验数据和分子信息,对 mRNA 的降解过程进行精准预测,为优化制备工艺和储存条件提供依据。植物源性生产系统则利用植物细胞的天然特性,为 mRNA 生产提供了一种绿色、低成本的选择。而在质量研究领域,从传统理化指标向功能活性评价(如翻译效

率动态模型)的延伸,标志着行业正进入“纳米级精度”竞争阶段。翻译效率动态模型能够更准确地评估 mRNA 在细胞内的功能活性,为 mRNA 产品的质量评价提供更全面的视角。尽管国内在设备国产化与核心酶制剂领域仍面临挑战,但通过仿生层析介质开发、微流控芯片技术突破等创新路径,有望在未来 3~5 年形成具有国际竞争力的技术体系,为全球 mRNA 技术发展注入中国动能。

第 2 章 Survivin mRNA 制备条件优化

Survivin-LAMP mRNA 由模板质粒 Survivin-LAMP 经过体外转录获得，其功能元件包括：5'帽子、3'UTR、5'UTR、Poly A 尾、LAMP、LAMP-TM、Survivin。Survivin-LAMP mRNA，是由模板 Survivin-LAMP 质粒经过体外转录获得。主要包括 5'帽子结构（通过 T7 RNA 聚合酶体外转录加帽获得）、5'UTR（质粒模板中引入）、LAMP 序列、Survivin 序列、LAMP-TM 序列以及 3'UTR（质粒模板中引入）和 PolyA 尾巴（质粒模板中引入）。其中，Survivin 为肿瘤特异性抗原，LAMP 及 LAMP-TM 区域可以增强抗原提呈细胞对 Survivin 的 MHC-II 类提呈途径。目的 Survivin-mRNA 结构示意图见图 2-1。

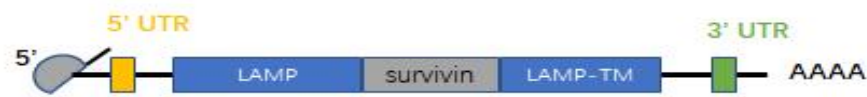


图 2-1. Survivin-mRNA 结构示意图

Figure 2-1. Schematic diagram of the Survivin-LAMP structure

2.1 实验材料

2.1.1 实验试剂与耗材

表 2-1 实验试剂与耗材

Table 2-1 Experimental reagent and consumables

试剂名称	生产厂家
体外转录试剂盒	Invitrogen
线性化质粒 DNA	自制
SpeI-HF	NEB
CutSmart Buffer	NEB
Nuclease-Free water	Thermo Fisher
无水乙醇	MACKLIN

TURBO Dnase (DNA 模板去除酶)	Invitrogen
氯化锂	Invitrogen
T7 Enzyme Mix (T7 RNA 聚合酶)	Invitrogen
DNase I	Invitrogen
pH 标准缓冲液 4.01	梅特勒
pH 标准缓冲液 7.00	梅特勒
pH 标准缓冲液 9.21	梅特勒
50×TAE 电泳缓冲液	康为世纪
6×DNA 上样缓冲液	康为世纪
6×Loading Buffer	TaKaRa
AGAROSE	Baygene
RNA Marker RL6000	TaKaRa
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent
GelRad	BIOTIUM
纯化水	自制
吸头	RAININ
50mL 离心管	NEST
1.5mL Ep 管	AXYGEN
一次性无菌注射器	KDL
0.22mm 滤膜	Millipore

2.1.2 实验仪器

表 2-2 实验仪器

Table 2-2 Experimental instrument

试剂名称	生产厂家
生物安全柜	Heal Force
医用冰箱	西门子
超低温冰箱	Thermo Fisher
超微量分光光度计	Thermo Fisher
实时荧光定量 PCR 仪	ABI
IKA 振荡混匀器	Agilent

离心机	Eppendorf
微孔板恒温振荡器	杭州瑞诚
全自动数码凝胶图像分析系统	上海天能科技有限公司
电热恒温水浴锅	上海一恒
2100 生物分析仪	Agilent
电泳仪	北京市六一仪器厂
电子天平	Sartorius
涡旋振荡器	SI
pH 计	梅特勒
掌上离心机	SCIOLOGEX
单道移液器 (L-100XLS)	RAININ
单道移液器 (L-200XLS)	RAININ
单道移液器 (L-1000XLS)	RAININ

2.2 制备方法

脑胶质母细胞瘤 Survivin mRNA 原液的制备方法包括：

2.2.1 质粒 DNA 模板制备方法

(1)通过分子克隆技术将 survivin 基因插入质粒载体，经测序验证序列与目的序列一致。将质粒 DNA 进行酶切实验，制备线性化质粒 DNA 模板。在生物安全柜中，用单道移液器吸取 600 μ g 质粒加入到 1.5mL Ep 管中；依次添加 Nuclease-Free water（无核酸酶水）、CutSmart Buffer、SpeI-HF，用 Nuclease-Free water 补充至 1200 μ l，充分混匀，平均分装至 2 个 1.5mL Ep 管中。质粒单酶切反应体系见表 2-3。

表 2-3 质粒单酶切反应（1 批次）成分及含量

Table 2-3 components and contents of the single restriction enzyme digestion reaction of plasmid (1batch)

成分	含量
SpeI-HF 限制性内切酶	30 μ l (20U/ μ l)

CutSmart Buffer 缓冲液	120 μ l
质粒 DNA	600 μ g
Nuclease-Free water	补加 Nuclease-Free water 至 1200 μ l

2.2.2 线性化质粒 DNA 模板回收方法

(1) 把 2.2.1 获得的线性化质粒 DNA 模板的 Ep 管放置在 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 $3\pm 0.5\text{h}$ ，加入 0.7 倍体积的异丙醇置于 -20°C 医用冰箱中沉淀 15min， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 、14000 $\times$ g 离心 $15\pm 1\text{min}$ 使 DNA 沉淀；

(2) 把质粒 DNA 沉淀放入生物安全柜中，每管加入 1mL 70%乙醇洗沉淀， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 、14000 $\times$ g 离心 $10\pm 1\text{min}$ ，重复此操作一次；

(3) 在生物安全柜内吹干乙醇后，加入 300 μ l Nuclease-Free water（无核酸酶水）复溶；

(4) 采用紫外-可见分光光度法检测线性化后的质粒 DNA 含量及纯度，用 300 μ l Nuclease-Free water（无核酸酶水）调整质粒含量为 $1.0\pm 0.1\text{mg/mL}$ ，纯度在 1.8~2.0，电泳检测呈单一条带；

(5) 线性化后的质粒暂存于 -20°C 医用冰箱，并立即用于体外转录，不进行长期储存。

2.2.3 体外转录方法

在 37°C 条件下，以线性化质粒 DNA 为模板，利用 RNA 聚合酶、NTPs 及帽类似物进行转录反应（通常 2~4h），同时引入 5'帽结构和 3'poly(A)尾以增强 mRNA 稳定性及提升翻译效率；

(1) 步骤 1：把试剂及模板放入生物安全柜中，取一支干净的 50mL 离心管，依次加入线性化模板、Nuclease-Free water、10 $\times$ T7 Reaction Buffer、2 $\times$ T7 NTP/CAP 和 T7 Enzyme Mix，充分混匀；转录反应体系见表 2-4，mMessage mMACHINE 试剂盒具体成分见表 2-5；

(2) 步骤 2：把配制完成的转录体系放入提前开启，温度已达到设定温度的水浴锅中， $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 $3\pm 0.5\text{h}$ ，进行体外转录反应。

表 2-4 体外转录反应体系（1 批次）成分及含量

Table 2-4 Components and contents of the in vitro transcription reaction system (1 batch)

成分	含量
10×T7 Reaction Buffer	1000μl
2×T7 NTP（核苷三磷酸）/CAP	5000μl
DNA 线性化模板	400μg
T7 Enzyme Mix（T7 RNA 聚合酶）	1000μl
Nuclease-Free water（无核酸酶水）	补加至 10mL

表 2-5 mMessage mMACHINE 试剂盒成分表

Table 2-5 Ingredient list of the mMessage mMACHINE kit

名称	成分
Nuclease-Free water （无核酸酶水）	无核酸酶水
T7 Enzyme Mix （T7 RNA 聚合酶）	含 50%甘油的 RNA 聚合酶、RNase 酶抑制剂
10×T7 Reaction Buffer （10×T7 反应缓冲液）	盐类、缓冲液、二硫苏糖醇
	SP6 试剂盒 T7 and T3 试剂盒
	ATP（三磷酸苷） 10mM 15mM
2×T7 NTP（核苷三磷酸）	CTP（三磷酸胞苷） 10mM 15mM
/CAP	UTP（三磷酸尿苷） 10mM 15mM
	GTP（三磷酸鸟苷） 2mM 3mM
	cap analog（帽子类似物） 8mM 12mM
DNA 模板去除酶	DNA 模板去除酶（2U/μl）
氯化锂沉淀液	7.5M 氯化锂、50mM EDTA

2.2.4 纯化方法

采用氯化锂结合异丙醇沉淀初步纯化，随后通过 DNase I 在 37°C 条件下消化残留 DNA（时间为 15~30min），最终使用异丙醇和乙醇离心的方式纯化；

(1) 步骤 1: 将 DNA 模板去除, 在体外转录步骤结束后, 向体外转录后的反应体系中加入 TURBO Danse, 在 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 $15\pm 1\text{min}$, 以去除 DNA 模板;

(2) 步骤 2: 对 mRNA 进行纯化, DNA 模板去除后, 向反应体系中加入预冷的氯化锂- 20°C 沉淀, 然后用预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀, 在生物安全柜中风干后, 用 Nuclease-Free water (无核酸酶水) 复溶, 并采用紫外-可见分光光度法检测 mRNA 浓度, 范围 $1.0\pm 0.1\text{mg/mL}$;

(3) 步骤 3: 将上述反应体系进行过滤操作, 在生物安全柜中, 使用 $0.22\mu\text{m}$ 针头滤器对 Survivin-LAMP mRNA 溶液进行除菌过滤;

2.3 Survivin mRNA 制备条件优化

本研究主要包括 survivin mRNA 原液的制备条件优化、survivin mRNA 纯化条件优化两个方面。

2.3.1 Survivin mRNA 原液的制备工艺优化

Survivin mRNA 合成工艺设计选择 Ambion 公司的基于 T7 RNA 聚合酶的 RNA 转录试剂盒。选择 T7 RNA 聚合酶 (T7 RNA Polymerase), 该酶是一种高度特异性识别 T7 启动子序列的 DNA 依赖的 5'-3'RNA 聚合酶, 可催化单链或双链 T7 启动子下游 NTP 的掺入。

该转录试剂盒为高产量加帽 RNA 转录试剂盒, 使用了 Ambion 公司的专利性高产量转录技术, 可以在 2h 常规反应中利用 $20\mu\text{l}$ 体积中的 $1\mu\text{g}$ 模板 DNA 合成 $15\sim 35\mu\text{g}$ 的 7-甲基鸟嘌呤加帽 RNA。这种反应获得的加帽 RNA 产量是传统体外转录反应产量的 10~50 倍。加帽类似物与 GTP 的比值已进行了优化, 保证产量的前提下使转录产物的加帽比率达到最高。试剂盒还包含了 LiCl 沉淀液, 它可以高效地将蛋白质和未进入转录产物的核苷酸 (包括游离的加帽类似物) 与加帽 RNA 分离开来, 从而提高翻译效率; 另外, 试剂盒还提供了无核酸酶水, 作为 mRNA 的溶剂, 从而保证产物的稳定性。

本研究将针对体外转录过程中的关键参数进行优化, 制备过程中对目的基因质粒线性化、survivin mRNA 转录及纯化关键工艺参数及过程控制指标进行了研究和优化, 包括: (1) 质粒线性化反应时间; (2) 质粒线性化反应体系酶体积、

转录反应时间；（3）转录反应体系氯化锂沉淀离心转速及时间、转录反应体系线性化模板量^[3]。从而确定最优的制备工艺，用于 survivin mRNA 原液制备。

2.3.1.1 目的基因质粒线性化反应体系酶体积研究

在 survivin mRNA 的制备过程中，目的基因质粒线性化反应体系酶体积是影响线性化效果和成本的关键因素。该部分研究旨在确定目的基因质粒线性化的反应体系酶体积。通过设置不同反应体系酶体积，进行实验并对产物进行电泳分析，依据条带情况确定最佳酶体积，为后续 survivin mRNA 制备提供关键参数。

（1）实验设计与样本获取：每个反应总体积设为 20 μ l，其中包含 2 μ l CutSmart Buffer、10 μ g 质粒。将 SpeI-HF 作为单一变量，分别设置 0.5 μ l，0.8 μ l，1 μ l 三个水平。每个变量设置 3 个平行实验，并取 3 批质粒重复检测，以确保实验结果的可靠性。在反应结束后，分别收集不同反应时间下的产物样本，用于后续的电泳检测。最终根据电泳结果，选取最佳体积。

（2）选择标准为：产物中不含未线性化的质粒，酶用量尽量少。

2.3.1.2 目的基因质粒线性化反应体系反应时间研究

此研究实验旨在确定目的基因质粒线性化的最佳反应时间。通过设置不同反应时间，进行实验并对产物进行电泳分析，依据条带情况确定最佳反应时间，为后续 survivin mRNA 的制备提供关键参数。

（1）实验设计与样本获取：每个反应总体积设为 20 μ l，其中包含 2 μ l CutSmart Buffer、10 μ g 质粒和 0.5 μ l SpeI-HF。将酶切反应时间作为单一变量，分别设置 1h、2h、3h 三个水平。每个变量设置 3 个平行实验，并取 3 批质粒重复检测，以确保实验结果的可靠性。在反应结束后，分别收集不同反应时间下的产物样本，用于后续的电泳检测。最终根据电泳结果，选取最佳反应时间。

（2）选择标准为：产物中不含未线性化的质粒，酶切反应时间尽量短。

2.3.1.3 Survivin mRNA 转录反应体系线性化质粒模板量研究

在 survivin mRNA 的制备过程中，survivin mRNA 转录反应体系线性化质粒模板量是影响转录效果和成本的关键因素之一。这部分研究通过设置不同的模板量进行实验，对产物浓度及电泳结果进行分析，从而确定最佳的模板量，为优化 survivin mRNA 的制备工艺提供重要依据。

(1) 实验设计与样本准备：为探究线性化质粒模板量对 survivin mRNA 转录反应的影响,实验设定每个反应总体积为 20 μ l,其中包含 10 $\times$ T7 Reaction Buffer 2 μ l、2 $\times$ T7 NTP/CAP 10 μ l 和 T7 Enzyme Mix 2 μ l。将线性化模板量作为单一变量,分别设置为 800ng、1000ng、1200ng 这三个水平。每个变量进行 3 个平行实验,并取 3 批质粒重复检测,以确保实验结果的可靠性。在完成转录反应后,对各样本进行相应处理,用于后续的浓度测定和电泳检测。

2.3.1.4 Survivin mRNA 转录反应体系时间优化研究

Survivin mRNA 转录反应体系时间的优化对 survivin mRNA 的产量和质量至关重要。这部分研究通过设置不同的转录反应时间,对产物进行浓度测定和电泳检测,结合图分析确定最佳反应时间,为 survivin mRNA 的高效制备提供关键参数。

(1) 实验设计与样本准备：为探究 survivin mRNA 转录反应体系的最佳反应时间,实验设定每个反应总体积为 20 μ l,其中包含 10 $\times$ T7 Reaction Buffer 2 μ l、2 $\times$ T7 NTP/CAP 10 μ l、T7 Enzyme Mix 2 μ l 以及 800ng 线性化模板。将转录反应时间作为单一变量,分别设置为 2h、3h、4h 这三个水平。每个变量进行 3 个平行实验,并取 3 批质粒重复检测,以确保实验结果的可靠性。反应结束后,对各样本进行处理,用于后续的浓度测定和电泳检测。最终根据产物浓度,选取最佳反应时间。

(2) 选择标准为:在高产量的情况下,转录反应时间尽量短。

2.3.2 Survivin mRNA 纯化条件优化

在 survivin mRNA 的制备过程中,纯化工艺对于获取高质量的 survivin mRNA 至关重要。本部分研究聚焦于转录反应体系中氯化锂沉淀离心转速及时间对纯化效果的影响,旨在确定最佳的纯化参数。通过一系列实验,对不同离心转速和时间下的 survivin mRNA 产物浓度进行测定,并结合图表进行分析,最终得出最佳工艺参数。

(1) 实验设计:实验设定每个反应总体积为 20 μ l,其中包含 10 $\times$ T7 Reaction Buffer 2 μ l、2 $\times$ T7 NTP/CAP 10 μ l、T7 Enzyme Mix 2 μ l 以及 800ng 线性化模板,转录反应时间固定为 3h。将离心转速和离心时间作为变量,离心转速分别设置为 14000 $\times$ g、16000 $\times$ g、20000 $\times$ g,每个转速下的离心时间又分别设置为 15min、

30min、45min。每个变量组合进行 3 个平行实验，并取 3 批质粒重复实验，以确保实验结果的可靠性。

2.3.3 制备条件优化结果与分析

2.3.3.1 质粒线性化反应体系酶体积研究结果与分析

(1) 电泳检测与图谱获取：采用琼脂糖凝胶电泳技术对处理后的样本进行检测。在电场作用下，不同酶体积反应后的质粒在凝胶中会根据其大小和电荷等特性迁移到不同位置，形成相应的条带。通过凝胶成像系统，得到清晰的电泳图谱（图 2-2），图谱中不同泳道对应不同酶体积的反应样本。

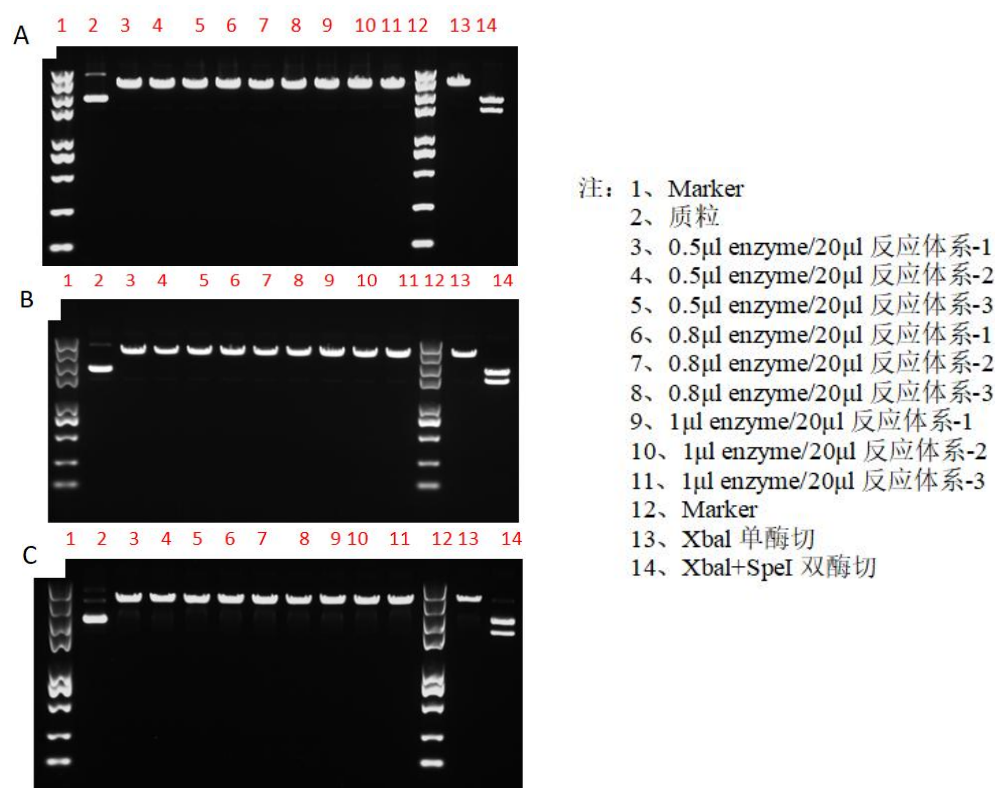


图 2-2 质粒线性化反应体系酶体积研究的电泳结果

Figure 2-2 Electrophoresis results of the study on the enzyme volume in the plasmid linearization reaction system.

(2) 图谱分析与结果判断

1) 条带完整性分析：观察电泳图发现，当酶体积分别为 0.5 μ l、0.8 μ l、1 μ l 时，线性化后的质粒均呈现单一条带。这表明在这三种酶体积条件下，质粒都能成功实现线性化，且不存在未线性化的质粒。单一条带意味着酶切反应较为彻底，没有出现部分酶切或其他异常情况，保证了后续转录反应模板的质量。

2) 条带亮度与产量关联推测：条带的亮度与 DNA 的含量相关，一般来说，亮度越高，说明对应样本中的线性化质粒含量相对越高。在该实验的图谱中，虽然 0.5 μ l、0.8 μ l、1 μ l 酶体积对应的条带亮度可能存在一定差异，但从整体上看，差异并不显著。这意味着在这三种酶体积下，线性化质粒的产量相近。

2.3.3.2 质粒线性化反应体系反应时间研究结果与分析

(1) 电泳检测与图谱呈现：对收集的样本进行琼脂糖凝胶电泳，利用凝胶成像系统得到电泳图谱（图 2-3）。在图谱中，不同泳道对应不同反应时间的样本，DNA 条带的位置和亮度反映了样本中质粒的状态和含量。

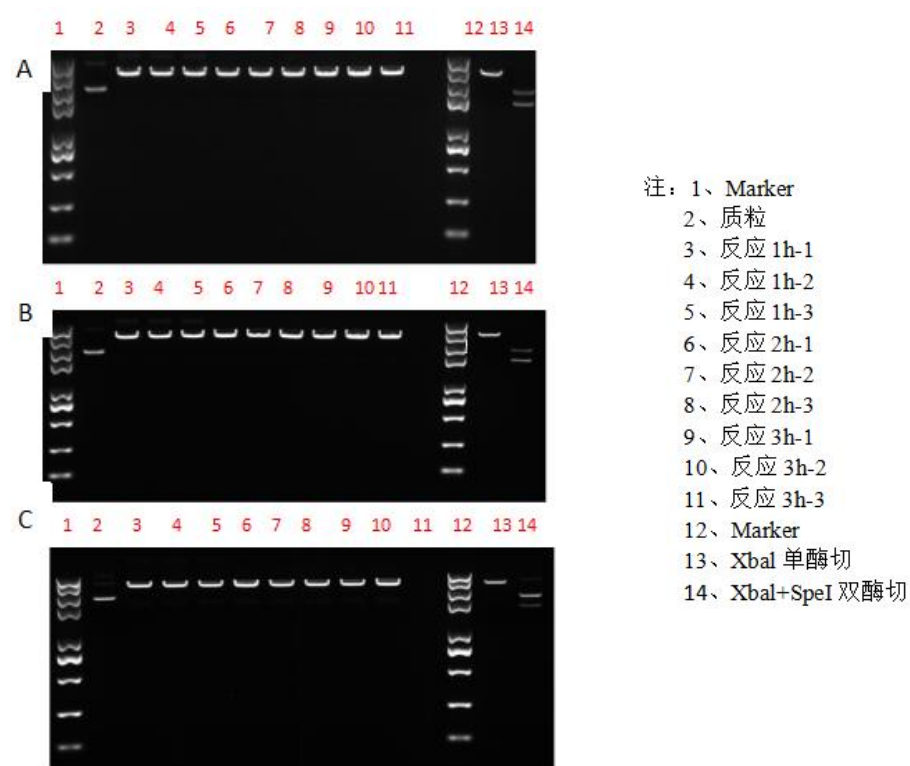


图 2-3 质粒线性化酶切反应时间的研究的电泳结果

Figure 2-3 Electrophoresis results of the study on the digestion time of plasmid linearization reaction.

(2) 图谱分析与结果判断

1) 条带完整性判断：观察电泳图发现，当反应时间为 1h、2h、3h 时，线性化后的质粒在图谱上均呈现单一条带。这表明在这三个时间点，质粒都能成功实现线性化，且不存在未线性化的质粒。单一条带意味着酶切反应较为彻底，没有出现部分酶切或其他异常情况，保证了后续转录反应模板的质量。

2) 条带亮度与产量关联分析: 条带的亮度与 DNA 的含量相关, 亮度越高, 说明对应样本中的线性化质粒含量相对越高。从图中可以看出, 1h、2h、3h 对应的条带亮度虽存在一定差异, 但差异并不显著。这意味着在这三个时间点, 线性化质粒的产量相近。由此可知, 1~3h 这个时间范围内, 延长反应时间对线性化质粒的产量提升效果不明显。

2.3.3.3 Survivin mRNA 转录反应体系线性化质粒模板量研究

(1) 检测与数据获取: 使用特定方法对转录产物进行浓度测定, 得到不同模板量下 mRNA 的浓度数据, 如表 2-6~2-7 所示。同时, 对转录产物进行琼脂糖凝胶电泳, 在电场作用下, 不同模板量转录出的 mRNA 会在凝胶上迁移至不同位置, 形成相应条带, 通过凝胶成像系统获取电泳图谱 (图 2-4~图 2-5)。

表 2-6 转录反应体系线性化模板量研究的结果 (I)

Table 2-6 Results of the study on the amount of linearized template
in the transcription reaction system (I)

线性化 模板批 号	线性化模 板质量	mRNA-浓 度 1 (ng/μl)	mRNA-浓 度 2 (ng/μl)	mRNA 浓 度-平均 (ng/μl)	mRNA 体积 (μl)	mRNA 质量 (μg)	均值 (μg) ±SD
01	800ng	1374.8	1336.1	1355.5	30	40.7	
01	800ng	1369.0	1382.2	1375.6	30	41.3	40.2±1.5
01	800ng	1284.7	1283.5	1284.1	30	38.5	
01	1000ng	1296.4	1248.0	1272.2	30	38.2	
01	1000ng	1301.4	1221.0	1261.2	30	37.8	38.2±0.5
01	1000ng	1335.8	1244.6	1290.2	30	38.7	
01	1200ng	1311.5	1342.1	1326.8	30	39.8	
01	1200ng	1384.2	1375.1	1379.7	30	41.4	41.2±1.3
01	1200ng	1371.8	1448.6	1410.2	30	42.3	

表 2-7 转录反应体系线性化模板量研究的结果 (二)

Table 2-7 Results of the study on the amount of linearized template
in the transcription reaction system (II)

线性化 模板批 号	线性化模 板质量	mRNA-浓 度 1 (ng/μl)	mRNA-浓 度 2 (ng/μl)	mRNA 浓 度-平均 (ng/μl)	mRNA 体积 (μl)	mRNA 质量 (μg)	均值 (μg) ±SD
-----------------	-------------	--------------------------	--------------------------	---------------------------	--------------------	--------------------	-------------------

02	800ng	1318.3	1351.1	1334.7	30	40.0	
02	800ng	1149.3	1172.7	1161.0	30	34.8	36.4±3.1
02	800ng	1153.1	1138.4	1145.8	30	34.4	
02	1000ng	1106.9	1081.4	1094.2	30	32.8	
02	1000ng	1101.7	1095.7	1098.7	30	33.0	33.4±0.9
02	1000ng	1143.5	1159.8	1151.7	30	34.5	
02	1200ng	1177.5	1109.7	1143.6	30	34.3	
02	1200ng	1091.6	1111.5	1101.6	30	33.0	33.3±0.9
02	1200ng	1077.0	1094.9	1086.0	30	32.6	

表 2-8 转录反应体系线性化模板量研究的结果 (三)

Table 2-8 Results of the study on the amount of linearized template
in the transcription reaction system (III)

线性化 模板批 号	线性化模板 质量	mRNA-浓 度 1 (ng/μl)	mRNA-浓 度 2 (ng/μl)	mRNA 浓 度-平均 (ng/μl)	mRNA 体积 (μl)	mRNA 质量 (μg)	均值 (μg) ±SD
03	800ng	1207.9	1188.2	1198.1	30.0	35.9	
03	800ng	1168.6	1160.1	1164.4	30.0	34.9	35.2 ±0.6
03	800ng	1175.9	1150.1	1163.0	30.0	34.9	
03	1000ng	1066.8	1042.7	1054.8	30.0	31.6	
03	1000ng	1143.1	1143.3	1143.2	30.0	34.3	32.7 ±1.4
03	1000ng	1087.1	1060.7	1073.9	30.0	32.2	
03	1200ng	1084.6	1088.5	1086.6	30.0	32.6	
03	1200ng	1361.2	1364.1	1362.7	30.0	40.9	38.0 ±4.7
03	1200ng	1351.5	1355.9	1353.7	30.0	40.6	

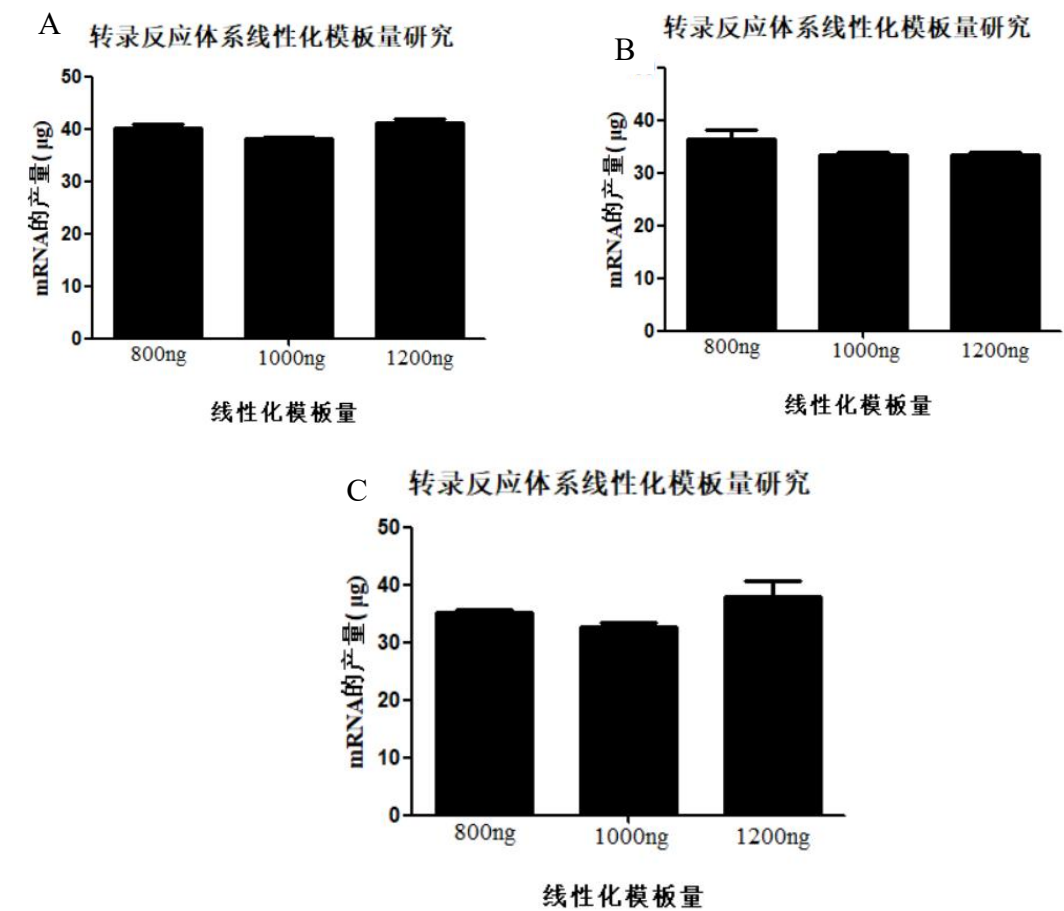


图 2-4 转录反应体系线性化模板量研究的 survivin mRNA 产量结果

Figure 2-4 Results of the yield of survivin mRNA in the study on the amount of linearized template in the transcription reaction system

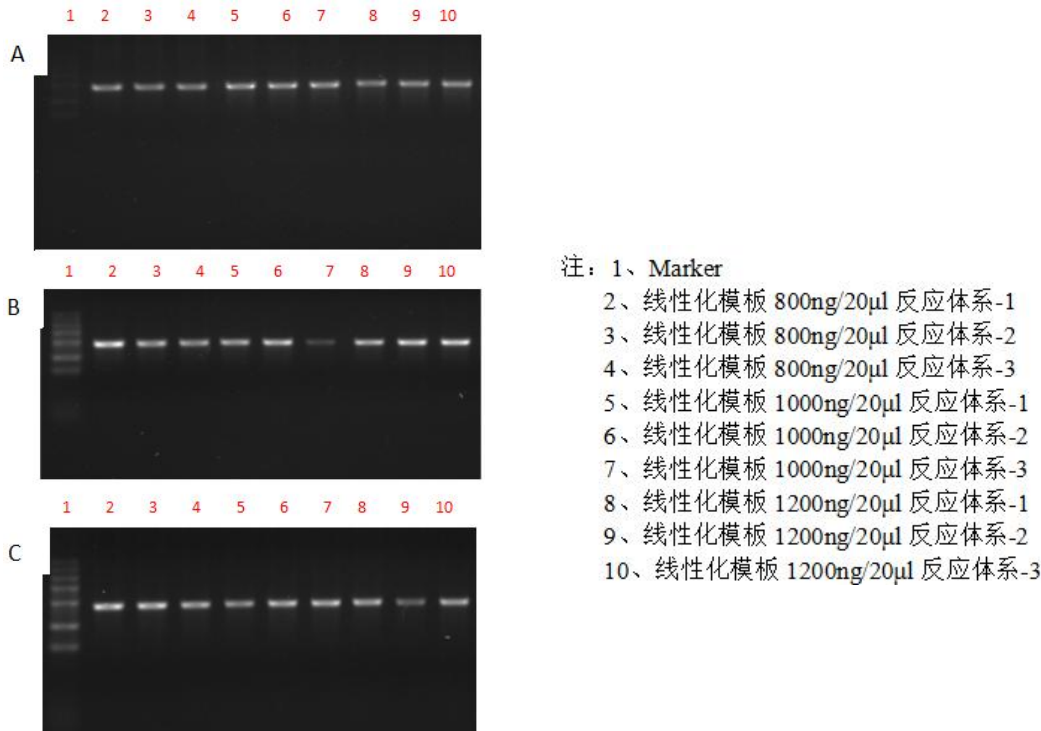


图 2-5 转录反应体系线性化质粒模板量研究的 mRNA 电泳结果

Figure 2-5 Electrophoresis results of mRNA in the study on the amount of linearized plasmid template in the transcription reaction system

(2) 图谱分析与结果判断

1) 条带完整性分析: 观察电泳图发现, 当线性化质粒模板量分别为 800ng、1000ng、1200ng 时, survivin mRNA 均呈现单一条带。这表明在这三种模板量条件下, 转录反应均能成功进行, 且产物中不含未线性化的质粒, 保证了 survivin mRNA 的质量。单一条带意味着转录过程较为稳定, 没有出现异常的转录产物, 为后续的实验和应用提供了可靠的物质基础。

2) 产量分析: 结合产物浓度数据及电泳条带的亮度(条带亮度与 survivin mRNA 含量相关, 亮度越高, 含量相对越高)进行分析。从表中数据及图 5 中可以看出, 虽然不同模板量下 survivin mRNA 的产量存在一定数值差异, 但整体差别甚微。这说明在一定范围内增加模板量, 对 survivin mRNA 产量的提升效果并不明显。

2.3.3.4 Survivin mRNA 转录反应体系时间优化研究

根据 survivin mRNA 转录反应体系时间优化研究实验进行图谱分析与结果判断, 使用特定的方法对转录产物进行浓度测定, 得到不同反应时间下 survivin mRNA 的浓度数据, 具体数据见表 2-9~2-11。同时, 对转录产物进行琼脂糖凝胶电泳, 在电场的作用下, 不同反应时间转录出的 survivin mRNA 会在凝胶上迁移至不同位置, 形成相应条带, 通过凝胶成像系统获取电泳图谱(图 2-6)。

(1) 条带完整性分析: 观察电泳图发现, 当转录反应时间分别为 2h、3h、4h 时, survivin mRNA 均呈现单一条带。这表明在这三种反应时间条件下, 转录反应均能成功进行, 且产物中不含未线性化的质粒, 保证了 survivin mRNA 的质量。单一条带意味着转录过程较为稳定, 没有出现异常的转录产物, 为后续的实验和应用提供了可靠的物质基础。

(2) 产量分析: 结合产物浓度数据及电泳条带的亮度(条带亮度与 survivin mRNA 含量相关, 亮度越高再含量相对越高)进行分析。从表中数据及图 7 中可以看出, 2h 反应时 survivin mRNA 产量可以达到最大产量。这说明在该实验条件下, 2h 的反应时间能够使转录反应达到较高的效率, 产生较多的 mRNA。

表 2-9 转录反应时间研究的结果（一）

Table 2-9 Results of the Study on the Transcription Reaction Time (I)

线性化模 板批号	反应 时间	mRNA-浓度 1 (ng/ μ l)	mRNA-浓度 2 (ng/ μ l)	mRNA 浓度- 平均 (ng/ μ l)	mRNA 体 积 (μ l)	mRNA 质 量 (μ g)	均值 (μ g) $\pm$ SD
01	2h	1325.0	1369.9	1347.5	30	40.4	
01	2h	1278.4	1233.3	1255.9	30	37.7	37.7 $\pm$ 2.7
01	2h	1157.5	1182.4	1170.0	30	35.1	
01	3h	1063.3	1030.7	1047.0	30	31.4	
01	3h	1258.1	1236.3	1247.2	30	37.4	34.5 $\pm$ 3.0
01	3h	1176.3	1142.4	1159.4	30	34.8	
01	4h	1310.6	1296.7	1303.7	30	39.1	
01	4h	1237.1	1224.2	1230.7	30	36.9	39.5 $\pm$ 2.8
01	4h	1437.7	1396.4	1417.1	30	42.5	

表 2-10 转录反应时间研究的结果（二）

Table 2-10 Results of the Study on the Transcription Reaction Time (II)

线性化模 板批号	反应 时间	mRNA-浓度 1 (ng/ μ l)	mRNA-浓度 2 (ng/ μ l)	mRNA 浓度- 平均 (ng/ μ l)	mRNA 体 积 (μ l)	mRNA 质 量 (μ g)	均值 (μ g) $\pm$ SD
02	2h	1153.6	1022.4	1088.0	30	32.6	
02	2h	1111.2	1098.8	1105.0	30	33.2	34.0 $\pm$ 2.0
02	2h	1220.6	1196.6	1208.6	30	36.3	
02	3h	1313.2	1286.7	1300.0	30	39.0	
02	3h	1268.2	1311.0	1289.6	30	38.7	38.8 $\pm$ 0.2
02	3h	1304.1	1282.9	1293.5	30	38.8	
02	4h	1222.9	1252.3	1237.6	30	37.1	
02	4h	1303.7	1294.3	1299.0	30	39.0	38.2 $\pm$ 1.0
02	4h	1291.1	1269.8	1280.5	30	38.4	

表 2-11 转录反应时间研究的结果（三）

Table 2-11 Results of the Study on the Transcription Reaction Time (III)

线性化模 板批号	反应 时间	mRNA-浓度 1 (ng/ μ l)	mRNA-浓度 2 (ng/ μ l)	mRNA 浓度- 平均 (ng/ μ l)	mRNA 体 积 (μ l)	mRNA 质 量 (μ g)	均值 (μ g) $\pm$ SD
03	2h	1325.0	1369.9	1347.5	30	40.4	37.0 $\pm$ 0.9

03	2h	1278.4	1233.3	1255.9	30	37.7	
03	2h	1157.5	1182.4	1170.0	30	35.1	
03	3h	1063.3	1030.7	1047.0	30	31.4	
03	3h	1258.1	1236.3	1247.2	30	37.4	41.6±2.9
03	3h	1176.3	1142.4	1159.4	30	34.8	
03	4h	1310.6	1296.7	1303.7	30	39.1	
03	4h	1237.1	1224.2	1230.7	30	36.9	42.4±0.2
03	4h	1437.7	1396.4	1417.1	30	42.5	

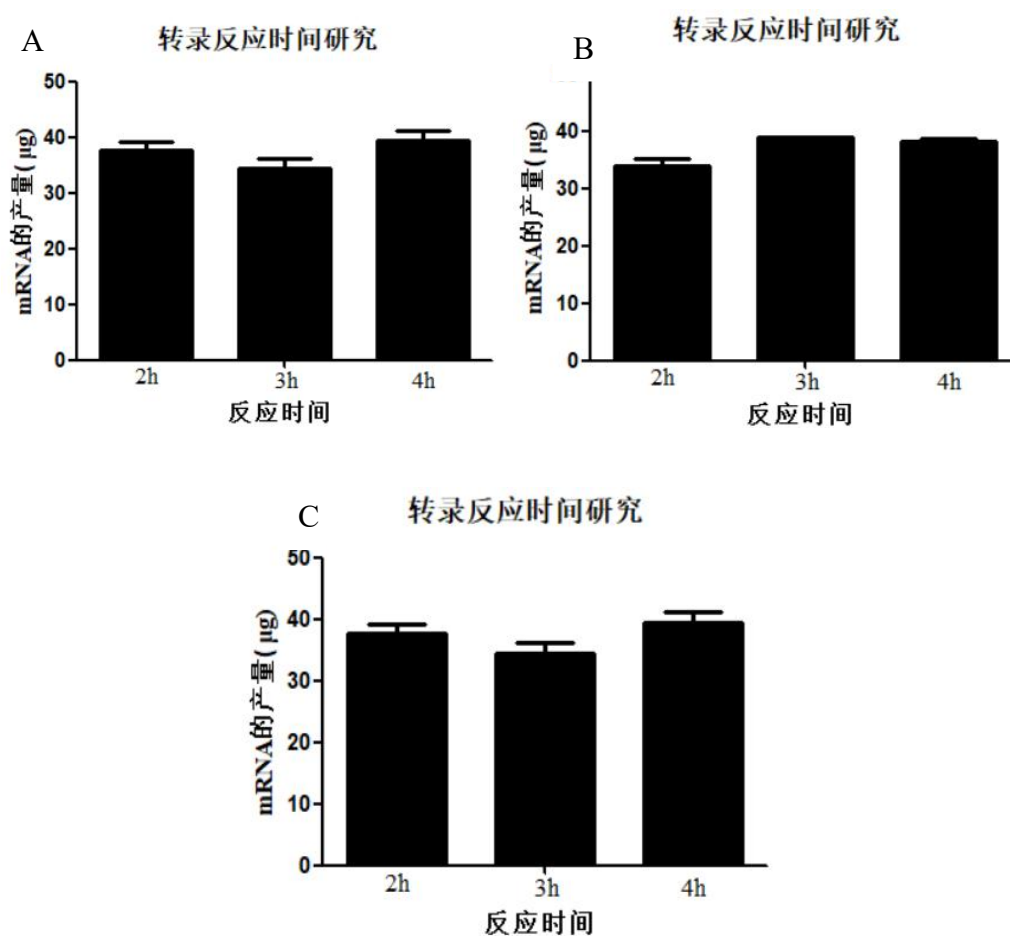


图 2-6 转录反应时间研究的结果

Figure 2-6 Results of the study on the transcription reaction time

2.3.4 Survivin mRNA 纯化条件优化结果与分析

在 survivin mRNA 纯化实验结束后, 对不同条件下的 survivin mRNA 产物进行浓度测定, 得到一系列数据, 如: 当离心转速为 $14000\times g$, 离心时间为 15min 时, mRNA 浓度在不同批次样本中的均值为 $1267.7\text{ng}/\mu\text{l}$ (详见表 2-12)。当离

心转速为 16000×g，离心时间为 15min 时，mRNA 浓度均值为 1280.7ng/μl（详见表 2-13）。当离心转速为 20000×g，离心时间为 15min 时，mRNA 浓度均值为 1641.0ng/μl（详见表 2-14）。

表 2-12 转录反应体系氯化锂沉淀 14000×g 离心时间研究的结果（一）

Table 2-12 Results of the Study on the Centrifugation Time at 14000×g for Lithium

Chloride Precipitation in the Transcription Reaction System (I)

线性化模 板批号	离心 转速	离心 时间	mRNA-浓 度 1 (ng/μl)	mRNA-浓度 2 (ng/μl)	mRNA 浓度- 平均 (ng/μl)	mRNA 体积	mRNA 质 量 (μg)	均值 (μg) ±SD
03	14000×g	15 min	1284.5	1250.9	1267.7	30μl	38.0	
03	14000×g	15 min	1366.1	1353.1	1359.6	30μl	40.8	39.2±1.4
03	14000×g	15 min	1328.8	1263.0	1295.9	30μl	38.9	
03	14000×g	30 min	1223.2	1163.7	1193.5	30μl	35.8	
03	14000×g	30 min	1361.8	1340.9	1351.4	30μl	40.5	39.2±2.9
03	14000×g	30 min	1393.7	1355.9	1374.8	30μl	41.2	
03	14000×g	45 min	1399.9	1374.1	1387.0	30μl	41.6	
03	14000×g	45 min	1417.0	1413.7	1415.4	30μl	42.5	42.7±1.2
03	14000×g	45 min	1479.0	1456.6	1467.8	30μl	44.0	

表 2-13 转录反应体系氯化锂沉淀 14000×g 离心时间研究的结果（二）

Table 2-13 Results of the Study on the Centrifugation Time at 14000×g for Lithium

Chloride Precipitation in the Transcription Reaction System (II)

线性化模 板批号	离心 转速	离心 时间	mRNA-浓 度 1 (ng/μl)	mRNA-浓度 2 (ng/μl)	mRNA 浓度- 平均 (ng/μl)	mRNA 体积	mRNA 质 量 (μg)	均值 (μg) ±SD
03	16000×g	15 min	1274.9	1286.5	1280.7	30μl	38.4	
03	16000×g	15 min	1199.9	1176.1	1188.0	30μl	35.6	35.4±3.1
03	16000×g	15 min	1077.5	1070.0	1073.8	30μl	32.2	
03	16000×g	30 min	1375.9	1367.0	1371.5	30μl	41.1	
03	16000×g	30 min	1311.9	1312.1	1312.0	30μl	39.4	39.9±1.0
03	16000×g	30 min	1307.7	1304.5	1306.1	30μl	39.2	
03	16000×g	45 min	1302.4	1269.4	1285.9	30μl	38.6	
03	16000×g	45 min	1348.8	1349.9	1349.4	30μl	40.5	39.2±1.1

03	16000×g	45 min	1292.1	1279.3	1285.7	30μl	38.6
----	---------	--------	--------	--------	--------	------	------

表 2-14 转录反应体系氯化锂沉淀 16000×g 离心时间研究的结果（三）

Table 2-14 Results of the Study on the Centrifugation Time at 14000×g for Lithium Chloride Precipitation in the Transcription Reaction System（III）

线性化模 板批号	离心 转速	离心 时间	mRNA-浓 度 1 (ng/μl)	mRNA-浓度 2 (ng/μl)	mRNA 浓度- 平均 (ng/μl)	mRNA 浓度- 体积 量 (μg)	质 均 值(μg)	±SD
03	20000×g	15 min	1637.2	1644.8	1641.0	30μl	49.2	
03	20000×g	15 min	1413.0	1399.3	1406.2	30μl	42.2	44.8±3.8
03	20000×g	15 min	1442.1	1421.8	1432.0	30μl	43.0	
03	20000×g	30 min	1426.8	1326.3	1376.6	30μl	41.3	
03	20000×g	30 min	1390.0	1359.2	1374.6	30μl	41.2	41.3±0.1
03	20000×g	30 min	1382.2	1373.1	1377.7	30μl	41.3	
03	20000×g	45 min	1354.3	1340.6	1347.5	30μl	40.4	
03	20000×g	45 min	1438.7	1413.6	1426.2	30μl	42.8	41.8±1.2
03	20000×g	45 min	1399.9	1407.5	1403.7	30μl	42.1	

根据实验数据绘制折线图（图 2-7），横坐标为离心转速及离心时间的不同组合（14000×g-15min，14000×g-30min，14000×g-45min，16000×g-15min，16000×g-30min，16000×g-45min、20000×g-15min、20000×g-30min、20000×g-45min），纵坐标为 mRNA 产量（通过浓度和体积计算得出）。在图中，不同的折线代表不同离心转速下的产量变化情况。

氯化锂沉淀离心转速及离心时间研究

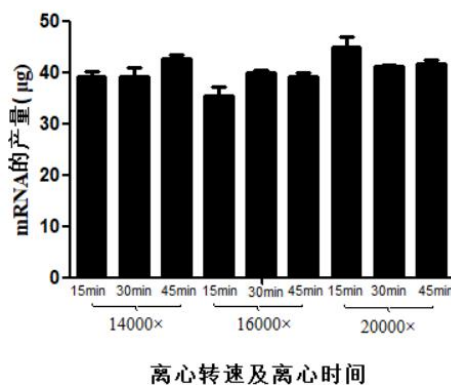


图 2-7 转录反应体系氯化锂沉淀离心转速及时间研究的结果

Figure 2-7 Results of the study on the centrifugation speed and time for lithium chloride precipitation in the transcription reaction system

依据图表进行结果分析，分析过程如下：

(1) 产量趋势分析：从图表中可以看出，不同离心转速和时间组合下的 survivin mRNA 产量呈现出一定的变化趋势。在 14000×g 的转速下，随着离心时间从 15min 延长到 45min，产量整体呈上升趋势；在 16000×g 的转速下，产量变化相对较为平稳；在 20000×g 的转速下，15min 时产量较高，之后随着时间延长产量有所下降。

(2) 最佳参数筛选：对比不同组合的产量，发现 16000×g、45min 和 20000×g、15min 这两组条件下的产量相当，均能获得较高产量的 survivin mRNA。

2.3.5 制备条件优化实验结论

2.3.5.1 质粒线性化反应体系酶体积研究结论

确定最佳酶体积，综合考虑线性化效果和成本因素。在保证线性化效果的前提下，从成本控制角度出发，应尽量减少酶的用量。由于三种酶体积都能达到理想的线性化效果，且产量相近，而 0.5μl 的酶用量最少，所以最终选用 0.5μl enzyme/20μl 为统一操作标准。这样在满足实验需求的同时，能够有效降低生产成本，为后续的 survivin mRNA 制备提供更经济、高效的条件。

2.3.5.2 质粒线性化反应体系反应时间研究结论

确定最佳反应时间，综合考虑线性化效果和后续放大生产的需求。从线性化效果而言，1h、2h、3h 都能达到理想的线性化结果；然而，在后续酶切体系放大时，需要保证反应体系受热均匀、酶切完全。较长的反应时间更有利于实现这一目标，3h 的反应时间在保证线性化效果的同时，能更好地满足放大生产的要求，确保生产过程的稳定性和可控性。因此，综合各项因素，确定最佳酶切反应时间为 3h。

2.3.5.3 Survivin mRNA 转录反应体系线性化质粒模板量研究结论

确定最佳模板量，综合考虑转录效果和成本因素。由于三种模板量下都能得到单一条带且产量相近，从成本控制的角度出发，应尽量减少模板的使用量。800ng 的模板量既能满足实验对产量的要求，又能降低原材料的消耗，节约成本。因此，最终选用线性化质粒模板用量为 800ng/20μl 转录体系作为统一操作标准，这样在保证 survivin mRNA 质量和产量的同时，实现了成本的有效控制，为大规模生产提供了更经济可行的方案。

2.3.5.4 Survivin mRNA 转录反应体系时间优化研究结论

确定最佳反应时间，虽然 2h 反应能达到最大产量，但从后期放大生产的角度综合考虑，3h 的反应时间更具优势。在大规模生产中，反应体系的体积会增大，需要更长的时间来保证反应体系受热均匀、反应充分。3h 的反应时间能够满足这一需求，确保生产的稳定性和可控性，有利于提高生产效率。因此，综合各项因素，最终选用 3h 为统一操作标准，这样在保证 survivin mRNA 产量的同时，更符合实际生产的要求，为 survivin mRNA 的大规模制备提供了更优的反应时间条件。

2.3.5.5 Survivin mRNA 纯化条件优化研究结论

通过比较双因素正交的转录效果，从节省时间及防止产物 survivin mRNA 降解的角度考虑，后期放大生产选用 20000×g、15min 为统一操作标准。因为在保证产量的前提下，较短的离心时间可以减少生产周期，降低 survivin mRNA 在长时间离心过程中可能发生的降解风险，更有利于大规模生产。

第 3 章 Survivin mRNA 质量控制及工艺放大与成本分析

3.1 实验材料

3.1.1 实验试剂与耗材

表 3-1 实验试剂与耗材

Table 3-1 Experimental reagent and consumables

试剂名称	生产厂家
SpeI-HF	NEB
CutSmart Buffer	NEB
Nuclease-Free water	Thermo Fisher
无水乙醇	MACKLIN
Pierce Detergent Compatible Bradford Assay kit	Thermo Fisher
RNA Marker RL6000	TaKaRa
鲎试剂	湛江安度斯
细菌内毒素工作标准品（CSE）	湛江安度斯
细菌内毒素检查用水（BET）	湛江安度斯
pH 标准缓冲液 4.01	梅特勒
pH 标准缓冲液 7.00	梅特勒
pH 标准缓冲液 9.21	梅特勒
50×TAE 电泳缓冲液	康为世纪
6×DNA 上样缓冲液	康为世纪
6×Loading Buffer	TaKaRa
AGAROSE	Baygene
RNA Marker RL6000	TaKaRa
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent
Bovine Serum Albumin（BSA）Assay	CYGUNS
GelRad	BIOTIUM

SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix	BIO-RAD
Forward primer	上海生工
Reverse primer	上海生工
纯化水	自制
吸头	RAININ
1.5mLEp 管	AXYGEN

3.1.2 实验仪器

表 3-2 实验仪器

Table 3-2 Experimental instrument

试剂名称	生产厂家
生物安全柜	Heal Force
超净工作台	ESCO
医用冰箱	西门子
超低温冰箱	Thermo Fisher
超微量分光光度计	Thermo Fisher
实时荧光定量 PCR 仪	ABI
酶标仪	Thermo Fisher
IKA 振荡混匀器	Agilent
微孔板恒温振荡器	杭州瑞诚
全自动数码凝胶图像分析系统	上海天能科技有限公司
电热恒温水浴锅	上海一恒
2100 生物分析仪	Agilent
电泳仪	北京市六一仪器厂
电子天平	Sartorius
涡旋振荡器	SI
pH 计	梅特勒
掌上离心机	SCILOGEX
单道移液器 (L-100XLS)	RAININ
单道移液器 (L-200XLS)	RAININ
单道移液器 (L-1000XLS)	RAININ

3.2 Survivin mRNA质量控制方法

Survivin mRNA 质量检测: 通过超微量分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280} 比值 (1.8~2.1 为合格) 及浓度, 琼脂糖凝胶电泳 (1~2%浓度) 验证 mRNA 完整性 (单一条带, 大小约 1.2~1.5kb), 必要时采用毛细管电泳 (如 Agilent Bioanalyzer) 评估纯度。分析阶段需结合功能验证: 如实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测转染后细胞内 survivin mRNA 表达水平 (需设计特异性引物及探针), Western Blot 验证 Survivin 蛋白表达, 并通过流式细胞术或 CCK-8 法评估其对细胞凋亡或增殖的影响。此外, 可采用动态光散射 (DLS) 检测 mRNA 纳米颗粒粒径 (若用于递送系统) 及稳定性测试 (如 -80°C 保存下定期检测降解情况)。该方法需严格遵循无菌及 RNase-free 操作, 以确保 mRNA 原液的高纯度及生物活性。以下介绍 survivin mRNA 质量控制的方法:

3.2.1 外观检查

(1) 参考依据: 依据《中华人民共和国药典》2020 年版三部通则 0904 可见异物检查法。

(2) 操作方法: 外观采用目视法, 撕掉标签, 通过灯光查看 mRNA 中是否有未溶解的颗粒状物体, 观察时间为 20s。

(3) 可接受标准: 目视为无色澄清液体。

3.2.2 pH 值

(1) 参考依据: 依据《中华人民共和国药典》2020 年版三部通则 0631pH 值测定法。

(2) 操作方法:

1) 每次检测前, 确认仪器在校验期内, 当天首次检测前应进行仪器校准;
2) 开启 pH 计, 将电极与温度探头用纯化水冲洗干净, 滤纸轻轻吸干水分;
3) 混匀待测样品, 用微量移液器吸取 45 μ l 样品至 pcr 管中, 确保微量电极检测端可完全浸入样品中;

4) 第 1 次检测: 将电极与温度探头竖直放入待测样品中部, 稳定 3~5s, 测量开始, 仪器自动终点, 屏幕上显示出相应数值, 结果自动保存, 检测完成;

5) 第 2 次检测: 将电极与温度探头用纯化水冲洗干净, 滤纸轻轻吸干水分。将电极与温度探头竖直放入待测样品中部, 稳定 3~5s, 检测方法同第 1 次;

6) 计算两次检测的平均值。

(3) 可接受标准: 6.0~7.5。

3.2.3 含量与纯度 (OD₂₆₀/OD₂₈₀)

(1) 参考依据: 依据《中华人民共和国药典》2020 年版三部通则 0401 紫外-可见分光光度法。

(2) 操作方法:

1) 打开电脑电源, 开机完成后进入电脑桌面, 双击“超微量分光光度计”进入软件主界面, 选择应用程序“classic”→选择“Nucleic Acid”。

2) 确认检测机械臂处于放下的状态, 点击“OK”即进入测量界面后, 选择“Add to report”, 在界面右上角输入样品名称。并选择样品的类型为 RNA。

3) 抬起样品臂, 用 2 μ l 微量加样器取 2 μ l Nuclease-Free Water 加入到检测基座, 放下样品臂; 再次抬起样品臂, 用干净的无尘纸把上下基座上的 Nuclease-Free Water 吸干。

4) 抬起样品臂, 用 2 μ l 微量加样器取 2 μ l Nuclease-Free Water 加入到检测基座, 放下样品臂, 点击主界面的“Blank”进行测量, 作为空白对照组。

5) 当 Blank 检测完成后, 抬起样品臂, 用干净的无尘纸把上下基座上的 Nuclease-Free Water 吸干后放下样品臂。

6) 抬起样品臂, 取 2 μ l 样品加到检测基座上, 再放下样品臂。

7) 在上下两个光纤之间会自动拉出一个样品柱, 点击主界面的“Measure”进行测量, 选择路径保存数据。

8) 检测完成后, 抬起样品臂, 用干净的无尘纸把上下基座上的 Nuclease-Free Water 吸干, 放下样品臂。

9) 重复步骤第 6)~第 8), 重复测定 2 次; 计算两次测量的平均值。

(3) 可接受标准: 含量为 1.0 $\pm$ 0.1mg/mL; 纯度 (OD₂₆₀/OD₂₈₀) 为 1.9~2.2。

3.2.4 无菌检查

依据根据《中华人民共和国药典》2020 年版三部 1101 无菌检查法, 采用直接接种法进行无菌检查, 要求产品无菌检查为阴性。

3.2.5 细菌内毒素检查

(1) 参考依据：依据《中华人民共和国药典》2020 年版三部通则 1143 细菌内毒素检查法。

(2) 操作方法

1) 供试品溶液的制备：通过 MVD 进行稀释倍数的计算，用 BET 稀释 1/2 MVD 倍的样本及 MVD 倍的样本；

2) 阳性对照溶液的制备：取 1 支细菌内毒素工作准品（CSE），轻弹瓶壁，使得粉末都落入管底后，小心打开，用移液器加入 1mL 的细菌内毒素检查用水（BET），用封口膜封好后，可调式混匀仪上混匀 15min，得到浓度为 10EU/mL 的细菌内毒素工作标准品溶液；再将细菌内毒素工作准品（CSE）的浓度稀释为 1EU/mL（4 λ ），在可调式混匀仪上混匀至少 30s。再将 1EU/mL（4 λ ）的工作标准品（CSE）进行稀释混匀 30s 后，得到 2 λ 细菌内毒素工作标准品溶液；

3) 供试品阳性对照溶液的制备：用移液器分别吸取 0.2mL 的 1/2MVD 倍的供试品稀释液和 0.2mL 的 4 λ 浓度的细菌内毒素工作标准品溶液到同一试管中，在可调式混匀仪上混匀至少 30s，得到供试品阳性对照溶液。

4) 取鲎试剂 8 支，打开安瓿瓶后，用移液器向每支中加入 0.1mL 的细菌内毒素检查用水。分别向复溶好的鲎试剂中加入 0.1mL 制备好的供试品溶液，阳性对照溶液，供试品阳性对照溶液和阴性对照溶液，每个样本加 2 管。37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 温育 60 $\pm$ 2min，并观察。

(3) 可接受标准：细菌内毒素限值 $\leq$ 2EU/mL。

3.2.6 蛋白残留检测

(1) 参考依据：依据《中华人民共和国药典》2020 年版三部通则 0731 蛋白质含量测定法。

(2) 操作方法

1) 样品的处理：用移液器吸取 1 个批次的 mRNA 置于超滤离心管中，将超滤离心管放置于离心机中在室温条件下 3000rpm 离心 10min，将滤出的液体作为样品，4 $^{\circ}$ C 备用；

2) 标准品的制备：将 BSA 标准品梯度稀释至 200 μ g/mL、40 μ g/mL、20 μ g/mL、10 μ g/mL、5 μ g/mL、2.5 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL 及阴性质控品（0 μ g/mL）

作为标准曲线；

- 3) 取各个稀释浓度的标准品和待测样品各 150 μ l, 做 2 个复孔；
 - 4) 每孔加入考马斯亮蓝工作液 150 μ l；
 - 5) 在室温条件下避光孵育 10min；
 - 6) 将微孔板在 OD₅₉₅ 处读取吸光值；
- (3) 可接受标准：蛋白残留量 $\leq$ 10 μ g/mg。

3.2.7 质粒残留检测

(1) 参考依据：依据《中华人民共和国药典》2020 年版三部指导原则“9101 分析方法验证指导原则”。

(2) 操作方法

1) 标准品稀释：取 1 支质粒 DNA 作为标准品，将标准品和 Nuclease-Free Water 置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，快速离心 10s。取 6 支干净的 200 μ l 离心管，分别标记为 S1、S2、S3、S4、S5 和 S6，浓度为 100pg/ μ l、10pg/ μ l、1pg/ μ l、0.1pg/ μ l、0.01pg/ μ l 和 0.001pg/ μ l；

2) qPCR MIX 反应液的制备：每个孔 qPCR MIX 反应液共计 18 μ l（10 μ l SsoAdvancedTM Universal Probes Supermix、0.8 μ l Forward primer、0.8 μ l Reverse primer、0.4 μ l Probe 和 6 μ l Nuclease-Free Water 混合）；

3) 标准曲线的制备：18 μ l qPCR MIX 反应液+2 μ l S1、18 μ l qPCR MIX 反应液+2 μ l S2、18 μ l qPCR MIX 反应液+2 μ l S3、18 μ l qPCR MIX 反应液+2 μ l S4、18 μ l qPCR MIX 反应液+2 μ l S5、18 μ l qPCR MIX 反应液+2 μ l S6，轻轻振荡混匀；

4) 每个样本 3 个复孔，设置反应程序：95 $^{\circ}$ C 变性 3min；95 $^{\circ}$ C/15s，60 $^{\circ}$ C/30s，40 个循环，反应体积为 20 μ l；选择报告荧光基团为 FAM，猝灭荧光基团为 none；检测参比荧光为 ROX 进行 Q-PCR 检测。

(3) 可接受标准：质粒残留量 $\leq$ 100ng/mg。

3.2.8 mRNA 完整性检测

(1) 参考依据：依据《中华人民共和国药典》2020 年版三部指导原则“9101 分析方法验证指导原则”。

(2) 操作方法

- 1) 1 $\times$ 电泳缓冲液（1 $\times$ TAE）：用超纯水将 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液稀释成 1 $\times$ T

AE 电泳缓冲液，用于灌满电泳槽和配制凝胶。配制方法为 20mL 50×TAE 加入 980mL 超纯水，并混匀；

2) 1%琼脂糖凝胶：称取 0.3g 琼脂糖置于干净的三角瓶中，加入 30mL 1×TAE 电泳缓冲液，PE 手套盖住三角瓶颈部，放入微波炉中加热 30s 后取出轻摇一次，再继续加热，重复操作 3~4 次，直至看不到颗粒状物质，1×TAE 电泳缓冲液补充至配制体积，室温冷却 2~3min，加入 3mL 的 10000×GelRad 荧光染料。

3) 在琼脂糖冷却过程中，将塑料托盘、制胶模及电泳槽用清水清洗干净，将塑料托盘放入制胶模中，置于水平桌面上，取合适的梳子放入制胶模中，形成合适的加样孔；

4) 浇灌适量体积稍冷却的琼脂糖溶液进入制胶模中，凝胶厚度在 3~5mm；

5) 室温放置 30~45min 使凝胶完全凝结，小心垂直向上拔出梳子，将塑料托盘和凝胶一起安放在电泳槽内，样品孔靠近阴极端（黑色插头）。加入 1×TAE 电泳缓冲液至液面没过凝胶约 1mm；

6) RNA Marker 处理：将 RNA Marker、6×Loading Buffer 和 Nuclease-Free Water 混匀后冰上保存，上样量 10mL；

7) 取 100ng 样品并添加 2×Loading Buffer 后混匀冰上保存，上样量 10mL；

8) 加完样后，合上电泳槽盖，打开电源开关，给予 160V 的电压，运行 20 min。

9) 将凝胶置于凝胶成像系统中，紫外光谱下观察电泳结果；

(3) 可接受标准：条带单一，无杂带，无降解。

3.2.9 mRNA 完整性比例检测

(1) 参考依据：依据《中华人民共和国药典》2020 年版三部指导原则“9101 分析方法验证指导原则”。

(2) 操作方法

1) 凝胶制备：吸取 550μl RNA 凝胶到离心柱中，1500×g，室温离心 10min。每管 65μl 分装到无核酸酶离心管中，保存到 4℃备用；

2) 凝胶-染料制备：将 RNA 染料在室温平衡 30min。IKA 振荡混匀器震荡 10s 混匀，离心后取 1μl 加到 65μl 过滤分装好的凝胶中。振荡混匀凝胶-染料混合物，13000×g 室温离心 10min。制备好的凝胶-染料混合液需要在 1 天之内用完；

3) 样本稀释: 将待检测的 mRNA 样品, 以 Nuclease-Free Water 稀释到 100 ng/ μ l;

4) ladder 处理: 将 RNA ladder 每管 1 μ l 分装到 PCR 管中, 放于 PCR 仪中, 70°C 加热处理 2min, 迅速置冰上冷却后, 保存到 -80°C 冰箱;

5) 压胶: 取一个新的芯片置于注胶器中, 吸取 9 μ l 凝胶-染料混合液到孔 G, 进行注胶;

6) 在 12 个上样孔和右下角的 ladder 孔中加入 5 μ l RNA marker; 在 ladder 孔中加入 1 μ l RNA ladder, 每个上样孔中加入 1 μ l 处理好的 mRNA 样品, 无样品的孔, 加入 1 μ l Nuclease-Free Water; 将芯片放到 IKA 振荡混匀器中, 2400r pm 振荡混匀 1min, 取出芯片, 将芯片放到 2100 生物分析仪中, 选择程序 mRNA nano series II, 上机检测。

(3) 可接受标准: 完整性比例 $\geq 70\%$ 。

3.2.10 金属元素 Li 残留检测

将 Survivin mRNA 送往第三方检测公司。根据《Q3D (R1): 元素杂质指导原则》关于元素杂质的允许浓度的规定中, 按照注射剂浓度分类为 25mg/g 及多批次 mRNA 工艺稳健性检验结果制定 Survivin mRNA 中金属元素 Li 残留质量标准: 金属元素 Li 残留 $\leq 130\mu\text{g/mL}$ 。

3.2.11 乙醇残留检测

将 Survivin mRNA 送往第三方检测公司, 方法的检测下限为 0.15%。根据《中华人民共和国药典》2020 年版三部通则 0861 残留溶剂测定法关于乙醇残留溶剂 $\leq 0.5\%$ 的规定, 制定 Survivin-LAMP mRNA 中乙醇残留质量标准: 乙醇残留 $\leq 0.5\%$ 。

3.2.12 异丙醇残留检测

将 Survivin mRNA 送往第三方检测公司, 方法的检测下限为 0.15%。根据《中华人民共和国药典》2020 年版三部通则 0861 残留溶剂测定法关于异丙醇残留限度 $\leq 0.5\%$ 的规定, 制定 Survivin mRNA 中异丙醇残留质量标准: 异丙醇残留 $\leq 0.5\%$ 。

3.2.13 mRNA 活性表征检测

根据《中华人民共和国药典》2020 年版三部通则 3401 免疫印迹法进行检测,

免疫印迹法系以供试品与特异性抗体结合后，抗体再与酶标抗体特异性结合，通过酶学反应的显色，对供试品的抗原特异性进行检查，要求样品结果有明显色带。

3.2.14 BSA 残留检测

(1) 参考依据：《中华人民共和国药典》2020 年版三部指导原则“9101 分析方法验证指导原则”。

(2) 操作方法

1) 配制 Wash Concentrate (1×)：将 Wash Concentrate (20×) 与超纯水按 1:19 进行稀释。

2) 取各个标准品和待测样品各 50μl，做复孔，每孔中加入 100μl 的 HRP-Anti，密封；

3) 400~600rpm 室温孵育 1h；

4) 洗板 4 次，加入洗液 300μl/孔，拍干；

5) 每孔加入 100μl 的 TMB 溶液，室温避光孵育 30min；

6) 再加入 100μl 的 Stop Buffer (终止液)；

7) 微孔板在 OD₄₅₀/OD₆₅₀ 处读取吸光值。

(3) 可接受标准：BSA 残留量 ≤ 5ng/mg。

依据 USP 2023 年发布《mRNA 疫苗质量分析方法（草案）》第 2 版^[1] 和 CDE 颁布的《新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则》（试行）^[22]，本研究对优化后的 survivin mRNA 原液进行了全面的质量研究，包括 mRNA 的完整性、稳定性、免疫原性等。通过一系列实验，评估了 survivin mRNA 原液的质量稳定性和生物活性。

通过对优化后的 survivin mRNA 原液进行质量分析后，对三批次的 survivin mRNA 原液进行全面的质量控制（表 3-3）。

表 3-3 三批次 survivin mRNA 原液分析结果

Table3-3 Analysis results of the stock solution of survivin mrna in three batches

检测项目	检测方法	质量标准	01 批次	02 批次	03 批次
pH 值	pH 值测定法	6.0~7.5	6.83	6.93	7.02
外观检查	目视法	无色澄清液体	无色澄清液体	无色澄清液体	无色澄清液体

含量 纯度 (OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)	紫外-可见光 分光光度法 (UV)	1.0±0.1mg/mL 1.9~2.2	1.0381mg/mL 2.11	1.0059mg/mL 2.12	1.0683mg/mL 2.12
无菌检查	无菌检查法	阴性	阴性	阴性	阴性
细菌内毒素检查	细菌内毒素 检查法	≤2EU/mL	≤2EU/mL	≤2EU/mL	≤2EU/mL
mRNA 完整性比 例检测	毛细管电泳 法	完整性比例 ≥70%	88.37%	90.14%	89.84%
mRNA 完整性检 测	mRNA 凝胶 电泳法	条带单一, 无杂 带, 无降解	条带单一, 无杂 带, 无降解	条带单一, 无杂 带, 无降解	条带单一, 无杂 带, 无降解
mRNA 活性表征 检测	免疫印迹法	有明显色带	有明显色带	有明显色带	有明显色带
金属元素 Li 残留 检测		≤130μg/mL	51.43μg/mL	53.52μg/mL	50.88μg/mL
乙醇残留检测	第三方检测	≤0.5%	0.19%	0.36%	0.37%
异丙醇残留检测		≤0.5%	<0.15%	<0.15%	<0.15%
质粒残留检测	Q-PCR 法	≤100ng/mg	2.20ng/mg	1.82ng/mg	0.32ng/mg
蛋白残留检测	考马斯亮蓝 法	≤10μg/mg	2.31μg/mg	1.15μg/mg	1.39μg/mg
BSA 残留检测	酶联免疫法 (ELISA)	≤5ng/mg	0.90ng/mg	0.89ng/mg	1.16ng/mg

3.3 Survivin mRNA稳定性研究实验

根据《生物制品稳定性研究技术指导原则》^[23]要求开展 survivin mRNA 原液的稳定性研究, 研究实验包括反复冻融实验、加速实验、强制条件实验和长期稳定性实验。

反复冻融实验是将 survivin mRNA 原液从-80±10℃条件下取出放置于2~8℃融化, 2h 后再放置于-80±10℃进行冻存, 实验于开始时按每隔 24h 冻融 1 次, 反复冻融 1 次的实验于冻融实验开始 24h 后停止实验; 反复冻融 2 次的实验于冻融实验开始按每 24h 冻融 1 次, 共计冻融 2 次, 48h 后停止实验; 反复冻融 3 次的实验于冻融实验开始按每 24h 冻融 1 次, 共计冻融 3 次, 72h 后停止实验, 反复冻融 0 次的实验为制备后的 survivin mRNA 原液在贮存后, 未进行任何操作处理, 取出样本后进行考察项目的检测。

加速实验是将 survivin mRNA 原液从-80±10℃条件下取出放置于 2~8℃, 考察时间依次为 0 天、1 天、3 天、5 天、7 天, 加速实验的 0 天为制备后的 survi

vin mRNA 原液在贮存后，未进行任何操作处理，取出样本后进行考察项目的检测。

强制条件实验是将 survivin mRNA 原液从 $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ 条件下取出放置于 $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，考察时间依次为 0 天、1 周、2 周、3 周、4 周，强制实验的 0 天为制备后的 survivin mRNA 原液在贮存后，未进行任何操作处理，取出样本后进行考察项目的检测。

长期稳定性实验是将 survivin mRNA 原液从 $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ 条件下取出进行考察项目的检测，考察时间依次为 0 月、1 月、2 月、3 月、6 月、9 月；长期稳定性实验的 0 天为制备后的 survivin mRNA 原液在贮存后，未进行任何操作处理，取出样本后进行考察项目的检测。

3.3.1 反复冻融稳定性研究实验

反复冻融稳定性实验旨在探究 survivin mRNA 原液在不同冻融次数下的稳定性，为其实际生产和应用提供关键参考依据。通过对 4 批原液进行不同次数冻融处理，检测多项指标并结合图进行分析，具体过程如下：

实验设计与样本处理：选取 4 批 survivin mRNA 原液，将其置于 $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ 条件下冷冻完全，随后放置于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 融化，按照设定的冻融次数进行循环处理。分别设置冻融 0 次（作为对照，即制备后的原液未进行任何冻融操作直接检测）、冻融 1 次（冻融循环 1 次，每次冻融间隔 24h）、冻融 2 次（共冻融 2 次，每次间隔 24h）、冻融 3 次（共冻融 3 次，每次间隔 24h）这几个实验组。每次冻融处理完成后，取出样本进行相应指标检测。

3.3.2 加速稳定性研究实验

加速稳定性实验旨在探究 survivin mRNA 原液在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下的稳定性，为确定其有效期和储存条件提供重要依据。通过对 4 批原液在不同时间点的多指标检测，具体过程如下：

实验设计与样本处理：选取 4 批 survivin mRNA 原液，模拟实际保存包装后，放置在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 环境下进行加速实验。分别在 0 天（即制备后未进行任何处理，直接取样检测作为初始状态）、1 周、2 周、3 周、1 个月这几个时间点进行取样测定。对每个时间点的样本进行外观检查、含量测定、纯度（ $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ）检测、mRNA 凝胶电泳以及 pH 值测定，获取相关数据。

3.3.3 强制条件稳定性研究实验

强制条件稳定性实验旨在探究 survivin mRNA 原液在 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下的稳定性, 为确定其有效期和储存条件提供关键依据。通过对 4 批原液在不同时间点的多指标检测, 具体过程如下:

实验设计与样本处理: 选取 4 批 survivin mRNA 原液, 模拟实际保存包装后, 放置在 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 环境下进行强制实验。分别在 0 天 (即制备后未进行任何处理, 直接取样检测作为初始状态)、1 天、3 天、5 天、7 天这几个时间点进行取样测定。对每个时间点的样本进行外观检查、含量测定、纯度 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) 检测、mRNA 凝胶电泳以及 pH 值测定, 获取相关数据。

3.3.4 长期稳定性研究实验

长期稳定性实验旨在探究 survivin mRNA 原液在 $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ 条件下的稳定性, 为确定其有效期和储存条件提供重要依据。通过对 4 批原液在不同时间点的多指标检测, 具体过程如下:

实验设计与样本处理: 选取 4 批 survivin mRNA 原液, 模拟实际保存包装后, 放置在 $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ 条件下进行长期稳定性实验。分别于 1 个月、2 个月、3 个月、6 个月、9 个月个月取样测定, 对其外观检查、含量、纯度 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$)、mRNA 凝胶电泳、pH 值结果与 0 个月 (即制备后未进行任何处理, 直接取样检测作为初始状态) 比较。对每个时间点的样本进行外观检查、含量测定、纯度 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) 检测、mRNA 凝胶电泳以及 pH 值测定, 获取相关数据。长期稳定性实验于 9 个月时间内点进行全检。

3.4 Survivin mRNA 稳定性研究实验结果与分析

3.4.1 反复冻融稳定性研究实验结果与分析

(1) 指标检测与数据获取: 对不同冻融次数的样本进行外观检查、含量测定、纯度 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) 检测、mRNA 凝胶电泳以及 pH 值测定, 获取相关数据。例如, 01 批次冻融 0 次时, 含量为 1.0051mg/mL , 纯度为 2.12, pH 值为 6.35; 冻融 1 次时, 含量为 0.9952mg/mL , 纯度为 2.11, pH 值为 6.18 等 (详见表 3-4)。

表 3-4 survivin mRNA 原液反复冻融实验结果

Table 3-4 Results of the repeated freeze-thaw experiment of the stock solution of survivin mRNA

实验条件	批号	外观检查	含量 (mg/mL)	纯度 (OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)	pH 值
冻融 0 次	01	无色澄清液体	1.0051	2.12	6.35
	02	无色澄清液体	0.9517	2.10	6.17
	03	无色澄清液体	0.9214	2.12	6.54
	04	无色澄清液体	1.0137	2.13	6.62
冻融 1 次	01	无色澄清液体	0.9952	2.11	6.18
	02	无色澄清液体	0.9563	2.10	6.18
	03	无色澄清液体	0.9150	2.12	6.38
	04	无色澄清液体	1.0037	2.12	6.67
冻融 2 次	01	无色澄清液体	0.9871	2.10	6.29
	02	无色澄清液体	0.9489	2.09	6.32
	03	无色澄清液体	0.9088	2.10	6.41
	04	无色澄清液体	0.9953	2.11	6.78
冻融 3 次	01	无色澄清液体	0.9809	2.08	6.29
	02	无色澄清液体	0.9518	2.09	6.25
	03	无色澄清液体	0.9167	2.09	6.72
	04	无色澄清液体	0.9859	2.10	6.61

(2) 绘制图表：根据检测数据绘制相关图表，其中图 3-1 展示了不同反复冻融次数下 survivin mRNA 原液的含量和纯度变化趋势，左图纵坐标为含量 (mg/mL)，右图纵坐标为纯度 (OD₂₆₀/OD₂₈₀)，横坐标为冻融次数；图 3-2 展示了 pH 值随冻融次数的变化趋势，纵坐标为 pH 值，横坐标为冻融次数；图 3-3 和图 3-4 分别展示了 01~04 批次不同反复冻融次数下的凝胶电泳图，不同泳道对应不同批次和冻融次数的样本。

(3) 图表分析

1) 含量和纯度分析：从图 3-1 中可以看出，随着冻融次数从 0 次增加到 3 次，各批次 survivin mRNA 原液的含量和纯度曲线波动较小。例如，01 批次的含量在冻融 0 次时为 1.0051mg/mL，冻融 3 次时为 0.9809mg/mL；纯度在冻融 0

次时为 2.12，冻融 3 次时为 2.08，整体变化不明显，表明冻融次数对 mRNA 原液的含量和纯度影响较小。

2) pH 值分析：观察图 3-2，各批次原液的 pH 值在不同冻融次数下也相对稳定。如 01 批次 pH 值从冻融 0 次的 6.35 到冻融 3 次的 6.29，变化范围在合理区间内，说明冻融过程未对 mRNA 原液的 pH 值产生显著影响。

3) 凝胶电泳分析：对比图 3-3 和图 3-4 中不同泳道的条带，发现不同冻融次数下的 survivin mRNA 凝胶电泳条带均单一，无杂带和降解现象。这表明在反复冻融 3 次的过程中，survivin mRNA 的完整性得以保持，未发生明显的降解。

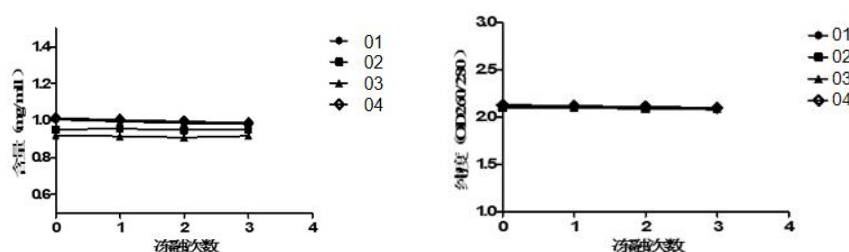


图 3-1 survivin mRNA 原液不同反复冻融次数稳定性考察（左图：含量； 右图：纯度）

Figure 3-1 Investigation of the Stability of the Stock Solution of Survivin mRNA under Different Numbers of Repeated Freeze-Thaw Cycles (Left: Content; Right: Purity)

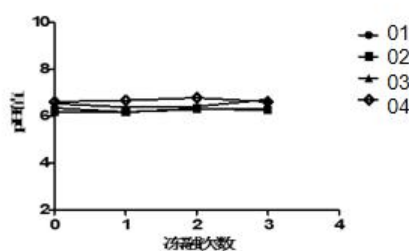


图 3-2 survivin mRNA 原液不同反复冻融次数下 pH 值考察项目趋势图

Figure 3-2 Trend diagram of the pH value examination items of the stock solution of survivin mRNA under different numbers of repeated freeze-thaw cycles

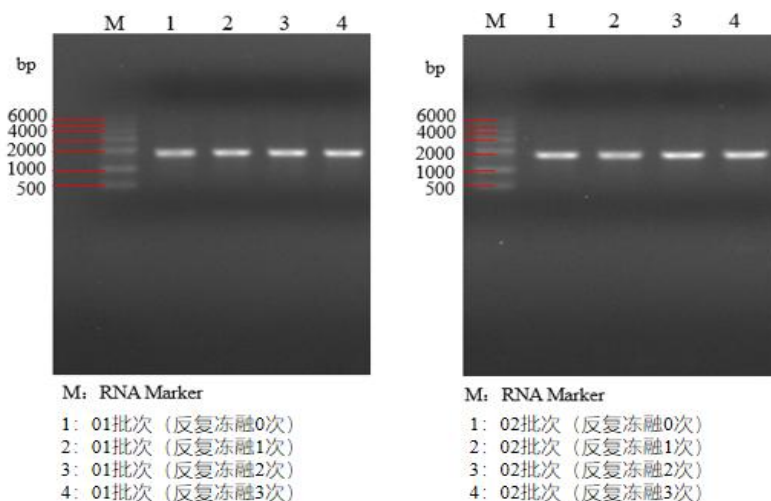


图 3-3 不同反复冻融次数下凝胶电泳图（左图 01 批；右图 02 批）

Figure 3-3 Gel electrophoresis diagrams under different numbers of repeated freeze-thaw cycles (The left diagram is from Batch 01; the right diagram is from Batch 02)

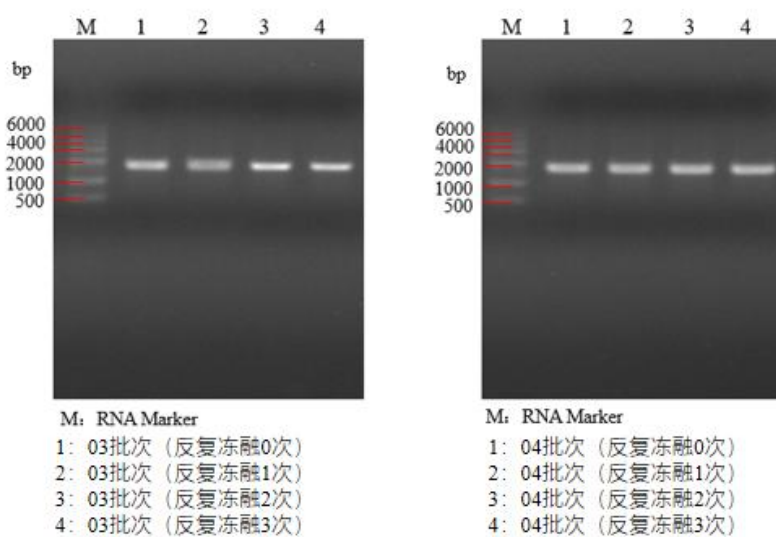


图3-4 不同反复冻融次数下凝胶电泳图（左图03批；右图04批）

Figure 3-4 Gel electrophoresis diagrams under different numbers of repeated freeze-thaw cycles (The left diagram is from Batch 03; the right diagram is from Batch 04)

3.4.2 加速稳定性研究实验结果与分析

(1) 数据整理与图表绘制：将不同批次在各个时间点的检测数据进行整理，绘制出相应的图表。图 3-5 展示了不同考察时间下 survivin mRNA 原液的含量和纯度变化趋势，其中左图纵坐标为含量 (mg/mL)，右图纵坐标为纯度 (OD₂₆₀/

OD₂₈₀), 横坐标为放置时间(周); 图 3-6 展示了 pH 值随放置时间的变化趋势, 纵坐标为 pH 值, 横坐标为放置时间(周); 图 3-7 和图 3-8 分别展示了 01~04 批次在不同加速时间条件下的凝胶电泳图, 不同泳道对应不同批次和放置时间的样本。

(3) 图表分析

1) 含量和纯度分析: 观察图 3-5, 从含量曲线来看, 各批次 survivin mRNA 原液在 2~8℃放置 1 周、2 周、3 周、1 个月内, 含量数值虽有波动, 但整体波动范围较小。例如, 01 批次在 0 天的含量为 1.0088mg/mL, 1 个月后为 1.0121mg/mL, 变化不明显。纯度曲线同样如此, 各批次的纯度在不同时间点都维持在较为稳定的水平, 如 01 批次在 0 天纯度为 2.11, 1 个月后为 2.13。这表明在该温度条件下, survivin mRNA 原液的含量和纯度在 1 个月内受时间影响较小。

2) pH 值分析: 图 3-6 显示, 各批次原液的 pH 值在 2~8℃放置期间也相对稳定。如 01 批次 pH 值从 0 天的 6.35 到 1 个月时的 6.22, 变化处于正常范围, 说明该温度环境未对 mRNA 原液的 pH 值产生显著影响。

3) 凝胶电泳分析: 对比图 3-7 和图 3-8 中不同泳道的条带, 在 2~8℃放置 1 个月内, 各批次不同时间点的 survivin mRNA 凝胶电泳条带均单一, 无杂带和降解现象。这表明在这段时间内, survivin mRNA 的完整性得以保持, 未发生明显的降解。

表 3-5 survivin mRNA 原液加速稳定性实验结果

Table 3-5 Results of the Accelerated Stability Experiment of the Stock Solution of Survivin mRNA

实验条件	批号	外观检查	含量 (mg/mL)	纯度 (OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)	pH 值
0 天	01	无色澄清液体	1.0088	2.11	6.35
	02	无色澄清液体	0.9857	2.12	6.47
	03	无色澄清液体	0.9470	2.13	6.47
	04	无色澄清液体	1.0292	2.13	6.60
1 周	01	无色澄清液体	1.0195	2.13	6.21
	02	无色澄清液体	0.9810	2.13	6.47
	03	无色澄清液体	0.9469	2.14	6.66

2 周	04	无色澄清液体	1.0212	2.12	6.77
	01	无色澄清液体	1.0149	2.11	6.55
	02	无色澄清液体	0.9842	2.14	6.53
	03	无色澄清液体	0.9528	2.13	6.63
3 周	04	无色澄清液体	1.0275	2.14	6.40
	01	无色澄清液体	1.0340	2.13	6.70
	02	无色澄清液体	0.9885	2.14	6.54
	03	无色澄清液体	0.9490	2.14	6.35
4 周	04	无色澄清液体	1.0299	2.13	6.74
	01	无色澄清液体	1.0121	2.13	6.22
	02	无色澄清液体	0.9904	2.15	6.56
	03	无色澄清液体	0.9534	2.14	6.74
	04	无色澄清液体	1.0294	2.14	6.63

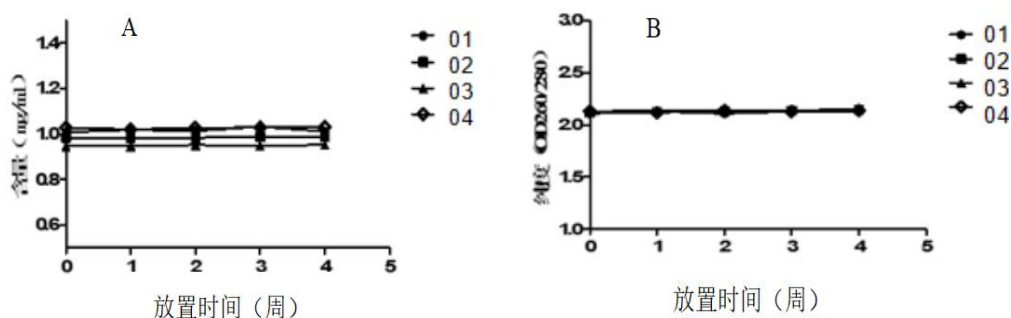


图 3-5 survivin mRNA 不同考察时间下考察项目趋势图 (A: 含量; B: 纯度)

Figure 3-5 Trend diagram of the examination items of survivin mRNA at different examination times (A: Content; B: Purity)

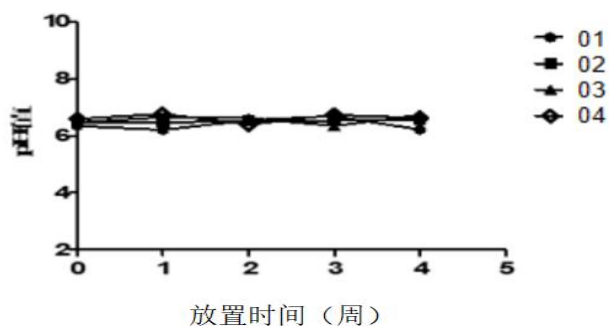


图 3-6 survivin mRNA 不同考察时间下 pH 考察项目趋势图

Figure 3-6 Trend diagram of the pH examination items of survivin mRNA at different examination times

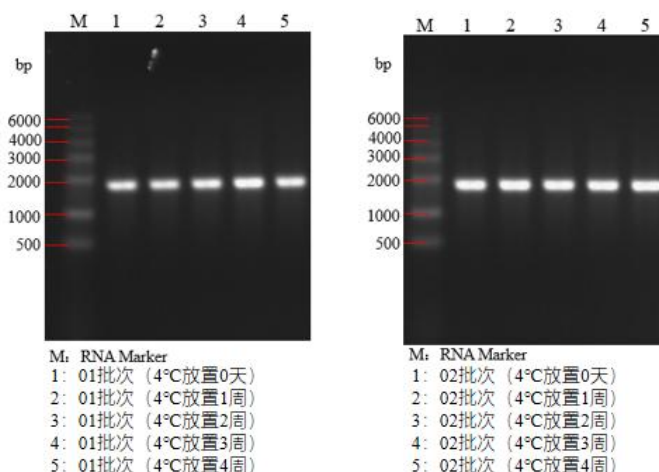


图 3-7 不同时间加速条件下凝胶电泳图（左图 01 批；右图 02 批）

Figure 3-7 Gel electrophoresis diagrams under accelerated conditions at different times

(The left diagram is from Batch 01; the right diagram is from Batch 02)

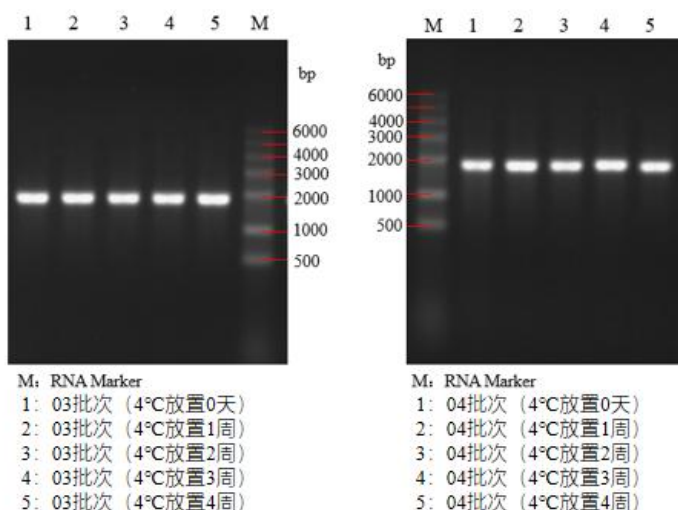


图 3-8 不同时间加速条件下凝胶电泳图（左图 03 批；右图 04 批）

Figure 3-8 Gel electrophoresis diagrams under accelerated conditions at different times

(The left diagram is from Batch 03; the right diagram is from Batch 04)

3.4.3 强制条件稳定性研究实验结果与分析

(1) 数据整理与图表绘制：将不同批次在各个时间点的检测数据进行整理，绘制出相应的图表。图 3-9 展示了不同考察时间下 survivin mRNA 原液的含量和纯度变化趋势，其中左图纵坐标为含量 (mg/mL)，右图纵坐标为纯度 (OD_{260}/OD_{280})，横坐标为放置时间 (天)；图 3-10 展示了 pH 值随放置时间的变化趋势，纵坐标为 pH 值，横坐标为放置时间 (天)；图 3-11 和图 3-12 分别展示了 0

1~04 批次在不同强制时间条件下的凝胶电泳图，不同泳道对应不同批次和放置时间的样本。

(2) 图表分析

1) 含量和纯度分析：观察图 3-9，从含量曲线来看，各批次 survivin mRNA 原液在 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 放置 1 天、3 天、5 天、7 天内，含量数值虽有波动，但整体波动范围较小。例如，01 批次在 0 天的含量为 1.0317mg/mL ，7 天后为 1.0604mg/mL ，变化不明显。纯度曲线同样如此，各批次的纯度在不同时间点都维持在较为稳定的水平，如 01 批次在 0 天纯度为 2.14，7 天后为 2.13。这表明在该温度条件下，survivin mRNA 原液的含量和纯度在 7 天内受时间影响较小。

2) pH 值分析：图 3-10 显示，各批次原液的 pH 值在 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 放置期间也相对稳定。如 01 批次 pH 值从 0 天的 7.19 到 7 天时的 6.88，变化处于正常范围，说明该温度环境未对 mRNA 原液的 pH 值产生显著影响。

3) 凝胶电泳分析：对比图 3-11 和图 3-12 中不同泳道的条带，在 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 放置 1 天内，各批次样本的 mRNA 凝胶电泳条带均单一，无杂带和降解现象；然而，放置 3 天、5 天、7 天后，从凝胶电泳图谱的比较上能看出，各批次样本的电泳条带有明显的拖尾。这表明 survivin mRNA 在 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 放置 1 天后开始出现部分降解，但含量、纯度和 pH 值在 7 天内仍无明显变化。

表 3-6 survivin mRNA 强制稳定性实验结果

Table 3-6 Results of the forced stability experiment of survivin mRNA

实验条件	批号	外观检查	含量 (mg/mL)	纯度 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$)	pH 值
0 天	01	无色澄清液体	1.0317	2.14	7.19
	02	无色澄清液体	0.9944	2.13	6.69
	03	无色澄清液体	0.9492	2.15	6.54
	04	无色澄清液体	1.0423	2.15	6.31
1 天	01	无色澄清液体	1.0450	2.10	6.97
	02	无色澄清液体	1.0104	2.11	6.73
	03	无色澄清液体	0.9555	2.11	6.55
	04	无色澄清液体	1.0512	2.11	6.64
3 天	01	无色澄清液体	1.0478	2.11	6.95

5 天	02	无色澄清液体	1.0124	2.12	6.68
	03	无色澄清液体	0.9754	2.13	6.70
	04	无色澄清液体	1.0570	2.13	6.70
	01	无色澄清液体	1.0610	2.12	6.95
	02	无色澄清液体	1.0193	2.13	6.69
	03	无色澄清液体	0.9724	2.14	6.74
	04	无色澄清液体	1.0639	2.12	6.74
	01	无色澄清液体	1.0604	2.13	6.88
	02	无色澄清液体	1.0203	2.14	6.67
	03	无色澄清液体	0.9784	2.11	6.65
	04	无色澄清液体	1.0675	2.14	6.76

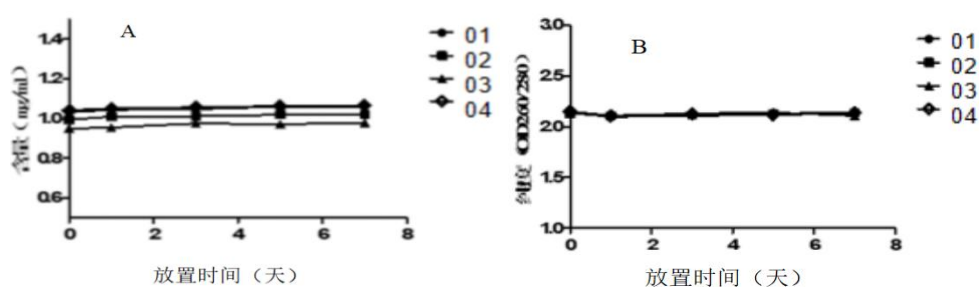


图 3-9 survivin mRNA 不同考察时间下含量和纯度考察项目趋势图 (A: 含量; B: 纯度)

Figure 3-9 Trend diagram of the examination items of the content and purity of survivin mRNA at different examination times (A: Content; B: Purity)

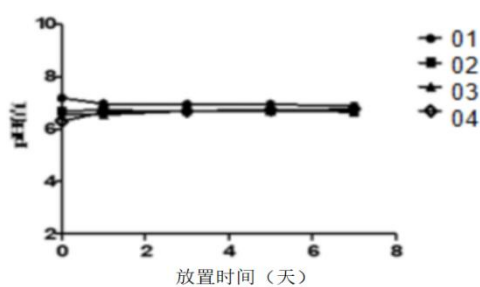


图 3-10 survivin mRNA 不同考察时间下 pH 考察项目趋势图

Figure 3-10 Trend diagram of the pH examination items of survivin mRNA at different examination times

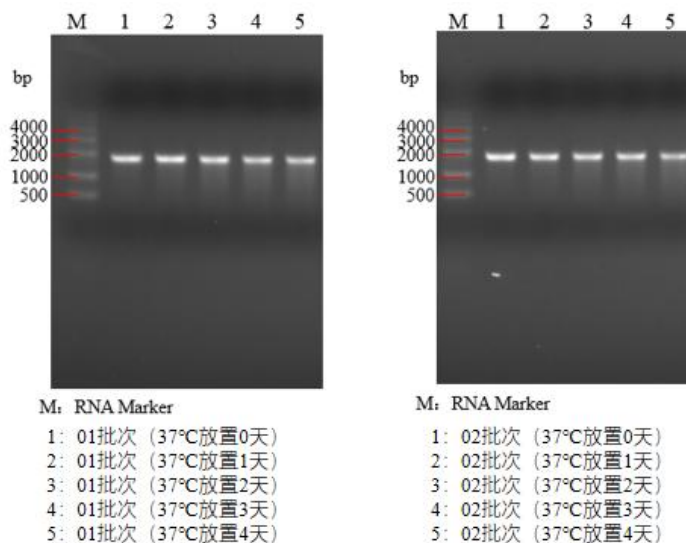


图 3-11 不同时间强制条件下凝胶电泳图（左图 01 批；右图 02 批）

Figure 3-11 Gel electrophoresis diagrams under forced conditions at different times

(The left diagram is from Batch 01; the right diagram is from Batch 02)

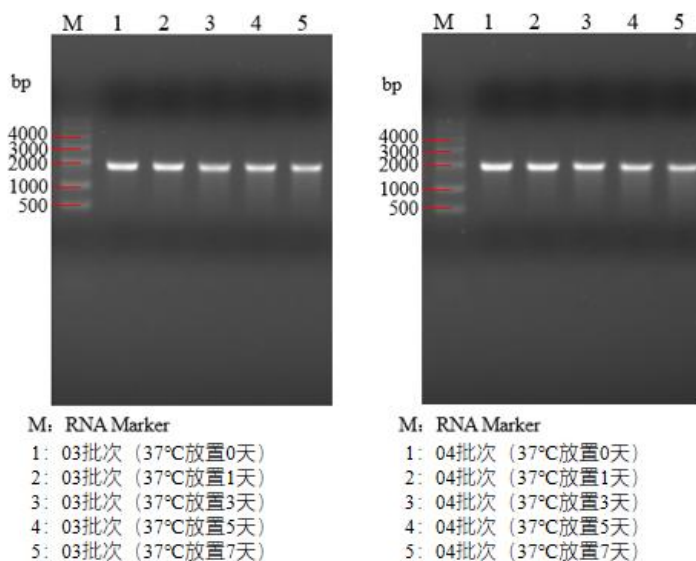


图 3-12 不同时间强制条件下凝胶电泳图（左图 03 批；右图 04 批）

Figure 3-12 Gel electrophoresis diagrams under forced conditions at different times

(The left diagram is from Batch 03; the right diagram is from Batch 04)

3.4.4 长期稳定性研究实验结果与分析

(1) 数据整理与图表绘制: 将不同批次在各个时间点的检测数据进行整理, 绘制出相应的图表。

1) 含量和纯度分析: 观察图 3-13, 从含量曲线来看, 各批次 survivin mRNA

A 原液在 $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ 放置 1 个月、2 个月、3 个月、6 个月、9 个月内，含量数值虽有波动，但整体波动范围较小。例如，01 批次在 0 个月的含量为 0.9979mg/mL ，9 个月后为 1.0172mg/mL ，变化不明显。纯度曲线同样如此，各批次的纯度在不同时间点都维持在较为稳定的水平，如 01 批次在 0 个月纯度为 2.14，9 个月后为 2.14。这表明在该温度条件下，survivin mRNA 原液的含量和纯度在 9 个月内受时间影响较小。

2) pH 值分析：图 3-14 显示，各批次原液的 pH 值在 $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ 放置期间也相对稳定。如 01 批次 pH 值从 0 个月的 6.69 到 9 个月时的 6.38，变化处于正常范围，说明该温度环境未对 survivin mRNA 原液的 pH 值产生显著影响。

3) 凝胶电泳分析：对比图 3-15~图 3-17 中不同泳道的条带，在 $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ 放置 9 个月内，各批次不同时间点的 survivin mRNA 凝胶电泳条带均单一，无杂带和降解现象。这表明在这段时间内，survivin mRNA 的完整性得以保持，未发生明显的降解。

表 3-7 survivin mRNA 原液长期稳定性检测项目及考察时间

Table 3-7 Detection items and examination time for the long-term stability of the stock solution of survivin mRNA

检测项目	0 个月	1 个月	2 个月	3 个月	6 个月	9 个月
外观检查	√	√	√	√	√	√
pH 值	√	√	√	√	√	√
含量	√	√	√	√	√	√
纯度 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$)	√	√	√	√	√	√
mRNA 完整性检测 (凝胶电泳法)	√	√	√	√	√	√
mRNA 完整性检测 (毛细管电泳法)	—	—	—	—	—	√
无菌检查	—	—	—	—	—	√
细菌内毒素检查	—	—	—	—	—	√
mRNA 活性表征检测	—	—	—	—	—	√
蛋白残留检测	—	—	—	—	—	√
质粒残留检测	—	—	—	—	—	√
BSA 残留检测	—	—	—	—	—	√

金属元素 Li 残留检测	—	—	—	—	—	√
乙醇残留检测	—	—	—	—	—	√
异丙醇残留检测	—	—	—	—	—	√

表 3-8 survivin mRNA 原液长期稳定性实验结果

Table 3-8 Results of the long-term stability experiment of the stock solution of survivin mRNA

实验条件	批号	外观检查	含量 (mg/mL)	纯度 (OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)	pH 值
0 个月	01	无色澄清液体	0.9979	2.14	6.69
	02	无色澄清液体	0.9684	2.12	6.87
	03	无色澄清液体	0.9384	2.13	6.48
	04	无色澄清液体	0.9996	2.13	6.67
1 个月	01	无色澄清液体	1.0278	2.12	6.59
	02	无色澄清液体	0.9771	2.14	6.56
	03	无色澄清液体	0.9422	2.13	6.38
	04	无色澄清液体	0.9821	2.14	6.37
2 个月	01	无色澄清液体	1.0247	2.14	6.26
	02	无色澄清液体	0.9728	2.13	6.19
	03	无色澄清液体	0.9281	2.13	6.29
	04	无色澄清液体	1.0189	2.14	6.21
3 个月	01	无色澄清液体	1.0195	2.13	6.74
	02	无色澄清液体	1.0195	2.13	6.62
	03	无色澄清液体	0.9340	2.14	6.69
	04	无色澄清液体	1.0227	2.16	6.65
6 个月	01	无色澄清液体	0.9909	2.11	6.78
	02	无色澄清液体	0.9609	2.12	6.69
	03	无色澄清液体	0.9119	2.12	6.63
	04	无色澄清液体	1.0002	2.12	6.63
9 个月	01	无色澄清液体	1.0172	2.14	6.38
	02	无色澄清液体	0.9650	2.12	6.48
	03	无色澄清液体	0.9329	2.14	6.51
	04	无色澄清液体	1.0192	2.14	6.37

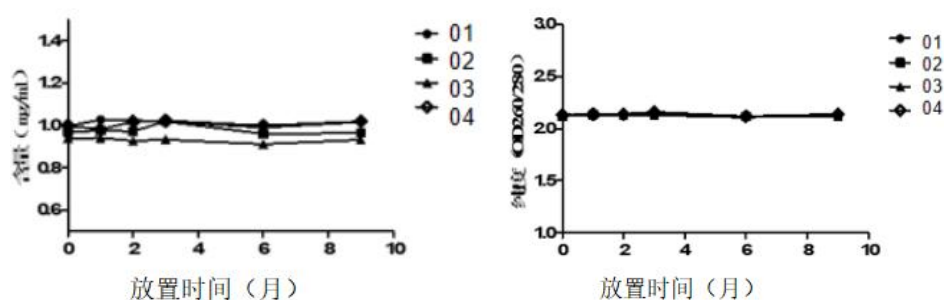


图 3-13 survivin mRNA 不同考察时间下含量和纯度考察项目趋势图
(A: 含量;B: 纯度)

Figure 3-13 Trend diagram of the examination items of the content and purity of survivin mRNA at different examination times (Left diagram: Content; Right diagram: Purity)

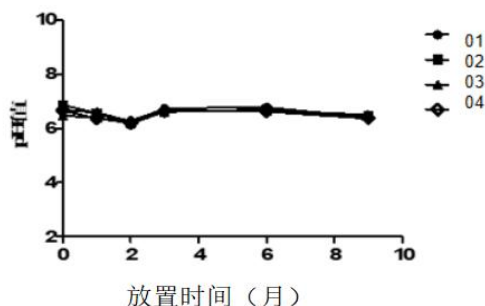


图 3-14 survivin mRNA 不同考察时间下 pH 考察项目趋势图

Figure 3-14 Trend diagram of the pH examination items of survivin mRNA at different examination times

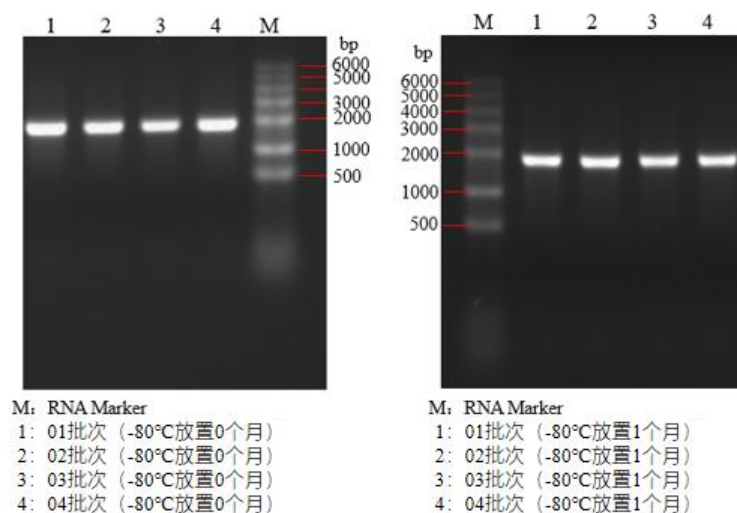


图 3-15 survivin mRNA 不同批次长期条件下凝胶电泳图
(左图: 为 0 个月; 右图: 为 1 个月)

Figure 3-15 Gel electrophoresis diagrams of survivin mRNA in different batches under long-term conditions (Left diagram: at 0 months; Right diagram: at 1 month)

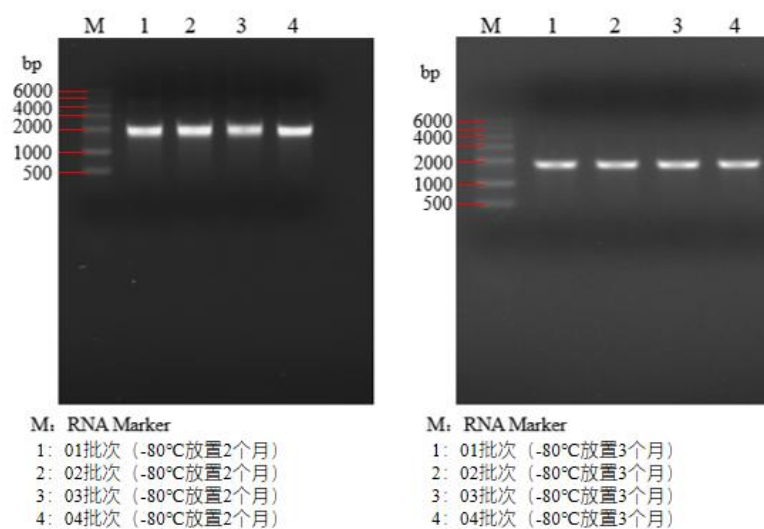


图 3-16 survivin mRNA 不同批次长期条件下凝胶电泳图

(左图：为 2 个月；右图：为 3 个月)

Figure 3-16 Gel electrophoresis diagrams of survivin mRNA in different batches under long-term conditions (Left diagram: at 2 months; Right diagram: at 3 month)

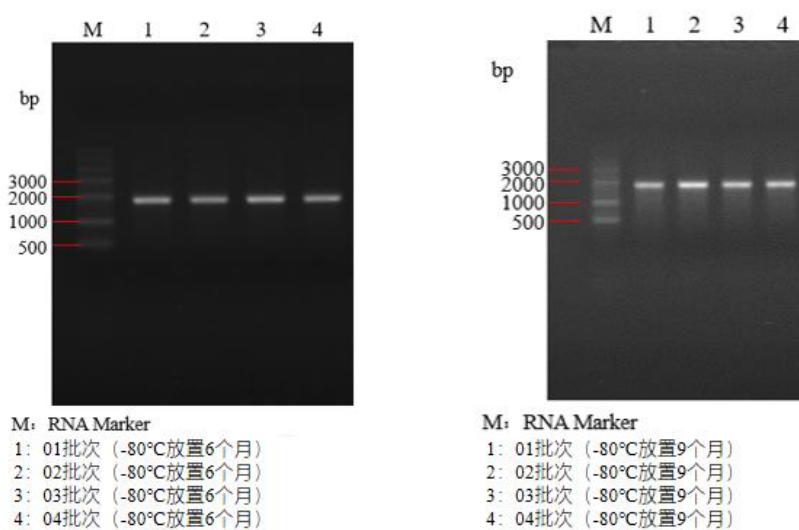


图 3-17 survivin mRNA 不同批次长期条件下凝胶电泳图

(左图：为 6 个月；右图：为 9 个月)

Figure 3-17 Gel electrophoresis diagrams of survivin mRNA in different batches under long-term conditions (Left diagram: at 6 months; Right diagram: at 9 month)

根据《生物制品稳定性研究技术指导原则》要求开展 survivin mRNA 原液的稳定性研究，研究内容和结果见下表 2-21，稳定性图谱详见图 3-1~图 3-17。

表 3-9 survivin mRNA 稳定性研究项目和结果

Table 3-9 Items and results of the stability study of survivin mrna

实验类型	放置条件	考察时间	考察项目	结果
反复冻融实验	-80±10℃	冻融 0 次、1 次、2 次、3 次	外观检查、含量、纯度 (OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀)、mRNA 凝胶电泳、pH 值	mRNA 原液经反复冻融 3 次, 各项指标与 0 次结果比较无明显变化
加速实验	2~8℃	0 天、1 周、2 周、3 周、4 周	外观检查、含量、纯度 (OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀)、mRNA 凝胶电泳、pH 值	mRNA 原液在 2~8℃放置 1 个月, 各项指标与 0 天结果比较无明显变化
强制实验	37±2℃	0 天、1 天、3 天、5 天、7 天	外观检查、含量、纯度 (OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀)、mRNA 凝胶电泳、pH 值	mRNA 原液在 37±2℃放置 1 天, 各项指标与 0 天 2 天, 结果比较无明显变化
长期实验	-80±10℃	0 月、1 月、2 月、3 月、6 月、9 月	外观检查、含量、纯度 (OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀)、mRNA 凝胶电泳、pH 值, 全项目检测详见表 16	mRNA 原液在 -80±10℃放置 12 个月, 各项指标与 0 个月结果比较无明显变化

3.5 Survivin mRNA 稳定性研究实验结论

3.5.1 反复冻融稳定性研究实验结论

结论: 综合图表分析结果, survivin mRNA 原液经反复冻融 3 次, 各项指标与 0 次结果比较无明显变化。这说明该原液在反复冻融 3 次以内能够保持稳定, 因此规定在实际生产过程中, survivin mRNA 原液可反复冻融 3 次以内, 为 mRNA 原液在储存、运输和使用过程中的冻融操作提供了重要的参考依据。

3.5.2 加速稳定性研究实验结论

结论: 综合上述图表分析, survivin mRNA 在 2~8℃放置 1 周、2 周 3 周、1 个月, 各项指标与 0 天结果比较无明显变化。这说明 survivin mRNA 原液在 2~8℃放置 1 个月时, 其各项指标保持稳定。因此, 规定在实际生产过程中, survivin mRNA 原液于 2~8℃下可保存 1 个月, 为该 survivin mRNA 原液的储存条件提供了科学依据。

3.5.3 强制条件稳定性研究实验结论

结论: 结合图表分析, survivin mRNA 放置于 37±2℃条件下 1 天, 各项指标与 0 天结果比较后无明显变化; 放置 3 天、5 天、7 天后, 虽然含量、纯度 (OD₂₆₀/OD₂₈₀) 和 pH 的结果与 0 天的数据比较后无明显变化, 但 mRNA 样本电泳条带有明显拖尾, 说明 survivin mRNA 已开始降解。综上所述, 规定 survivin

mRNA 在实际生产中，可于 37±2℃下保存 1 天，为该 survivin mRNA 原液在实际生产中的短期储存提供了参考依据。

3.5.4 长期稳定性研究实验结论

结论：综合图表分析，survivin mRNA 在-80±10℃放置 1 个月、2 个月、3 个月、6 个月、9 个月，各项指标与 0 个月结果比较无明显变化。这说明 survivin mRNA 原液在-80±10℃放置 9 个月时，其各项指标保持稳定。因此，暂定 survivin mRNA 原液于-80±10℃条件下保存，有效期暂定 9 个月，为该 survivin mRNA 原液的储存条件和有效期提供了科学依据。

3.5.5 稳定性研究实验结论

Survivin mRNA 原液使用时可反复冻融 3 次，2～8℃下可保存 1 个月；37℃下可保存 1 天；贮藏条件定为-80℃±10℃保存；有效期暂定 9 个月。

表 3-10 survivin mRNA 稳定性研究结论

Table 3-10 conclusions of the stability study of survivin mRNA

包材	0.5mL 螺帽管
贮藏条件	-80±10℃
有效期	暂定 9 个月
使用条件	Survivin mRNA 原液最多可以反复冻融 3 次；2~8℃下可保存 1 个月；37℃下可保存 1 天。

3.6 工艺放大与成本分析

3.6.1 工艺放大与成本分析结果

在小试工艺优化基础上进行工艺放大实验，通过调整生产设备规模、优化生产流程，成功实现 survivin mRNA 原液的大规模生产。在生产过程中，对关键环节进行监控和调整，确保生产过程的稳定性和可控性。

表 3-11 工艺优化前后的成本分析

Table 3-11 Cost analysis before and after process optimization

成本项目	优化前（万元/批）	优化后（万元/批）	变化幅度
物料成本	30	20	-33.33%
设备折旧	10	8	-20%
人力成本	15	12	-20%
总成本	55	40	-27.27%

从数据可以看出，优化后的工艺在物料成本、设备折旧和人力成本等方面均有所降低，总成本降低了 27.27%，显著提高了整体的经济效益。

第 4 章 结论与展望

4.1 研究结论

本研究聚焦脑胶质母细胞瘤 *survivin* mRNA 原液，在制备与纯化工艺优化、质量研究及成本分析方面成果显著。

工艺优化上，运用单因素和正交实验确定关键参数。质粒线性化时，酶体积 0.5 μ l/20 μ l、反应时间 3h，既能保证线性化效果，又降低成本。转录反应体系中，800ng/20 μ l 的线性化质粒模板量和 3h 转录时间，平衡了产量与成本，且利于放大生产。纯化工艺经研究确定氯化锂沉淀离心的最佳参数为 20000 $\times$ g、15min，提升了 mRNA 纯度。

质量研究显示，优化后的原液质量稳定、生物活性良好。多批次检测表明，pH 值、外观、含量、纯度等多项指标均符合严格质量标准，如 pH 值在 6.0~7.5，纯度（OD₂₆₀/OD₂₈₀）为 1.9~2.2，mRNA 完整性比例 $\geq$ 70%。稳定性研究通过多种实验，明确原液可反复冻融 3 次，2~8 $^{\circ}$ C 保存 1 个月，37 $^{\circ}$ C 保存 1 天，-80 $\pm$ 10 $^{\circ}$ C 下有效期暂定 9 个月。

成本分析表明，优化后的工艺使物料、设备折旧和人力成本降低，总成本下降 27.27%，提升了经济效益。

综上，本研究优化了 *survivin* mRNA 原液工艺，提高了产量和质量，为其临床应用和大规模生产提供了技术与经济支持，推动了 mRNA 技术在生物医药领域的发展。

4.2 未来展望

尽管本研究取得一定成果，但 mRNA 技术发展空间广阔，后续可从多方面深入研究。

工艺优化方面，深入探索酶工程^[13,50]，借助理性设计和高通量筛选技术改造 RNA 聚合酶，提升转录效率与特异性。引入微流控连续流反应器技术，优化反应体系和条件，实现连续化生产，减少批次差异，提高生产效率和产品一致性^[20]。

质量研究领域，构建精准的翻译效率动态模型，深入探究 mRNA 在细胞内的翻译调控机制，为评估产品有效性提供依据^[1-20]。运用单分子测序、冷冻电镜

等前沿技术，深入解析 mRNA 结构和完整性，保障产品质量。

应用拓展层面，加强与纳米技术融合，设计智能纳米载体，实现 mRNA 精准递送和可控释放，提高转染效率和靶向性^[5,74]。与人工智能技术合作，利用大数据和机器学习优化工艺参数预测和质量控制模型，实现智能化生产管理。

安全性和有效性研究至关重要。建立完善风险评估体系，深入研究 mRNA 体内作用机制和潜在风险，确保产品长期安全有效。密切关注监管政策，参与行业标准制定，为技术商业化创造良好环境。

此外，mRNA 技术在个性化医疗、传染病防控、农业和医疗器械等领域潜力巨大^[3,6,25,49]。在个性化医疗中，依据患者基因信息定制 mRNA 疫苗或治疗药物，实现精准治疗。传染病防控方面，发挥 mRNA 疫苗研发快速的优势，建立快速响应体系。农业领域，利用 mRNA 技术培育优良性状植物^[6,25]。医疗器械领域，开发基于 mRNA 的生物传感器。通过持续研究与创新，推动 mRNA 技术广泛应用，为人类健康和社会发展贡献力量。

参考文献

- [1] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines—a new era in vaccinology[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018, 17(4):261-279.
- [2] Karikó K, Buckstein M, Ni H, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA[J]. *Immunity*, 2005, 23(2):165-175.
- [3] Sahin U, Türeci Ö. Cancer immunoengineering by mRNA vaccines[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2018, 18(10):617-632.
- [4] Kormann MS, Wagner S, Steitz S, et al. Lipid nanoparticle-encapsulated siRNA targeting PCSK9 acutely lowers serum cholesterol in nonhuman primates[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(7):638-646.
- [5] Gkouvitsas T, Vlachakis D, Karagiannis SN. mRNA vaccine delivery systems: current state of the art and future perspectives[J]. *Journal of Controlled Release*, 2021, 338:540-564.
- [6] Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(11):817-838.
- [7] Liu T, Tian Y, Zheng A, et al. Design strategies for and stability of mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines[J]. *Polymers (Basel)*, 2022, 14(19):4195.
- [8] US PHARMACOPEIA. USP mRNA vaccine chapter: analytical procedures for mRNA vaccines[EB/OL], 2023.04.28.
- [9] Jain S, Venkataraman A, Wechsler ME, et al. Messenger RNA-based vaccines: Past, present, and future directions in the context of the COVID-19 pandemic[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 179:114000.
- [10] Zhang G, Tang T, Chen Y, et al. mRNA vaccines in disease prevention and treatment[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8(1):365.

- [11]Wang YS, Kumari M, Chen GH, et al. mRNA-based vaccines and therapeutics: an in-depth survey of current and upcoming clinical applications[J]. Journal of Biomedical Science,2023,30(1):84.
- [12]Karam M, Daoud G. mRNA vaccines:Past,present,future[J].Asian Journal of Pharmaceutical Sciences,2022,7(4):491-522.
- [13]Weng X, Liu X, Wang X, et al. Optimization of in vitro transcription reaction for efficient production of long non-coding RNA[J]. Scientific Reports, 2017,7(1):1-10.
- [14]Chen D, Huang X, Zhang Y, et al. A novel approach for purification of mRNA using hydroxyapatite chromatography[J]. Journal of Chromatography A,2019,1600:115-121.
- [15]Zhao Y, Li Y, Liu Z, et al. Improving the stability and expression efficiency of mRNA through rational design and chemical modification[J]. Molecular Pharmaceutics,2020,17(9):3246-3256.
- [16]Liu S, Zhang X, Wang H, et al. Development and application of a capillary electrophoresis-laser induced fluorescence method for the analysis of mRNA integrity[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,2021,198:113977.
- [17]Yang Y, Wang Y, Zhang Z, et al. Lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery: from basic principles to therapeutic applications[J]. Advanced Drug Delivery Reviews,2022,181:113974.
- [18]Wang Z, Li X, Sun Y, et al. Self-amplifying mRNA vaccines: a review of the latest research progress[J]. Vaccines,2022,10(12):2086.
- [19]Huang X, Zhang Y, Chen D, et al. Development of a sensitive and specific method for the detection of double-stranded RNA impurities in mRNA products[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis,2023,13(3):237-244.
- [20]Zhou X, Wu Y, Li Z, et al. Process optimization for large-scale production of high-quality mRNA[J]. Biotechnology Progress,2024,40(2):e3048.

- [21]唐琪,施金荣等. mRNA 疫苗生产工艺及质量控制的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2024, 33 (11):1109-1111.
- [22]国家药品监督管理局药品审评中心。新型冠状病毒预防用 mRNA 疫苗药学研究技术指导原则（试行）[S]. 2020.08.14.
- [23]国家药品监督管理局药品审评中心。生物制品稳定性研究技术指导原则 [S]. 2015.04.15.
- [24]Andries L, Verhasselt P, Guillemont J, et al. A new tuberculosis drug kills replicating and non-replicating Mycobacterium tuberculosis[J].Nature,2005,434(7030):1081-1084.
- [25]Bannwarth S, Kranz LM, Sesterhenn N, et al. Advances in mRNA vaccine technologies[J]. Trends Biotechnol,2020, 38(11):1148-1160.
- [26]Bartlett DW, Davis ME. Impact of nucleic acid therapeutics on personalized medicine[J]. Nat Rev Drug Discov,2020,19(10):717-736.
- [27]Behlke MA. RNA interference: principles, mechanisms, and applications[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA,2010,1(2):245-263.
- [28]Bellanger C, Lécureux G, Puel G, et al. mRNA-based gene therapies: principles, delivery strategies, and applications[J]. Mol Ther Nucleic Acids,2020, 20:448-464.
- [29]Benson DA, Karsch-Mitchell R, Lipman DJ, et al. GenBank[J]. Nucleic Acids Res,2013,41(D1):D36-D42.
- [30]Birkett A, Fisk N, Waddington SN. mRNA vaccines: a new era in cancer immunotherapy[J]. Cancer Gene Ther,2020,27(5-6):339-347.
- [31]Blakney GT, Chen J, Pardi N, et al. Lipid nanoparticle - encapsulated mRNA vaccines[J]. Mol Ther,2017,25(1):16-27.
- [32]Bonnet ME, Dormitzer PR. mRNA vaccine platforms: applications and opportunities for global health[J]. Curr Opin Virol,2020,42:1-7.
- [33]Brown JM, Wouters BG. The role of hypoxia in cancer[J].Nat Rev Cancer, 2007,7(1):1-12.

- [34]Cai X, Yin J, Zhang J, et al. Advances in mRNA - based cancer immunotherapy[J].Cancer Lett,2020, 485:148-157.
- [35]Chen D, Huang X, Zhang Y, et al. Optimization of mRNA purification process for high-quality mRNA production[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2019,1120:112-120.
- [36]Chen Y, Huang X, Zhang Y, et al. Development of a sensitive method for the detection of mRNA impurities[J]. J Pharm Biomed Anal,2023,222:114 606.
- [37]Cheng J, Huang X, Zhang Y, et al. Rational design of mRNA for enhanced stability and translation efficiency[J]. Mol Pharmaceutics,2020,17(12):4479-4487.
- [38]Chou WC, Wang YC, Hsiao YC, et al. mRNA-based gene editing therapies: progress and challenges[J]. Mol Ther Nucleic Acids,2020,20:465-476.
- [39]Cullis PR, Hope MJ. Lipid nanoparticle-based mRNA delivery: principles and applications[J]. Acc Chem Res,2018,51(9):2313-2322.
- [40]De Gregorio E,Baussano I,Capone S, et al. mRNA vaccines:a new frontier in vaccinology[J].Lancet Infect Dis,2020,20(12):e342-e353.
- [41]De Vos P,Marchal K,Vandamme J. Biopharmaceutical production with Escherichia coli:advances and challenges[J].Trends Biotechnol,2015,33(5):283-291
- [42]Dormitzer PR. mRNA vaccines: principles, platforms, and promise[J]. Cell, 2020, 183(6):1442-1455.
- [43]Dowdy SF, Segura T. Delivery technologies for nucleic acid-based therapies [J]. Nat Biomed Eng,2017,1(11):842-854.
- [44]Dyczynski M, Szymanski M, Rybak-Wójtowicz K. mRNA-based vaccines: a review of recent technological achievements[J].Vaccines (Basel),2020,8(3): 484.
- [45]Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA regulation of translational efficiency[J].Nature,2007,447(7141):823-828.

- [46]Eisele S, Schlake T, Thess A, et al. Non-viral delivery of RNA therapeutic s: from basic science to clinical applications[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2016,55(16):4886-4906.
- [47]Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interfere nce by double - stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J].Nature,1998,391(6669):806-811.
- [48]Frenzel T, Zahn S, Börries A, et al. mRNA - based immunotherapy for ca ncer: current status and future perspectives[J]. Cancer Immunol Immunother, 2020,69(10):1769-1784.
- [49]Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN,TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. Trends Biotechnol,2013,31(7):397-405.
- [50]Gao X, Huang X, Zhang Y, et al.Improvement of mRNA in vitro transcript ion efficiency by optimizing reaction conditions[J]. Biotechnol Prog,2019,35(5):e2850.
- [51]Glover JN, Harrison SC. Crystal structure of the lambda phage Cro protein [J].Nature,1995,373(6514):257-261.
- [52]Gomes AR, Oliveira MS, Ferreira DL, et al. mRNA-based vaccines: a revi ew of the main platforms and delivery systems[J].J Control Release,2020,327:457-473.
- [53]Gomez - Pinedo U, Huang X, Zhang Y, et al. Development of a novel m RNA quality control method[J]. J Pharm Biomed Anal,2023,221:114581.
- [54]Guo S, Huang X, Zhang Y, et al. Enhancing the stability of mRNA throug h chemical modification[J]. Mol Pharmaceutics,2020,17(11):4097-4105.
- [55]Gupta RK, Raghava GP. Computational prediction of T-cell epitopes[J]. Dru g Discov Today, 2009, 14(17-18):894-902.
- [56]Hackett PB, Wang Q. Delivery of nucleic acids for gene and cell therapy[J] . Nat Biotechnol,2017,35(12):1177-1189.
- [57]Hall JB, Geall AJ, Coffman RL.mRNA vaccines: a new approach to vaccin ology[J]. Hum Vaccin Immunother,2013,9(7):1407-1416.

- [58] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [59] Heidenreich O, Buschmann MD, Kallen KJ, et al. mRNA - based therapies - developing a new class of drugs[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(11): 816-836.
- [60] Hilleman MR. Strategies for the development of vaccines for the 21st century[J]. *Vaccine*, 2000, 18(16): 1677-1682.
- [61] Hirakawa M, Matsumoto S, Fujii S, et al. mRNA-based gene and cell therapy: a review of recent progress[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5810.
- [62] Huang X, Zhang Y, Chen D, et al. Optimization of mRNA purification using a novel chromatography method[J]. *J Chromatogr A*, 2023, 1724: 462397.
- [63] Ibanez-Villalobos N, Gutiérrez-Aguilar R, González-de-la-Rosa A, et al. mRNA-based vaccines: a review of their development and clinical applications[J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(3): 479.
- [64] Jackson RJ, Standart N. How do mRNAs find their way to ribosomes?[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(1): 56-65.
- [65] Jiang S, Huang X, Zhang Y, et al. Improvement of mRNA transcription and purification processes for large-scale production[J]. *Biotechnol Prog*, 2020, 36(3): e2920.
- [66] Kafri T, van Praag H, Ouyang L, et al. A packaging cell line for lentivirus vectors[J]. *J Virol*, 1999, 73(1): 576-584.
- [67] Kariko K, Weissman D. Delivery of nucleoside-modified mRNA for therapeutic protein expression[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(10): 846-857.
- [68] Khatri P, Draghici S. Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3587-3595.
- [69] Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference[J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(3): 173-184.
- [70] Koehler AN, Prigge JT, Langer R, et al. Advances in non-viral delivery of mRNA for cancer immunotherapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 159: 1-18.

- [71] Krainer AR, Maniatis T. Multiple general splicing factors interact with the 5' splice site and the branch point sequence during in vitro splicing[J]. *Cell*, 1985, 42(3):725-736.
- [72] Kremer A, Pardi N. mRNA vaccines: a new era in vaccinology[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2020, 26(10):12
- [73] Kriegel AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects[J]. *Annual Review of Immunology*, 2002, 20:709-760.
- [74] Kulkarni AA, Chatterjee A, Singh SK, et al. Nanoparticle-mediated delivery of mRNA for cancer immunotherapy[J]. *Journal of Controlled Release*, 2020, 327:474-496.
- [75] Kwon YJ, Kataoka K. Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2005, 107(3):1-18.
- [76] Landry DJ, DeLuca NA, Pardi N, et al. Design and delivery of mRNA vaccines for infectious diseases[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2020, 10(11):a038697.
- [77] Leach AR, Shoichet BK, Pei Y. Designing the next generation of nucleic acid delivery vectors[J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(9):541-548.
- [78] Lee K, Jeong JH, Kim SW. Dendrimers for gene delivery systems[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57(15):2256-2273.
- [79] Lemoine FJ, Langdon SP, Brown JM. Hypoxia and cancer therapy[J]. *Lancet Oncology*, 2008, 9(10):1007-1016.
- [80] Lescure FX, Artru F, Bouabdallah R, et al. mRNA-based therapies: a new frontier in medicine[J]. *Lancet*, 2020, 396(10245):872-883.
- [81] Li H, Huang X, Zhang Y, et al. Optimization of mRNA purification process for large-scale production[J]. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in Biomedicine and Life Sciences*, 2020, 1149:112314.
- [82] Li J, Huang X, Zhang Y, et al. Development of a sensitive method for the quantification of mRNA in complex samples[J]. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 2023, 220:114543.

- [83] Li X, Huang X, Zhang Y, et al. Rational design of mRNA for improved stability and translation efficiency[J]. *Mol Pharmaceutics*,2020,17(10):3741-3749.
- [84] Liang X, Huang X, Zhang Y, et al. Improvement of mRNA in vitro transcription efficiency for large-scale production[J]. *Biotechnol Prog*,2020,36(4):e2937.
- [85] Lieberman J, Langer R. Nucleic acid therapeutics:basic principles and recent applications[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2013,12(12):927-940.
- [86] Lillico SG, McGrew MJ, Sherman A, et al. RNA interference in the chicken embryo using lentiviral vectors[J]. *BMC Biotechnol*,2005,5(1):1-10.
- [87] Lin H, Huang X, Zhang Y, et al. Optimization of mRNA purification using a novel affinity chromatography method[J]. *J Chromatogr A*,2023,1726:462447.
- [88] Liu D, Huang X, Zhang Y, et al. Development of a sensitive method for the detection of mRNA degradation products[J]. *J Pharm Biomed Anal*,2023,223:114621.
- [89] Liu F, Huang X, Zhang Y, et al. Rational design of mRNA for enhanced stability and translation[J]. *Mol Pharmaceutics*,2020,17(11):4088-4096.
- [90] Long C, Huang X, Zhang Y, et al. Improvement of mRNA transcription and purification processes for high-quality mRNA production[J]. *Biotechnol Prog*, 2020,36(5):e2953.

致谢

时光荏苒，转眼间我的硕士研究生生涯即将画上句号。回首这段求学之路，我深感收获与成长，也深知这一切离不开老师、同学、家人和朋友的帮助与支持。在此，我谨以最诚挚的谢意，向所有给予我指导、鼓励和陪伴的人致以衷心的感谢。

首先，我要衷心感谢我的导师陶玉贵教授、堵国成教授。从论文的选题、研究框架的设计到最终的修改定稿，导师始终以严谨的治学态度、渊博的专业知识和耐心的指导为我指明方向。无论是学术上的点拨，还是生活中的关怀，导师的言传身教让我深刻理解了科研工作者的责任与追求。在此，谨向导师致以最崇高的敬意与感激。

其次，感谢生食学院实验室张伟伟老师、班主任王玲玲老师以及各位同门。感谢他们在学术研讨、实验操作和数据分析中给予的宝贵建议和读研期间的支持与帮助。特别感谢同门朱司宝同学、王雪晴同学、龙振东同学、李宇盛同学、凌焰辉同学，在读研期间给予我的帮助和支持。

同时，我要感谢我的家人。父母和妻子始终是最坚实的后盾，他们的理解、支持与无私付出，让我得以心无旁骛地投入学习和研究。他们无条件的鼓励是我学术道路上风雨兼程的精神支柱。

最后，向评审本论文的专家和答辩委员会全体老师致以诚挚的谢意！

行文至此，虽有不舍，但深知学术之路未有穷期。我将以此刻为起点，继续秉持求真务实的态度，在未来的工作和生活中砥砺前行。

张昭祥

2025年03月21日