

分类号:

密级:



甘肃中医药大学

GANSU UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE

硕士学位论文
(专业学位)

论文题目 (中文)	诺如病毒mRNA疫苗的研究
论文题目 (外文)	Studies on Norovirus mRNA Vaccines
研究生姓名	王雅璐
学科、专业	公共卫生与预防医学、公共卫生
研究方向	传染病防控
指导老师、职称	段招军 研究员
实践老师、职称	李金松 副研究员
论文工作起止年月	2021年7月至2023年3月
论文提交日期	2023年4月
论文答辩日期	2023年5月
学位授予日期	2023年6月

目 录

缩略词中英文对照表	3
前言	4
第一章 RNA 候选疫苗体外转录系统的设计构建与鉴定	7
1. 目的抗原的选择	7
2. 两种 RNA 体外转录系统的设计	8
3. 两种 RNA 体外转录系统的构建与鉴定	10
3.1 实验材料	10
3.2 实验方法	12
3.3 结果	21
4. 讨论	25
5. 小结	28
第二章 诺如病毒 RNA 疫苗体外表达系统的功能验证与筛选	29
1. 实验材料	29
1.1 实验材料与仪器	29
1.2 实验试剂及溶液配制	29
2. 实验方法	30
2.1 体外转染 Cap-mRNA-NORO	30
2.2 酶联免疫吸附实验(ELASA)	30
2.3 间接免疫荧光实验(IFA)	31
2.4 蛋白免疫印迹实验(Western blot)	31
3. 结果	33
3.1 体外转染 Cap-W1-NORO、Cap-W2-NORO 酶联免疫吸附试 验验证	33
3.2 体外转染 Cap-W1-NORO、Cap-W2-NORO 间接免疫荧光试 验验证	34
3.3 体外转染 Cap-W1-NORO、Cap-W2-NORO 蛋白免疫印迹试 验验证	35
4. 讨论	37
5. 小结	39
结论	40
不足与展望	40
参考文献	41
文献综述 mRNA 疫苗的技术创新和研究进展	44
参考文献	49

摘要

目的：设计构建两种诺如病毒 mRNA 候选疫苗体外转录系统。分析比较表达差异，筛选出最佳体外转录系统，为后期诺如病毒 mRNA 疫苗的开发奠定理论和实验基础。

方法：（1）将 EGFP 报告基因和 NoV-VP1 基因插入所设计体外转录系统，构建重组质粒。（2）以线性化 DNA 为模板进行体外转录加帽纯化制备 mRNA。（3）mRNA 的体外转染。（4）通过镜下荧光观察、酶联免疫吸附试验、间接免疫荧光试验、蛋白免疫印迹试验对两组体外转录系统进行功能验证。

结果：（1）通过体外转录加帽纯化回收成功制备出质量较好的 mRNA 样品。（2）插入 EGFP 报告基因的两组 mRNA 样品转染细胞后，显微镜激发光下可见绿色荧光，mRNA-W1 组荧光较强。（3）插入 GII.4 NoV-VP1 目标抗原的两组 mRNA 样品转染细胞后，ELISA 结果为阳性；IFA 镜下观察有明显荧光；Western Blot 有明显特异性条带；细胞内 NoV-VP1 蛋白成功表达，mRNA-W1 组翻译效率、蛋白表达量、表达持续时间较优。

结论：成功构建两种诺如病毒 mRNA 疫苗体外转录系统，两种系统都能较好的表达 GII.4 NoV-VP1 目的蛋白。mRNA-W1 系统表达效果优于 mRNA-W2 系统，最终确定筛选出 mRNA-W1 体外转录系统用于后续诺如病毒 mRNA 疫苗的研究，助力我国诺如病毒预防控制工作。

关键词：诺如病毒；VP1 蛋白；RNA 疫苗；体外转录

ABSTRACT

Objective: Two in vitro transcription systems for norovirus mRNA candidate vaccines were designed and constructed. By analyzing and comparing the expression differences, the best in vitro transcription system was screened out, which laid a theoretical and experimental foundation for the development of Norovirus mRNA vaccine in the later stage.

Methods: (1) The EGFP reporter gene and NoV-VP1 gene were inserted into the designed in vitro transcription system to construct the recombinant plasmid. (2) Preparation of mRNA by in vitro transcription cap purification using linearized DNA as a template. (3) mRNA transfection in vitro. (4) Functional verification of the two in vitro transcription systems was performed by microscopic fluorescence observation, enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence assay, and Western blotting.

Results: (1) The mRNA samples with good quality were successfully prepared by in vitro transcription cap purification. (2) Green fluorescence was observed under the excitation light of the microscope after transfection of the two groups of mRNA samples with EGFP reporter gene, and the fluorescence of mRNA-W1 group was stronger. (3) Two groups of mRNA samples inserted with GII.4 NoV-VP1 target antigen were transfected into cells, and the ELISA results were positive. IFA microscopic observation showed obvious fluorescence; western Blot has obvious specific bands ; the intracellular NoV-VP1 protein was successfully expressed, and the mRNA-W1 group had better translation efficiency, protein expression and expression duration.

Conclusion: Two in vitro transcription systems of Norovirus mRNA vaccine were successfully constructed, and both systems could express GII.4 NoV-VP1 target protein. The expression effect of mRNA-W1 system was better than that of mRNA-W2 system. Finally, the mRNA-W1 in vitro transcription system was selected for the follow-up study of norovirus mRNA vaccine to help the prevention and control of norovirus in China.

Keywords: Norovirus, VP1 protein, RNA vaccine, In vitro transcription

缩略词中英文对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
NoV	Norovirus	诺如病毒
AGE	Acute gastroenteritis	人急性胃肠炎
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
mRNA	Messenger RNA	信使核糖核酸
DNA	Desoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
bp	Base pair	碱基对
ORF	Open Reading Frames	开放阅读框
PBS	Phosphate-Buffer Saline	磷酸盐缓冲液
3'-UTR	3'-untranslated region	3'非翻译区
5'-UTR	5'-untranslated region	5'非翻译区
VLP	Virus like particles	病毒样颗粒
HBGAs	Histo-blood group antigens	人组织血型抗原
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein	增强绿色荧光蛋白

前言

1. 研究背景

诺如病毒 (Norovirus, NoV) 属于杯状病毒科 (Caliciviridae), 诺如病毒属。是能感染所有年龄组并引起人急性胃肠炎 (Acute gastroenteritis, AGE) 爆发的主要病原体。NoV 被归类为 B 类生物防御病原体。易引起大规模的暴发, 易受感染的群体多为 5 岁以下的儿童及老年人。NoV 主要通过人与人接触进行直接传播, 通过食物、水、污染的物体表面进行间接传播^[1]。因病毒传染性较强、感染滴度低、能在环境中稳定存在, 所以易在学校、老人院、等半封闭拥挤环境中引起大规模的暴发。NoV 在冷冻及 60°C (持续 30min) 条件下依然具有传染性, NoV 能够在较低的 pH 环境中生存, 而酒精对其没有任何灭活作用与效果^[2]。全球约 18% 的急性胃肠炎 (Acute gastroenteritis, AGE) 病例是由 NoV 引起, 每年约有超过 6.84 亿人患病, 造成社会经济损失超 600 亿美元^[3]。NoV 在发达国家和发展中国家均造成重大的疾病负担^[4-9]。NoV 感染在全球范围内被认为是一个重大的公共卫生问题。我国作为 NoV 的主要流行区之一, 如何去预防和控制 NoV 传播也是我国疫情防控工作中需关注的重点, 目前仍没有特异针对 NoV 的抗病毒药物, 少数 NoV 疫苗还处于临床前或临床试验阶段。

2. 研究现状

因 NoV 低载量就能感染以及可通过接触进行传播等特点, 单靠改善个人卫生和环境, 并不能完全有效地控制 NoV。当前更有效的防控手段是疫苗。研发针对 NoV 的药物与疫苗也面临着较大的挑战。1) NoV 具有高度多样性和变异性, 疫苗研发需要考虑到抗原多样性和大量基因型。2) NoV 蛋白研究缺乏反向遗传学系统来验证病毒感染期间的蛋白质功能。3) 由于科研人员无法开发出用于培养 NoV 的细胞系, 所以至今我们对 NoV 免疫机制的理解以及抗病毒药物的开发都进展甚微^[10, 11]。4) NoV 进化快, 在宿主的免疫压力下, NoV 会发生点突变和基因重组, 疫苗整体研发时间较长^[12]。

现有 NoV 疫苗类型包含腺病毒载体疫苗及其它载体疫苗、VLP 疫苗、P 颗粒疫苗等, 大部分在研疫苗的研究阶段都处在临床前期。研究最深入的 NoV 疫苗是日本 Takada 公司开发的 TAK-214 双价 VLPs 疫苗, 现已进入 II 期临床试验, 其余几种正在临床研究进行中的 NoV 疫苗类型也均是腺病毒载体疫苗和 VLP 疫苗。

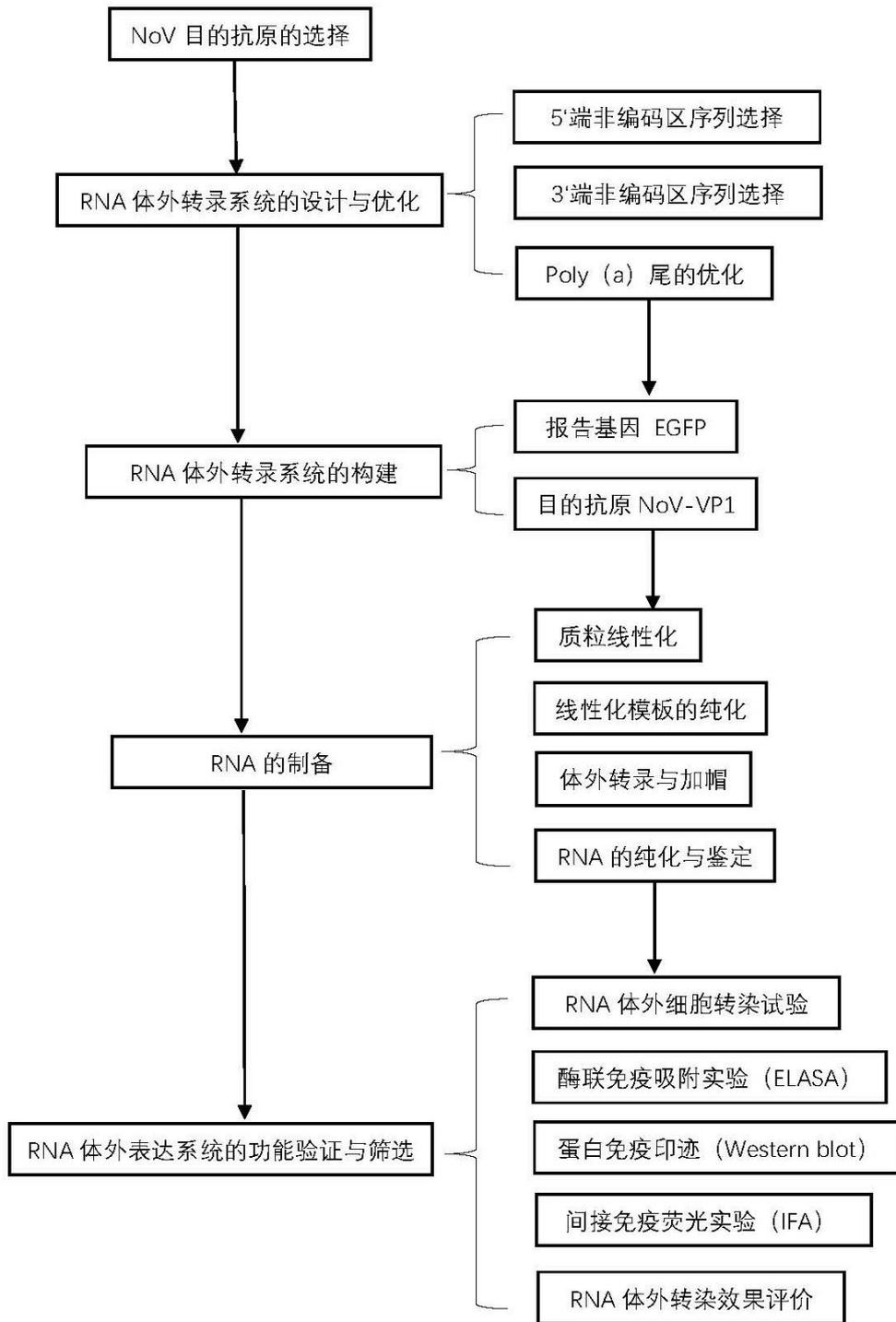
近年来, 随着 mRNA 合成、分子修饰和传递技术的进步, mRNA 疫苗已经取得了

重大的进步，成为一种具有重要意义核酸疫苗。它是在第一代减毒活疫苗和第二代亚单位疫苗的基础上研发的第三代疫苗^[13]。mRNA 疫苗在肿瘤和传染病防治方面具有广泛的应用前景^[14]。mRNA 疫苗也为 NoV 疫苗研发提供了新思路。研究者们发现，mRNA 技术是一种能够有效地激活抗体，利用编码特定抗原的核苷酸序列进行调节的全新方法。它能够利用其特定的核苷酸序列来激活抗体，从而产生有效的防御机制。与传统疫苗相比，mRNA 疫苗具有显著优势。更具高效性，也具有快速开发的能力。mRNA 疫苗可以使用非病毒递送系统，降低制造成本的同时保证安全给药。此外，mRNA 疫苗可以表达多个所需目的抗原，不需要大范围调整疫苗生产过程，在疫苗开发过程中有很大的灵活性。

3.研究目的与意义

设计构建两种诺如病毒 mRNA 候选疫苗体外转录系统，进行功能验证。通过分析目的蛋白的表达差异，筛选效果最佳的体外转录系统，优化诺如病毒 mRNA 疫苗前期技术参数。为诺如病毒 mRNA 疫苗的设计与研发提供理论和实验依据，从而制备有效安全的诺如病毒 mRNA 疫苗，预防易感人群感染诺如病毒所引起的急性胃肠炎。

4.技术路线



第一章 RNA 候选疫苗体外转录系统的设计构建与鉴定

1.目的抗原的选择

诺如病毒（Norovirus, NoV）是一种具有单股正链 RNA 基因组的无包膜病毒，病毒颗粒的直径约为 27-40nm，衣壳呈二十面体立体对称。NoV 基因组全长约为 7.5-7.7kb，由 3 个开放阅读框(Open Reading Frames, ORFs)，5'端和 3'端非翻译区组成(图 1)^[15]。病毒基因组 5'端与 VPg 蛋白相连，3'端有多聚腺苷酸尾（poly A），它们的主要作用是稳定病毒基因组结构^[16]。ORF1 编码一个聚蛋白，与小核糖核酸病毒的解旋酶、半胱氨酸蛋白酶和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶（RdRp）编码区域相似^[17]。ORF2 编码具有壳（S）和突出（P）结构域的主要结构蛋白（VP1），S 结构域围绕病毒 RNA，由 P2 结构域组成的 P 结构域通过柔性铰链连接到 S 结构域；ORF3 编码次要结构蛋白(VP2)，病毒的抗原性和毒株特异性是由 VP1 蛋白决定，VP2 位于病毒粒子内部，与 VP1 蛋白协同作用，可能参与病毒的组装，维持衣壳的稳定性^[15]。

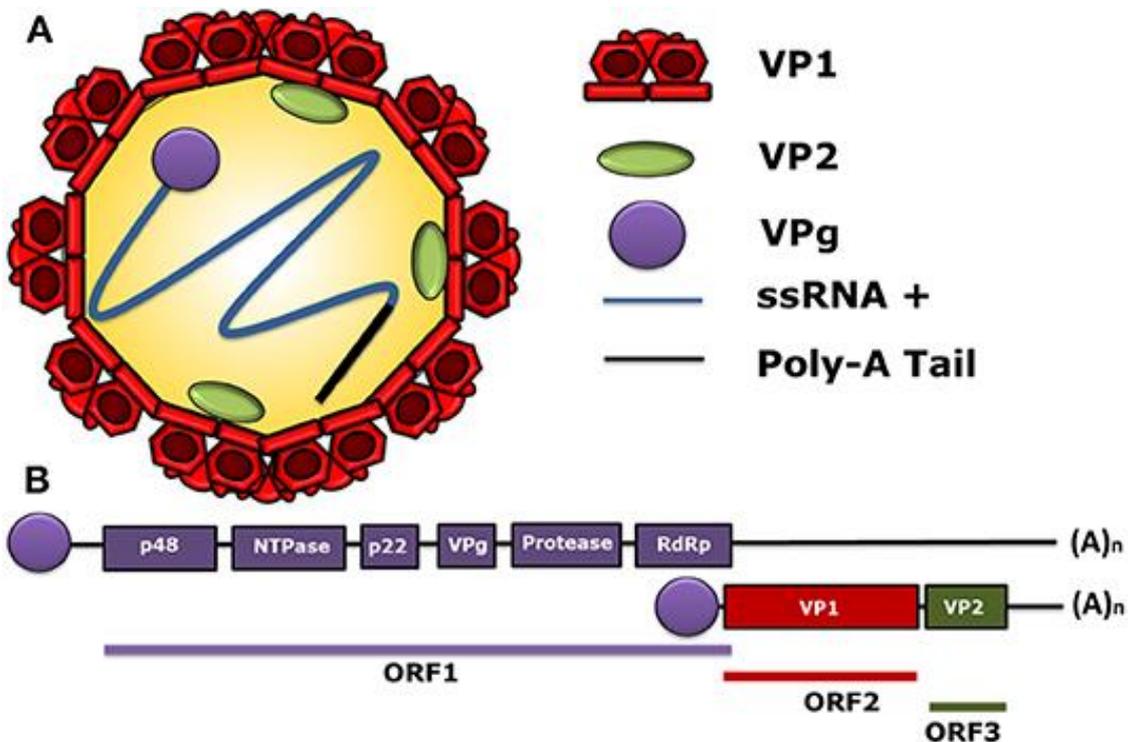


图 1 NoV 分子结构^[15]

NoV 采用双分型系统，分型依据为主要衣壳蛋白 VP1 氨基酸序列多样性和依赖 RNA 的 RNA 聚合酶（RdRp）核苷酸多样性，根据 VP1 蛋白的不同，NoV 分为 10

个组 (GI-GX),共包含 49 个基因型^[18]。诺如病毒 (NoV) 基因型 I 和 II(GI 和 GII) 目前被认为是人类急性胃肠炎暴发的全球主要原因。NoV GII.4 变异株从 90 年代中期起, 流行度迅速提高, 成为全球 NoV 流行的主要基因型, 多年来 50%~70%的暴发是由它引起的, rna 重组是病毒进化的主要驱动力^[19,20]。NoV GII.4 基因型的毒株随着时间的推移不断的进化, 平均每过 2~4 年就会有新毒株出现去取代旧毒株成为优势株, 引发大流行。GII.4 Sydney 株从 2012 年开始出现以来, 一直在 NoV 全球暴发的基因型中占主导地位, 包含 GII.4 sydney [P16] 和 GII.4 sydney [P31] 两种类型。根据中国疾病预防控制中心病毒病所的监测数据显示, 至今为止 GII.4 sydney[P31]株仍是我国 NoV 暴发的主要流行毒株, GII.4 sydney[P16]总体的检出率较低, 仅为 0.35%^[21,22]。

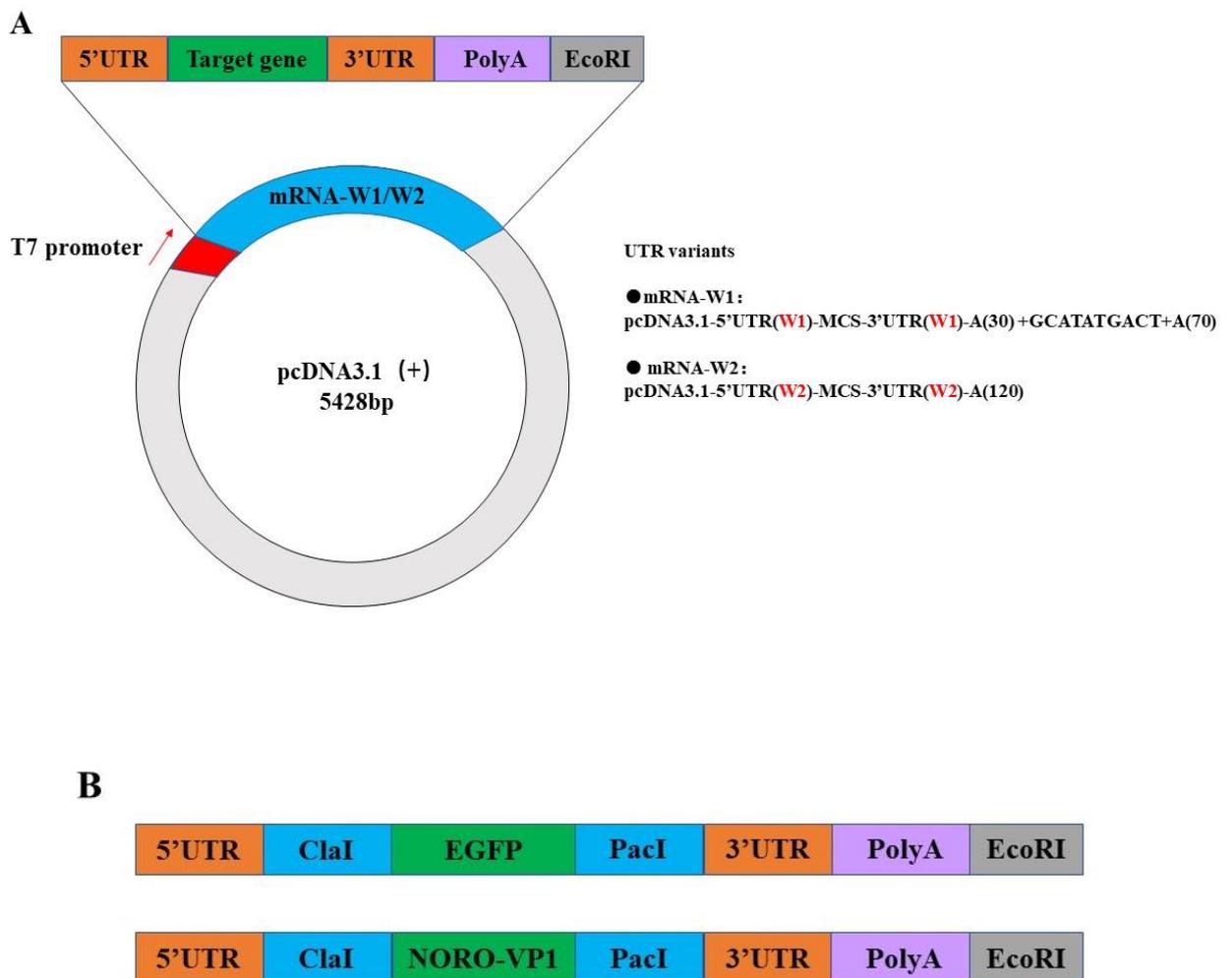
mRNA 疫苗具有较高的抗原选择灵活性, 但是在针对某些特定病毒的研发中, 必须格外小心, 以确保最佳效果。要保证疫苗所包含 RNA 编码蛋白的安全性和有效性。寻找最佳蛋白质抗原是 mRNA 疫苗研发的重点之一。NoV ORF2 区编码的主要衣壳蛋白 VP1 是 NoV 疫苗开发的重点, 包含关键中和表位和 HBGAs 受体结合位点^[23]。VP1 可以脱离病毒其他部分完成独立表达, 在真核表达中自行组装形成 VLP。本研究选择 GII.4 sydney 我国 NoV 主要流行株的 VP1 作为目的抗原进后期实验, 为后续 NoV mRNA 疫苗的开发提供经验。

2.两种 RNA 体外转录系统的设计

通过外源基因表达技术, mRNA 疫苗可以从线性化质粒模板中获取, 并且可以设计出特定的 DNA 模板, 再得到 mRNA。mRNA 的构成包含几种基本元素, 依次包括帽子结构(Cap)、5'UTR 区、编码抗原蛋白的开放阅读框、3'UTR 区和 Poly(A)尾结构^[13]。mRNA 的翻译效率主要受到 5'UTR 区的影响, 而 3'UTR 区则是导致 mRNA 不稳定的主要因素。大多数 mRNA 降解都是从 Poly (A) 尾开始的, 而 3'端 Poly (A) 尾结构是影响 mRNA 稳定性的最重要因素, Cap 结构也与 mRNA 的稳定性密切相关^[24]。因此, 我们需要重新设计 DNA 模板上的非翻译区、Poly (A) 尾结构以及在转录过程中需要添加的 Cap 等元件, 以提高转录效率, 进而提高 mRNA 的稳定性和翻译效率。

本文共设计两种不同的体外转录系统 5'UTR-MCS-3'UTR-polyA, 两种设计中 UTRs 序列和 polyA 结构均不相同, 并将两种设计分别记作 mRNA-W1 和 mRNA-W2。本研究中具体 5'UTR、3'UTR 序列信息属实验室内部数据, 暂不公布。

在多克隆位点（MCS）处插入酶切位点 *Cla*I 和 *Pac*I，以便于后续目的基因的插入。在 3'UTR 端 polyA 尾结构后插入酶切位点 *Eco*RI，以便于后期质粒模板的线性化。将 mRNA-W1 和 mRNA-W2 两段分别连入表达载体 pcDNA3.1 (+) 中 T7 启动子后，完成两种体外转录系统的构建，将其命名为 pcDNA-W1 和 pcDNA-W2。为了更好的验证和评价本研究所设计的 RNA 候选疫苗体外表达系统，除目的抗原 GII.4 NoV-VP1 的插入，也插入 EGFP（Enhanced Green Fluorescent Protein，增强绿色荧光蛋白）作为报告基因同时进行实验，将连入目的基因的重组质粒依次命名为 pcDNA-W1-EGFP、pcDNA-W1-NORO、pcDNA-W2-EGFP 和 pcDNA-W2-NORO。重组质粒结构示例如（图 2）所示。



A. 两种设计体外转录系统具体示意图；

B. 报告基因 EGFP 和目的抗原 NORO-VP1 表达盒模式图

图 2 两种体外转录系统及目的基因验证示意图

3.两种 RNA 体外转录系统的构建与鉴定

3.1 实验材料

3.1.1 质粒、细菌、引物合成与测序

- (1) 携带 NoV GII.4 VP1 区的质粒由中国疾病预防控制中心病毒所病毒性腹泻室提供；
- (2) 携带 EGFP 报告基因的质粒由中国疾病预防控制中心病毒所侯院士实验室提供；
- (3) pcDNA-W1 和 pcDNA-W2 两种体外转录系统质粒是本实验室设计，由南京金斯瑞生物科技有限公司合成；
- (4) 所有扩增引物和基因测序由北京天一辉远生物科技有限公司完成。

3.1.2 实验仪器

表 1 仪器厂家及型号

仪器名称	厂家	货号
生物安全柜	北京造鑫企业有限公司	Baker403
超净工作台	济南莱宝医疗器械有限公司	SW-CJ-2D
PCR 扩增仪	美国 SCILOGEX 公司	TC1000-G
恒温水浴锅	美国 Thermo 公司	Heto HWT100
常温台式高速离心机	德国 Eppendorf 公司	5415D
高速冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司	5804R
旋涡混合器	美国 Scientific Industries 公司	SI-0246
恒温摇床	江苏金坛市金城国胜实验仪器厂	THZ-8A
电子天平	德国 Sartorius 公司	BT323S
迷你离心机	美国 AndyBio 公司	M-Microcentrifuge
Nanodrop lite 分光光度计	美国 Thermo 公司	ND-NDL-US-CAN
Research plus 移液器	德国 Eppendorf 公司	10 μ L -1000 μ L
灭菌滤芯枪头	美国 Axygen 公司	10 μ L -1000 μ L
1.5mL 无菌无酶 EP 管	美国 Axygen 公司	MTC-150-C-S
细菌培养皿	Greiner	628102
滤膜培养瓶	Corning/康宁	430641
微琼脂糖电泳仪	六一生物	DYCP-31A
凝胶成像系统	美国 BIO-RAD 公司	Gel Doc™ XR+System

3.1.3 实验试剂与溶液配制

表 2 试剂厂家及货号

试剂名称	厂家	货号
常用限制性内切酶	NEB	PacI/Cla I/EcoRI
氨苄青霉素 (Amp)	leagene/雷根	CA0006
异丙基-b-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)	TIANGEN/天根生化	RT108-01
X-gal	TIANGEN/天根生化	RT119
一步法快速克隆试剂盒	YEASEN/翊圣	10912ES10
T4 DNA 连接酶	Promega	A3610
I-5™ 2×High-Fidelity Master Mix	TSINGKE	TP001
2×Taq 预混 PCR 反应体系	Genstar/康润	A012-01
QIAGEN OneStep RT-PCR 试剂盒	Qiagen/凯杰	210212
Trans DNA Marker	Transgen/全式金	2k/5k/15k
10 × Loading Buffer	TaKaRa	9157
QIAquick Gel Extraction Kit (250)	Qiagen/凯杰	28706
QIAquick PCR Purification Kit (50)	Qiagen/凯杰	28104
DH5α 感受态细胞	TIANGEN/天根生化	CB101-02
EndoFree Plasmid Maxi Kit (10)	Qiagen/凯杰	12362
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen/凯杰	27106
酚: 氯仿: 异戊醇 DNA 提取试剂	Solarbio	P1011
酚: 氯仿: 异戊醇 RNA 提取试剂	Solarbio	P1012
HiScribe™ T7 ARCA mRNA Kit	NEB	E2065S
ssRNA Ladder	NEB	N0362S
MEGAclear 转录纯化试剂盒	Thermo Fisher/赛默飞世尔	AM1908

表 3 LB 培养基配制表

氨苄 LB 液体培养基/L	氨苄 LB 固体培养基/L
胰蛋白胨 10g	胰蛋白胨 10g
酵母提取物 5g	酵母提取物 5g
NaCl 10g	NaCl 10g
—	琼脂粉 15g
加入蒸馏水配制, 121°C 高压灭菌 20 min 冷却至约 55°C 并加入终浓度为 100 mg/mL 的氨苄抗生素。	

3.2 实验方法

3.2.1 重组质粒的构建

3.2.1.1 引物设计

根据需要插入的目的基因 EGFP、NORO-VP1 的具体序列，使用 SnapGene 软件设计特异性引物，在目的基因片段正、反向 PCR 引物的 5'端引入 20 bp 左右的线性化载体末端（pcDNA-W1、pcDNA-W2）同源序列，使目的基因（EGFP、NORO-VP1）PCR 产物 5'和 3'的末端序列与线性化载体两端完全吻合，便于后期同源重组的连接。同时在引物的 5'端引入 Kozak 序列（GCCACC）以提高目的基因蛋白的表达效果，具体引物序列见（表 4）。

表 4 PCR 扩增引物

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
W1-EGFP-F	CGGCGCCGCCACC <u>ATCGAT</u> GCCACC ATGGTGAGC	770 bp
W1-EGFP-R	GCCACCGAGGCTCCAGC <u>TTAATTAAT</u> TACTTGTACAGC	
W2-EGFP-F	CCTCAAACAGACACC <u>ATCGAT</u> GCCACC ATGGTGAGC	1670 bp
W2-EGFP-R	GCAAGAAAGCGAGC <u>TTAATTAAT</u> TACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	
W1-NORO-F	CCGGCGCCGCCACC <u>ATCGAT</u> GCCACC ATGAAG	770 bp
W1-NORO-R	GCTAGGCCACCGAGGCTCCAGC <u>TTAATTAAT</u> CACAGGGCTC	
W2-NORO-F	GCAACCTCAAACAGACACC <u>ATCGAT</u> GCCACC ATGAAGATGGC	1672 bp
W2-NORO-R	GCAAGAAAGCGAGC <u>TTAATTAAT</u> CACAGGGCTCTTCTTCTGC	

注：表中下划线处代表酶切位点序列；蓝色 **GCCACC** 部分为 Kozak 序列；
红色序列代表与载体末端（pcDNA-W1、pcDNA-W2）同源序列。

3.2.1.2 目的基因扩增与回收

使用上述表 4 中特异性引物，以实验室提供所含目的基因（EGFP、NORO-VP1）的质粒为模板，扩增 EGFP 和 NORO-VP1 基因全长，同时在目的基因两端引入同源臂。PCR 反应体系见（表 5），PCR 具体反应条件见（表 6）。并扩增后产物片段分别命名为 EGFP1-PCR,EGFP2-PCR,NORO1-PCR,NORO2-PCR。

经过 PCR 扩增后，将得到的扩增产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳，我们可以观察到预期的条带，并将对应的基因片段使用胶回收技术进行处理，具体操作步骤如下：

[1] 在紫外下小心的把含有目的片段大小约 760bp/1670bp 的 DNA 片段切割下来，尽

- 量去掉多余的胶。
- [2] 把带有目标片段的凝胶放入 1.5ml 的离心管中，加入 300ul Buffer QG，并将其放置于水浴/金属浴中，维持 50°C 的温度 10min；中间轻轻颠倒混匀 2 次。
 - [3] 等胶块彻底溶化，待混合溶液变成黄色后，加入 100ul 异丙醇再充分混匀。
 - [4] 将试剂盒中离心柱装入干净的收集管中，将第三步中溶液吸入 QIAquick 柱中，13,000rpm 离心 1min。
 - [5] 弃液，将柱子重新套回收集管中，向离心柱中加入 500μl Buffer QG, 13,000rpm 离心 1min。
 - [6] 弃液，将柱子重新套回收集管中，向离心柱中加入 750μl Buffer PE, 静置 3min, 13,000rpm 离心 1min, 弃液再次离心 1min 以去除残留 Buffer。
 - [7] 丢弃液体，将柱子置于一个全新的 1.5ml 的离心管内，以进行后期收集，加入 30μl 洗脱液在柱子中心，室温放置 3-5min, 13,000rpm 离心 1min。
 - [8] 将管中回收的 DNA 测浓度后保存于-20°C 备用。

表 5 PCR 反应体系

	AMOUNT
Template DNA	1 μl
I-5TM 2X High-Fidelity Master Mix	25 μl
10 μM Primer F	2 μl
10 μM Primer R	2 μl
Nuclease-free water	20 μl
Total Reaction Volume	50 μl

表 6 PCR 反应条件

Step	Temperature	Time	
Initial Denaturation	98°C	2 mins	
Denaturation	98°C	10 s	35 cycles
Annealing	67°C	15 s	
Extension	72°C	50 s	
Final Extension	72°C	5 mins	
	4°C	Hold	

3.2.1.3 酶切、同源重组连接、转化、质粒提取与鉴定

将设计好合成的质粒 pcDNA-W1、pcDNA-W2 使用限制性核酸内切酶 Cla I 和 Pac

I 进行双酶切反应，具体酶切反应条件见表 7。通过 2%琼脂糖凝胶电泳，将获得的酶切产物在紫外线照射下分离出具有相应大小的条带的片段，按照上文中胶回收试剂盒操作对线性化质粒进行胶回收。将回收产物命名为 pcDNA-W1-cut、pcDNA-W2-cut。

表 7 ClaI 和 PacI 双酶切体系

REAGENT	AMOUNT	FINAL CONCENTRATION
ClaI	2 μ l	
PacI	2 μ l	
10x Buffer	2 μ l	
Template DNA	1 μ l	1 μ g
Nuclease-free water	13 μ l	
Total Reaction Volume	20 μ l	
Mix thoroughly and pulse-spin in a microfuge. Incubate at 37°C for 3 h.		

将制备好的 EGFP1-PCR, NORO1-PCR/ EGFP2-PCR,NORO2-PCR 分别与 pcDNA-W1-cut/pcDNA-W2-cut 通过一步法快速克隆试剂盒进行同源重组连接反应，在进行反应前需先计算最适 DNA 使用量，DNA 片段最适使用量 = $[0.02 \times \text{载体碱基对数}] \text{ng}$ (0.03 pmol)，线性化载体最适使用量： $0.02 \times \text{xx bp} = X \text{ ng}$ ，插入片段最适使用量应为： $0.02 \times \text{xx bp} = Y \text{ ng}$ 。插入片段 DNA 的使用量需要大于 10 ng，若公式计算的最佳使用 DNA 少于 10ng，则直接使用 10ng。线性化载体使用量尽量控制在 50-200 ng 之间。具体反应体系与操作见表 8。在反应结束后，将反应管放入冰上冷却 5 分钟，以确保其稳定性提高转化效率。

表 8 同源重组反应体系（冰上配制）

组分	重组反应
ddH ₂ O	Up to 20 μ L
2× Hieff Clone® MultiS Enzyme Premix	10 μ l
线性化载体	X /浓度 μ l
插入片段	Y/浓度 μ l
Total Reaction Volume	20 μ l
Mix thoroughly and pulse-spin in a microfuge. Incubate at 50°C for 50 min.	

将 DH5 α 感受态细胞从冰中解冻，然后将同源重组产物以 10 μ l 的浓度转移至 30-100 μ l 感受态细胞内，并使用枪头将其均匀，接着将其放置于 30 min 的冰中，再以 42°C 的温度热激 90 秒，最后进行 2-5 分钟的冰浴孵育。将 200 毫升的液态 LB 培养基添加到容器内，放置于恒温孵箱内，在 37°C 下孵化 10 min 复苏，然后将容器放置于摇床上，

以 200 rpm 的转速摇 45 min。取 80-150 μ l 菌液，用涂布棒在含有氨苄抗性的平板上涂匀（提前 10min 在板上涂好 x-gal、IPTG 蓝白斑筛选试剂）。扣盖正面放置，菌液吸收后，倒置平板，37 $^{\circ}$ C 过夜孵育 12-16 h。挑取皿中单克隆菌落加入少许氨苄抗性的液体 LB 进行摇菌，待菌液浑浊后对菌液进行 PCR 鉴定与测序。将菌液测序结果与所构建的质粒图谱使用 MEGA 软件进行详细比对，测序结果正确的菌液放大培养与保菌备用。

3.2.2 重组质粒大量制备

使用 EndoFree Plasmid Maxi Kit 试剂盒进行操作，具体步骤如下：

1. 在 300 mL 氨苄抗性 LB 液体培养基里，按照要求精准地接种经过鉴定的重组质粒的菌液，以获得最佳效果，34 $^{\circ}$ C 条件下 220 r/m 培养 15 h（适量调低温度可改善 polyA 结构中 A 的丢失情况）；
2. 菌液在提质粒前最好测 OD 值，参照为 amp+ LB；
3. 富集准备好的菌液，在 4 $^{\circ}$ C, 6000 x g 离心 15 min；
4. 去掉上清后用 10ml 的 Buffer P1（4 $^{\circ}$ C 保存）使其完全重悬；
5. 加入 10ml 的 Buffer P2，在室温(15-25 $^{\circ}$ C)下孵育 5 min，轻轻翻转 4-6 次使其充分混合；（溶液配置中若使用了 lyseBlue 试剂，管内溶液会变成蓝色）
6. 在孵育过程中，将 QIAfilter Cartridge 瓶盖轻轻的旋到 QIAfilter Cartridge 的出口喷嘴上，将其架好。
7. 向第五步中液体加入 10ml 提前冷却的 Buffer P3，轻轻翻转 4-6 次使其充分混合；（使用 LyseBlue 试剂，将溶液混合至完全无色）
8. 将第七步中所有裂解液倒入 QIAfilter Cartridge 筒内。在室温下培养 10 min。此时不要插入柱塞，从 QIAfilter Cartridge 出口喷嘴上拆下盖。将 QIAfilter Cartridge 的柱塞插入，然后将裂解液精确地过滤，将其装入一个容量为 50ml 的管子中；（此步轻轻操作，防止用力过猛将沉淀也冲入管中）
9. 将 2.5 ml Buffer ER 加入经过过滤的裂解液中，并将其倒置 10 次，然后放置在冰上孵育 30 min，以获得最佳实验结果；
10. 使用 10ml Buffer QBT 润湿平衡 QIAGEN-tip 500，让其通过重力流（使用前 8min 提前湿润）
11. 将步骤 9 中过滤的裂解液加入 QIAGEN-tip 中，让它进入 tip；

12. 用 2×30 毫升 Buffer QC 清洗 QIAGEN-tip;
13. 用 15 ml Buffer QN 将膜上 DNA 洗脱到 30 ml 无内毒素管中;
14. 在洗脱的 DNA 中加入 10.5 ml 室温放置的异丙醇沉淀 DNA 并混合均匀。 4°C , 15000 g 离心 30min 后, 小心的弃去上清液。
15. 再用 5ml 无内毒素处理的 70%乙醇在室温下洗涤 DNA 颗粒, 加完乙醇在 4°C 放 5min, 直至絮状沉淀溶解后以 15000 x g 的速度离心 10min, (离心时注意离心力方向, 注意离心后颗粒贴附面, 方便下一步冲洗) 离心完毕后小心地倒出上清液, 小心不要扰乱颗粒;
16. 更换手套后在超净台中进行以下操作: 轻轻倒置离心管, 让液体彻底流干, 风干颗粒 5-10 min, 使用无内毒素 Buffer TE 将 DNA 重新溶解, 用 Buffer TE 充分冲洗颗粒贴附的管壁。
17. 通过使用分光光度仪来精确检测样品的浓度和纯度, 然后将质粒精确地分装, 并在 -80°C 下储存以备后续使用。

3.2.3 质粒线性化与纯化 (体外转录模板的制备)

取出大量提取的重组质粒 pcDNA-W1-EGFP、pcDNA-W1-NORO、pcDNA-W2-EGFP 和 pcDNA-W2-NORO, 使用 EcoRI 限制性内切酶进行单酶切反应, 酶切体系见 (表 9)。

表 9 单酶切反应体系

REAGENT	AMOUNT	FINAL CONCENTRATION
EcoRI	5 μl	
10x Buffer	5 μl	
DNA	X μl	5 μg
Nuclease-free water	Up to 50 μl	
Total Reaction Volume	50 μl	
Mix thoroughly and pulse-spin in a microfuge. Incubate at 37°C for overnight digestion.		

酶切反应后吸取少量单酶切反应产物, 进行 2%的琼脂糖凝胶电泳, 观察电泳条带是否单一, 确定质粒被彻底切开后再进行回收。使用 QIAquick PCR Purification Kit 进行线性化重组质粒的纯化回收具体操作步骤如下:

- (1) 向 50 μl 体积的线性化反应物中加入 250 μl 的 Buffer PB 并混合均匀, 将试剂盒中 qiquick 柱子放置于提供的 2 毫升收集管中。
- (2) 为了结合 DNA, 将 300 μl 的样品加入到 qiquick 柱中, 然后 13,000 rpm 离心 60 s,

直到所有样品都通过柱子后弃液，将 qiquick 柱重新放回管中。

- (3) 将 750 μ l Buffer PE 加到柱子中，13,000 rpm 离心 60s 后弃液，将柱子再次放回管中。
- (4) 离心 QIAquick 柱 13,000 rpm 60s 以去除残留的洗涤缓冲液。
- (5) 弃液后将 qiquick 柱子放入在新的干净 1.5 毫升微量离心管中。
- (6) 将 30-50 μ l 的 Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) 或水 (pH 7.0-8.5) 加到 QIAquick 膜的中心位置，室温静置 3min 后 13,000 rpm 离心 60s。
- (7) 使用分光光度计测量线性化质粒浓度后，放入-20 $^{\circ}$ C保存。

使用苯酚:氯仿萃取纯化纯化质粒法进行线性化重组质粒的纯化回收具体操作步骤如下：

- (1) 加入无核酸酶水至转录产物中，调节反应体积至 500-600 μ l 以降低 DNA 损失；
- (2) 用等体积 1:1 的酚:氯仿混合 DNA 提取液提取 DNA，4 $^{\circ}$ C 14000 rpm 离心 15 min 后小心吸取上清；
- (3) 用等体积氯仿进行两次提取，4 $^{\circ}$ C 14000 rpm 离心 15 min，小心吸取上清，并将其转移到一个新的 ep 管中；
- (4) 加入 2 倍体积的乙醇沉淀 RNA。 -20 $^{\circ}$ C 孵育至少 30min；
- (5) 取出后 4 $^{\circ}$ C 14000 rpm 离心 20 min 收集 DNA 颗粒；
- (6) 小心将上清弃除后加入 70%的冰乙醇漂洗颗粒，4 $^{\circ}$ C 14000 rpm 离心 10 min；
- (7) 小心的弃除乙醇，轻轻旋转沥干管壁，用小枪头清除残留液体；
- (8) 空气干燥颗粒，将 DNA 重悬于无核酸酶水中。
- (9) 使用分光光度计测量回收后 DNA 浓度，将 DNA 模板分装放入-20 $^{\circ}$ C保存。

使用异丙醇醋酸钠法进行线性化重组质粒的纯化回收具体操作步骤如下：总体系 (600 μ l)，质粒线性化后产物 300 μ l，异丙醇 240 μ l，3M 乙酸钠 (PH4.8-5.2) 60 μ l。

- (1) 将以上反应体系放于-20 $^{\circ}$ C静置至少 30min
- (2) 取出样品后在 4 $^{\circ}$ C，12000rpm 离心 15min，将上清去除干净，过程中固定离心管离心时的放置方式，小心倒液，防止将沉淀倒出。
- (3) 加 1ml 75%的乙醇,在 4 $^{\circ}$ C，12000rpm，离心 15min，此处温度必须为 4 $^{\circ}$ C，否则 DNA 很难沉淀，小心去除上清，洗两遍；依旧需要注意离心管离心时的放置方式，小心倒出液体，防止将沉淀倒出。
- (4) 将收集样品的 EP 管开盖放入超净台中风干，使乙醇完全挥发。

(5) 取 25-50 μ l 的超纯水将沉淀溶解后, 使用分光光度计测取 DNA 浓度后, 分装放于-20 $^{\circ}$ C 备用。

3.2.4 体外转录与 mRNA 加帽反应

使用 HiScribe™ T7 ARCA mRNA Kit 进行 RNA 的体外转录和加帽反应。反应体系和反应条件见(表 10)。反应完成后留取少量反应物用于后续 RNA 鉴定, 同时向反应管中加入 2 μ l DNaseI 置于 37 $^{\circ}$ C 温箱作用 15min 以去除 DNA 模板, 继续留取少量去模板产物用于后续 RNA 鉴定。将完成反应的 mRNA 依次命名为 Cap-W1-EGFP、Cap-W1-NORO、Cap-W2-EGFP 和 Cap-W2-NORO。

表 10 体外转录反应体系及条件

REAGENT	AMOUNT	FINAL CONCENTRATION
Nuclease-free water	Up to 20 μ l	
2X ARCA/NTP Mix	10 μ l	1 mM GTP, 4 mM ARCA, 1.25 mM CTP, 1.25 mM UTP, >1.25 mM ATP final
Template DNA	x μ l	1 μ g
T7 RNA Polymerase Mix	2 μ l	
Total Reaction Volume	20 μ l	
Mix thoroughly and pulse-spin in a microfuge. Incubate at 37 $^{\circ}$ C for 3.5 h.		

3.2.5 Cap-mRNA 的纯化与保存

本研究选用 MEGAclean 转录纯化试剂盒法、苯酚:氯仿萃取纯化法和氯化锂沉淀法进行 RNA 的纯化处理。纯化 RNA 时需采取部分预防措施防止 RNA 降解, 在整个实验过程中需戴手套来防止手上的 RNase 污染, 配备专门用于 RNA 实验的移液器, 使用的枪头应不含 RNase, 使用不含 RNase 的化学试剂; 使用工作台等设备前需用温和的漂白剂擦拭设备表面, 再用无核酸酶的水轻轻冲洗, 最后使用 RNaseZap 喷于表面作用 10-20min 后拭去。

MEGAclean 转录纯化试剂盒法操作步骤如下:

- (1) 使用 100 μ L Elution Solution 溶解 RNA 产物, 用枪头混匀;
- (2) 将 350 μ L 的 Binding Solution Concentrate 浓缩液倒入样品中, 并使用枪头进行混合, 以达到均匀状态;
- (3) 加入 250 μ L 无水乙醇到样品中, 轻轻混匀;

- (4) 吸取混合后的样本到过滤柱中，12000 rpm 离心 1 min，弃液；
- (5) 再加 500 μ L Wash Buffer，12000 rpm 离心 1 min，弃液；
- (6) 重复步骤 5；
- (7) 进行空离，将 Wash Buffer 去除干净，12000 rpm 离心 1 min；
- (8) 将柱子换到一个新的 ep 管中，加 50 μ L Eluent Solution 后，65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min；
- (9) 将反应管在室温下 12000 rpm 离心 1 min；
- (10) 使用分光光度计测量纯化后 RNA 浓度，将 RNA 分装放入-80 $^{\circ}$ C 保存。

苯酚:氯仿萃取纯化法操作步骤如下：

- (1) 加入无核酸酶水至转录产物中，调节反应体积至 500 μ l 以降低 RNA 损失；
- (2) 用等体积 1:1 的酚:氯仿混合 RNA 提取液提取 RNA，4 $^{\circ}$ C 14000 rpm 离心 15 min 后小心吸取上清；
- (3) 用等体积氯仿进行两次提取，4 $^{\circ}$ C 14000 rpm 离心 15 min，小心吸取上清，并将其转移到一个新的 ep 管中；
- (4) 加入 2 倍体积的乙醇沉淀 RNA。 -80 $^{\circ}$ C 孵育至少 30min；
- (5) 取出后 4 $^{\circ}$ C 14000 rpm 离心 20 min 收集 RNA 颗粒；
- (6) 小心将上清弃除后加入 70%的冰乙醇漂洗颗粒，4 $^{\circ}$ C 14000 rpm 离心 10 min；
- (7) 小心的弃除乙醇，轻轻旋转沥干管壁，用小枪头清除残留液体；
- (8) 空气干燥颗粒，将 RNA 重悬于合适的 RNA 储存液中。
- (9) 使用分光光度计测量纯化后 RNA 浓度，将 RNA 分装放入-80 $^{\circ}$ C 保存。

氯化锂沉淀法具体操作步骤如下：（LiCl 沉淀法可以去除大部分未合并的 NTPs，但不能有效沉淀短于 300 个碱基或浓度低于 0.1 mg/ml 的 RNA）

- (1) 以 50 μ l 总反应体系为基准，加入 25 μ l LiCl 溶液，轻轻混匀。
- (2) 在-20 $^{\circ}$ C 以下孵育至少 30min。
- (3) 在 4 $^{\circ}$ C 14000 rpm 离心 15min，使 RNA 形成颗粒。
- (4) 小心的吸除上清。
- (5) 加入 500 μ l 70%冰乙醇漂洗颗粒，4 $^{\circ}$ C 14000 rpm 离心 10min。
- (6) 小心的吸除乙醇，快速旋转试管，使液体落在壁上。
- (7) 用小枪头小心地吸取清除壁上残留液体。
- (8) 使用空气干燥颗粒，将 mRNA 重新悬于合适的 RNA 存储溶液。
- (9) 将 RNA 在 65 $^{\circ}$ C 下加热 10 min，使 RNA 完全溶解。

(10) 使用分光光度计测量纯化后 RNA 的浓度, 将 RNA 分装放入-80°C保存。

3.2.6 体外转染 Cap-mRNA-EGFP

细胞转染试剂选用 jetPEI Polyplus Transfection 和 Lipofectamine™ 3000。

jetPEI 具体操作步骤如下:

- (1) 细胞在转染前一天铺板, 将细胞 (VERO -E6/293T) 以 2×10^5 个/孔的数量接种于 24 孔板中, 使用培养基 (DMEM+10%FBS+1%PS) 进行培养, 将 24 孔板放入含 CO₂ 含量为 5% 的 37°C 恒温培养箱中培养, 直至接种细胞长至 70-90% 汇合度时进行转染;
- (2) 第二天向细胞中加入转染复合物, 转染复合物配制参照说明书, 将 Cap-mRNA 1 μ g 加入到试剂盒里 50 μ l Buffer 后, 离心涡旋轻混后, 再加入 jetPEI 2 μ l, 使得最终 jetPEI 与 Cap-mRNA 体积与质量比例为 2 μ l/1 μ g; 室温静置 10 min 后, 将复合物按照一定的比例分别加入到培养孔中, 然后轻轻摇晃均匀, 最后将其放入细胞培养箱内;
- (3) 转染后 4-6 h 后, 为维持细胞状态, 将板内换上低血清培养基 (DMEM+3%FBS+1% PS), 每孔 500 μ l;
- (4) 在分析转染的细胞之前, 将细胞在 37 °C 孵育 2-4 天。

Lipofectamine™ 3000 具体操作步骤如下:

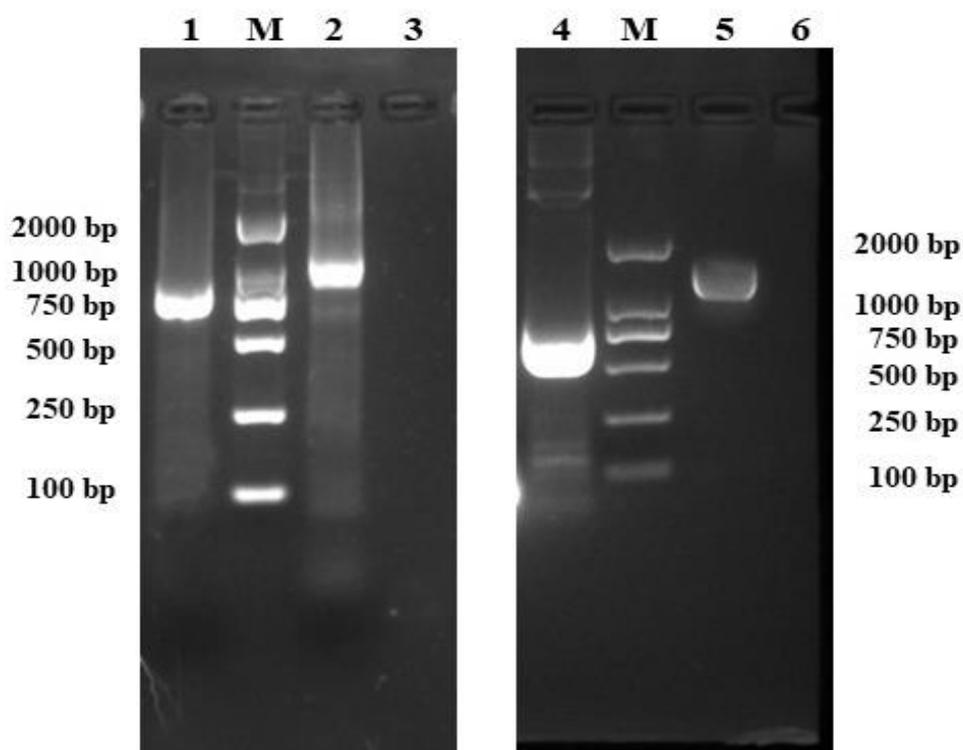
- (1) 第一天, 在 24 孔板上, 我们接种 1-2 $\times 10^5$ 个细胞数/孔的细胞, 并使用 DMEM+10%FBS+1%PS 的培养基; 在 37°C 恒温培养箱内, 让 CO₂ 浓度达到 5%, 以便让细胞得到最佳的生长环境; 直至接种细胞长至 70-90% 汇合度时进行转染;
- (2) 第二天配制转染复合物, 使用 Opti-MEM™ 培养基稀释 Lipofectamine™ 3000 试剂, 体积比为 (25 μ l: 1.5 μ l) 并充分混匀; 接下来我们将使用 Opti-MEM 培养基来稀释 RNA, 并制作出 RNA 预混液。在这里, 我们也可以选择不使用 P3000™ 试剂。
- (3) 在每管已稀释的 Lipofectamine™ 3000 试剂中加入稀释的 RNA (体积 1:1 比例), 室温孵育 15min, 最终 Lipofectamine™ 3000 与 RNA 体积质量比为 (1.5 μ l/1 μ g);

- (4) 将 RNA-脂质复合物加入到细胞后, 将板子放入细胞培养箱;
- (5) 转染后 4-6 h 后, 为维持细胞状态, 为细胞换上低血清培养基(DMEM+3%FBS+1% PS), 每孔 500 μ l;
- (6) 在分析转染的细胞之前, 将细胞根据实验要求在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2-4 天。

3.3 结果

3.3.1 报告基因 EGFP 和目的基因 NORO-VP1 的扩增

使用上述方法中设计的 EGFP 特异性引物, 以携带 EGFP 基因的质粒为模板, 扩增 EGFP, 并在两端引入 pcDNA-W1/W2-cut 同源序列; 使用 NORO-VP1 特异性引物, 以携带 NORO-VP1 基因的质粒为模板, 扩增 NORO-VP1 基因全长, 并在两端引入 pcDNA-W1/W2-cut 同源序列。取 PCR 产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果与预期目的基因 (EGFP 基因约为 760bp, NORO-VP1 基因约为 1670bp) 条带大小一致, 结果见 (图 3)。PCR 产物经北京天一辉远生物科技有限公司测序, 结果无误。

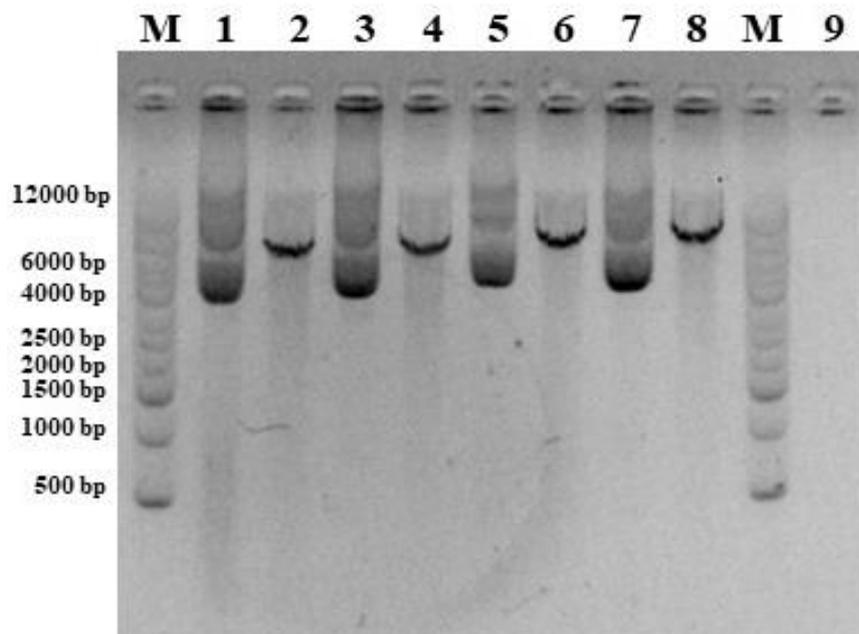


M: DNA 2000 Marker; 1: EGFP1-PCR; 2: NORO1-PCR; 3: 阴性对照; 4: EGFP2-PCR; 5: NORO2-PCR; 6: 阴性对照

图 3 目的基因 PCR 扩增电泳结果

3.3.2 重组质粒 pcDNA-W1-EGFP、pcDNA-W2-EGFP、pcDNA-W1-NORO 和 pcDNA-W2-NORO 的线性化与纯化

制备 RNA 进行体外转录需要提前制作 DNA 线性化模板。使用设计好的限制性内切酶 EcoRI 单酶切已经制备好的重组质粒 pcDNA-W1-EGFP、pcDNA-W2-EGFP、pcDNA-W1-NORO、和 pcDNA-W2-NORO，反应后吸取少量单酶切反应产物，进行 2% 的琼脂糖凝胶电泳，观察电泳条带是否单一，确定质粒彻底线性化(长度分别为 6400bp, 6590bp, 7280bp, 7490bp) 电泳结果见(图 4)。对线性化质粒进行纯化回收后，使用分光光度计测量线性化 DNA 模板浓度和纯度，结果见(图 5)。



M: DNA 1kb Marker; 1: pcDNA-W1-EGFP; 2: pcDNA-W1-EGFP-EcoRI; 3: pcDNA-W2-EGFP; 4: pcDNA-W2-EGFP-EcoRI; 5: pcDNA-W1-NORO; 6: pcDNA-W1-NORO-EcoRI; 7: pcDNA-W2-NORO; 8: pcDNA-W2-NORO-EcoRI; 9: 阴性对照

图 4 重组质粒 pcDNA-W1/W2-EGFP 和 pcDNA-W1/W2-NORO 线性化电泳图

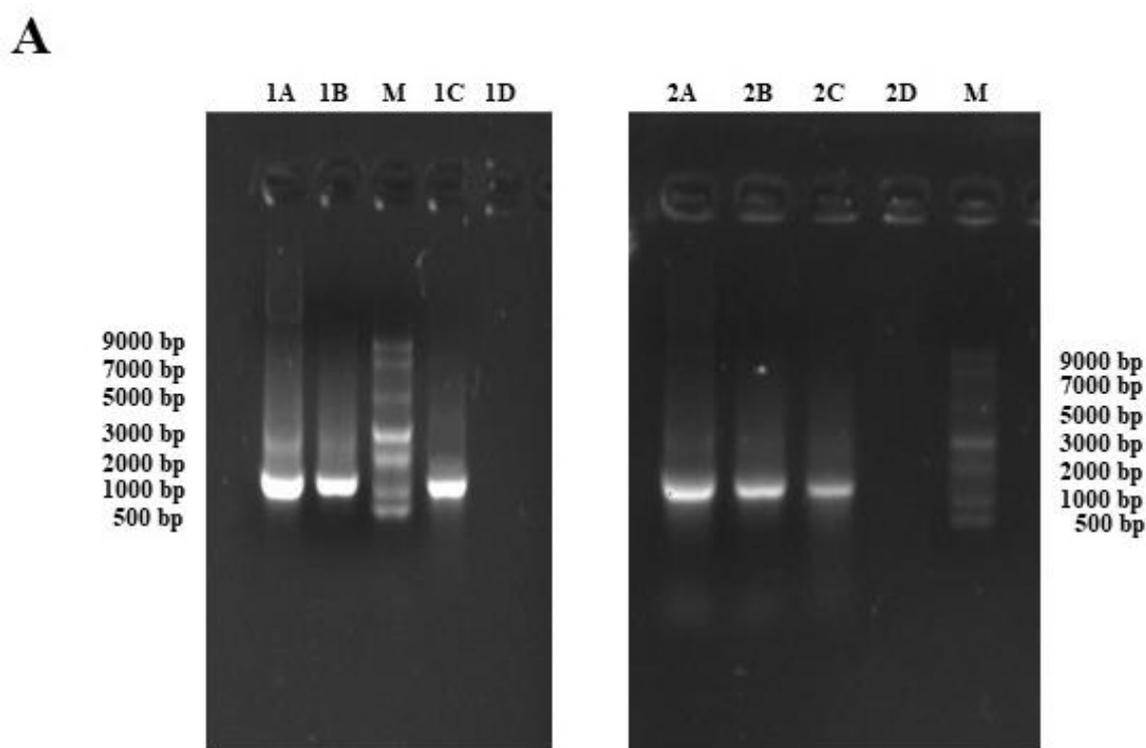


图 5 线性化 DNA 模板浓度测量图

3.3.3 Cap-mRNA: Cap-W1-EGFP、Cap-W2-EGFP、Cap-W1-NORO 和 Cap-W2-NORO 的鉴定

为了观察 mRNA 转录及后续纯化过程效果,将纯化前后的 mRNA 均稀释至 50ng/ μ l,各取 2 μ l,以 ssRNA Ladder 为标准进行 RNA 2%琼脂糖电泳条带鉴定,结果表明,未纯化过的 mRNA 含有多余杂带,纯化后得到的 mRNA 条带单一且大小与预期相符, Cap-W1-EGFP、Cap-W2-EGFP、Cap-W1-NORO 和 Cap-W2-NORO 分别为 1019bp, 1230bp, 1922bp, 2130bp 的 RNA 条带,具体条带结果见(图 6)。

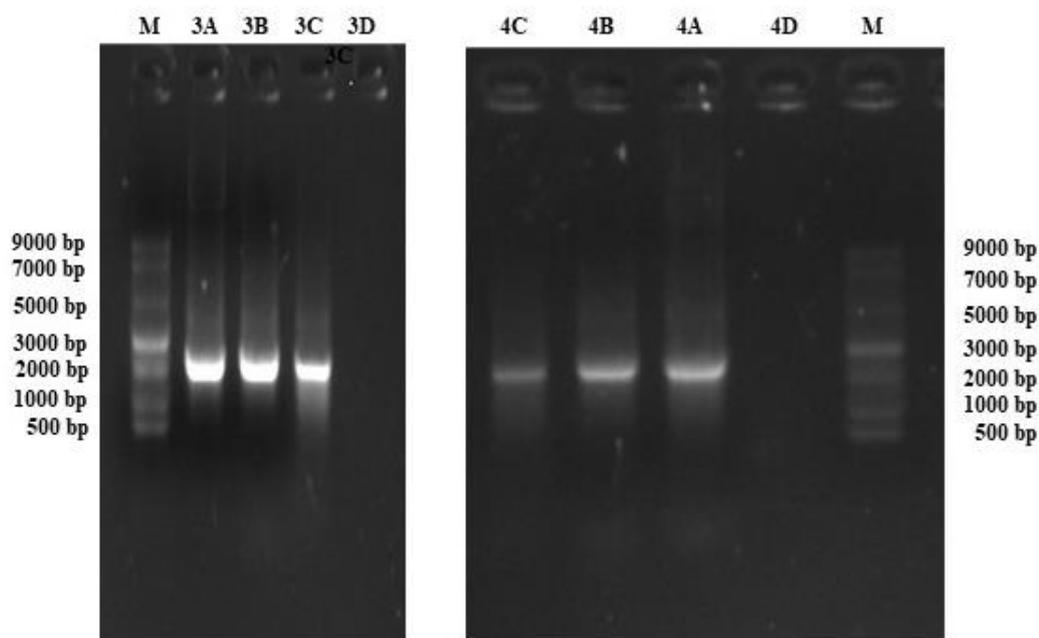
将纯化好的 mRNA: Cap-W1-EGFP、Cap-W2-EGFP、Cap-W1-NORO、和 Cap-W2-NORO 逆转录为 cDNA 后,使用特异性引物进行 PCR 扩增后送北京天一辉远生物科技有限公司测序,使用软件 MEGA 将测序结果与重组质粒 pcDNA-W1-EGFP、pcDNA-W2-EGFP、pcDNA-W1-NORO、和 pcDNA-W2-NORO 图谱进行比对,比对结果无误。结合电泳图,说明 RNA 体外转录加帽与纯化结果与预期相符。



M: ssRNA Ladder; A: 转录加帽后产物; B: 转录加帽产物去 DNA 模板; C: 纯化后产物; D: 阴性对照;

1: Cap-W1-EGFP; 2: Cap-W2-EGFP

图 6-A RNA 纯化前后电泳条带鉴定图

B

M: ssRNA Ladder; A: 转录加帽后产物; B: 转录加帽产物去 DNA 模板; C: 纯化后产物; D: 阴性对照;

3: Cap-W1-NORO; 4: Cap-W2-NORO

图 6-B RNA 纯化前后电泳条带鉴定图

3.3.4 体外转录系统表达功能的鉴定

将制备好的 mRNA Cap-W1-EGFP、Cap-W2-EGFP 转染细胞(24 孔板, $1\mu\text{g}$ mRNA/孔), 分别在转染后多个时间段取出细胞培养板在荧光显微镜下观察 mRNA 荧光表达情况。VERO-E6、293T 等细胞中 mRNA Cap-W1-EGFP、Cap-W2-EGFP 实验组均可观察到绿色荧光。证明所设计编码 EGFP 基因的两种 RNA 体外表达系统能成功表达绿色荧光蛋白, 两种 RNA 候选疫苗体外转录系统均具有可行性。

转染后 3 h, 镜下就开始观察到 mRNA 在细胞中有绿色荧光蛋白的表达。荧光镜下显示, 转染 mRNA 后 36h-72h 时(不同细胞株范围有细微变动), 荧光蛋白表达效果达到高峰, 直至转染后 200 h, 荧光强度随着细胞状态变差而逐渐减弱。同等实验条件下, 镜下 Cap-W1-EGFP 荧光强度大于 Cap-W2-EGFP, 荧光维持时间长于 Cap-W2-EGFP。激发光下荧光结果见(图 7-8)。

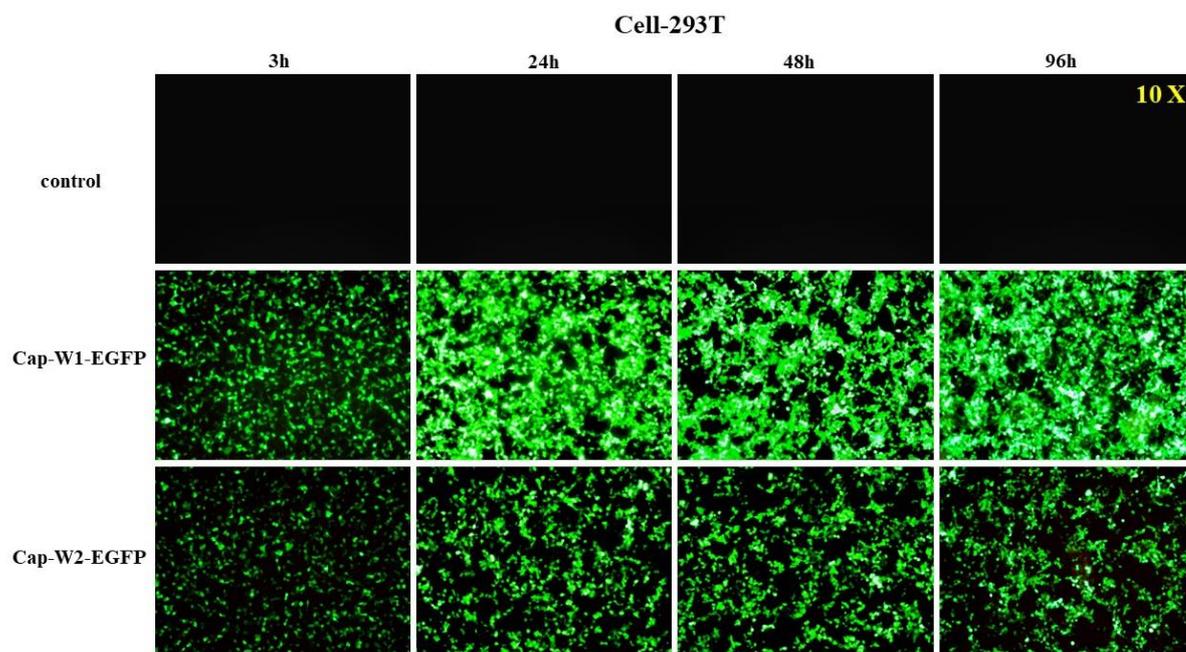


图 7 两种表达系统转染 293T 细胞荧光结果图

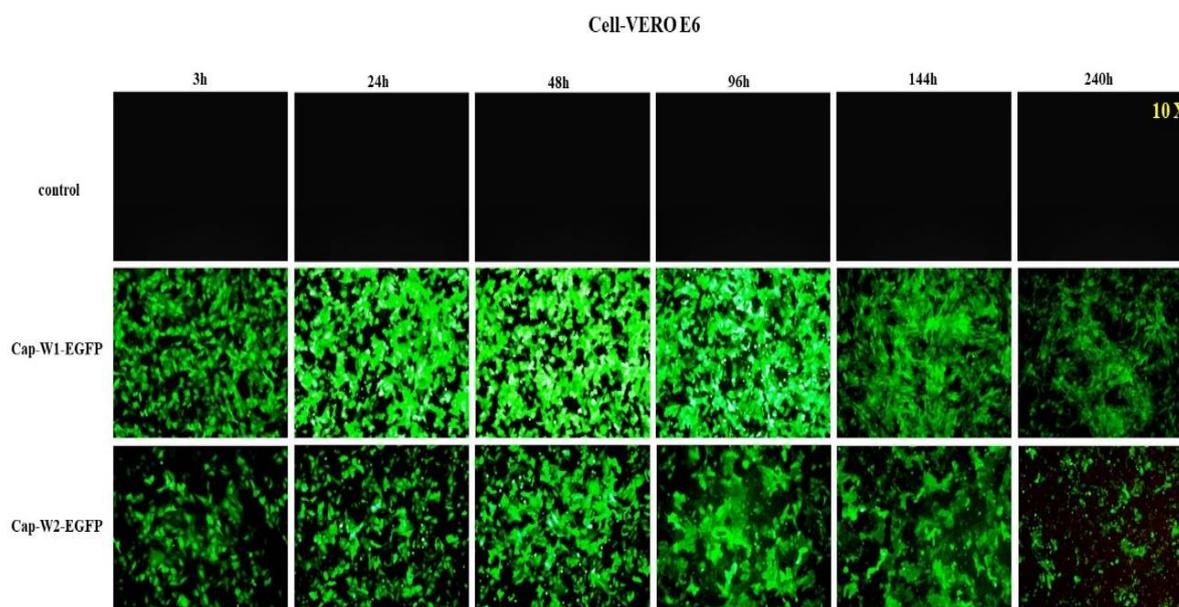


图 8 两种表达系统转染 VERO E6 细胞荧光结果图

4.讨论

NoV 的流行除了对人群健康造成严重威胁，也带来巨大的社会经济损失，疫苗是针对 NoV 最有效的预防手段。因 NoV 基础研究相对薄弱，疫苗研发仍有诸多挑战。目前在研的 NoV 疫苗（VLP 疫苗、P 颗粒疫苗、腺病毒载体疫苗）开发所需时间较长，大

多数仍处在临床前期研究阶段。mRNA 疫苗具有高效、精简、可快速开发等特点；有潜力替代常规疫苗，解决 NoV 疫苗开发难题，发展成为 NoV 疫苗的领跑者。

抗原的确定是 mRNA 疫苗前期研究的重要基础。VP1 蛋白作为暴露在 NoV 表面的主要衣壳蛋白，具有高度变异性，VP1 抗原来源毒株的选择是 mRNA 疫苗研发的重要部分。根据 2018 年 9 月~2021 年 8 月中国 NoV 暴发实验室监测网络平台(CaliciNet China)的 NoV AGE 暴发疫情分子流行病学调查报告可知，GII.4 Sydney 株自 2012 年出现以来一直是全球流行优势株，也是引起我国 NoV 暴发与散发的优势流行株；所以本研究认为我国 GII.4 Sydney 流行株的 VP1 是 NoV mRNA 疫苗研究的较佳目的抗原，选择该毒株进行后期实验。

要获得可高效表达外源目的基因的 mRNA 疫苗需要多方面考虑并进行不断的筛选和优化。体外转录表达系统的优化与设计和 mRNA 的制备都是 mRNA 疫苗研究的重点。mRNA 的 5'和 3'非翻译区(UTRs)可以显著影响转录翻译效率^[25-27]。帽子结构和 poly(A)尾结构对翻译效率影响有协同作用^[28-31]。对 mRNA 的几个基本组成元件进行精确设计是优化 RNA 体外转录表达系统的关键。5'UTR 在维持 RNA 的稳定性和翻译启动效率方面发挥重要作用^[32]。3'UTR 是 mRNA 衰变和通过细胞 RNA 结合蛋白翻译效率的重要调节因子，可以调节 mRNA 的半衰期^[33, 34]。本研究表达系统设计均采用短而松散的 5'UTR 区域，以利于形成稳定的二级结构，避免小核糖体去结合起始编码元件。同时通过引入稳定元件，使 mRNA 具有更高的稳定性，以有效地抑制 AU、AUUUA 和 GU 富集序列对 mRNA 稳定性的影响。

mRNA 的表达水平通常还与 poly(A)的尾部长度成正相关^[29, 35-37]。通过在 3'UTR 上进行特殊的优化，可以有效地延缓 poly(a)尾的降解^[38]。哺乳动物细胞中所有主动翻译的 mRNA 都含有 100 至 250 个 A^[39]。长聚 a 尾(即>120 单位)可以增加蛋白质表达的效率^[40]。本研究表达系统中 poly(A)尾部分的结构明确且均匀，均通过在模板载体中编码聚(A)束来实现，避免了通过酶聚腺苷酸化来将 A 附着的方式。研究中所设计的表达系统 mRNA-W1 中 poly(a)具体结构为：A(30)+GCATATGACT+A(70)，mRNA-W2 中使用了数量为 120 个 a 的 poly(a)结构。所构建的两种不同体外转录系统(mRNA-W1 和 mRNA-W2)，UTRs 序列和 polyA 结构均不相同，选 EGFP 和 NORO-VP1 基因插入，筛选出表达效果较佳的表达系统进行后期诺如病毒 mRNA 疫苗的研究，为诺如病毒 mRNA 疫苗的后续研究打下基础。

体外转录过程(IVT)也是疫苗研发中需要重视的过程^[41, 42]。多数 mRNA 生产制备中

都需要分别进行 DNA 模板制备、体外转录 (IVT) 和 5'端加帽的酶促反应, 每一步完成后都要进行核酸的沉淀, 同时去除其他反应成分。这种迭代过程涉及到每一步的样品损失, 也增加了生产制备 mRNA 的时间和成本^[43]。本研究构建重组质粒时主要采用两种方法, 其中通过设计引物引入同源臂进行同源重组的连接效率要远高于 T4 连接酶的连接效率, T4 连接酶连接效率低可能与插入片段的结构与长度有关。使用高质量的质粒 (去除内毒素, 超螺旋质粒含量 >90%, 需尽可能的去掉宿主蛋白与宿主基因组) 更有利于下一步的 mRNA 制备, 能转录出的质量更好的 mRNA。DNA 模板纯化使用胶回收试剂盒回收线性化质粒片段的损失较高, 易引入其他杂质污染 DNA 模板对 mRNA 的制备造成不利影响, 使用 PCR 产物纯化试剂盒的回收效果较好。帽结构已被证明是正常 mRNA 功能所必需的^[28]。在体外转录后加帽时, 抗反向帽类似物(anti-reverse cap, ARCA) 产生较完美的 mRNA, 能更紧密地附着在核糖体上^[44]。ARCA 在 C2/C3 位置被修饰, 保证在转录时甲基只取代正确位点的 OH, 且 Cap 可通过与真核翻译起始复合物 eIF4F 的结合提高 mRNA 翻译效率^[45, 46]。因此本研究在加帽时选择使用 ARCA 试剂盒进行加帽, 可以保证 5'端帽子结构的精确调整。

转录加帽后 mRNA 需进行纯化回收与保存, 本研究尝试了多种纯化方式, 发现具体纯化方法需要根据序列结构设计情况来进行选择与调整。Oligo(dT) capture 适用于大部分 poly (a) 尾结构的 mRNA, 回收率较高, 也是本研究使用较多的方法。氯化锂沉淀法可以有效地去除大部分未合并的 NTPs 和酶, 缺点在于不能回收长度较短和浓度较低的 mRNA, 不适用于总体产量较小的转录产物。酚氯仿萃取和乙醇沉淀法可以去除蛋白质和游离核苷酸, 这种纯化方法成本低, 对操作人员手法要求较高, 重复性相对较差, RNA 回收率较低。

为验证所构建体外转录系统的可行性, 使用 EGFP 报告基因插入所构建的体外转录系统 mRNA-W1 和 mRNA-W2 中。制备 mRNA 后进行细胞转染实验, 观察 mRNA 转染后 EGFP 的荧光强度。验证结果显示, 两种系统均可在不同细胞中表达 EGFP。将制备好的 Cap-W1-EGFP 和 Cap-W2-EGFP 分别转染到细胞仅 3h 后, 就可在荧光显微镜下观察到明显的绿色荧光, 在相同数量的 VERO E6/293T/MA104 细胞中, 多个时间段对比, 转染同质量 EGFP 质粒对照的目的蛋白表达效果和蛋白表达持续时间都不及 mRNA 组。mRNA 疫苗相比传统疫苗, 不需要进入细胞核就可以激活蛋白质生产, 细胞都是直接根据 mRNA 携带的编码信息合成抗原蛋白。以插入 EGFP 报告基因的验证结果来看, Cap-W1-EGFP 组镜下荧光强度远大于 Cap-W2-EGFP 组, 哪种表达系统更适用于诺如病毒

RNA 疫苗，还需进一步验证。

5.小结

- 1) 以插入 EGFP 报告基因的鉴定结果来看，两种 RNA 体外表达系统具有可行性，都能成功表达绿色荧光蛋白。
- 2) 具体哪种体外表达系统更适用于后续诺如病毒的 mRNA 疫苗开发，还需进一步的验证。

第二章 诺如病毒 RNA 疫苗体外表达系统的功能验证与筛选

1. 实验材料

1.1 实验材料与仪器

本此研究所使用细胞株（VERO-E6、MA104、293T、A549 等）来自中国疾病预防控制中心病毒病所腹泻室保存，中国疾病预防控制中心侯院士实验室惠赠。

表 11 仪器厂家及型号

仪器名称	厂家	货号
Mini-PROTEAN® Tetra	美国 BIO-RAD 公司	165-8004
PowerPac™电泳仪	美国 BIO-RAD 公司	1645070
自动细胞计数仪	北京新科融创科技发展有限公司	Cellometer Mini
细胞培养板	Corning/康宁	6 孔/12 孔/24 孔/96 孔
细胞透气培养瓶	Corning/康宁	25cm ² /75cm ²
5ml 灭菌移液管	Corning/康宁	4487
酶标仪	美国 Thermo 公司	1410101
蛋白转膜仪	南京金斯瑞生物科技有限公司	L00686C
倒置显微镜	OLYMPUS	CKX53

其余实验仪器同第一章表 1

1.2 实验试剂及溶液配制

表 12 试剂厂家及货号

试剂名称	厂家	货号
DMEM 高糖培养基	GIBCO	C11995500BT
PBS	中科迈晨（北京）科技有限公司	CC008
胎牛血清（FBS）	Thermo Fisher/赛默飞世尔	TA100099044
胰酶（含 EDTA）	Hyclone/海克隆	SH30042.01
Lipofectamine™ 3000	Thermo Fisher/赛默飞世尔	L3000015
jetPEI	Polyplus Transfection	PT-101-10N
OPTI MEM	Thermo Fisher/赛默飞世尔	31985062
Norovirus 3rd Generation kit	RIDASCREEN	C1401
细胞裂解液	Solarbio	R0030
蛋白分子量标准（15-12kD）	Beyotime/碧云天	P0078
吐温（Tween 20）	美国 Sigma 公司	P1379
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司	P0012A
HRP-山羊抗兔 IgG(H+L)	Biodragon/博奥龙	BF03008
FITC-山羊抗兔 IgG(H+L)	Biodragon/博奥龙	BF05002

溶液配制:

(1) PBS 缓冲液: 用蒸馏水将磷酸盐缓冲液 (PBS) 干粉说明定容至固定体积, 121°C 高压灭菌 20min, 待冷却至室温后储存备用。

(2) PBST: 1L PBS 缓冲液 + 500ul Tween-20, 混匀后室温保存。

表 13 SDS-PAGE 凝胶配制表

12%分离胶 (10mL)	5%浓缩胶 (2mL)
2 ml 去离子水	1.4 ml 去离子水
4mL 30%Acr-Bis	0.33mL 30%Acr-Bis
3.8mL 1M Tris (pH8.8)	0.25mL 1M Tris(pH6.8)
0.1mL 10%SDS	0.02mL 10%SDS
0.1mL 10%过硫酸铵	0.02mL 10%过硫酸铵
0.004mL TEMED	0.002mL TEMED
混匀后注入制胶板体积的 4/5, 注入少量乙醇 驱赶气泡。	吸干胶板中乙醇, 将配制好的浓缩胶注入凝 固的分离胶上层, 插上梳子待凝。

2. 实验方法

2.1 体外转染 Cap-mRNA-NORO

体外转染方法同第一章。

2.2 酶联免疫吸附实验 (ELASA)

选用细胞裂解液和 Norovirus 3rd Generation kit 试剂盒进行 NORO-VP1 的酶联免疫吸附试验验证。具体操作步骤如下:

- (1) Cap-NORO-W1/W2 转染细胞 48 h 后, 弃去孔中原有培养基, 将 PBS 溶液进行两次清洗, 以消除残留的培养基; 在 24 孔板上, 每孔添加 65 μ L 的细胞裂解溶液 (含 PMSF), 然后用枪头进行 5 次吹打, 以确保裂解液试剂与细胞之间的完全接触, 在冰上放置裂解 5-10min;
- (2) 在细胞完全裂解之后, 将样品经过 3-5min 分钟的 14000 g 离心处理, 然后从中提取出上清液, 以便进行接下来的实验;
- (3) 将试剂和微孔板提前置于室温(20-25°C)平衡, 将 1 份浓缩洗涤缓冲液与 9 份蒸馏水混合, 浓缩液中若存在任何晶体可以预先在 37°C 的水浴中加热溶解再使用。
- (4) 进行首次孵育: 在试纸条支架中插入计划数量的孔后, 向孔中添加 100 ul 阳性 Control+、阴性 Control- 和待检测样本。随后再加入 100 μ l Conjugate1 (生物素偶联抗体) 并通过轻轻敲击板侧面的方式混匀; 在室温(20-25°C)下孵育 60min。
- (5) 清洗: 将孔中孵化的液体倒入废液收集容器中, 将印版敲在铺好的吸水纸上, 去

除干净残留的水分，每次将 300ul 的缓冲液用于清洁平板，以确保其完全干净，需进行五次彻底的清洁。每次清洗后，再用干燥未使用吸水纸将孔内液体敲掉，确保孔内完全排空。

- (6) 第二次孵育：用移液管将 100ul Conjugate2 注入孔中，然后在室温(20–25℃)下孵育 30min。
- (7) 清洗：同第五步
- (8) 第三次孵化：用 100ul 底物填充所有孔，然后在室温(20–25℃)下黑暗中孵育平板 15min，随后用 50 ul 终止液填充所有孔终止反应，通过轻轻敲击板的侧面小心混合，在 450nm 处测量消光值（高阳性样本可能会导致底物出现黑色沉淀）；
- (9) 质量控制：每次进行测试时必须使用阳性和阴性质控品，确保试剂稳定且测试正确进行。如果阴性对照的消光率(O.D)在 450nm 时 <0.2 ，而阳性对照的测量值在 450nm 时 >0.8 ，表面测试已正确进行且结果可信，阴性对照大于 0.2 时可能说明洗涤过程不充分；
- (10) 评估和解释：计算截止值:为了确定临界值，将 0.15 个消光单位加到阴性对照的测量消光值上，截止值=阴性对照的消光+ 0.15；
- (11) 实验结果：如果消光率比计算的临界值高 10 %以上，则样本的评估为阳性。如果消光率在（小于临界值的 10 %到大于临界值的 10 %）范围内,则评估样本为边缘性的，重复进行实验，若再次落入这个范围内，则判定该样本为阴性；低于计算临界值 10 %以上的样本必须被判定为阴性。

2.3 间接免疫荧光实验 (IFA)

将 Cap-NORO-W1/W2 转染细胞 48 h 后，进行间接免疫荧光试验验证，具体操作步骤如下：

- (1) 将孔中原有的培养基弃去，用 PBS 溶液进行 2-3 次清洗，以消除残留物；然后将 4%的多聚甲醛溶液添加到孔中，并在 4℃下保持 30min；
- (2) PBS 浸洗 3 遍，加 5%BSA（PBS 配制，10ml+0.5g BSA）37℃封闭 1h；PBS 浸洗 2 遍，加入 1% BSA 稀释的一抗（1：1000），4℃孵育过夜；
- (3) PBS 浸洗 3 遍，加入用 1%BSA 稀释的二抗，FITC 标记（1:1000）；37℃孵育 2h；
- (4) PBS 浸洗 3 遍，使用共聚焦荧光显微镜观察荧光。

2.4 蛋白免疫印迹实验 (Western blot)

将 Cap-NORO-W1/W2 转染至细胞 12 h 后，弃去孔中原有培养基，用 PBS 浸洗两次去除残留培养基；24 孔板每孔加入 65 μ L 细胞裂解液（含 PMSF），用枪头吹打 5 次，使裂解液和细胞能够充分接触，在冰上放置裂解 5-10min，待细胞充分裂解后，将裂解后的样品 14000 g 离心 3-5min，吸取上清保存为样品，取上样缓冲液+样品煮沸 10min，10000 rpm 离心 10 min，冻存与 -80 $^{\circ}$ C 冰箱和用于下一步的跑蛋白胶。

- (1) 将制备好的蛋白样品 20 μ l 加入配制好的 SDS-PAGE 凝胶孔中，加入预染蛋白 Maker，接通电源，调节电压至 80V，开始电泳 30 min 后，再次调整电泳电压为 120 V，直到溴酚蓝条带移至分离胶最低端时（约 1 h），停止电泳。
- (2) 转膜前准备工作：将 10 \times 转膜液配置为 1 \times 的转膜液并倒入大小适中的收纳盒中，将转膜操作过程中需要的转膜夹、海绵垫、滤纸浸于上述转膜液约 5 min（海绵垫及滤纸均需裁剪至 SDS-PAGE 蛋白胶大小）；转膜（蛋白从胶 \rightarrow 硝酸纤维素膜）（负极 \rightarrow 正极），根据胶的大小剪滤纸，NC 膜，按顺序铺膜见（图 9），逐出气泡；

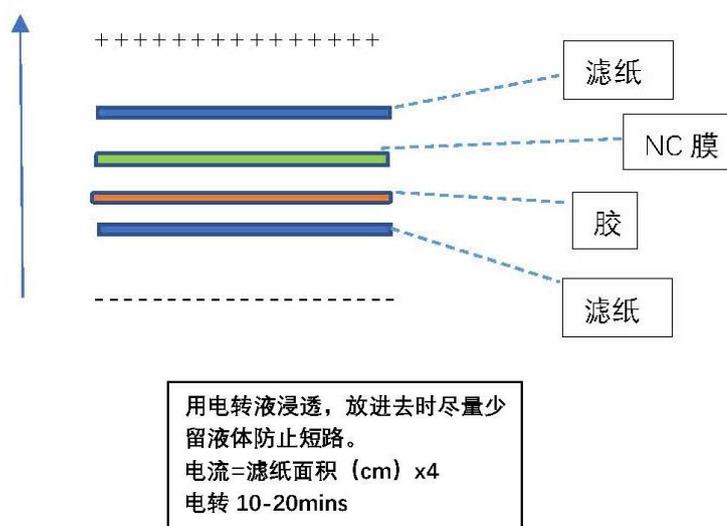


图 9 WB 电转铺膜示意

- (3) 时间到后将 NC 膜取出，用 PBST 放在摇床上漂洗 5min \times 2 次；
- (4) 封闭：使用适量脱脂奶粉 5%（2.5g+50mlPBS/PBST）封膜，37 $^{\circ}$ C 2h；
- (5) 倒掉奶粉，用 PBST 放在摇床上漂洗 5min \times 5 次；
- (6) 使用一抗（5%脱脂奶粉 1: 1000 稀释），4 $^{\circ}$ C 孵膜浸泡过夜。
- (7) 倒掉液体，用 PBST 放在摇床上漂洗 5min \times 5 次；
- (8) 使用二抗（5%脱脂奶粉 1: 1000 稀释）（HRP 标记），37 $^{\circ}$ C 封膜浸泡 2h，倒掉液体，用 PBST 放在摇床上漂洗 5min \times 5 次；

(9) 显色：在膜上滴上显色液，放入成像仪拍照。

3. 结果

3.1 体外转染 Cap-W1-NORO、Cap-W2-NORO 酶联免疫吸附试验验证

将制备好的 mRNA Cap-W1-NORO、Cap-W2-NORO 以完全相同实验条件转染至细胞 48h 后（24 孔板，250ng/孔，500ng/孔，1 μ g/孔），按方法制备样品，各取 100 μ l 进行 ELISA 实验，其中 control-和 control+样本为试剂盒内质控品，sample control+为 NoV 阳性样本对照。结果中 control-的消光率(O.D)在 450nm 处均<0.2，control+和 sample control+在 450nm 处测量值均>0.8，表明该测试结果可信。根据所计算阳性截止值，所有 mRNA 实验组结果均为阳性，见（图 10-11）。证明所设计编码 NORO-VP1 基因的两种 RNA 体外表达系统都可以成功表达 VP1 蛋白。

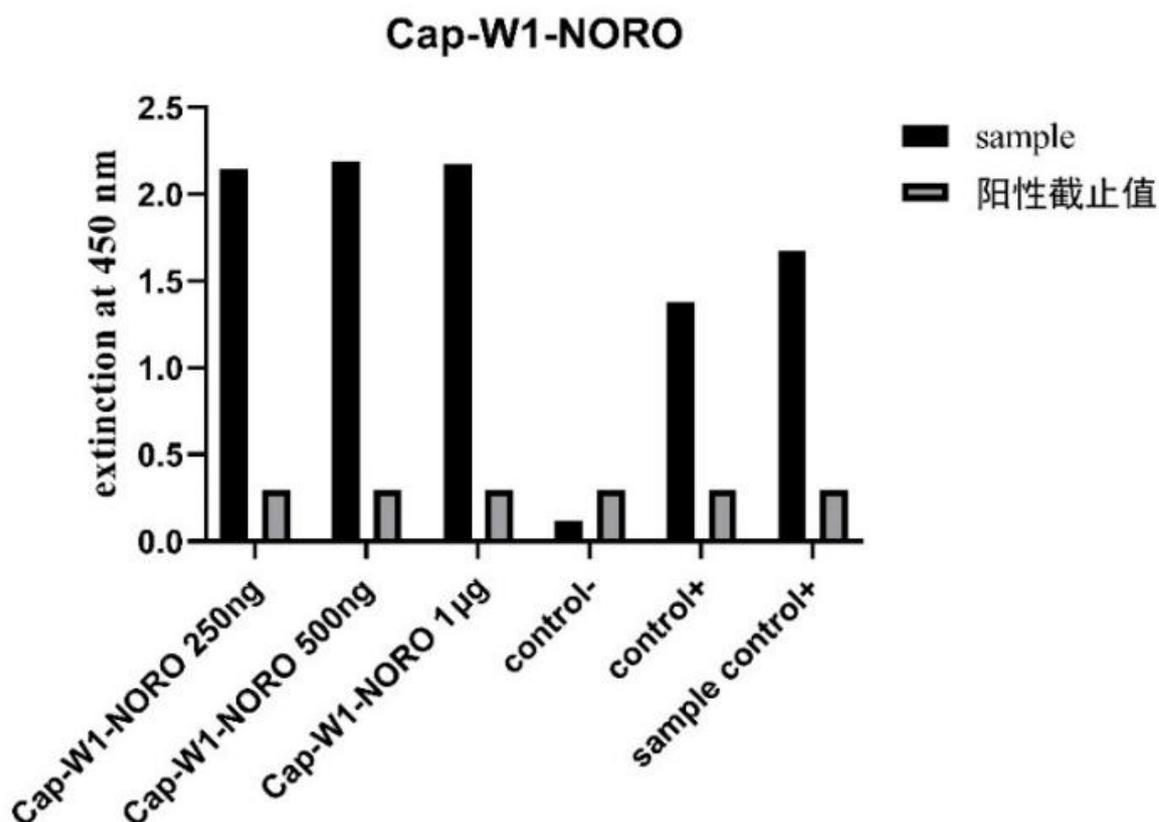


图 10 不同质量 Cap-W1-NORO 转染后 ELISA 结果图

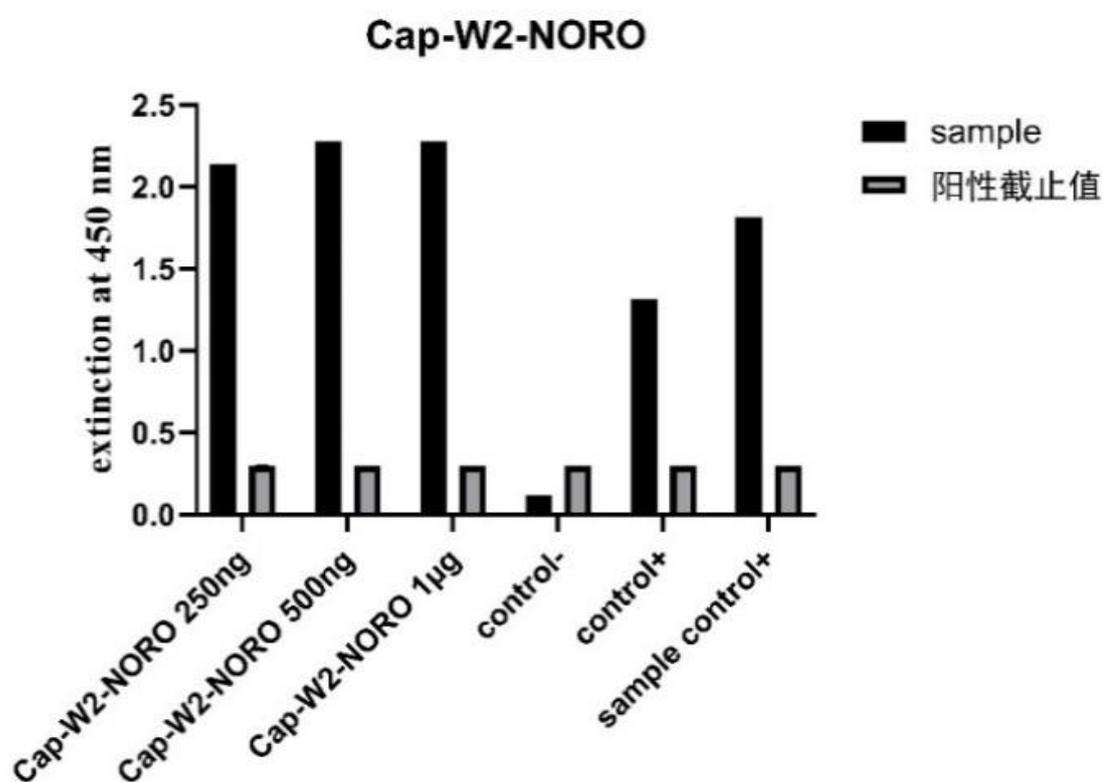


图 11 不同质量 Cap-W2-NORO 转染后 ELISA 结果图

3.2 体外转染 Cap-W1-NORO、Cap-W2-NORO 间接免疫荧光试验验证

将制备好的 mRNA Cap-W1-NORO、Cap-W2-NORO 以完全相同实验条件转染至细胞 48h 后 (24 孔板, 1µg/孔), 进行间接免疫荧光试验, (一抗: NoV GII.4-VP1 VLP 兔多抗; 二抗: FITC 标记羊抗兔抗体)。将细胞培养板放置于荧光显微镜下观察荧光情况。Cap-W1-NORO 与 Cap-W2-NORO 组在显微镜激发光下均有绿色荧光, 且 Cap-W1-NORO 组荧光强度略强于 Cap-W2-NORO 组, 结果见 (图 12)。结果证明所设计编码 NORO-VP1 基因的两种 RNA 体外表达系统可以成功表达 VP1 蛋白。

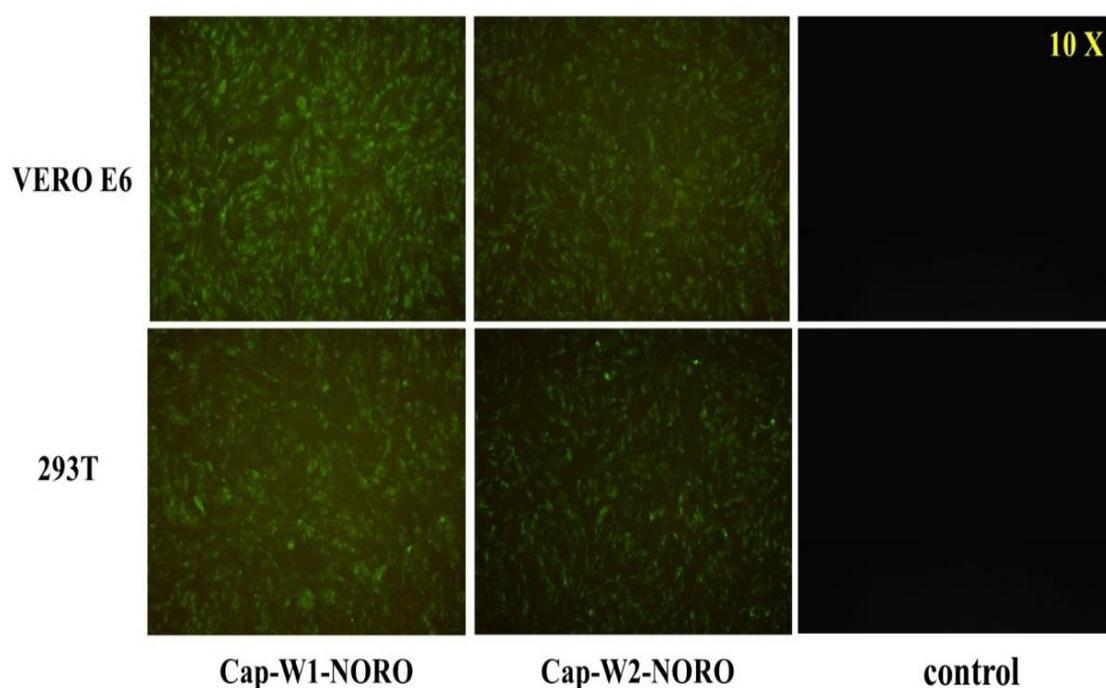


图 12 两种表达系统转染细胞 IFA 结果图

3.3 体外转染 Cap-W1-NORO、Cap-W2-NORO 蛋白免疫印迹试验验证

为了进一步验证 W1、W2 两种表达系统在蛋白表达上的差异，将 Cap-W1-NORO 和 Cap-W2-NORO 同实验条件转染细胞 48h 后，按说明书制备蛋白样品进行蛋白免疫印迹试验（一抗：NoV GII.4-VP1 VLP 兔多抗；二抗：HRP 标记羊抗兔抗体）。

转染 VERO E6 细胞 Western Blot 实验结果见（图 13），为更好的在同张膜上对比两种表达系统的印迹条带，结合预实验结果，对两种样品上样量进行调整（Cap-W1-NORO 蛋白样品使用 PBS 稀释 5 倍；Cap-W2-NORO 蛋白样品不进行稀释）。（图 A）显示两种表达系统都可以成功表达 VP1 蛋白，Cap-W1-NORO 组 VP1 表达量高于 Cap-W2-NORO 组。进一步观察 Western Blot 结果中目的蛋白电泳条带，使用 ImageJ 软件，通过将目标蛋白的灰度值与内部参考蛋白的灰度值相除，我们可以对得到的结果数据进行归一化处理；使用 Graphpad Pism 软件将灰度分析结果值制作为柱状图（图 B）。就 NORO-VP1 的蛋白表达量来说，稀释 5 倍后的 Cap-W1-NORO 样本明显高于未稀释的 Cap-W2-NORO 样本。

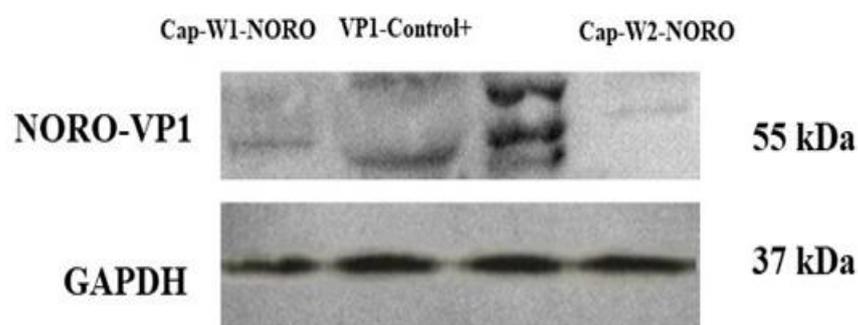
A

图 13-A 两种表达系统转染 VERO E6 细胞 Western Blot 结果图

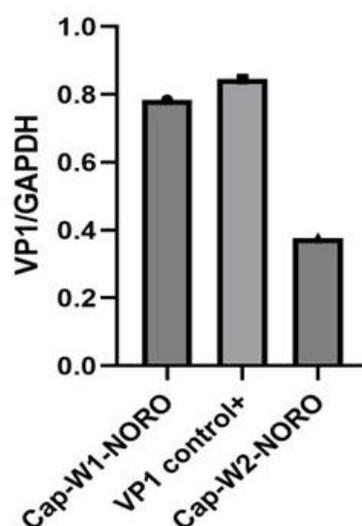
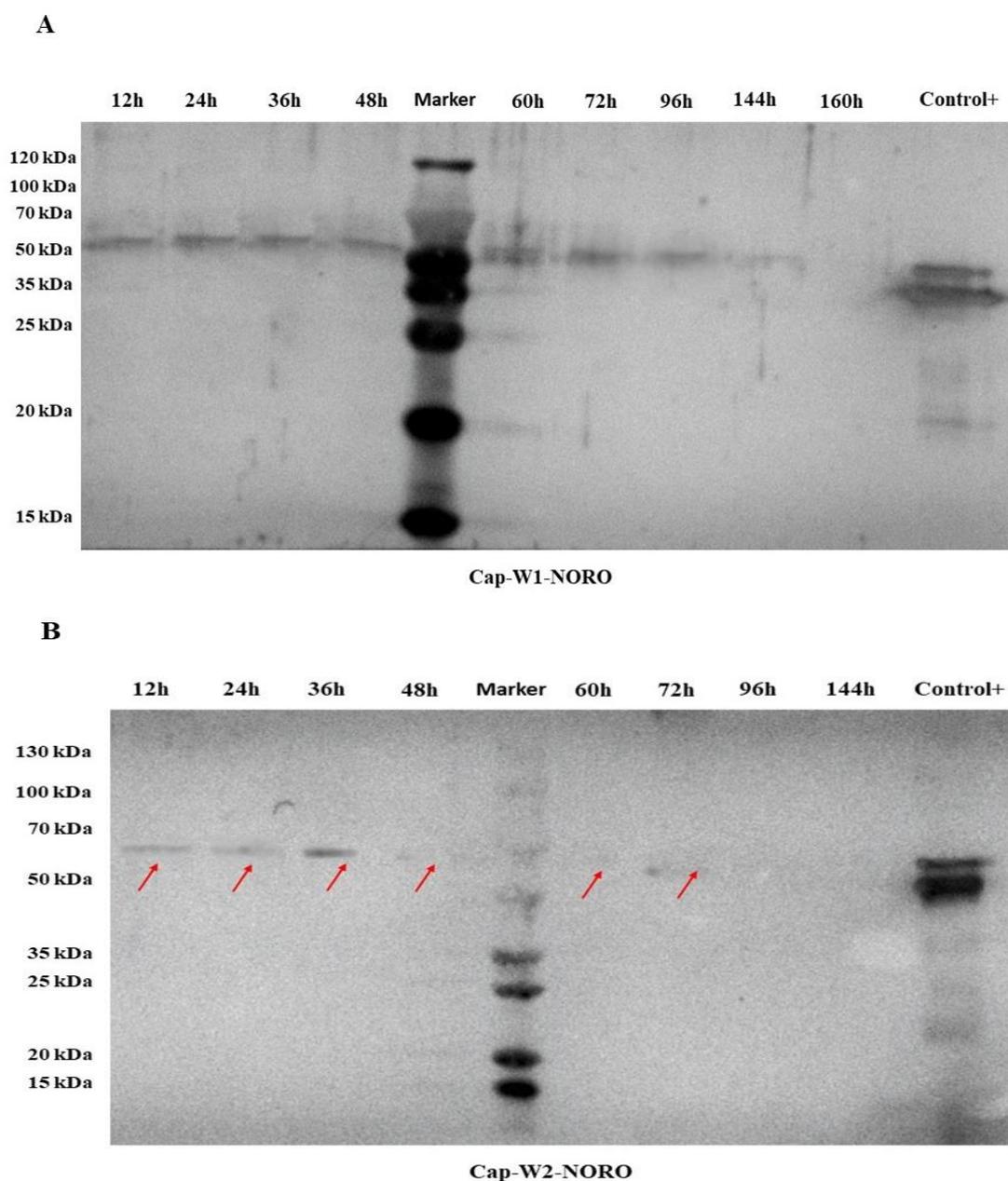
B

图 13-B 两种表达系统转染 VERO E6 细胞 Western Blot 结果灰度分析柱状图

为进一步验证上述结果,将两组制备好的 mRNA(Cap-W1-NORO 和 Cap-W2-NORO)以同等实验条件转染于 293T 细胞中,每组样本设置 10 个平行孔,转染后(12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 96h, 144h)按固定时间段裂解细胞,制备蛋白样本。为使实验条带图清晰易对比,调整两种样品上样量(Cap-W1-NORO 蛋白样品使用 PBS 稀释 5 倍; Cap-W2-NORO 蛋白样品不进行稀释)后进行 Western Blot 实验。

转染 293T 细胞鉴定结果见(图 14)。表明两种表达系统都可以成功表达 VP1 蛋白。图 A 图 B 显示,两组样本 Western Blot 膜上均有大小相符(55kDa)目的条带,位置略高于阳性对照条带(可能与细胞内蛋白质糖基化修饰有关)。相同实验条件下,稀释 5 倍后的 Cap-W1-NORO 组样本 NORO-VP1 蛋白表达量仍明显高于未稀释 Cap-W2-NORO

组样本。结合 VERO E6 等细胞转染后 Western Blot 结果，证明所设计构建的 RNA 候选疫苗体外转录系统 mRNA-W1 在 mRNA 翻译蛋白表达上要优于 mRNA-W2。



A: Cap-W1-NORO 组 Western Blot 检验; B: Cap-W1-NORO 组 Western Blot 检验

图 14 两种表达系统转染 293T 细胞 Western Blot 结果图

4. 讨论

因 NoV 的高度变异性；感染后机体免疫机制研究，培养细胞系和可用动物模型的缺乏，目前国内外均没有投入使用的 NoV 疫苗。传统疫苗开发周期较长，针对 NoV 研究最深入的疫苗仍处于临床二期研究阶段。mRNA 疫苗作为一种新型核酸疫苗，具有使

用非病毒递送系统给药的能力，还可以通过修改 mRNA 结构中具体编码区域的序列，轻松实现 mRNA 疫苗靶向抗原的改变；因此针对暴发的传染病来说，mRNA 疫苗可快速生产的优势十分明显，其分子结构设计优化和递送技术都在快速发展完善。目前 mRNA 疫苗在肿瘤和感染性疾病方面应用研究较多。国内外暂未有针对 NoV 的 mRNA 疫苗研究，本研究针对 NoV 的 mRNA 疫苗前期构建进行了初步的探索。

mRNA 周转调节在基因表达的整体控制过程中起着重要作用，所以近年来细胞质中自然表达 mRNA 稳定水平的机制受到了广泛关注。每个 mRNA 分子翻译产生多少蛋白质取决于翻译机制在编码序列(CDS)上启动和延长的程度以及 mRNA 的功能半衰期。而 mRNA 的稳定性和翻译效率一般是由 RNA 和蛋白质相互作用的复杂网络所控制，同时也和 mRNA 的一级、二级结构有关^[47]。3'UTR 和 5'UTR 非编码区域的序列被认为是调节转录稳定性的重要因素，具体原因与机制目前尚未有定论^[48]。现有相关数据很多都来自酵母细胞裂解物或原核细胞的研究^[49]。而真核细胞系的数据相对不具有结论性，需进行进一步的分析。

本研究继续使用 NoV-VP1 目的抗原基因筛选所构建的体外转录系统 mRNA-W1 和 mRNA-W2。通过观察 mRNA 转染后 NoV-VP1 的 ELISA 结果、间接免疫荧光实验中荧光强度、PAGE 胶染色条带、Western Blot 印迹中 VP1 蛋白的表达量差异，最后在两种设计中筛选出了较优的体外转录表达系统：mRNA-W1。验证结果显示，两种系统均可在不同细胞中表达 NoV-VP1 蛋白。虽然两种表达系统均可行，但因表达系统的设计不同，表达效果也有所差异，说明非编码区序列不同会影响体外转录系统后期的翻译效率，这可能与两种设计中 5'UTR 调控序列的不同和 3'UTR 序列排布方式增加 RNA 的稳定性提高了其翻译效率有关，从而使 mRNA-W1 的蛋白表达量高于 mRNA-W2。

将制备好的 Cap-W1-NORO 和 Cap-W2-NORO 分别转染到 VERO E6 细胞 48h 后，同时收取样品进行酶联免疫吸附试验，两组样品 NoV-VP1 蛋白实验结果均为阳性。因所使用 ELISA 试剂盒只能进行定性分析，证明所设计编码 NORO-VP1 基因的两种 RNA 体外表达系统都可以成功表达 VP1 蛋白。转染到 VERO E6 细胞进行间接免疫荧光试验，显微镜激发光下两组均有绿色荧光，Cap-W1-NORO 组荧光强度略强于 Cap-W2-NORO 组。转染到 293T 细胞，转染后每隔 12h 收取样品进行 Western Blot 试验比较蛋白表达持续时间情况。转染到 VERO E6 细胞后，收取样品进行 Western Blot 试验。PAGE 胶电泳染色后和 Western Blot 印迹均可见 NoV-VP1 (55kDa) 蛋白条带。且实验组条带位置均略高于阳性对照组，这可能与细胞内蛋白翻译后糖基化修饰有关^[50-53]。为进一步比较

两组系统表达差异，对电泳条带进行了灰度分析。上述实验结果均表明转染同质量 mRNA 相同时间段内，Cap-W1-NORO 组蛋白表达量明显大于 Cap-W2-NORO 组，且 Cap-W1-NORO 组表达持续时间略长于 Cap-W2-NORO 组。说明 mRNA-W1 表达系统中 5'UTR-MCS-3'UTR-polyA 的各个元件设计在表达 EGFP 和 NORO-VP1 时的 mRNA 稳定性、mRNA 翻译效率优于 mRNA-W2 表达系统，为我们进一步开发诺如病毒 mRNA 疫苗奠定了基础。

5. 小结

- 1) 两种系统均能在不同细胞中成功表达 NoV-VP1 蛋白，因 5'UTR、3'UTR、poly (a) 各部分元件结构不同，表达效果有差异。
- 2) 所构建两组系统种，mRNA-W1 体外转录系统的翻译效率、蛋白表达量较高。

结论

1. mRNA-W1 中 poly (a) 结构设计为: A(30)+GCATATGACT+A(70); mRNA-W2 中使用数量 120 个 A 的 poly (a) 结构。成功设计构建两种 UTRs 序列和 polyA 结构组合均不相同的体外转录系统 (mRNA-W1 和 mRNA-W2)。
2. 构建重组质粒时引入同源臂进行同源重组的连接效率高于 T4 连接酶的连接效率, T4 连接酶连接效率可能与插入片段的结构与长度相关。制备 RNA 模板质粒质量关键, 应无内毒素, 超螺旋质粒含量应 >90%, 需尽可能的去宿主蛋白与宿主基因组。DNA 模板纯化使用 PCR 产物纯化试剂盒的回收效果好于胶回收试剂盒。转录后加帽使用 ARCA 试剂盒进行加帽, mRNA 纯化回收多种纯化方式中, Oligo(dT) capture 更适用于本研究中所设计结构的 mRNA, 回收率较高。
3. 两种系统可在不同细胞中表达 EGFP 和 NoV-VP1 蛋白, 所构建 RNA 体外表达系统均具有可行性。因 5'UTR、3'UTR、poly (a) 部分设计均不同, 表达效果有差异。无论是插入 EGFP 还是 NoV-VP1, mRNA-W1 系统的 RNA 翻译效率、蛋白表达量、表达持续时间都明显优于 mRNA-W2 系统。最终确定筛选出 mRNA-W1 体外转录表达系统用于后续诺如病毒 mRNA 疫苗的研究。

不足与展望

1. 因疫苗研究与开发整体技术路线较长, 后续还需在动物水平对疫苗的免疫原性和疫苗递送系统方面进行更深入的研究。
2. mRNA 疫苗的迅速生产使得它成为一种重要的疫苗选择, 它不仅可以有效地抵御新型传染病的蔓延, 而且还可以弥补疫苗供应的不足, 它的出现可能推动 NoV 疫苗的开发和使用, 开辟一条全新的道路, 拥有巨大的发展潜力。将来可能在针对 NoV 和其他新病原体的疫苗开发中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Patel M M, Hall A J, Vinjé J, Parashar U D. Noroviruses: a comprehensive review[J]. *J Clin Virol*, 2009, **44**(1): 1-8.
- [2] Atmar R L, Opekun A R, Gilger M A, Estes M K, Crawford S E, Neill F H, Graham D Y. Norwalk virus shedding after experimental human infection[J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, **14**(10): 1553-1557.
- [3] Bartsch S M, Lopman B A, Ozawa S, Hall A J, Lee B Y. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis[J]. *PLoS One*, 2016, **11**(4): e0151219.
- [4] Phillips G, Tam C C, Conti S, Rodrigues L C, Brown D, Iturriza-Gomara M, Gray J, Lopman B. Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: improved estimates using viral load for norovirus diagnosis[J]. *Am J Epidemiol*, 2010, **171**(9): 1014-1022.
- [5] Verhoef L, Koopmans M, W V A N P, Duizer E, Haagsma J, Werber D, L V A N A, Havelaar A. The estimated disease burden of norovirus in The Netherlands[J]. *Epidemiol Infect*, 2013, **141**(3): 496-506.
- [6] Thomas M K, Murray R, Flockhart L, Pintar K, Pollari F, Fazil A, Nesbitt A, Marshall B. Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2013, **10**(7): 639-648.
- [7] Scallan E, Hoekstra R M, Angulo F J, Tauxe R V, Widdowson M A, Roy S L, Jones J L, Griffin P M. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens[J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, **17**(1): 7-15.
- [8] Tam C C, Rodrigues L C, Viviani L, Dodds J P, Evans M R, Hunter P R, Gray J J, Letley L H, Rait G, Tompkins D S, O'Brien S J. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice[J]. *Gut*, 2012, **61**(1): 69-77.
- [9] Hall A J, Lopman B A, Payne D C, Patel M M, Gastañaduy P A, Vinjé J, Parashar U D. Norovirus disease in the United States[J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, **19**(8): 1198-1205.
- [10] Lopman B A, Steele D, Kirkwood C D, Parashar U D. The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control[J]. *PLoS Med*, 2016, **13**(4): e1001999.
- [11] Taube S, Kolawole A O, Höhne M, Wilkinson J E, Handley S A, Perry J W, Thackray L B, Akkina R, Wobus C E. A mouse model for human norovirus[J]. *mBio*, 2013, **4**(4).
- [12] van Prehn J, Reigadas E, Vogelzang E H, Bouza E, Hristea A, Guery B, Krutova M, Norén T, Allerberger F, Coia J E, Goorhuis A, van Rossen T M, Ooijsvear R E, Burns K, Scharvik Olesen B R, Tschudin-Sutter S, Wilcox M H, Vehreschild M, Fitzpatrick F, Kuijper E J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2021, **27 Suppl 2**: S1-s21.
- [13] 胡瞬, 易有金, 胡涛, 李福胜. mRNA 疫苗的开发及临床研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2019, **39**(11): 105-112.
- [14] Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, **13**(10): 759-780.
- [15] Campillay-Véliz C P, Carvajal J J, Avellaneda A M, Escobar D, Covián C, Kalergis A M, Lay M K. Human Norovirus Proteins: Implications in the Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response[J]. *Front Immunol*, 2020, **11**: 961.
- [16] Leen E N, Kwok K Y, Birtley J R, Simpson P J, Subba-Reddy C V, Chaudhry Y, Sosnovtsev S V, Green K Y, Prater S N, Tong M, Young J C, Chung L M, Marchant J, Roberts L O, Kao C C, Matthews S, Goodfellow I G, Curry S. Structures of the compact helical core domains of feline calicivirus and murine

- norovirus VPg proteins[J]. *J Virol*, 2013, **87**(10): 5318-5330.
- [17] Thorne L G, Goodfellow I G. Norovirus gene expression and replication[J]. *J Gen Virol*, 2014, **95**(Pt 2): 278-291.
- [18] Chhabra P, de Graaf M, Parra G I, Chan M C, Green K, Martella V, Wang Q, White P A, Katayama K, Vennema H, Koopmans M P G, Vinjé J. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. *J Gen Virol*, 2019, **100**(10): 1393-1406.
- [19] Worobey M, Holmes E C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses[J]. *J Gen Virol*, 1999, **80** (Pt 10): 2535-2543.
- [20] Lai M M. RNA recombination in animal and plant viruses[J]. *Microbiol Rev*, 1992, **56**(1): 61-79.
- [21] 朱曦, 孔翔羽, 章青, 李静欣, 李慧莹, 靳淼, 段招军. 2016-2019 年我国诺如病毒暴发疫情的分子流行病学特征分析[J]. *疾病监测*, 2021, **36**(08): 774-779.
- [22] Zhu X, He Y, Wei X, Kong X, Zhang Q, Li J, Jin M, Duan Z. Molecular Epidemiological Characteristics of Gastroenteritis Outbreaks Caused by Norovirus GII.4 Sydney [P31] Strains - China, October 2016-December 2020[J]. *China CDC Wkly*, 2021, **3**(53): 1127-1132.
- [23] van Loben Sels J M, Green K Y. The Antigenic Topology of Norovirus as Defined by B and T Cell Epitope Mapping: Implications for Universal Vaccines and Therapeutics[J]. *Viruses*, 2019, **11**(5).
- [24] Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, Kallen K J. Developing mRNA-vaccine technologies[J]. *RNA Biol*, 2012, **9**(11): 1319-1330.
- [25] Asrani K H, Farelli J D, Stahley M R, Miller R L, Cheng C J, Subramanian R R, Brown J M. Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA[J]. *RNA Biol*, 2018, **15**(6): 756-762.
- [26] Sample P J, Wang B, Reid D W, Presnyak V, McFadyen I J, Morris D R, Seelig G. Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, **37**(7): 803-809.
- [27] Trepotec Z, Aneja M K, Geiger J, Hasenpusch G, Plank C, Rudolph C. Maximizing the Translational Yield of mRNA Therapeutics by Minimizing 5'-UTRs[J]. *Tissue Eng Part A*, 2019, **25**(1-2): 69-79.
- [28] Gallie D R. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency[J]. *Genes Dev*, 1991, **5**(11): 2108-2116.
- [29] Mockey M, Gonçalves C, Dupuy F P, Lemoine F M, Pichon C, Midoux P. mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **340**(4): 1062-1068.
- [30] Michel Y M, Poncet D, Piron M, Kean K M, Borman A M. Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation[J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(41): 32268-32276.
- [31] Borman A M, Michel Y M, Malnou C E, Kean K M. Free poly(A) stimulates capped mRNA translation in vitro through the eIF4G-poly(A)-binding protein interaction[J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(39): 36818-36824.
- [32] Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, **19**(3): 158-174.
- [33] Goldstein N, Bockstal V, Bart S, Luhn K, Robinson C, Gaddah A, Callendret B, Douougih M. Safety and Immunogenicity of Heterologous and Homologous 2-Dose Regimens of Adenovirus Serotype 26- and Modified Vaccinia Ankara-Vectored Ebola Vaccines: A Randomized, Controlled Phase 1 Study[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2020, **226**(4): 595-607.
- [34] Hartnell F, Brown A, Capone S, Kopycinski J, Bliss C, Makvandi-Nejad S, Swadling L, Ghaffari E, Cicconi P, Del Sorbo M, Sbrocchi R, Esposito I, Vassilev V, Marriott P, Gardiner C M, Bannan C, Bergin

- C, Hoffmann M, Turner B, Nicosia A, Folgori A, Hanke T, Barnes E, Dorrell L. A Novel Vaccine Strategy Employing Serologically Different Chimpanzee Adenoviral Vectors for the Prevention of HIV-1 and HCV Coinfection[J]. *Front Immunol*, 2018, **9**: 3175.
- [35] Elango N, Elango S, Shivshankar P, Katz M S. Optimized transfection of mRNA transcribed from a d(A/T)100 tail-containing vector[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **330**(3): 958-966.
- [36] Peng J, Murray E L, Schoenberg D R. In vivo and in vitro analysis of poly(A) length effects on mRNA translation[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, **419**: 215-230.
- [37] Preiss T, Muckenthaler M, Hentze M W. Poly(A)-tail-promoted translation in yeast: implications for translational control[J]. *Rna*, 1998, **4**(11): 1321-1331.
- [38] Chen Y H, Collier J. A Universal Code for mRNA Stability?[J]. *Trends Genet*, 2016, **32**(11): 687-688.
- [39] Brawerman G. The Role of the poly(A) sequence in mammalian messenger RNA[J]. *CRC Crit Rev Biochem*, 1981, **10**(1): 1-38.
- [40] Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon P, Koslowski M, Huber C, Türeci O, Sahin U. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells[J]. *Blood*, 2006, **108**(13): 4009-4017.
- [41] Pardi N, Muramatsu H, Weissman D, Karikó K. In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, **969**: 29-42.
- [42] Weissman D, Pardi N, Muramatsu H, Karikó K. HPLC purification of in vitro transcribed long RNA[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, **969**: 43-54.
- [43] Pardi N, Hogan M J, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology[J]. *Curr Opin Immunol*, 2020, **65**: 14-20.
- [44] Faghfuri E, Pourfarzi F, Faghfour A H, Abdoli Shadbad M, Hajiasgharzadeh K, Baradaran B. Recent developments of RNA-based vaccines in cancer immunotherapy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2021, **21**(2): 201-218.
- [45] Kuhn A N, Diken M, Kreiter S, Selmi A, Kowalska J, Jemielity J, Darzynkiewicz E, Huber C, Türeci O, Sahin U. Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo[J]. *Gene Ther*, 2010, **17**(8): 961-971.
- [46] Bettinger T, Carlisle R C, Read M L, Ogris M, Seymour L W. Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(18): 3882-3891.
- [47] Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs[J]. *Genome Biol*, 2002, **3**(3): Reviews0004.
- [48] Yu J, Russell J E. Structural and functional analysis of an mRNP complex that mediates the high stability of human beta-globin mRNA[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**(17): 5879-5888.
- [49] Preiss T, Hentze M W. Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast[J]. *Nature*, 1998, **392**(6675): 516-520.
- [50] Eichler J. Protein glycosylation[J]. *Curr Biol*, 2019, **29**(7): R229-r231.
- [51] Lis H, Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects[J]. *Eur J Biochem*, 1993, **218**(1): 1-27.
- [52] Wong C H. Protein glycosylation: new challenges and opportunities[J]. *J Org Chem*, 2005, **70**(11): 4219-4225.
- [53] Moremen K W, Tiemeyer M, Nairn A V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, **13**(7): 448-462.

文献综述

mRNA 疫苗的技术创新和研究进展

摘要: mRNA 疫苗作为一种新型核酸疫苗, 具有高度通用、高效、精简、可快速开发低成本生产等特点。有潜力成为传统常规疫苗的替代品。自 2019 年新型冠状病毒 (COVID-19) 大流行给全球造成较大疾病负担以来, mRNA 疫苗快速发展成为 COVID-19 疫苗的领跑者。同时 mRNA 疫苗技术也得到了广泛的关注。mRNA 疫苗在肿瘤、感染性疾病防治上有着较广泛的应用前景。为了深入了解全球 mRNA 疫苗的研发进展, 本文重点从 mRNA 疫苗的分子结构设计优化、递送技术、疾病中的应用等方面对 mRNA 疫苗技术进行了分析与概述, 同时总结了对 mRNA 疫苗未来前景的深入探讨。

关键词: mRNA 疫苗; mRNA 疫苗递送系统; 疾病预防

Technological innovation and research progress of mRNA vaccine

Abstract: As a new type of nucleic acid vaccine, mRNA vaccine has the characteristics of high universality, high efficiency, simplification, rapid development and low cost production. It has the potential to become a substitute for traditional conventional vaccines. Since the 2019 novel coronavirus (COVID-19) pandemic caused a large global disease burden, the mRNA vaccine has rapidly developed into a leader in COVID-19 vaccines. At the same time, mRNA vaccine technology has also received extensive attention. mRNA vaccines have broad application prospects in the prevention and treatment of tumors and infectious diseases. In order to deeply understand the research and development progress of global mRNA vaccine, this paper focuses on the analysis and overview of mRNA vaccine technology from the aspects of molecular structure design optimization, delivery technology and disease application of mRNA vaccine, and summarizes the future prospects of mRNA vaccine.

Keywords: mRNA vaccine; mRNA vaccine delivery system; disease prevention

随着全球人口和环境利用的增加, 控制疾病的传播成为一项重要的任务。为了遏制疾病的传播, 作为主要预防手段的疫苗开始发挥作用^[1-3]。COVID-19 大流行期间, 两种非常有效的 mRNA 疫苗取得成功后^[4-6]。除 COVID-19 外, mRNA 疫苗在其他传染病方

向的应用也在增多。mRNA 技术出现在大众视野中，引起广泛关注，也为其他疾病疫苗的研发提供了一种创新的思路。近年来随着 mRNA 合成制备、分子设计优化技术及递送系统的迅速发展，mRNA 疫苗技术参数也在逐渐完善。

通过改变 mRNA 结构中具体编码区域的序列，可以实现 mRNA 疫苗靶向抗原的轻松改变。因此开发针对快速进展的暴发传染病，mRNA 疫苗的优势十分明显。除了可快速生产外，mRNA 疫苗还具有不需要进入细胞核就可以激活蛋白质生产的能力、使用非病毒递送系统给药的能力、通过在细胞中表达靶抗原并同时触发免疫反应来诱导成功的抗原特异性免疫的巨大潜力^[7,8]。通过使用 mRNA 技术，可以在不改变生产过程的情况下同时表达多个抗原，从而提高开发的灵活性和效率。mRNA 技术的发展速度超出预期，已晋升到医药行业核心阶段，本文重点从 mRNA 疫苗的分子结构设计优化、递送技术、疾病中的应用方面对 mRNA 疫苗技术进行了概述，为后续相关研究提供参考依据。

1.mRNA 疫苗概述

信使 RNA 是基因和蛋白质之间的瞬时中间体，在 1961 年被人首次发现^[9]。mRNA 疫苗属于在之前传统疫苗基础上发展起来的第三代的核酸疫苗^[8]。核酸疫苗是一种新型的预防和治疗疾病的方法，它利用外源基因（DNA /RNA）编码特定抗原蛋白，并将其导入宿主细胞，使其表达，从而激活宿主的免疫反应，而有效地抵御疾病的侵袭^[8]。mRNA 疫苗无需依赖细胞扩增的过程，主要通过酶促体外转录反应进行生产^[10]。通过采用先进的生产系统，可以有效避免细胞培养过程中的复杂问题，而且生产系统可以轻松扩展，前期合成速度快，一旦在活体动物中证实了有效的目的抗原的产生，向下推进速度将很快。免疫后 RNA 会很快在转染细胞质中降解，从而消除基因组整合安全性风险。

mRNA 疫苗研发关键环节主要包含抗原选择、序列优化、筛选修饰核苷酸、优化递送系统、免疫效果评价和安全性评价等^[11]。目前已经开发出来的 mRNA 疫苗主要有两种，一种是传统的 mRNA，通过编码抗原和两侧 5'UTR、3'UTR 构成；另一种是正链 RNA 病毒基因组的自扩增 mRNA。自扩增 mRNA 编码抗原和细胞内病毒 RNA 扩增所需的非结构蛋白，诱导高水平抗原表达^[12]。第一种 mRNA 携带目的抗原的编码序列，mRNA 在进入细胞并释放到细胞质中后立即被翻译。自扩增 mRNA 通常来自正链 RNA 病毒的基因组，可直接自扩增产生 RNA 中间体和多种抗原编码亚基因组，利于产生高水平的编码抗原^[13]。mRNA 疫苗的应用主要集中在传染性疾病和肿瘤两大领域^[14]。

2. IVT mRNA 的组成与设计

mRNA 分子主要由 5'和 3'非翻译区 (UTR)、ORF、poly (A) 三个部分组成, 它们共同构成了 mRNA 的非编码区和阅读框^[15]。自扩增 mRNA 包含所有以上结构, 区别在于其 ORF 中有一个额外编码区, 该编码区负责编码病毒复制机制, 可实现连续的细胞 RNA 扩增。mRNA 的 5'末端含有 7-甲基鸟苷 (m7G) 部分, 然后才是第一个核苷酸 (m7GpppN) 的三磷酸部分。m7GpppN 通常被称为 5'端帽, 5'端帽子在翻译启动和蛋白质的产生速率中起作用, 它是一种保护性结构, 保护 RNA 免受核酸酶切割^[16]。5'端帽子是必不可少的, mRNA 可以通过引入转录后修饰来提高其效率和稳定性。其中包括第一核苷酸 (Cap 2, m2GpppN1m) 和第二个核苷酸 (Cap 7, m1GpppN2mN7m) 核糖环位置 1'的 2'-O-甲基化^[17, 18]。5'端帽子结构的修饰除了可以提高 mRNA 的翻译效率, 还可以阻止了内体和胞质受体 (RIG-I 和 MDA5) 的活化, 这些受体主要与病毒 mRNA 的防御机制有关。模式识别受体 (PRR) 可以识别未经帽化的 mRNA, 这将激活先天免疫应答, 抑制蛋白质的合成。

IVT mRNA 加帽通常有两种方法: 一种是添加帽类似物作为 RNA 聚合酶底物进行一步共转录加帽, 另一种是使用专门的加帽酶进行转录后加帽。虽然 UTR 不能翻译成所需蛋白质, 但它们参与调节 mRNA 表达。真核 mRNA 的 5'端和 3'端 UTR 上有顺式元件和二级结构, 它们对于 mRNA 翻译和稳定来说至关重要。但由于缺乏对所涉及的调控机制的研究与了解, 目前的 IVT mRNA 设计主要还是使用高表达基因的 UTR^[19, 20]。这也为 UTR 区域设计和优化留下了很大的进步空间。当多余的二级结构被引入 5'UTR 时, 翻译效率也会受到影响^[21]。同时优化 3' UTR 可显著提高 IVT mRNA 的稳定性^[22]。3' UTR 通常在 mRNA 转运和定位中发挥作用。在 3' UTR 的特定区域, mRNA 定位信号以序列和结构依赖性方式与反式作用因子相互作用。UTR 除了帮助核糖体识别 mRNA, 还有助于 mRNA 的转录后修饰^[23]。在 UTR 中加入顺式调节序列可以改善 mRNA 翻译效率及其半衰期。

真核细胞中多腺苷酸化发生在转录之后, 从细胞核转运到细胞质形成 poly (A) 尾巴, 其中含有由 PABP 结合连续腺嘌呤核苷酸 (50-250nt), 可以促进核输出, 提高翻译效率同时给抑制 RNA 降解^[24-27]。使用什么长度的 poly (A) 尾结构的 IVT mRNA, 需要结合具体 IVT mRNA 的内在特性和细胞质环境来确定^[28]。

3. mRNA 的递送系统

mRNA 疫苗进入细胞的能力对它是否能发挥作用至关重要,为了诱导抗原特异性免疫反应, mRNA 疫苗必须在递送到细胞后翻译成抗原,无处不在的 RNA 酶是 mRNA 递送需要面对的巨大挑战。递送系统需要 mRNA 不降解并将其递送到所需靶组织。传统 DNA 疗法需要递送到细胞核,而 mRNA 一旦递送到细胞质,就可以立刻诱导产生治疗效果^[29]。

迄今为止发展相对成熟的 mRNA 递送主要是纳米材料,其中包括聚合物、脂质和无机纳米颗粒^[30,31]。由辉瑞生物科技开发的针对 SARS-CoV-19 的 COVID-2 mRNA 疫苗就是采用 LNP 将 mRNA 有效输送到体内^[32]。LNP 递送系统被认为是递送 RNA (包括 mRNA 疗法/疫苗)的最有效平台。一般来说,LNP 系统由结构脂质、可电离脂质、聚乙二醇(PEG)脂质和胆固醇四种主要脂质成分组成。可电离脂质在酸性条件下的质子化导致阳离子脂质的形成,阳离子脂质再通过电荷相互作用与阴离子 RNA 结构相互作用,被可电离脂质包围的 RNA 结构随后通过疏水相互作用吸引其他脂质成分,最后组装成保护脆弱 RNA 结构的 LNP。大部分在研或获批临床的疫苗均使用 LNPs^[33]。LNP 的主要优势为制剂简单、模块化、生物相容性和较大的 mRNA 载量。

阳离子脂质是开发 mRNA 疫苗递送早期的第一代脂质,早期的阳离子脂质在体外显示出有希望的基因递送,但它们的体内功效不足,其不可生物降解的性质是其体外递送和功效无效的主要原因^[34]。可电离脂质(pH 依赖性离子脂质)是含有伯胺的第二代阳离子脂质,在 \leq 生理 pH 时可以赋予它们正电荷。与第一代阳离子脂质相比,它在生理 pH 下在血液中具有中性电荷的特点可以提高其安全性^[32]。第三代可电离脂质的合成进行了优化,增加了可电离脂质的高通量产量^[35]。

聚乙二醇(PEG)在化妆品,食品行业中有着广泛的应用,它是一种亲水材料。LNP 中的 PEG 成分通常与锚定脂质有关,研究发现 PEG 是 LNP 配方中必不可少的化学物质,可以提高 LNPs 在生物体液中的胶体稳定性。它们在颗粒稳定性和包封效率等关键参数方面起着关键作用,可以利用 PEG 的分子量和锚脂的碳链长度来微调免疫细胞的循环,改变效率^[36]。一般情况下来说,PEG 的量与 LNP 的大小成反比的;PEG 含量越高,LNP 的尺寸反而越小^[37]。除此之外,PEG-脂质还有能够将特定配体与 LNP 偶联的优势,这有助于靶向药物递送^[38,39]。

4. mRNA 技术在疾病预防与治疗中的应用

mRNA 疫苗是一个相对较新的技术。在 2019 年 2 月开始严重急性呼吸综合征冠状

病毒大流行的背景下，两种以改良 mRNA 为中心的 SARS-CoV-17 疫苗迅速进入临床阶段^[40]。两者都是依赖于编码整个 S 蛋白的非复制 mRNA 序列，使用 LNP 包装以保证 RNA 安全性。

mRNA 疫苗与传统的灭活疫苗相比，可以诱导更强的细胞免疫。癌症疫苗诱导肿瘤抗原特异性细胞免疫，特别是抗原特异性细胞毒性 T 细胞免疫的特点^[4]。这决定了 mRNA 疫苗在癌症免疫治疗中的治疗效果。mRNA 疫苗被认为是有效的治疗肿瘤的方法，它通过针对肿瘤细胞表达特异性抗原，激活细胞介导的免疫反应，从而抑制肿瘤细胞的增殖，从而实现预防和控制肿瘤发展的效果^[41, 42]。针对癌症的 mRNA 疫苗一般起治疗作用，而不是传统的预防作用。

目前，mRNA 疫苗在抗击传染病方面的研究取得了巨大进展，其中包括：目前进度在 I 期临床试验中的，开发出的可以抵御人类免疫缺陷病毒、寨卡病毒、狂犬病病毒和流感病毒的疫苗；目前进度在 II 期临床试验中的，开发出的可以抵御巨细胞病毒的疫苗^[43-46]。

5. 展望

对 mRNA 疫苗的研究其实已经进行了很多年，直到 COVID-19 大流行，这项新技术才引起了较大的关注。在研发 COVID-19 疫苗的竞赛中，mRNA 作为安全有效的平台的出现，为全世界展示了 mRNA-LNP 技术。随着 mRNA 疫苗有效性和安全性的相关数据的增多，mRNA 技术的使用不再局限于 COVID-2 大流行。mRNA 疫苗具有对抗多种传染性疾病病原体和癌症的潜力。mRNA 疫苗安全、有效且易于生产的特点都可能在未来应对流行病时发挥重要作用。mRNA 技术具有揭开医学新时代的能力。预计在未来，目前的 mRNA 疫苗技术水平将会前进一大步。随着技术的完善和各种作用机制的深入了解，mRNA 技术也可能被开发用于更多疾病方面的治疗。

参考文献

- [1] Chavda V P, Sonak S S, Munshi N K, Dhamade P N. Pseudoscience and fraudulent products for COVID-19 management[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, **29**(42): 62887-62912.
- [2] Chavda V P, Feehan J, Apostolopoulos V. A Veterinary Vaccine for SARS-CoV-2: The First COVID-19 Vaccine for Animals[J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, **9**(6).
- [3] Chavda V P, Chen Y, Dave J, Chen Z S, Chauhan S C, Yallapu M M, Uversky V N, Bezbaruah R, Patel S, Apostolopoulos V. COVID-19 and vaccination: myths vs science[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2022, **21**(11): 1603-1620.
- [4] Jackson N A C, Kester K E, Casimiro D, Gurunathan S, DeRosa F. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective[J]. *NPJ Vaccines*, 2020, **5**: 11.
- [5] Kwon H, Kim M, Seo Y, Moon Y S, Lee H J, Lee K, Lee H. Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine[J]. *Biomaterials*, 2018, **156**: 172-193.
- [6] Wang F, Zuroske T, Watts J K. RNA therapeutics on the rise[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, **19**(7): 441-442.
- [7] Pardi N, Hogan M J, Porter F W, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, **17**(4): 261-279.
- [8] Ertl P F, Thomsen L L. Technical issues in construction of nucleic acid vaccines[J]. *Methods*, 2003, **31**(3): 199-206.
- [9] Brenner S, Jacob F, Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis[J]. *Nature*, 1961, **190**: 576-581.
- [10] 邓涛, 张家友, 杨晓明. 流感病毒神经氨酸酶及其疫苗的研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, **34**(06): 751-755.
- [11] 王勋, 王鹏飞. 应对新冠病毒突变株的疫苗研究进展[J]. *张江科技评论*, 2021(06): 35-37.
- [12] Maruggi G, Chiarot E, Giovani C, Buccato S, Bonacci S, Frigimelica E, Margarit I, Geall A, Bensi G, Maione D. Immunogenicity and protective efficacy induced by self-amplifying mRNA vaccines encoding bacterial antigens[J]. *Vaccine*, 2017, **35**(2): 361-368.
- [13] Maruggi G, Zhang C, Li J, Ulmer J B, Yu D. mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases[J]. *Mol Ther*, 2019, **27**(4): 757-772.
- [14] Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report[J]. *Immunity*, 2020, **52**(4): 583-589.
- [15] 胡瞬, 易有金, 胡涛, 李福胜. mRNA 疫苗的开发及临床研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2019, **39**(11): 105-112.
- [16] Ramanathan A, Robb G B, Chan S H. mRNA capping: biological functions and applications[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(16): 7511-7526.
- [17] Daffis S, Szretter K J, Schriewer J, Li J, Youn S, Errett J, Lin T Y, Schneller S, Züst R, Dong H, Thiel V, Sen G C, Fensterl V, Klimstra W B, Pierson T C, Buller R M, Gale M, Jr., Shi P Y, Diamond M S. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members[J]. *Nature*, 2010, **468**(7322): 452-456.
- [18] Cowling V H. Regulation of mRNA cap methylation[J]. *Biochem J*, 2009, **425**(2): 295-302.
- [19] Malone R W, Felgner P L, Verma I M. Cationic liposome-mediated RNA transfection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, **86**(16): 6077-6081.
- [20] Zarghampoor F, Azarpira N, Khatami S R, Behzad-Behbahani A, Foroughmand A M. Improved translation efficiency of therapeutic mRNA[J]. *Gene*, 2019, **707**: 231-238.
- [21] Ding Y, Tang Y, Kwok C K, Zhang Y, Bevilacqua P C, Assmann S M. In vivo genome-wide profiling of RNA secondary structure reveals novel regulatory features[J]. *Nature*, 2014, **505**(7485): 696-700.

- [22] Orlandini von Niessen A G, Poleganov M A, Rechner C, Plaschke A, Kranz L M, Fesser S, Diken M, Löwer M, Vallazza B, Beissert T, Bukur V, Kuhn A N, Türeci Ö, Sahin U. Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening[J]. *Mol Ther*, 2019, **27**(4): 824-836.
- [23] Chatterjee S, Pal J K. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases[J]. *Biol Cell*, 2009, **101**(5): 251-262.
- [24] Vinciguerra P, Stutz F. mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, **16**(3): 285-292.
- [25] Kahvejian A, Svitkin Y V, Sukarieh R, M'Boutchou M N, Sonenberg N. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms[J]. *Genes Dev*, 2005, **19**(1): 104-113.
- [26] Gray N K, Collier J M, Dickson K S, Wickens M. Multiple portions of poly(A)-binding protein stimulate translation in vivo[J]. *Embo j*, 2000, **19**(17): 4723-4733.
- [27] Siddiqui N, Mangus D A, Chang T C, Palermino J M, Shyu A B, Gehring K. Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein[J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(34): 25067-25075.
- [28] Jalkanen A L, Coleman S J, Wilusz J. Determinants and implications of mRNA poly(A) tail size--does this protein make my tail look big?[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, **34**: 24-32.
- [29] Son S, Lee K. Development of mRNA Vaccines/Therapeutics and Their Delivery System[J]. *Mol Cells*, 2023, **46**(1): 41-47.
- [30] Byun M J, Lim J, Kim S N, Park D H, Kim T H, Park W, Park C G. Advances in Nanoparticles for Effective Delivery of RNA Therapeutics[J]. *Biochip J*, 2022, **16**(2): 128-145.
- [31] Hou X, Zaks T, Langer R, Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery[J]. *Nat Rev Mater*, 2021, **6**(12): 1078-1094.
- [32] Cullis P R, Hope M J. Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies[J]. *Mol Ther*, 2017, **25**(7): 1467-1475.
- [33] Wang C, Zhang Y, Dong Y. Lipid Nanoparticle-mRNA Formulations for Therapeutic Applications[J]. *Acc Chem Res*, 2021, **54**(23): 4283-4293.
- [34] Granot Y, Peer D. Delivering the right message: Challenges and opportunities in lipid nanoparticles-mediated modified mRNA therapeutics-An innate immune system standpoint[J]. *Semin Immunol*, 2017, **34**: 68-77.
- [35] Mahon K P, Love K T, Whitehead K A, Qin J, Akinc A, Leshchiner E, Leshchiner I, Langer R, Anderson D G. Combinatorial approach to determine functional group effects on lipidoid-mediated siRNA delivery[J]. *Bioconjug Chem*, 2010, **21**(8): 1448-1454.
- [36] Heyes J, Hall K, Tailor V, Lenz R, MacLachlan I. Synthesis and characterization of novel poly(ethylene glycol)-lipid conjugates suitable for use in drug delivery[J]. *J Control Release*, 2006, **112**(2): 280-290.
- [37] Mui B L, Tam Y K, Jayaraman M, Ansell S M, Du X, Tam Y Y, Lin P J, Chen S, Narayanannair J K, Rajeev K G, Manoharan M, Akinc A, Maier M A, Cullis P, Madden T D, Hope M J. Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, **2**(12): e139.
- [38] Fang Y, Xue J, Gao S, Lu A, Yang D, Jiang H, He Y, Shi K. Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the "PEG dilemma" in efficient drug delivery[J]. *Drug Deliv*, 2017, **24**(sup1): 22-32.
- [39] Leung A K, Tam Y Y, Cullis P R. Lipid nanoparticles for short interfering RNA delivery[J]. *Adv Genet*, 2014, **88**: 71-110.

- [40] Hui D S. Hybrid immunity and strategies for COVID-19 vaccination[J]. *Lancet Infect Dis*, 2023, **23**(1): 2-3.
- [41] Van Lint S, Goyvaerts C, Maenhout S, Goethals L, Disy A, Bentejn D, Pen J, Bonehill A, Heirman C, Breckpot K, Thielemans K. Preclinical evaluation of TriMix and antigen mRNA-based antitumor therapy[J]. *Cancer Res*, 2012, **72**(7): 1661-1671.
- [42] Kreiter S, Diken M, Selmi A, Türeci Ö, Sahin U. Tumor vaccination using messenger RNA: prospects of a future therapy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2011, **23**(3): 399-406.
- [43] Feldman R A, Fuhr R, Smolenov I, Mick Ribeiro A, Panther L, Watson M, Senn J J, Smith M, Almarsson Ö, Pujar H S, Laska M E, Thompson J, Zaks T, Ciaramella G. mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials[J]. *Vaccine*, 2019, **37**(25): 3326-3334.
- [44] Richner J M, Himansu S, Dowd K A, Butler S L, Salazar V, Fox J M, Julander J G, Tang W W, Shresta S, Pierson T C, Ciaramella G, Diamond M S. Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection[J]. *Cell*, 2017, **168**(6): 1114-1125.e1110.
- [45] Roth C, Cantaert T, Colas C, Prot M, Casadémont I, Levillayer L, Thalmensi J, Langlade-Demoyen P, Gerke C, Bahl K, Ciaramella G, Simon-Loriere E, Sakuntabhai A. A Modified mRNA Vaccine Targeting Immunodominant NS Epitopes Protects Against Dengue Virus Infection in HLA Class I Transgenic Mice[J]. *Front Immunol*, 2019, **10**: 1424.
- [46] VanBlargan L A, Himansu S, Foreman B M, Ebel G D, Pierson T C, Diamond M S. An mRNA Vaccine Protects Mice against Multiple Tick-Transmitted Flavivirus Infections[J]. *Cell Rep*, 2018, **25**(12): 3382-3392.e3383.