

# 荧光素酶 mRNA 的构建及电穿孔介导的 mRNA 体内表达特性

樊玲江<sup>1,2</sup>, 周克茹<sup>2</sup>, 刘艳光<sup>2</sup>, 王桂芹<sup>2</sup>, 石婷<sup>5</sup>, 胡轶红<sup>3</sup>, 李代禧<sup>1,4</sup>

- 1 上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093
- 2 中科南京生命健康高等研究院, 江苏 南京 211135
- 3 中国科学院上海巴斯德研究所, 上海 200031
- 4 人工智能研究中心 鹏程实验室, 广东 深圳 518055
- 5 上海交通大学 生命科学与生物技术学院, 上海 200240

樊玲江, 周克茹, 刘艳光, 王桂芹, 石婷, 胡轶红, 李代禧. 荧光素酶 mRNA 的构建及电穿孔介导的 mRNA 体内表达特性. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3379-3389.

FAN LJ, ZHOU KR, LIU YG, WANG GQ, SHI T, HU YH, LI DX. Preparation of luciferase-expressing mRNA and expression characteristics of mRNA delivered by electroporation *in vivo*. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3379-3389.

**摘要:** 为构建一种非复制型 mRNA 平台并探究电穿孔介导的 mRNA 对小鼠健康状况的影响及蛋白的表达情况, 以荧光素酶作为靶标基因, 用 T7 RNA 聚合酶体外转录及酶法加帽加尾的策略制备 mRNA, 用活体基因导入仪通过电穿孔的方式体内递送 mRNA, 借助小动物活体成像系统观测荧光素酶蛋白在小鼠体内的表达强度和持续时间。结果表明, 使用该非复制型 mRNA 平台得到的 mRNA 成功在体内外表达, 电穿孔介导的 mRNA 对小鼠健康体征无明显影响, 所有的小鼠均成功表达了荧光素酶蛋白, 蛋白表达在电穿孔后第 1 天达到峰值, 在第 4 天迅速下降, 但蛋白表达强度和持续时间存在较大的小鼠个体间差异。研究对非复制型 mRNA 的构建及其应用于疫苗或肿瘤药物研发具有重要参考价值。

**关键词:** 电穿孔; mRNA; 活体成像; 荧光素酶

**Received:** December 2, 2021; **Accepted:** March 29, 2022

**Supported by:** Open Funding Project of State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University (MMLKF21-11); Innovation Capacity Building Project of Jiangsu Province, China (BM2020019)

**Corresponding authors:** LI Daixi. Tel: +86-21-55271117; E-mail: dxli75@usst.edu.cn

HU Yihong. Tel: +86-21-54923052; E-mail: yhhu@ips.ac.cn

**基金项目:** 上海交通大学微生物代谢国家重点实验室开放课题 (MMLKF21-11); 江苏省创新能力建设计划 (BM2020019)

# Preparation of luciferase-expressing mRNA and expression characteristics of mRNA delivered by electroporation *in vivo*

FAN Lingjiang<sup>1,2</sup>, ZHOU Keru<sup>2</sup>, LIU Yanguang<sup>2</sup>, WANG Guiqin<sup>2</sup>, SHI Ting<sup>5</sup>, HU Yihong<sup>3</sup>, LI Daixi<sup>1,4</sup>

1 School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

2 Nanjing Advanced Academy of Life and Health, Nanjing 211135, Jiangsu, China

3 Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

4 Peng Cheng Laboratory, AI Research Center, Shenzhen 518055, Guangdong, China

5 School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** In this study, we aimed to construct a non-replication mRNA platform and explore the side effects of electroporation-mediated delivery of mRNA on the mice as well as the expression features of the mRNA. With luciferase gene as a marker, *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase was carried out for the synthesis of luciferase-expressed mRNA, followed by enzymatic capping and tailing. The mRNA was delivered *in vivo* by electroporation via an *in vivo* gene delivery system, and the expression intensity and duration of luciferase in mice were observed via an *in vivo* imaging system. The results demonstrated that the mRNA transcripts were successfully expressed both *in vitro* and *in vivo*. The electroporation-mediated delivery of mRNA had no obvious side effects on the mice. Luciferase was expressed successfully in all the mRNA-transduced mice, while the expression intensity and duration varied among individuals. Overall, the expression level peaked on the first day after electroporation and rapidly declined on the fourth day. This study is of great importance for the construction of non-replication mRNAs and their application in vaccine or antitumor drug development.

**Keywords:** electroporation; mRNA; *in vivo* imaging; luciferase

mRNA 目前在疫苗开发、蛋白替代治疗、基因编辑、干细胞重编程和免疫治疗等多个方面均得到了广泛应用<sup>[1]</sup>。根据 mRNA 结构元件组成的不同, 当前 mRNA 平台主要分为未修饰的非复制型 mRNA、核苷修饰的非复制型 mRNA、自复制型的 mRNA 以及环状 mRNA<sup>[2]</sup>。由于 mRNA 的不稳定性和高固有免疫原性, mRNA 药物的设计需要考虑如何提高 mRNA 的半衰期、蛋白翻译效率并降低 mRNA 固有免疫原性, mRNA 组成结构的设计优化、mRNA 制备纯化以及 mRNA 的有效递送是 mRNA 药物

开发的主要方面<sup>[3-4]</sup>。

非复制型 mRNA 结构简单、片段长度小, 其结构元件主要包括开放阅读框 (open reading frame, ORF), ORF 两侧 5' UTR 和 3' UTR 两个非翻译区 (untranslated region, UTR), 一个通过三磷酸酯桥连接到第一个核苷酸上的 7-甲基鸟苷 (m7G) 并在 5'端第一个碱基 2 位甲基化形成 5'的 I 型帽子结构, 以及一个 3'多聚腺苷酸尾 (polyA tail)<sup>[3]</sup>。5'm7G 帽阻断细胞质 RNA 传感器例如 RNA 解旋酶视黄酸诱导基因 I (RIG- I) 的识别, 抑制 5'→3'外切酶介导的降

解, 招募翻译起始因子, 促进高效翻译。5' UTR 和 3' UTR 的长度、结构和调控元件的优化均有助于促进蛋白的表达。聚腺苷酸尾及其长度对于翻译和保护 mRNA 疫苗结构免受降解至关重要<sup>[3]</sup>。序列工程(密码子优化)和核苷修饰可以提高翻译效率<sup>[4]</sup>, 还会抑制 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)识别和对 mRNA 结构的先天免疫反应。对于 mRNA 的制备, 保证 mRNA 纯度至关重要<sup>[5]</sup>。DNA 依赖性 RNA 聚合酶在 RNA 合成过程中会产生小的寡核苷酸和双链 RNA 杂质, 去除这些被模式识别受体识别的杂质, 通过抑制 I 型干扰素和炎症细胞因子的产生, 促进翻译和蛋白质合成<sup>[6]</sup>。

化学修饰和序列优化改变了蛋白翻译的效率及 mRNA 的稳定性<sup>[4,7]</sup>, 但裸 mRNA 作为治疗或免疫手段仍旧存在很大的问题, 细胞对 mRNA 的摄取和转运效率低, 因此如何实现 mRNA 的高效递送是 mRNA 开发和应用的關鍵<sup>[5-6]</sup>。目前 mRNA 的递送系统可分为物理递送、化学递送和体外树突状细胞(dendritic cells, DCs)递送<sup>[3]</sup>。物理递送主要有活体基因导入仪和基因枪两种形式<sup>[8]</sup>, 化学递送主要研究的类型包括鱼精蛋白、聚合物、肽类和脂质体等几大类<sup>[3,9]</sup>。其中脂质体纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)是高效稳定的 mRNA 递送载体, 已成为当前 mRNA 疫苗开发中最常用的递送系统, 但在疫苗开发生产中, 一方面其中的核心脂质材料阳离子脂质有专利保护, 生产开发成本高; 另外, 有研究显示 LNP 靶向肝脏、心脏等器官, 可能是肝炎、心肌炎等的诱导因素, 其长期的安全性还有待时间的检验<sup>[10-11]</sup>。电穿孔于 1982 年首次应用于基因递送, 现已成为造血细胞类体外 mRNA 转染的有效方法, 用基因枪进行电穿孔为裸 mRNA 递送提供了有效途径<sup>[12]</sup>, 电穿孔增加了细胞膜的通透性, 大大

提高了 mRNA 大分子进入细胞的效率, 进而在体内完成目的蛋白的高效表达<sup>[12-13]</sup>。

为了研究电穿孔介导的 mRNA 在体内的蛋白表达情况, 本研究对编码荧光素酶蛋白的 mRNA 进行体外转录系统的构建并验证其有效性。体外转录制备的 mRNA 通过电穿孔递送入小鼠体内, 使用小动物活体成像系统通过对荧光光子量的连续观测来判断荧光蛋白表达量及蛋白表达持续时间。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒与细胞

质粒 pGEM-3Zf(+) 购自 Promega 公司, HEK293T(人胚胎肾细胞 293T) 购自 ATCC。

### 1.2 实验动物

动物实验使用体重 16-20 g 的雌性 7 周龄 SPF 级 Balb/c 小鼠, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司, 体内动物实验在上海巴斯德研究所伦理委员会的批准下进行(伦理批号: A2021026)。

### 1.3 主要试剂和仪器

MEGAscript™ T7 Transcription Kit、RNase-free Water、Lipofectamine2000 购自 Thermo fisher 公司, Vaccinia Capping System、mRNA Cap 2'-O-methyltransferase、RNase inhibitor 购自 Novoprotein 公司, A-Plus™ Poly(A) Polymerase Tailing Kit、修饰性核苷酸 methylpseudouridine-5'-triphosphate 购自 Cellscript 公司, 限制性内切酶 BamH I -HF 购自 NEB 公司, RL6000 RNA marker 购自 TaKaRa 公司, 荧光素酶底物 D-luciferin 购自 GLP BIO 公司, Luciferase Assay System 购自 Promega 公司, 兔源萤火虫荧光素酶单克隆抗体购自 Abcam 公司, 胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司, LiCl、EDTA、鼠源  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自 Sigma 公司。生物安全

柜、酶标仪、微量分光光度计 NanoDrop 2000 购自 Thermo fisher 公司, IVIS 小动物活体成像系统、气体麻醉机购自 PerkinElmer 公司, 冷冻离心机购自 GeneSpeed 公司, PCR 仪购自 Bio-Rad 公司, 基因导入仪购自上海塔瑞莎生物技术有限公司。

#### 1.4 mRNA 体外制备

pGEM-3Zf(+) 质粒的 T7 启动子元件后插入目的 mRNA 对应的模板序列, 包括 5' UTR、ORF 和 3' UTR, 序列末端引入 BamH I -HF 特异性酶切位点。mRNA 体外制备原理示于图 1, 即用限制性核酸内切酶 BamH I -HF 对质粒模板进行线性化, 通过切胶回收目的片段并使用胶回收试剂盒纯化得到线性化模板 DNA。采用转录后加帽加尾的策略体外制备 mRNA。以纯化后的线性化质粒为模板, 使用 MEGAscript™ T7 转录试剂盒按照试剂盒说明书进行体外转录, 但用修饰性核苷酸假尿苷 m<sup>1</sup>Ψ-5'-TP 代替尿苷酸得到含修饰性核苷酸的 RNA 产物。使用近岸生物公司的 vaccinia capping 加帽试剂盒和 2'-O-

甲基转移酶试剂盒按照标准试剂盒操作流程对 RNA 进行 cap 1 加帽。使用 A-Plus™ Poly(A) 加尾试剂盒选择试剂盒说明书中的标准加尾体系对 mRNA 进行加尾, 加尾长度约 120 nt。每一步 RNA 产物均使用 LiCl (75 mmol/L in EDTA) 沉淀进行纯化, 纯化产物使用微量分光光度计 (NanoDrop2000) 进行定量, 并通过普通琼脂糖凝胶电泳定性, 确保结果准确无误后将 mRNA 最终产物冷冻保存于 -80 °C 备用。

#### 1.5 蛋白表达体外验证

为了验证体外转录的 mRNA 产物的蛋白表达情况, 我们使用 mRNA 转染 HEK293T 细胞。96 孔板设置 mRNA 转染组和空白对照组, 每组两个平行, 每孔接种 5 000 个细胞, 使用 Lipo2000 试剂按照试剂盒说明书进行脂转, 每孔转染 300 ng mRNA, 转染后连续培养 24 h 后, 裂解细胞并使用 luciferase 相对荧光强度检测试剂盒检测相对荧光活性来间接说明蛋白的表达情况。为了验证体外转录的 mRNA 产物不同时间的蛋白表达情况, 我们使用上述同条件设置

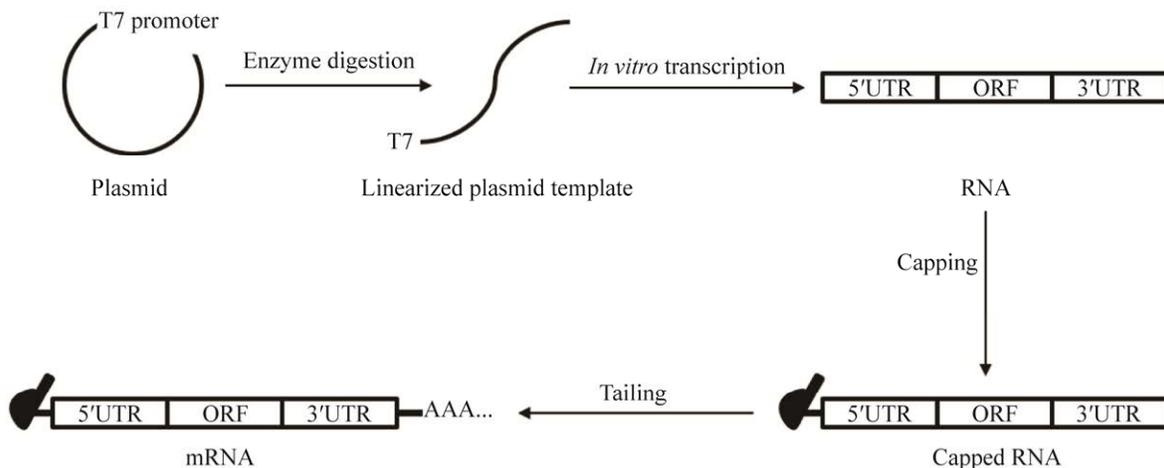


图 1 体外转录系统构建流程

Figure 1 Construction of *in vitro* transcription system. We used MEGAscript™ T7 transcription kit for *in vitro* transcription following the kit instructions, and cap 1 capping of RNA was performed using the capping kit and 2'-O-methyltransferase kit following the standard kit protocol. Using A-Plus™ Poly(A) tailing system tailing.

mRNA 转染组和空白对照组, 分别于 1、2、5、6、12、24、48、60 h 收样并进行检测。同时本研究还使用活体成像仪检测了荧光蛋白表达强度。为了验证蛋白表达, 我们还采用了 Western blotting 法检测, 通过收取 mRNA 转染 24 h 的 293T 细胞, 裂解后分别用抗  $\beta$ -actin 及 luciferase 抗体进行检测。

### 1.6 电穿孔介导的 mRNA 递送

为了进一步验证递送系统的可靠性, 以及研究电穿孔介导递送的 mRNA 于小鼠体内的蛋白表达情况, 小鼠随机分成两组, 实验组 10 只, 分两笼饲养, 每笼 5 只小鼠, 对照组 5 只, 实验组用活体基因导入仪递送裸 mRNA, 每只小鼠电转量为 5  $\mu$ g mRNA, 体积 30  $\mu$ L, 基因导入仪选择仪器电转条件为电压 30 V, 6 次脉冲, 在小鼠后腿肱四头肌肌肉注射, 在注射部位给定短时脉冲导入 mRNA; 对照组每只小鼠同条件递送 30  $\mu$ L 体积的磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS)。

### 1.7 生物发光成像

小鼠称重, 按照 150 mg/kg 剂量腹腔注射底物 D-luciferin (15 mg/mL), 小鼠置于预麻盒使用异氟烷进行气体麻醉, 经前期底物荧光动力学分析, 选择底物注射后第 15 分钟使用 IVIS 成像系统进行活体生物发光成像。用 Living Image 软件 v4.4 确定目标区域的总光子量。在 mRNA 导入后 4 h 和 24 h 时间点进行小动物活体成像, 之后每隔 24 h 重复活体生物发光成像, 直至荧光强度接近背景值停止检测。

### 1.8 统计分析

使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。实验采用单因素方差分析进行分析, 使用  $t$  检验分析, 当  $P$  值  $< 0.05$  表明差异显著 (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 构建的体外转录系统

对于 mRNA 体外制备和储存过程, 本研究全部选择使用无酶耗材、无酶试剂并在无 RNase 污染的洁净环境下进行实验操作, 在体外转录、加帽和加尾的制备体系中加入 RNase 抑制剂 (RNase inhibitor), 保证在制备过程中 RNA 不被降解, 制备得到的 mRNA 于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存, 保证 RNA 在长时间储存过程中不被降解; 裸 mRNA 递送至体内后, 随时伴随着被 RNase 降解的风险, 一方面 RNA 在体内可自然降解是 RNA 应用于药物研发安全性的体现, 另一方面需要延长 mRNA 半衰期保证有效的蛋白表达强度和持续时间, 通过非编码区优化、加帽、加尾、修饰性核苷酸的引入以及密码子优化等方式能够抑制 RNase 对 mRNA 的识别和降解, 从而延长 mRNA 的半衰期。本研究以荧光素酶蛋白作为指示蛋白, 通过小动物活体成像指示了 mRNA 在小鼠体内表达的持续时间。

构建编码荧光素酶的重组质粒, 通过普通琼脂糖凝胶电泳及测序验证质粒序列准确无误, 用 BamH I -HF 进行酶切线性化, 各孔重复酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果如图 2A, 结果显示酶切条带单一、片段大小正确。以线性化的质粒为模板进行体外转录, 用 LiCl 进行纯化, 并通过琼脂糖凝胶电泳检验 RNA, 图 2B 中使用已知片段大小的指示用 RNA 作为对照 (control) RNA, 结果表明, RNA 产物条带单一、大小正确, 可用于后续实验。

### 2.2 mRNA 体外转染效果

用 mRNA 转染 HEK293T 细胞, 验证系统的体外表达情况, 转染细胞裂解后检测相对荧光素酶蛋白表达以及相对荧光素酶活性。如图 3A 所示, luc-mRNA 为转染组, blank 为空白对

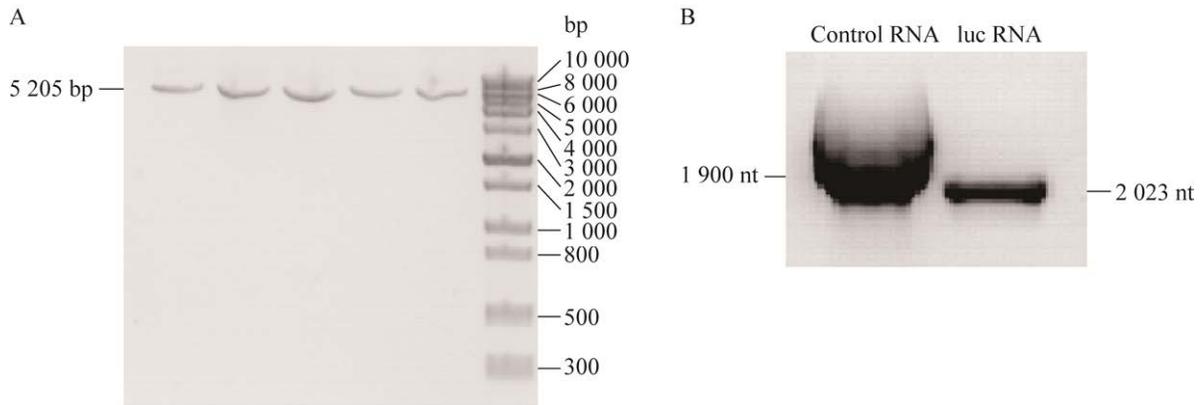


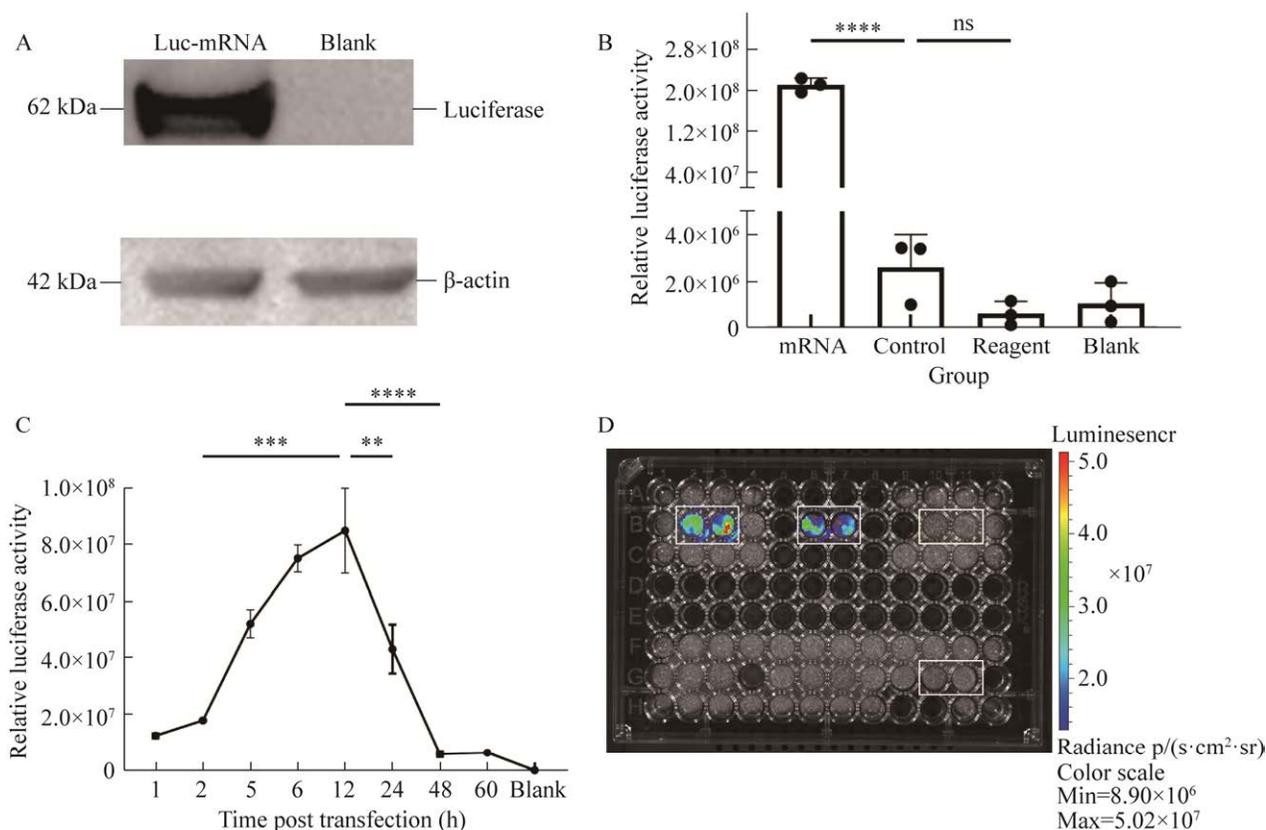
图2 线性化重组质粒琼脂糖凝胶电泳 (A) 与 RNA 琼脂糖凝胶电泳 (B)

Figure 2 The agarose gel electrophoresis images of the linearized recombinant plasmids were repeated for each well and RNA agarose gel electrophoresis images. (A) The results showed that the enzymatic bands were single and the fragment size was correct. (B) Using known fragment size mRNA as indicator RNA. The RNA product band was single and of the correct size and was used for subsequent experiments.

对照组，通过检测相同蛋白上样量的不同实验组对应的蛋白表达情况， $\beta$ -actin 作为内参在两组中表达量近一致，空白对照组没有表达出萤火虫荧光素酶蛋白，而转染组明显检测到了萤火虫荧光素酶的蛋白。这表明该系统初步构建成功，可以进一步验证蛋白活性及其功能。图 3B 所示，mRNA 组为脂转 mRNA 实验组，control 组为脂转未加帽加尾的 mRNA 对照组、reagent 组为脂转试剂对照组、blank 组为空细胞对照组，结果表明，mRNA 转染组检测到显著 ( $P \leq 0.001$ ) 高于对照组的荧光强度，即 mRNA 在 HEK293T 细胞内成功表达荧光素酶蛋白，进一步说明体外转录系统构建的成功。图 3C 表明，荧光素酶蛋白在 mRNA 转染细胞 1 h 后即可被检出，在 12 h 时强烈表达，在 24 h 之后开始下降，以荧光素酶活性记，从其达到高峰表达的时间点计算，荧光素酶在细胞内的半衰期为 12 h。

为了进一步说明转染后细胞内蛋白表达水平，以及体外成像系统的适用性，对 mRNA 脂

转 24 h 后的 HEK293T 细胞进行体外成像，如图 3D 所示，luc-mRNA 为脂转 mRNA 实验组，并设置 300 ng/孔 mRNA 转染的实验组 (蓝色方框内孔，孔 B2、B3、B5、B7；每孔转染 600 ng/ $\mu$ L mRNA)，转染 mRNA 但未加底物对照组 (黄色方框内孔，孔 B10、B11；每孔转染 600 ng/ $\mu$ L mRNA)，control 为脂转未加帽加尾的 RNA 对照组 (红色方框内孔，孔 G10、G11)。图 3D 为经 IVIS 成像系统的分析软件 living image 对成像系统捕获的发射光进行定量和显示得到的伪彩图，不同的颜色代表了不同的发光值 (光子数)，由蓝色到红色的渐变分别对应发光值由低到高的变化，右侧的颜色列表展示了  $1.0 \times 10^7 - 5.0 \times 10^7$  p/(s·cm<sup>2</sup>·sr) 不同发光值 (光子数) 对应的颜色。发光值间接反映荧光素酶蛋白的表达量。结果表明，对照组未检测到荧光强度，300 ng/孔转染量的实验组检测到较高强度的荧光，对应较高的蛋白表达水平，成像系统适用于所构建的 mRNA 体外转录系统，可进一步用于小鼠体内转染效果评价。



**图 3 mRNA 转染后的蛋白表达鉴定**

Figure 3 Protein expression after mRNA transfection. (A) 293T cells were transfected with Luc mRNA, lysed and subjected to Western blotting, and the results of internal reference proteins were nearly consistent, the transfected group obviously expressed firefly luciferase protein, while the blank group did not. (B) Relative luciferase activity (RLA) after mRNA transfection. Significantly ( $P \leq 0.001$ ) higher fluorescence intensity was detected in the mRNA transfected group than in the control group. (C) The relative luciferase activity (RLA) at different time points after mRNA transfection. The RLA at 12 h versus 24 h after mRNA transfection was significantly higher than that at 48 hours versus 60 hours and significantly different from that of the blank group. (D) Bioluminescence image after mRNA transfection. No fluorescence was detected in the control group, and a higher intensity of fluorescence, corresponding to a higher protein expression level, was detected in the experimental group with a transfection amount of 300 ng/well. Data were analyzed by one-way ANOVA ( $n=3$ , ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; compared with control).

## 2.3 mRNA 体内转导效果

### 2.3.1 实验动物观察

对电导后的小鼠进行连续观测发现, 实验组 (Ep-mRNA) 和对照组 (control) 小鼠皮毛颜色正常, 状态良好, 处于健康的生命状态, 连续观测的两周内体重结果 (图 4) 表明, 小鼠体重在电转 mRNA 前后无明显差异, 电导 mRNA 未对小鼠产生明显的副作用。

### 2.3.2 mRNA 体内蛋白表达

为了研究电穿孔介导的 mRNA 在小鼠体内的蛋白表达情况, 肌肉电穿孔给药后使用小动物活体成像系统连续监测蛋白表达, 监测周期为 28 d。生物发光图像可以观测到蛋白表达部位及蛋白表达强度的分布, 图 5 为经 IVIS 成像系统的分析软件 living image 对成像系统捕获的发射光进行定量和显示得到的伪彩图, 不同

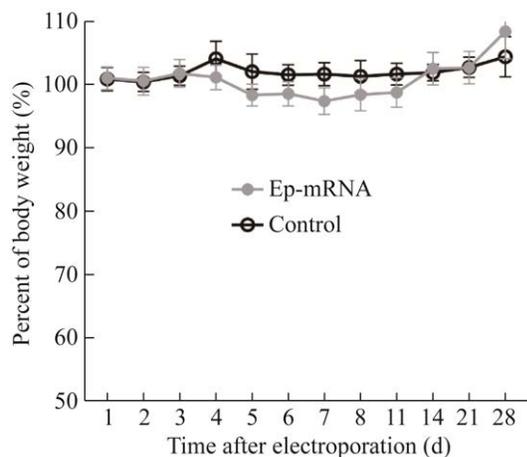


图4 电导 mRNA 后小鼠体重变化

Figure 4 Body weight changes of mice after mRNA delivery by electroporation. Mice did not differ in body weight before and after electroporation of mRNA, and conductance mRNA did not cause obvious side effects to the mice.

的颜色代表了不同的发光值，由蓝色到红色的渐变分别对应发光值由低到高的变化，右侧颜色列表展示了  $0.4 \times 10^6 - 1.0 \times 10^6$  p/(s·cm<sup>2</sup>·sr) 不同发光值对应的颜色。mRNA 电导后 4 h，8 只小鼠在注射部位观测到荧光表达，两只未观测到；电导后 24 h，10 只小鼠均观测到荧光强度，包括之前未检测到的两只，其中两只小鼠荧光强度较第 4 小时呈降低趋势，其余小鼠荧光强度均呈增强趋势；电导后 72 h，有 1 只小鼠未观测到荧光，荧光强度整体较第 24 小时呈下降趋势，但有 3 只小鼠观测到的荧光强度仍维持或呈增强趋势。通过小动物活体成像中 ROI 值的计算可以更直观地显示各个小鼠荧光素酶作用于底物产生的荧光情况，图 6 则展示了各个小鼠电导 mRNA 后检测到的总光子通量，由图 6 可知小鼠个体间蛋白表达差异明显，尤其在 mRNA 转导后的第 1 到第 4 天，总光子通量达到一个数量级的差异；在第 48 小时，实验组小鼠整体的总光子通量达到峰值；在第 14 天，

所有小鼠总光子通量基本达到一致。

所有小鼠均成功表达了荧光素酶蛋白，光子总量最大值达到了  $10^7/s$ ，表明电穿孔介导的 mRNA 的体内表达是成功的，但蛋白表达强度和持续时间存在较大的小鼠个体间差异。

### 3 讨论

荧光素酶是常用的蛋白表达指示蛋白<sup>[6]</sup>，可以作用于荧光素酶底物产生荧光，荧光强度与荧光素酶表达量呈正相关，相较于生物发光法，荧光法检测灵敏度高且能够很好地降低小鼠活体成像的背景噪音，故本研究选择萤火虫荧光素酶为靶标蛋白研究非复制型 mRNA 的构建和蛋白体内表达。

非复制型 mRNA 的平台构建包括 mRNA 序列设计、mRNA 的制备和 mRNA 的递送和检测 3 个部分<sup>[3]</sup>。mRNA 的组成结构元件及整体序列结构的设计和改造对于提高 mRNA 的稳定性和翻译效率至关重要，是 mRNA 应用平台的核心技术之一<sup>[3,5]</sup>。对非编码区的优化可有效提高 mRNA 的稳定性，5' UTR 还对 mRNA 翻译效率的提高具有重要影响，引入经典 Kozak 序列提高翻译效率和避免稳定二级结构的出现是该序列区域两个重要关注点<sup>[7,4-15]</sup>。目前有多种来源和改造的 UTR 可选择，但是尚未有最佳选择的标准依据。当前人  $\beta$ -珠蛋白和  $\alpha$ -珠蛋白的非编码区序列选用最为广泛，也是本研究中选择的序列<sup>[5,15]</sup>。对编码区密码子的优化可以有效提高蛋白表达量，随着人们对密码子和蛋白翻译过程的研究深入，密码子优化的概念和策略也在不断细化和推进，以达到提高蛋白翻译速率和保证蛋白折叠准确性相平衡的目的<sup>[7,15]</sup>，本研究使用成熟的密码子优化软件对荧光素酶编码基因进行了鼠源密码子优化。帽子结构是

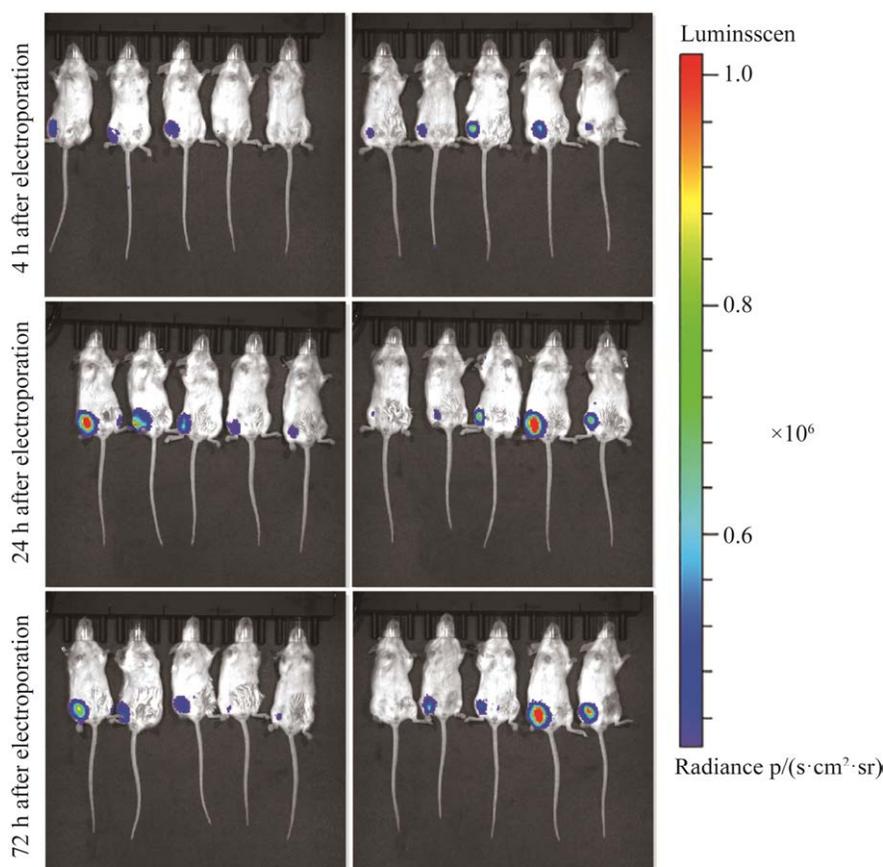


图 5 电穿孔 4 h、24 h 和 72 h 后的体内生物发光图像

Figure 5 *In vivo* bioluminescence images 4 h, 24 h, and 72 h after electroporation. At 4 h after mRNA conductance, fluorescence expression was observed at the injection site in eight mice and not in two; At 24 h after conductance, fluorescence intensity was observed in all 10 mice.

真核细胞翻译起始识别位点，也可保护其不被 RNA 核酸外切酶识别，延缓 mRNA 降解速率，是 mRNA 体外构建必不可少的一部分<sup>[3,12,16]</sup>。真核细胞内 mRNA 的降解通常是从聚腺苷酸尾 (polyA) 的降解开始的，除此之外 polyA 也参与 mRNA 的翻译起始，有研究显示，polyA 尾长度为 120 nt 可以达到最好的蛋白翻译效率<sup>[15,17]</sup>，但在不同细胞种类中显示出差异，本研究选择 120 nt 的加尾长度。对于整体序列，还需关注 GC 含量、过度稳定的 mRNA 二级结构和小 RNA 结合位点等<sup>[3,9,15]</sup>。

使用修饰性核苷酸可以显著降低 mRNA 的

固有免疫原性，从而进一步提高 mRNA 的半衰期，降低 mRNA 副作用<sup>[4,18]</sup>。该平台选择使用修饰性核苷酸 7-甲基-假尿嘧啶代替尿嘧啶 (U)。对于 mRNA 的制备，体外转录模板可以选择 PCR 扩增法或质粒线性化两种方式制备，考虑到突变位点引入概率我们选择线性化质粒为模板，并用转录后加帽加尾的策略制备 mRNA。用高效转录的 T7 RNA 聚合酶进行体外转录，使用酶法进行两步加帽可以达到 99% 以上的 I 型帽子结构的加帽效率，酶法加尾可通过调整加尾体系和孵育时间等条件得到适宜的加尾长度<sup>[19]</sup>。T7 RNA 聚合酶转录过程中会

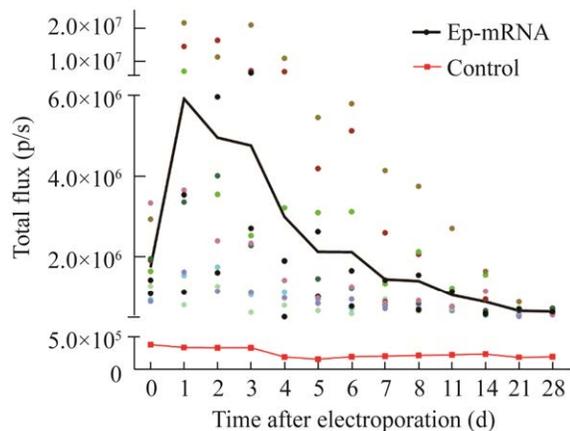


图6 小动物活体成像总光子量变化

Figure 6 Total flux changes of small animal intravital imaging after electroporation. All mice successfully expressed luciferase protein, with a maximum of  $10^7/s$  total photons, indicating that electroporation mediated mRNA expression *in vivo* was successful.

产生双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA), 用高效液相色谱法或纤维素法对 mRNA 进行纯化可以有效降低 dsRNA 的污染, 从而进一步降低 mRNA 的固有免疫原性和提高 mRNA 翻译效率<sup>[20]</sup>。考虑到 dsRNA 的含量较低且有研究显示固有免疫原性的降低可能是 mRNA 二级结构被打开, 该研究中 mRNA 的制备暂未做进一步纯化处理。按照以上序列设计和制备方法得到的 mRNA 样品, 经体外转染 HEK293T 检测蛋白表达, 初步验证了该表达系统的可行性且蛋白获得表达。

mRNA 为带负电的大分子, 需要借助物理或化学方法才能达到有效的胞内递送<sup>[18,21]</sup>。电转通过改变细胞膜通透性使得 mRNA 大分子易于穿过细胞膜进入细胞质, 之后细胞膜恢复初始状态<sup>[14,16]</sup>。研究表明, 脂质体递送可以有效保护 mRNA 不被核酸酶快速降解, 延长 mRNA 半衰期, 提高 mRNA 的细胞摄取效率<sup>[11,22]</sup>。本研究选择电穿孔方式进行 mRNA 的体内递送,

一方面电穿孔技术已广泛应用于 DNA 等大分子的递送, 具有一定的安全性和有效性保障, 另一方面可以避免其他外源化学物质的引入, 排除对研究 mRNA 表达的干扰。

外源 mRNA 会被细胞内的固有免疫识别受体例如 Toll 样受体 (TLR) 识别, 诱导产生炎症反应<sup>[23]</sup>; 电转也可能造成一定的物理损伤<sup>[14,24]</sup>, 所以 mRNA 经电穿孔介导进入小鼠体内后, 我们对小鼠的健康状况进行了监测并重点关注了小鼠体重指标, 以确定该 mRNA 平台的安全性, 结果表明, 电穿孔的方式未对小鼠体重造成显著性下降, 健康状况也未受到影响。

靶标蛋白的表达强度和持续时间是 mRNA 药物评价重要的指标之一<sup>[25-26]</sup>。本研究通过小动物活体成像系统检测荧光素酶作用于底物产生的荧光强度间接反映荧光素酶蛋白的表达量和持续时间, 结果显示本研究实现了 mRNA 在小鼠体内的原位表达。实验中观测到小鼠个体间蛋白表达强度和蛋白活性持续时间不一致的情况, 造成该差异的可能原因包括小鼠个体间差异、mRNA 的不稳定性、基因导入仪仪器本身的不稳定性以及实验操作差异例如注射部位的选择、电极插入深度等, 对于该不一致性的情况仍需在未来进行深入探究。

本研究构建了一种电穿孔介导的非复制型 mRNA 平台, 研究了 mRNA 在小鼠体内的表达特征。该平台可在非编码区优化、密码子优化、mRNA 纯化、mRNA 递送等方面进行进一步的优化并有望应用于 mRNA 疫苗或基因治疗药物的研发。

## REFERENCES

- [1] Pascolo S. Messenger RNA-based vaccines. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4(8): 1285-1294.
- [2] Li B, Luo X, Dong YZ. Effects of chemically modified messenger RNA on protein expression. *Bioconjugate*

- Chem, 2016, 27(3): 849-853.
- [3] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(4): 261-279.
- [4] Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt SC, et al. N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J Control Release*, 2015, 217: 337-344.
- [5] Ulmer JB, Mason PW, Geall A, et al. RNA-based vaccines. *Vaccine*, 2012, 30(30): 4414-4418.
- [6] Krammer F. Novel universal influenza virus vaccine approaches. *Curr Opin Virol*, 2016, 17: 95-103.
- [7] Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*, 2008, 16(11): 1833-1840.
- [8] Roos AK, Eriksson F, Timmons JA, et al. Skin electroporation: effects on transgene expression, DNA persistence and local tissue environment. *PLoS One*, 2009, 4(9): e7226.
- [9] Kormann MSD, Hasenpusch G, Aneja MK, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 154-157.
- [10] Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, 2017, 543(7644): 248-251.
- [11] Maier MA, Jayaraman M, Matsuda S, et al. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Mol Ther*, 2013, 21(8): 1570-1578.
- [12] Huysmans H, De Temmerman J, Zhong ZF, et al. Improving the repeatability and efficacy of intradermal electroporated self-replicating mRNA. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 17: 388-395.
- [13] Zehrung D, Jarrahan C, Wales A. Intradermal delivery for vaccine dose sparing: overview of current issues. *Vaccine*, 2013, 31(34): 3392-3395.
- [14] Leyman B, Huysmans H, Mc Cafferty S, et al. Comparison of the expression kinetics and immunostimulatory activity of replicating mRNA, nonreplicating mRNA, and pDNA after intradermal electroporation in pigs. *Mol Pharm*, 2018, 15(2): 377-384.
- [15] Zhong ZF, Mc Cafferty S, Combes F, et al. mRNA therapeutics deliver a hopeful message. *Nano Today*, 2018, 23: 16-39.
- [16] Cu Y, Broderick KE, Banerjee K, et al. Enhanced delivery and potency of self-amplifying mRNA vaccines by electroporation *in situ*. *Vaccines*, 2013, 1(3): 367-383.
- [17] Knudsen ML, Ljungberg K, Liljeström P, et al. Intradermal electroporation of RNA. *Methods Mol Biol Clifton N J*, 2014, 1121: 147-154.
- [18] Li B, Zhang XF, Dong YZ. Nanoscale platforms for messenger RNA delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2019, 11(2): e1530.
- [19] Richner JM, Himansu S, Dowd KA, et al. Modified mRNA vaccines protect against zika virus infection. *Cell*, 2017, 168(6): 1114-1125.e10.
- [20] Fotin-Mleczek M, Duchardt KM, Lorenz C, et al. Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *J Immunother*, 2011, 34(1): 1-15.
- [21] Karikó K, Weissman D. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2007, 10(5): 523-532.
- [22] Gilboa E, Vieweg J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev*, 2004, 199: 251-263.
- [23] Ramaswamy S, Tonnu N, Tachikawa K, et al. Systemic delivery of factor IX messenger RNA for protein replacement therapy. *PNAS*, 2017, 114(10): E1941-E1950.
- [24] Petsch B, Schnee M, Vogel AB, et al. Protective efficacy of *in vitro* synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(12): 1210-1216.
- [25] 于玲莉, 李香玉, 陈桂良, 等. mRNA 药物的研发及挑战. *中国新药杂志*, 2021, 30(22): 2029-2033. Yu LL, Li XY, Chen GL, et al. Development and challenges of mRNA-based therapeutics. *Chin J New Drugs*, 2021, 30(22): 2029-2033 (in Chinese).
- [26] 孙程洁, 成殷, 王冲. mRNA 疫苗的研究进展及监管概述. *中国药事*, 2022, 36(1): 1-9. Sun CJ, Cheng Y, Wang C. Research progress and regulatory overview of mRNA vaccine. *Chin Pharm Aff*, 2022, 36(1): 1-9 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)