

고분해능 LC/MS를 이용한 mRNA 5' 캡핑의 신속 분석

저자

Brian Liau
Agilent Technologies, Inc.

서론

현재 진행중인 SARS-CoV-2 팬데믹으로 인해 mRNA의 산업 규모 생산이 더욱 주목을 받고 있습니다. mRNA 백신은 바이러스에 대항하는 가장 효과적인 도구 중 하나로 입증되었으며 *in vitro* 전사(IVT)에 의해 합성된 고품질 mRNA에 의존합니다.¹ mRNA의 단백질로의 효율적인 번역은 전사 과정 동안² 또는 이후³ mRNA에 붙게 되는, 캡핑이라 불리는 5' 말단 디뉴클레오타이드 변형에 따라 크게 달라집니다. 중요한 것은, 성공적으로 캡핑된 물질의 백분율과 덧붙은 캡핑 구조의 유형은 투입된 물질의 품질, 반응 조건, mRNA 시퀀스와 같은 요인에 영향을 받습니다. 따라서 mRNA 5' 캡핑은 철저하게 특성을 규명하고 모니터링해야 하는 주요 품질 속성입니다.

본 연구는 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF를 사용하여 시료 전처리 및 분석 시간을 합쳐 75분 만에 신속한 mRNA 캡핑 분석을 수행합니다. 시료 전처리는 내열성 효소를 사용하여 높은 반응 온도에서 캡핑 구조를 포함하는 5' 말단 올리고뉴클레오타이드의 유리를 가속화합니다(그림 1). 그런 다음 캡핑된 올리고뉴클레오타이드는 간단한 클린업 절차 후 AdvanceBio Oligonucleotide 컬럼을 사용하여 시료 매트릭스로부터 분리합니다.

이 분석법의 유용성을 입증하기 위해, 까다로운 mRNA 시퀀스에 대한 Vaccinia 효소 캡핑 반응을 최적화합니다. 연구 결과는 핵산 치료제의 프로세스 최적화 및 품질 관리를 위한 고감도의 효율적인 분석법으로서 고분해능 LC/MS의 가치를 보여줍니다.

본 연구에 사용된 약어

- DNA: Deoxyribosenucleic acid
- PCR: Polymerase chain reaction
- mRNA: Messenger ribonucleic acid
- ARCA: Anti-reverse cap analogue
- UTR: Untranslated region
- GTP: Guanosine triphosphate
- NTP: Nucleoside triphosphate
- SAM: S-adenosylmethionine

실험

모든 PCR 프라이머와 합성 RNA/DNA 키메라 프로브는 Integrated DNA Technologies에서 합성했습니다.

in vitro 전사 및 mRNA 캡핑

T7 프로모터의 ~3,800nt 이하 시퀀스 다운스트림 모델을 인코딩하는 플라스미드는 Sino Biological에서 구입했습니다. 시퀀스는 코딩 영역뿐만 아니라 5' 및 3' UTR을 포함했습니다.

T7 프로모터 및 관심 시퀀스는 Herculase II Fusion DNA 종합효소 키트(애질런트 제품 번호 600677)를 사용하여 PCR 증폭했고, StrataPrep PCR 정제 키트(애질런트 제품 번호 400771)를 사용하여 클린업했습니다. PCR 반응의 특이성 및 산물의 농도는 DNA 7500 키트(제품 번호 5067-1506)를 통해 Agilent 2100 Bioanalyzer 기기에서 측정했습니다.

그런 다음, PCR 산물은 제조업체 권장 프로토콜에 따라 T7 RNA 종합효소(New England Biolabs M0251)를 사용하여 mRNA에 전사되었습니다. DNA 주형 및 잔류 PCR 프라이머를 제거하기 위해, 100µL의 *in vitro* 전사 반응물을 DNase-I(New England Biolabs M0303) 분해 전에 뉴클레아제가 없는 물 100µL로 희석했습니다. 이어서 mRNA는 8M LiCl 70µL를 첨가하여 침전시키고, -20°C에서 밤새 냉각시킨 후 12,000xg 4°C에서 15분 동안 원심분리하였습니다. mRNA 침전물을 70% 에탄올에서 2회 세척하여 공기로 건조시킨 다음 뉴클레아제가 없는 물에 용해하고 RNA 6,000 나노 키트(제품 번호 5064-1511)를 장착한 Agilent 2100 Bioanalyzer 기기를 사용하여 정량했습니다. 그 후 mRNA 5µg의 분취액을 제조하여 -80°C에서 동결시켰습니다.

mRNA 캡핑에는 두 가지 방법이 사용되었습니다.

- 1) ARCA를 이용한 동시 전사(Co-transcriptional) 캡핑
- 2) Vaccinia 캡핑 효소를 이용한 효소 캡핑

ARCA 캡핑의 경우, mRNA 시료는 GTP 대 ARCA 비율이 4:1인 NTP 혼합물로 전사되었습니다. 효소 캡핑의 경우는, 5~10µg의 정제된 캡핑되지 않은 mRNA를 Vaccinia 캡핑 시스템 키트(New England Biolabs M2080)를 사용하여 캡핑한 다음 Monarch RNA 클린업 키트(New England Biolabs T2040)를 사용하여 정제하고 분석 전에 뉴클레아제가 없는 물에 용리했습니다.

위치 지정 RNase-H 절단

용액 내 RNase-H의 위치 지정 절단은 Lapham, J. 등에 의해 설명된 대로 구현되었습니다.⁴ 15nt 키메라 2'-O-methyl RNA/DNA 프로브는 mRNA 시료(그림 1)에 상보적으로

설계되었으며 다음 두 가지 조건에서 RNase-H 절단 위치를 지정하는 데 사용되었습니다. (1) 1시간동안의 열을 가한 어닐링 후 37°C에서 RNase-H로 30분간 절단, 또는 (2) 50°C에서 내열성 RNase-H로 30분간 분해. 절단 후, 5' 캡을 포함하는 길이 40nt 또는 50nt의 올리고뉴클레오타드가 유리되고 분해된 시료는 Small RNA 키트(제품 번호 5067-1548)로 Agilent 2100 Bioanalyzer 기기에서 시각화하기 전 Monarch RNA 클린업 키트(New England Biolabs T2040)를 이용하여 정제했습니다.

5' 캡핑 올리고뉴클레오타드의 LC-DAD/MS 기기

- 1290 Infinity II LC, 다이오드 어레이 검출기(제품 번호 G7117B) 장착
- 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

알칼리 금속 첨가물을 줄이기 위해 유로에서 유리를 제거하는 데 주의하였습니다. Agilent Nalgene 병(제품 번호 9301-6460)을 이동상 용기로 사용했으며 각 용매 라인에는 스틸 프리티 장착되었습니다. 애질런트 폴리프로필렌 시료 바이알이 사용되었습니다(제품 번호 5190-2242). 매일 실험을 시작하기 전에 LC 시스템과 컬럼을 50% MeOH + 0.1% 포름산 용액으로 30분 동안 세척하여 알칼리 금속 첨가물을 더욱 감소시켰습니다.

분해된 mRNA 시료는 AdvanceBio Oligonucleotide 컬럼 (2.1 x 50mm, 2.7µm, 120Å, 제품 번호 659750-702)에서 분리했습니다. 이동상 및 LC 그레디언트는 표 1에, 질량 분석기 설정은 표 2에 나타냈으며, 데이터 분석은 표 3의 deconvolution 설정으로 MassHunter BioConfirm 10.0에서 수행했습니다.

표 1. 이동상 및 LC 그레디언트.

Agilent 1290 Infinity II LC 시스템		
컬럼	AdvanceBio Oligonucleotide, 2.7µm, 2.1 x 50mm, 120 Å	
용매 A	15mM dibutylamine + 25mM HFIP 초순수 증류수 용액	
용매 B	15mM dibutylamine + 25mM HFIP 메탄올 용액	
그레디언트	시간(분)	%B
	0	10
	4	30
	25	51
	25~28	90
컬럼 온도	50°C	
유속	0.4mL/분	
주입량	20µL	
주입당 mRNA	2µg	

표 2. 질량 분석기 설정.

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
수집 모드	음이온, 표준(3,200m/z) 질량 범위, 고감도(2Ghz)
가스 온도	350°C
가스 유속	12L/분
Nebulizer	25psig
Sheath 가스 온도	275°C
Sheath 가스 유속	10L/분
V _{cap}	4,500V
노즐 전압	2,000V
Fragmentor	250V
스키머	65V
MS1 범위	400~3,200m/z
MS1 스캔 속도	2Hz
기준 질량	1,033.9881

표 3. Deconvolution 설정.

MassHunter BioConfirm 10.0 설정	
추출 크로마토그램(MS)	다이오드 어레이 검출기
MS1 지연 시간	0.06초
Decon. 알고리즘	최대 엔트로피
베이스라인 제거	1
첨가 이온	양성자 손실
질량 범위	10,000~30,000Da
질량 단계	0.5Da
제한된 m/z 범위 사용	1,040~3,200

결과 및 토의

전체 길이의 mRNA는 일반적으로 표준 LC/MS 분석에 너무 크기 때문에 먼저 RNase-H 위치 지정 절단을 최적화했습니다. 두 개의 RNA/DNA 키메라 프로브를 5' UTR 내에서 서로 다른 서열에 상보적으로 설계하여, RNase-H 절단을 뉴클레오티드 40 또는 50 (그림 1A)이 되도록 지정함으로써 5' 캡핑 구조를 가진 40nt 또는 50nt 길이의 올리고뉴클레오티드가 성공적으로 절단되어 유리될 수 있도록 했습니다. 이러한 작은 5' 캡핑된 올리고뉴클레오티드는 LC/MS 분석에 적합합니다.

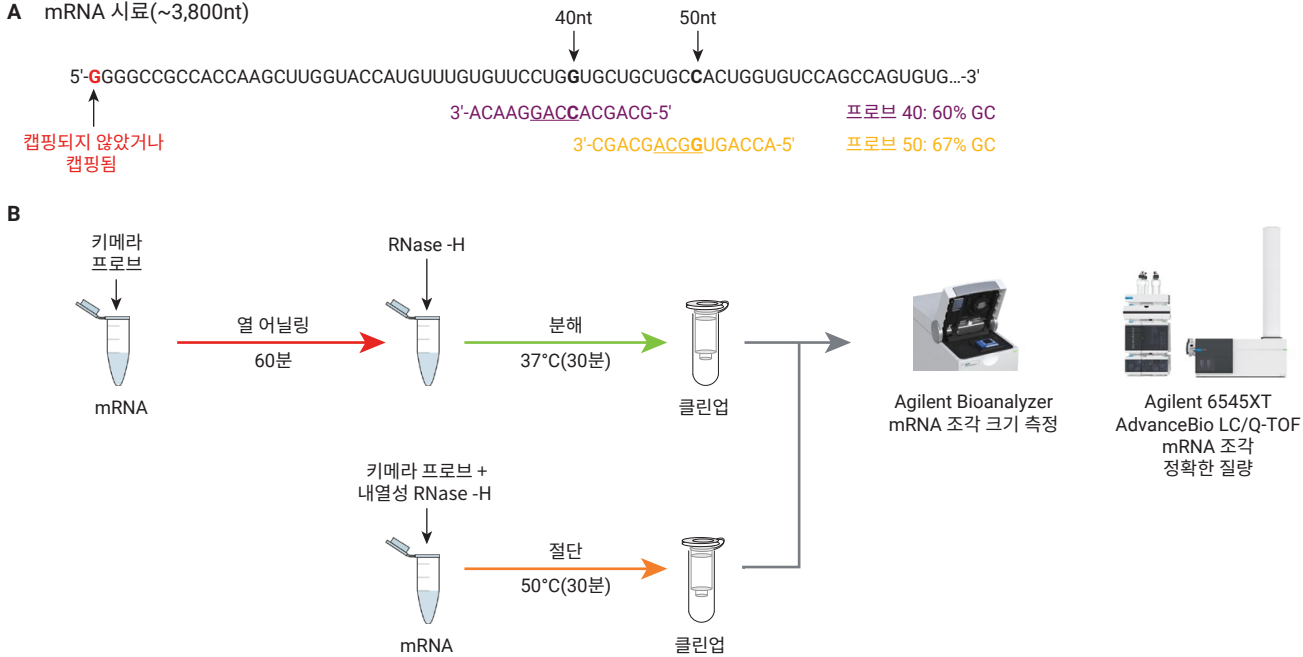


그림 1. mRNA 시료 전처리 및 분석. (A) mRNA 시료에 상보적인 키메라 프로브를 40nt(보라색) 및 50nt(금색)에서 RNase-H 절단 위치로 지정하도록 설계되었습니다. 밑줄 친 프로브 뉴클레오티드는 DNA로 구성되었고, 그렇지 않은 경우 2'-O-methyl RNA로 구성되었습니다. (B) 비내열성(상단) 또는 내열성 RNase-H(하단)를 이용한 시료 전처리 도식도. 하단 도식도를 이용한 총 분석 시간: 절단(30분) + 클린업(10분) + LC/MS(25분) + 데이터 분석(10분) = 75분.

다른 발현물에서와 같이⁵, 이러한 실험에 대한 일반적인 워크플로는 비내열성의 RNase-H 효소를 추가하기 전에 별도의 1시간동안 열을 가한 어닐링 단계 후 37°C에서의 시료 분해 과정을 수반합니다(그림 1B, 상단 도식도). 열 어닐링 중에 사용되는 고온(~95°C)이 다음과 같은 상황을 야기할 수 있기 때문에 별도의 단계가 필요합니다. (1) 비내열성 RNase-H를 변성시키고, (2) 반응 완충액에 존재하는 2가 양이온으로 인한 mRNA 가수분해를 촉진할 수 있습니다.⁶

본 연구에서는 충분히 높은 GC 함량의 키메라 프로브를 사용할 경우 내열성의 RNase-H(그림 1B, 하단 도식도)를 사용해 적당히 상승된 온도인 50°C에서 절단 반응을 수행하여 이를 촉진할 수 있다고 가정했습니다. 원칙적으로, 온도가 상승하면 mRNA 2차 구조가 풀리게 되어 높은 GC 함량의 키메라 프로브가 그들의 상보적 mRNA 영역에 결합하고 내열성의 RNase-H에 의해 절단 위치를 지정할 수 있을 것으로 예상됩니다.

그림 2와 같이, 위치 지정 절단은 비내열성 또는 내열성 RNase-H로 두 개의 서로 다른 높은 GC 함량의 프로브(프로브 40 및 프로브 50, 각각 >60% GC)를 사용하여 수행되었습니다. 결과 분해물은 Small RNA 키트(제품 번호 5067-1548)를 사용한 Agilent 2100 Bioanalyzer 자동 전기영동 도구를 통해 분리했으며 Virtual gel image 표현을 사용하여 정성적으로 평가했습니다.

프로브 40 및 프로브 50 모두 모든 조건에서 mRNA 시료의 절단 위치를 성공적으로 지정했습니다. 그러나 프로브 50은 비내열성 RNase-H 사용 시 비표적 결합이 나타나 원치 않는 산물을 야기했습니다(그림 2, 빨간색 화살표). 내열성 RNase-H를 사용한 경우 프로브 50은 특정 절단 위치를 지정하여 보다 짧은 시간 내에 더 깨끗한 시료를 얻을 수 있었습니다.

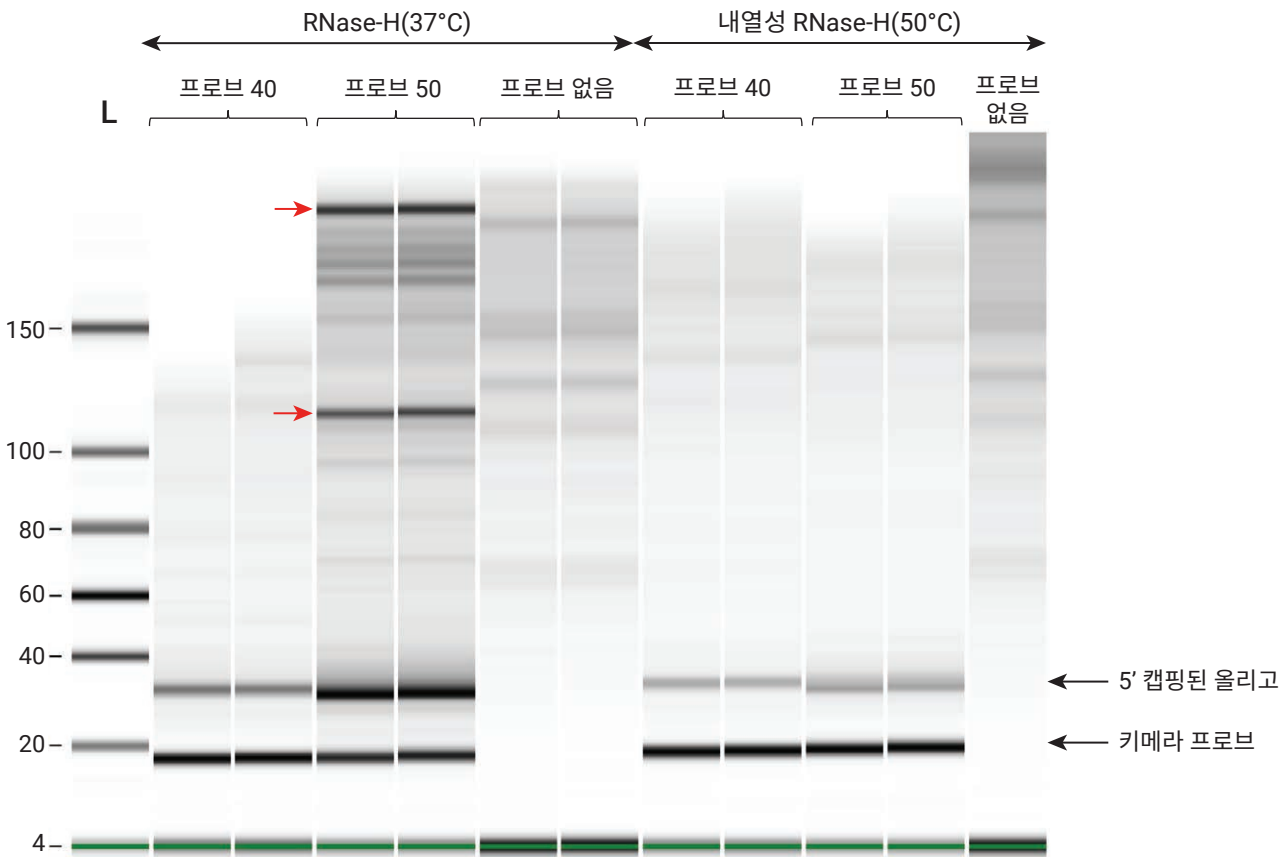


그림 2. 내열성 및 비내열성 RNase-H를 사용한 위치 지정 절단 평가. 프로브 40 및 프로브 50은 각각 뉴클레오타이드 40 및 50에 효소 절단 위치를 지정합니다. 빨간색 화살표는 비표적 분해 산물을 나타냅니다. L: ladder.

다음으로, 프로브 50 + 내열성 RNase-H를 사용하여 분해된, 캡핑되지 않은 mRNA를 IP-RP LC/MS로 분석했습니다. 그림 3은 Agilent AdvanceBio Oligonucleotide 컬럼(2.1 × 50mm, 2.7μm, 120Å, 제품 번호 659750-702)에서의 프로브 50 및 잔존하는 mRNA와 캡핑되지 않은 5' 올리고뉴클레오티드에 대한 분리를 나타냅니다. MassHunter BioConfirm 10.0에 내장된 자동 데이터 분석 워크플로를 사용하여 UV 크로마토그램에서 식별된 피크에서 질량 스펙트럼을 추출한 후 표 3에 나타난 설정을 사용하여 자동으로 deconvolution했습니다. 표 4는 각 반응에 존재할 수 있을 것으로 예상되는 캡핑되지 않은 종, 캡핑 중간 생성물, 완전히 캡핑된 종들을 보여줍니다.

캡핑되지 않은 mRNA는 불안정한 5' 말단 triphosphate 그룹으로 구성되어 있기 때문에, 반응 조건에 따라 가수분해된 di- 또는 monophosphate 중의 3 일부가 관찰될 수 있습니다. 그림 4는 triphosphate 및 diphosphate 피크에 대한 추출 질량 스펙트럼과 deconvoluted 질량을 나타냅니다. 최적화된 내열성 RNase-H

절단 프로토콜은 소량(4.2%)의 diphosphate를 생성했을 뿐 검출 가능한 수준의 monophosphate 종은 생성하지 않았으며, 이는 반응 조건이 알맞게 온화했음을 시사합니다.

캡핑되지 않은 시료 중 약 15%의 triphosphate 올리고뉴클레오티드는 추가적인 비주형 +G 뉴클레오티드를 포함한 시퀀스 변이체인 것으로 밝혀졌습니다(그림 4D). 이는 T7 전사 미끄러짐(transcriptional slippage)으로 인해 발생할 수 있으며, 이는 전사된 서열의 시작에 반복되는 G 뉴클레오티드가 존재할 때 흔히 볼 수 있습니다.⁷ 그림 5에서 볼 수 있듯이, 미끄러짐 시퀀스 변이체는 Cap 1로의 후속 메틸화 반응 전후에 모두 ARCA를 통해 동시 전사로 캡핑된 mRNA 시료에서도 명백하게 나타났습니다. 미끄러짐 시퀀스 변이체는 별개의 크로마토그래피 피크로 식별될 수 있었지만 베이스라인 분리는 되지 않았습니다. 모든 캡핑된 올리고뉴클레오티드는 캡핑되지 않은 올리고뉴클레오티드와 잘 분리되었습니다.

표 4. 캡핑되지 않은 종, 캡핑 중간 생성물, 캡핑된 종. 빨간색 글자는 'p'로 표시된 인산염 결합 5' 말단 뉴클레오타이드를 나타내며, 효소 반응에 의해 캡핑 구조로 만들어지거나 치환될 수 있습니다.

캡핑되지 않은 종		캡핑 중간 생성물		캡핑된 종	
이름	시퀀스	이름	시퀀스	이름	시퀀스
Triphosphate	pppGGGGCC...	Diphosphate	ppGGGGCC...	ARCA Cap 0	3'-O-Me-m7GpppGGGGCC...
		G-Cap	GpppGGGGCC...	ARCA Cap 1	3'-O-Me-m7GpppmGGGGCC...
				Cap 0	m7GpppGGGGCC...

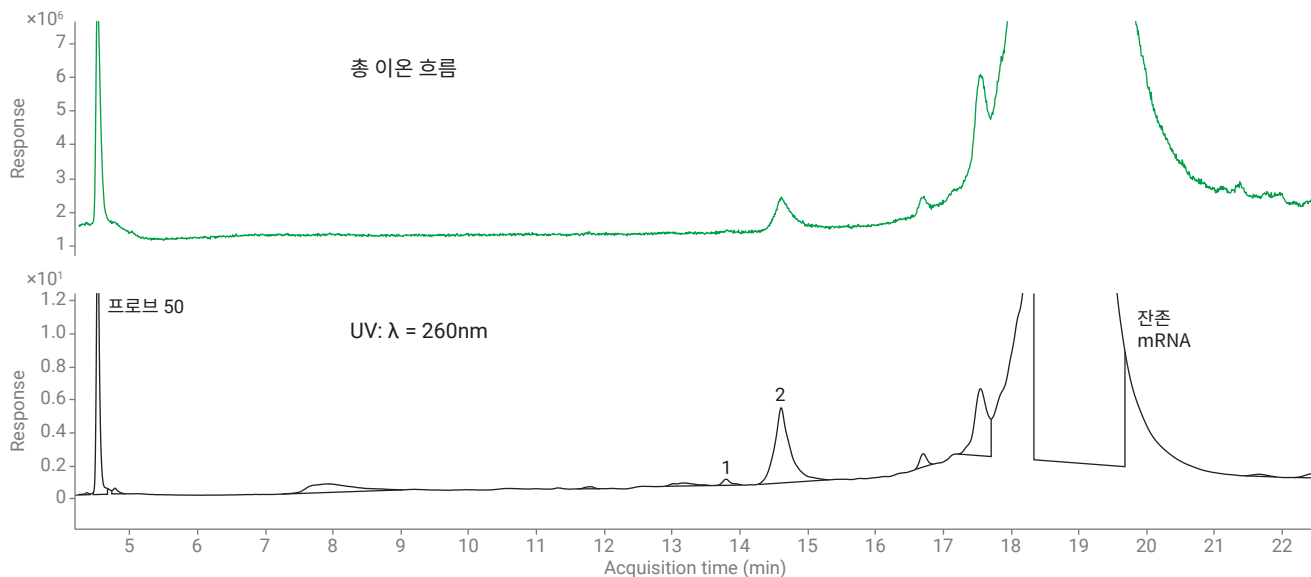


그림 3. 5' 캡핑되지 않은 올리고뉴클레오티드의 키메라 프로브 및 시료 매트릭스와의 크로마토그래피 분리. 피크 1: 5' diphosphate, 피크 2: 5' triphosphate 올리고뉴클레오티드.

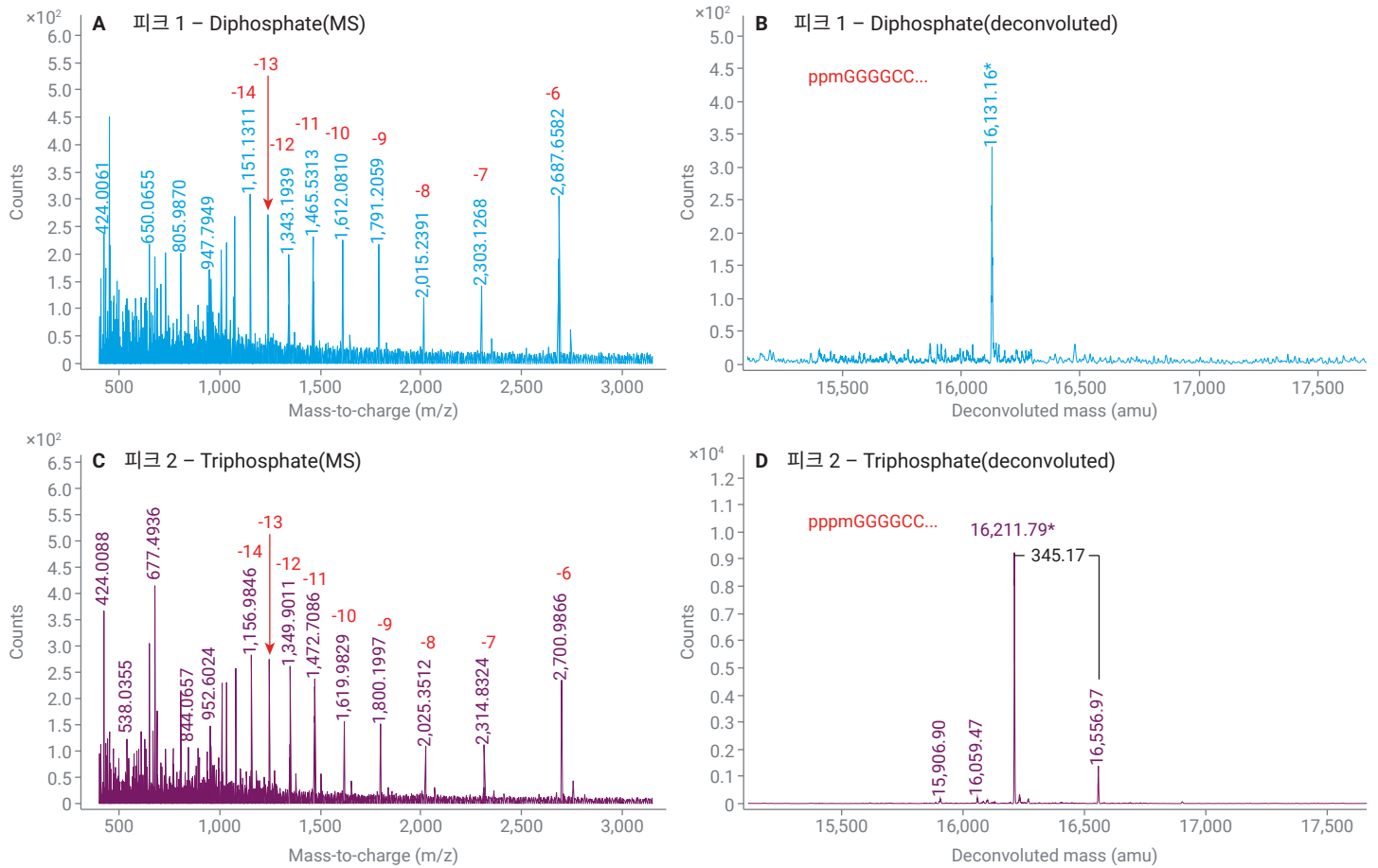


그림 4. 5' 캡핑되지 않은 mRNA 올리고뉴클레오타이드의 질량 스펙트럼. 그림 3의 Peak 1에 대한 (A) 추출 및 (B) deconvoluted 질량 스펙트럼. 그림 3의 Peak 2에 대한 (C) 추출 및 (D) deconvoluted 질량 스펙트럼. 빨간색 숫자는 diphosphate 및 triphosphate 올리고뉴클레오타이드에서 발생하는 추출 질량 스펙트럼에서 각 피크의 전하 상태를 나타냅니다. 별표로 표시된 질량 피크(16131.16Da 및 16211.79Da)는 추정되는 diphosphate 및 triphosphate 식별(서열 삽입)에 10ppm 미만의 질량 오차로 매칭했습니다(표 5). 패널 D에서, triphosphate + G 시퀀스 변이체(+345.17 Da)가 triphosphate 캡핑되지 않은 올리고뉴클레오타이드와 동시 용리된 것이 관찰되었습니다.

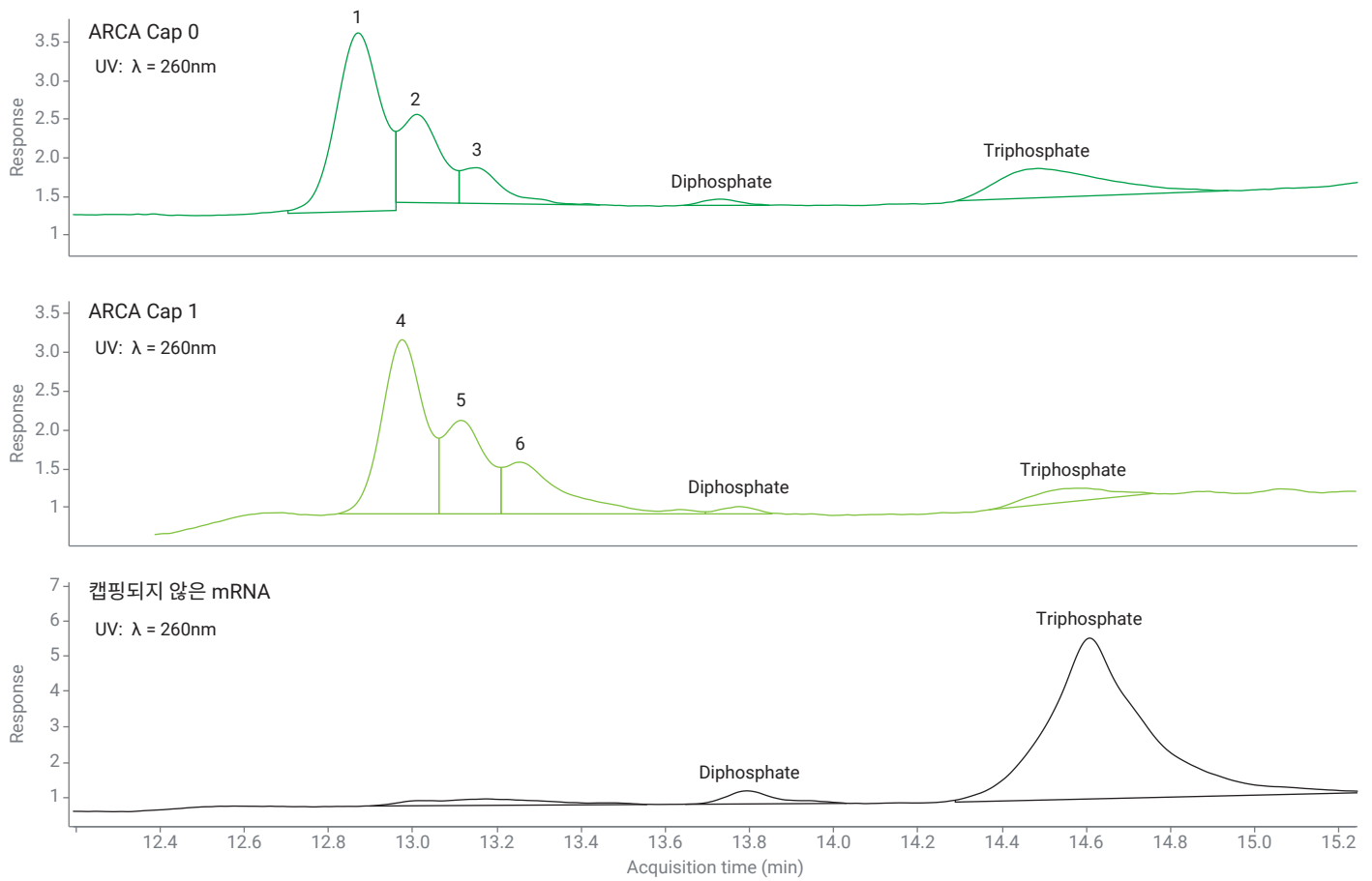


그림 5. 캡핑되지 않은 올리고뉴클레오타이드와 캡핑된 올리고뉴클레오타이드 분리. 피크 1~3: ARCA Cap 0, 피크 4~6: ARCA Cap 1. 캡핑된 종은 미끄러짐 시퀀스 변이체로서 0~2개의 비주형 G 뉴클레오타이드를 포함합니다.

그림 6은 ARCA Cap 0 및 ARCA Cap 1 피크에 대한 추출 질량 스펙트럼과 deconvoluted 질량을 나타냅니다. 발표된 문헌²과 일치하게, ARCA Cap 0 동시 전사 캡핑 효율은 높지만 (91.3±1.76%) 완전하지는 않다는 것을 발견했습니다. 이후 ARCA Cap 1로 메틸화된 시료에서 캡핑 효율은 ARCA Cap 0과 유의하게 다르지 않았으며(90.6±1.53%) 이는 모든 Cap 0 구조가 Cap 1로 완전히 변환되었음을 의미합니다.

마지막으로, LC/MS 분석법을 사용해 Vaccinia 효소 캡핑의 효율을 평가하였습니다. 비록 이 반응이 ARCA 동시 전사 캡핑보다 더 효율적이며 시료 시퀀스에 상대적으로 독립적이라고 주장되었지만³, 이번 연구 결과에서는 그렇지 않다는 것이 입증되었습니다. 제조업체 권장 반응 조건을 사용하여, Vaccinia 효소 캡핑을 통해 캡핑되지 않은 물질, 캡핑 중간 생성물, 완전히 캡핑된 시료 혼합물이 생성되었습니다(그림 7 및 표 6). 그림 8에서 볼 수 있듯이, 대부분의 시료(90.9±0.6%)가 5' 말단 di- 또는 triphosphate으로 캡핑되지 않은 상태로 남아 있었고, 6.5±0.7%는 캡핑되었지만 메틸화되지는 않은, 즉 G-Cap 이었습니다. 시료의 2.6 ± 0.5%만이 Cap 0으로 캡핑되고 메틸화되었습니다.

표 5. ARCA 캡핑 및 캡핑 중간 생성물 올리고뉴클레오타이드의 질량 정확도.

ARCA 동시 전사 캡핑			
식별	이론 질량	관측 질량	정확도(ppm)
ARCA Cap 0	16504.59	16504.62	2.01
ARCA Cap 0 + G	16849.80	16849.69	6.37
ARCA Cap 0 + 2G	17195.01	17195.03	1.50
ARCA Cap 1	16518.59	16518.85	15.77
ARCA Cap 1 + G	16863.80	16864.11	18.47
ARCA Cap 1 + 2G	17209.01	17208.73	16.13
Di-phosphate	16131.52	16131.37	9.21
Tri-phosphate	16211.51	16211.50	0.38
Tri-phosphate + G	16556.55	-	-

표 6. 효소 캡핑 및 캡핑 중간 생성물 올리고뉴클레오타이드의 질량 정확도.

효소 캡핑			
식별	이론 질량	관측 질량	정확도(ppm)
Cap 0	16490.59	16490.65	3.55
Cap 0 + G	16835.80	16836.00	11.97
G-Cap	16476.57	16476.65	4.85
Di-phosphate	16131.52	16131.49	1.95
Tri-phosphate	16211.51	16211.61	6.24
Tri-phosphate + G	16556.72	16556.97	15.33

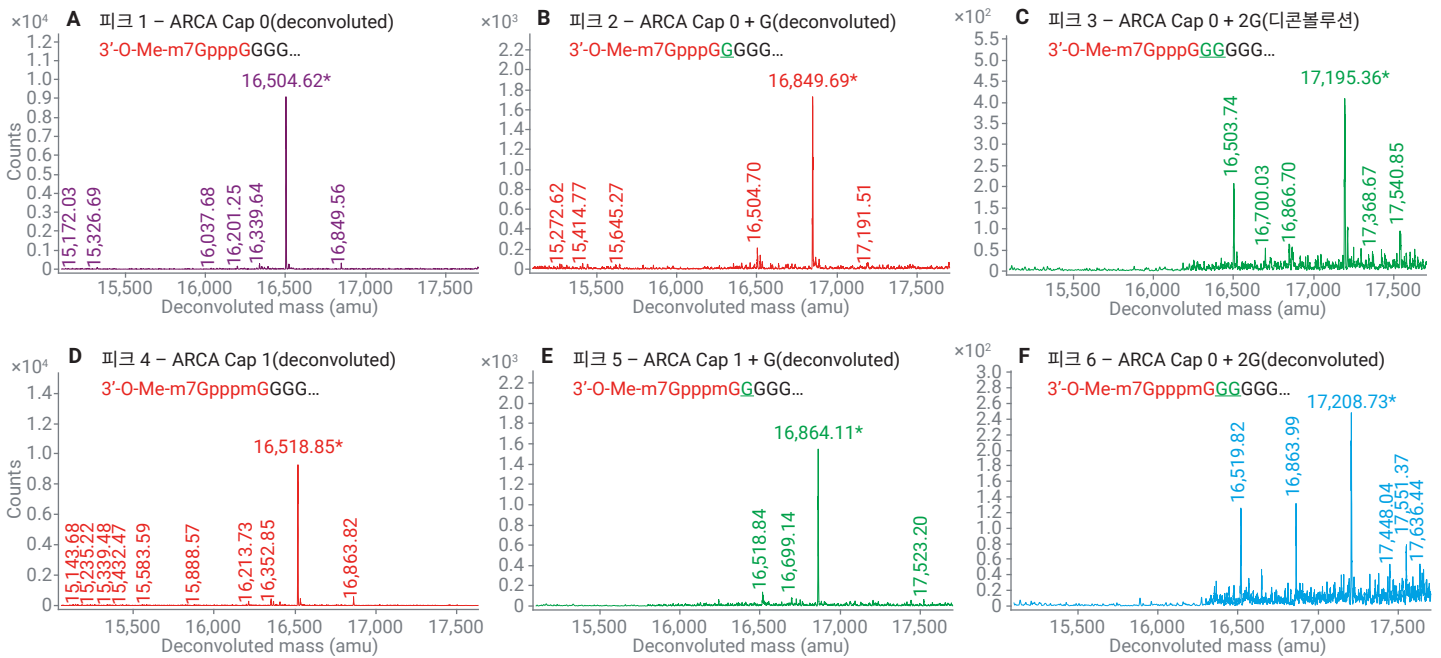


그림 6. ARCA Cap 0 mRNA 올리고뉴클레오타이드의 질량 스펙트럼. (A~C) 그림 5의 피크 1~3에 대한 deconvoluted 질량 스펙트럼. (D~F) 그림 5의 피크 4~6에 대한 deconvoluted 질량 스펙트럼. 별도로 표시된 질량 피크(16504.62 Da, 16849.69 Da, 17195.36 Da, 16518.85 Da, 16864.11 Da, 17208.73 Da)는 추정된 식별(서열 삽입)에 20ppm 미만의 질량 오차로 매칭했습니다(표 5). 녹색으로 밑줄 친 글자는 T7 전사 미끄러짐으로 인해 발생할 수 있는 비주형 뉴클레오타이드를 나타냅니다.

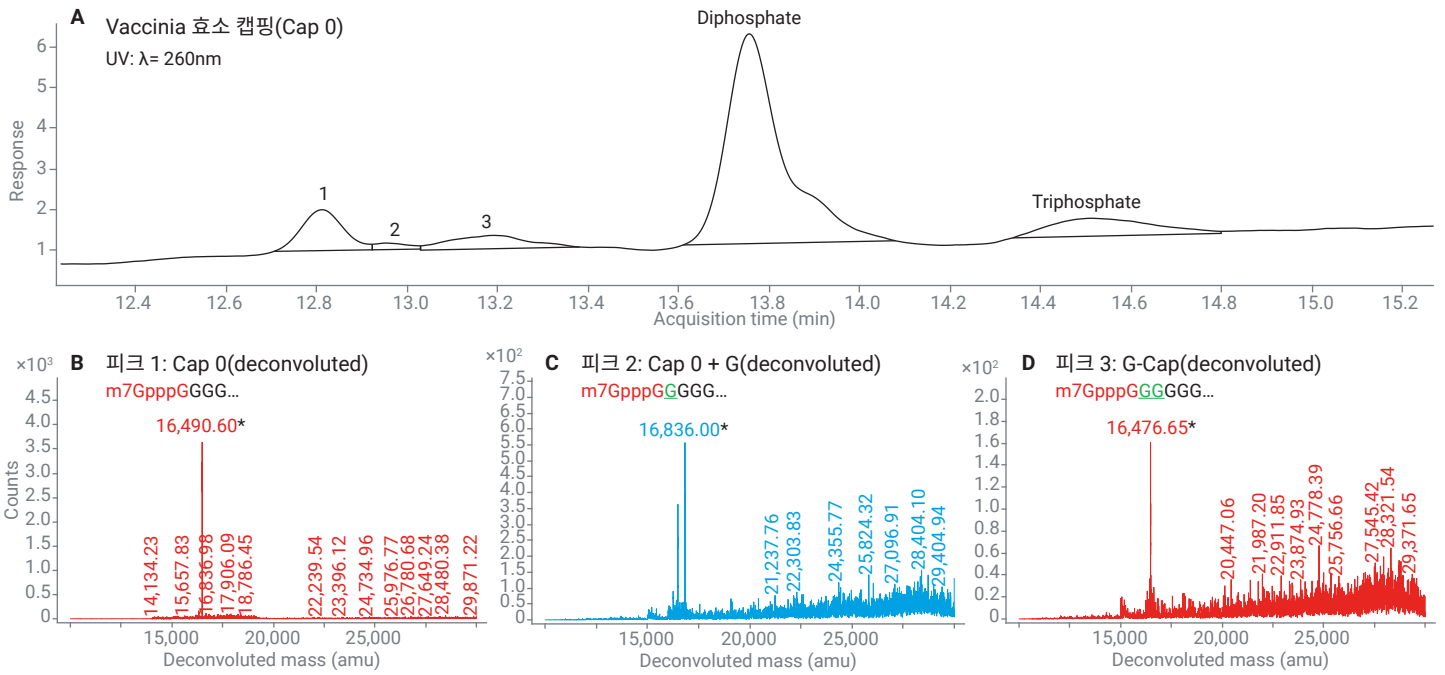


그림 7. Vaccinia 효소 캡핑 올리고뉴클레오타이드 및 캡핑 중간 생성물의 LC/MS. (A) 피크 1~2: Cap 0 및 +G 시퀀스 변이체, 피크 3: G-캡핑 올리고뉴클레오타이드, (B~D) 캡핑된 올리고뉴클레오타이드의 deconvoluted 질량 스펙트럼. 별표로 표시된 모든 질량 피크(16,490.60, 16,836.00, 16,476.65 Da)는 추정된 식별(서열 삽입)에 12ppm 미만으로 매칭했습니다(표 6). 녹색으로 밑줄 친 글자는 T7 전사 미끄러짐으로 인해 발생할 수 있는 비주형 뉴클레오타이드를 나타냅니다.

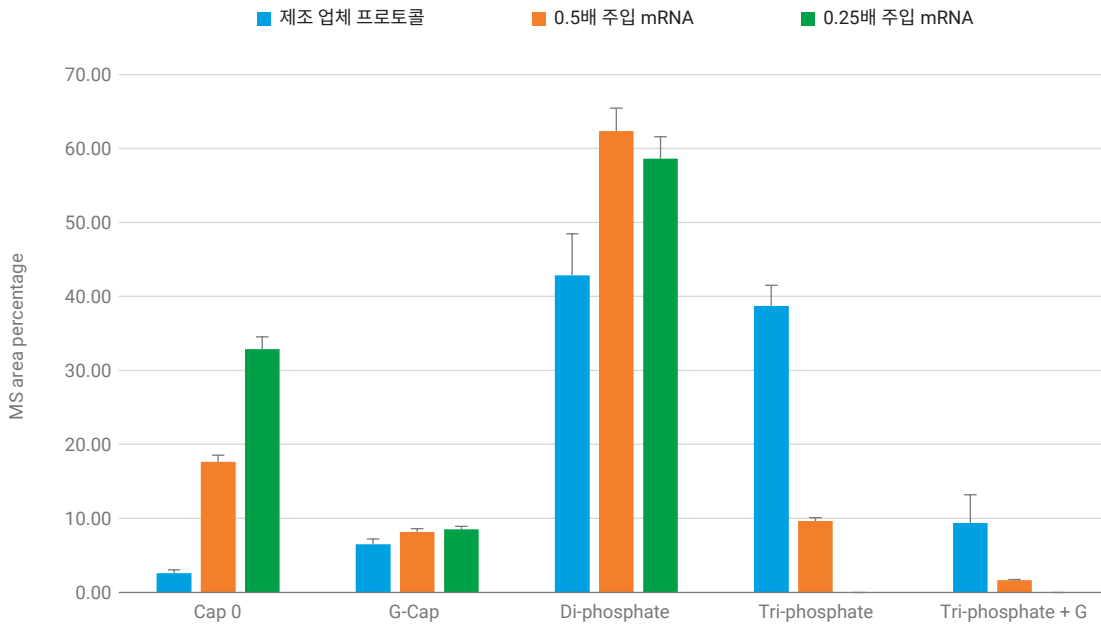


그림 8. LC/MS를 통한 Vaccinia 효소 캡핑 최적화.

캡핑 효율을 높이기 위해, mRNA의 투입량을 0.5배, 0.25배로 줄여, mRNA 대비 SAM, GTP, Vaccinia 캡핑 효소의 몰 비율을 높였습니다. 이러한 전략은 꽤 성공적이어서 이를 통해 캡핑되지 않은 물질은 감소하였고(0.5배 = 73.6±1.3% uncapped, 0.25배 = 58.6±0.8% uncapped), 캡핑된 물질은 증가했습니다(0.5배 = 17.7±1.8% Cap 0, 0.25배 = 32.9±0.4% Cap 0). 개별 반응물의 농도를 별도로 증가시켜도 캡핑 효율은 증가하지 않았으며 (데이터는 표시되지 않음), 이는 개별 성분에 결함이 없음을 시사합니다.

결론

본 연구에서는 mRNA 5' 캡핑을 정량하기 위한 더욱 빠른 LC/MS 분석법을 개발했습니다. 이 워크플로의 주요 개선 사항 중 하나는 내열성 RNase-H를 충분히 높은 GC 함량의 키메라 RNA/DNA 올리고뉴클레오타이드 프로브와 함께 사용함으로써 별도의 열을 가하는 어닐링 단계 없이 mRNA 절단의 속도를 높인 것입니다. GC 함량이 지나치게 높은 프로브는 비표적 결합 또는 2차 구조를 형성할 가능성이 높기 때문에 적합하지 않을 수 있습니다. 실제로 37°C에서 절단을 수행했을 때, 프로브 50(67% GC 함량, 그림 2)을 통해 비표적 분해를 관찰했습니다. 낮은 반응 온도에서 비표적 결합이 선호되므로, 고온에서 절단을 수행하면 반응을 촉진할 뿐만 아니라 더 깨끗한 시료를 얻을 수 있습니다. 별도의 실험에서는 GC 함량이 낮은 프로브(40%)가 내열성의 RNase-H 절단 위치를 지정하는 데 성공적이지 못하다는 것을 발견했습니다(데이터는 표시되지 않음).

이 연구에서는 다음의 두 가지 서로 다른 캡핑 방법을 사용하여 이 워크플로를 입증했습니다. (1) ARCA를 이용한 동시 전사 캡핑, (2) Vaccinia 캡핑 효소를 이용한 효소 캡핑. ARCA 캡핑 결과는 문헌 내용과 잘 일치했지만, Vaccinia 효소 캡핑에 대한 본 연구에서의 경험은 기대에 미치지 못했습니다. 시료 시퀀스의 분석으로 다음의 가능한 원인이 강조됩니다. 첫 12개의 뉴클레오타이드는 90% 이상의 매우 높은 GC 함량을 가지고 있으며, Vaccinia 효소 캡핑을 방해할 수 있는 2차 구조 형성의 가능성을 높입니다. G의 동종 중합체적 반복은 또한 비주형 G 뉴클레오타이드를 시퀀스 변이체로 포함시킬 수 있기 때문에(그림 5), 이러한 결과는 이 서열의 5' UTR을 재설계하는 것이 처리의 용이성과 제품 품질을 향상시킬 수 있음을 나타냅니다.

유사한 분석적 접근이 최근 M.Beverly 등에 의해 발표되었는데⁵, 해당 문헌에서는 키메라 프로브를 자성 비드와 공유 결합시켜 RNase-H에 의한 위치 지정 절단 및 절단된 올리고뉴클레오타이드의 친화성 농축을 동시에 가능하도록 했습니다. 본 연구에서는 이 접근법의 수많은 최적화에도 불구하고 시료의 특정 절단 위치 지정에 실패했습니다(데이터는 표시되지 않음). 이는 시료의 5' 말단에 상보적인 키메라 프로브가 매우 높은 GC 함량을 가지고 있으며, 그로 인해 광범위한 비특이적 결합을 야기했기 때문일 수 있습니다. 키메라 프로브를 시료에서 까다로운 영역을 피하도록 설계할 수 있어 본 연구의 워크플로가 더 유연하다는 것을 확인했습니다. 또한 실리카 기반의 스피ن 컬럼을 사용한 시료 클린업은 친화성 기반의 접근법보다 시퀀스 의존성이 낮을 수 있어, 대개 더 높은 시료 회수율로 이어질 것입니다.

결론적으로, 이 응용 자료는 mRNA 5' 캡핑의 고분해능 및 신속한 분석을 위한 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF의 유용성을 강조했습니다. 우리는 이 워크플로가 의약품 개발 및 품질 관리 실험실 모두에서 유용하게 사용될 것으로 기대합니다.

참고 문헌

- Hassett, K. J. *et al.* Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *15*, 1–11.
- Stepinski, J. *et al.* Synthesis and Properties of mRNAs Containing the Novel “Anti-Reverse” Cap Analogues 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG. *RNA* **2001**, *7*, 1486–1495.
- Fuchs, A. L. *et al.* A General Method for Rapid and Cost-Efficient Large-Scale Production of 5' Capped RNA. *RNA* **2016**, *22*, 1454–1466.
- Lapham, J. *et al.* Site-Specific Cleavage of Transcript RNA. *Methods in Enzymology* **2000**, *317*, 132–139.
- Beverly, M. *et al.* Label-Free Analysis of mRNA Capping Efficiency using RNase H Probes and LC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 5021–5030.
- AbouHaidar, M. G. *et al.* Non-Enzymatic RNA Hydrolysis Promoted by the Combined Catalytic Activity of Buffers and Magnesium Ions. *Z Naturforsch C J Biosci* **1999**, *54*, 542–548.
- T.Conrad *et al.* Maximizing Transcription of Nucleic Acids with Efficient T7 Promoters. *Nat. Comm. Biol.* **2020**, *3*, 1–8.

www.agilent.com/chem

연구용으로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 9월 21일, 한국에서 인쇄
5994-3984KO
PR7000-3098

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

 **Agilent**
Trusted Answers