

고분해능 LC/MS를 사용한 mRNA Poly-A 서열 변이 분석

저자

Brian Liao
Agilent Technologies, Inc.

서론

2020년 SARS-CoV-2 대유행으로 상황이 급박해지면서 정책 입안자와 제약 회사들은 전례 없는 속도로 mRNA 백신을 개발하고 배포해야 하는 상황으로 내몰렸습니다. mRNA 백신은 임상 시험¹⁻⁴에서 기대 이상의 안전성과 효능을 보여주었으며 대체 기술에 기반을 둔 백신의 효과를 증가했습니다. mRNA 백신은 유전자 치료로 간주되기 때문에⁵ FDA 지침에 따라 제품 관련 불순물에 대해 광범위한 특성 분석을 실시해야 합니다. 여기에는 서열 변이로 알려진, 서열에 약간의 오류가 있는 mRNA 분자 집단이 포함될 수 있습니다. 또한 mRNA 백신은 최적의 안정성과 생물학적 활성을 갖기 위해 3' 말단에 A 뉴클레오타이드 (poly-A)의 길고 반복적인 섹션이 필요합니다.⁶ 따라서 poly-A 서열의 길이와 조성은 모두 주요 품질 속성에 해당합니다.

본 연구에서는 Agilent AdvanceBio 6545XT LC/Q-TOF를 사용하여 *시험관 내* 전사 시스템의 공통 구성 요소인 *E. coli* Poly-A Polymerase(PAP)에 의해 형성된 poly-A 꼬리 서열을 분석했습니다. 연구 결과, PAP가 ATP에 대해 완전히 선택적이지 않으며 CTP 및 UTP 전구체 모두에서 작용을 일으켜 표준 *시험관 내* 전사 조건 하에서 상당한 수의 원하지 않은 C 및 U 뉴클레오티드를 편입시킬 수 있는 것으로 나타났습니다. 이러한 서열 변이는 제품 관련 불순물로 간주될 수 있기 때문에 이러한 결과는 PAP 사용에 경각심을 환기시키며 핵산 치료법의 공정 최적화와 품질 관리를 위한 민감하고 효율적인 분석법으로서 LC/MS의 가치를 잘 보여줍니다.

본 연구에 사용된 약어:

- ATP – adenosine triphosphate
- CTP – cytidine triphosphate
- UTP – uridine triphosphate
- GTP – guanosine triphosphate
- A, C, U 및 G nucleotides – adenosine, cytidine, uridine 및 guanosine monophosphate
- Poly-A – polyadenosine
- PAP – *E. coli* Poly-A Polymerase
- RNA-seq – RNA sequencing

실험

mRNA의 *시험관 내* 전사

업스트림 T7 프로모터와 다운스트림 BGH 종결자 서열이 측면에 있는 3822 nt 유전자를 인코딩하는 pCMV3 플라스미드는 Sino Biological에서 구입했습니다. DNA 염기서열은 T7 및 BGH 종결자 프라이머(Agilent Herculase II Fusion DNA Polymerase, 제품 번호 600677)를 사용하여 35주기 동안 PCR 증폭했습니다. 정제(Agilent StrataPrep PCR 정제 키트, 제품 번호 400771) 후, 증폭된 dsDNA를 Agilent 2100 Bioanalyzer에서 DNA 7500 키트(제품 번호 5067-1506)로 분석하여 농도를 측정하고 증폭의 균일성을 평가했습니다. 그런 다음 증폭된 dsDNA (약 13nM)는 HiScribe T7 ARCA mRNA 키트(New England Biolabs, 제품 번호 E2060S)를 사용하여 *시험관 내*에서 전사하고 제조업체 권장 프로토콜을 사용하여 포함된 PAP 효소로 꼬리를 붙인 다음 LiCl로 침전시켰습니다. PAP 꼬리 붙이기 전후에 전사된 mRNA의 분취액을 2100 Bioanalyzer에서 RNA 6000 나노 키트(제품 번호 5064-1511)로 분석하여 반응을 모니터링했습니다.

Poly-A 꼬리 붙이기 실험

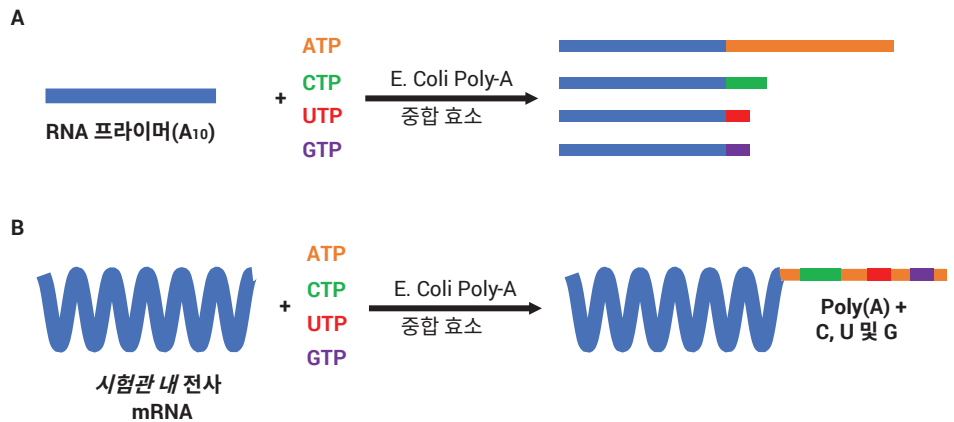


그림 1. 이 응용 자료에서 수행된 꼬리 붙이는 반응의 개략도. (A) RNA 프라이머에 대해 반응당 하나의 전구체로만 수행된 반응. (B) 표준 조건(모든 전구체) 하에서 *시험관 내* 전사된 mRNA에 대해 수행된 반응입니다.

PAP 선택성 연구를 위해, 5' 및 3'-OH (Integrated DNA Technologies)가 포함된 합성 10-mer poly-A 서열을 그림 1A와 같이 반응당 하나의 전구체 nucleoside triphosphate(ATP, CTP, UTP 또는 GTP 중 하나의 1mM)만 사용하여 37°C에서 30분 동안 PAP 효소로 확장시켰습니다.

시료 전처리

약 20피코몰의 poly-A 꼬리를 붙인 mRNA를 1,000U의 RNase T1로 37°C에서 3시간 동안 분해하여 poly-A 서열을 유리시켰습니다. 200µL의 oligo-dT 마그네틱 비드로 각 시료를 5회 정제해 poly-A 시퀀스를 풀다운했습니다.⁷ 각 풀다운은 50µL의 1x IDTE 완충액(Integrated DNA Technologies, 제품 번호 11-05-01-05)에서 용출시키고 최종적으로 250µL의 용량을 모았습니다. LC/MS 분석에 앞서, 모아진 용출액을 10kDa MWCO(Sartorius, 제품 번호 VS0102)가 들어 있는 Vivaspin 500 카트리지를 사용하여 60µL의 초순수 증류수로 탈염시켰습니다.

poly-A 서열의 LC-DAD/MS

기기 구성은 다음과 같습니다.

- 1290 Infinity II LC 다이오드 어레이 검출기(P/N G7117B)
- 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 프리팅이 장착되었습니다. 애질런트 폴리프로필렌 시료 바이알이 사용되었습니다(제품 번호 5190-2242). 처음 사용하기 전에 LC 시스템과 컬럼을 50% MeOH + 0.1% 포름산 용액으로 밤새 세척하여 알칼리 금속 첨가물을 더욱 감소시켰습니다. 필요한 경우 50% MeOH + 0.1% 포름산으로 30분 동안 세척하면 일반적으로 실험 사이에 시스템을 세정하기에 충분했습니다.⁸

Poly-A 서열은 PLRP-S 컬럼(2.1 x 50mm, 5µm, 1,000Å, 제품 번호 PL1912-1502)에서 분리했습니다. 더 높은 크로마토그래피 분해능을 얻기 위해 PAP 선택성 실험에 Infinity Poroshell 120 HPH-C18 컬럼(2.1 x 50mm, 1.9µm, 120Å, 제품 번호 699675-702)을 사용했습니다. 이동상 및 LC 그레디언트를 표 1에 나타냈습니다. 질량 분석기는 표 2의 설정으로 음이온 모드에서 작동했으며, 데이터 분석은 표 3의 deconvolution 설정으로 BioConfirm 10.0에서 수행했습니다.

표 1. 이동상 및 LC 그레디언트

Agilent 1290 Infinity II LC 시스템		
컬럼	InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18, 1.9µm, 2.1 x 50mm, 120Å	Agilent PLRP-S, 5µm, 2.1 x 50mm, 1,000Å
용매 A	15mM dibutylamine + 25mM HFIP 초순수 증류수 용액	
용매 B	15mM dibutylamine + 25 mM HFIP 메탄올 용액	
그레디언트	0 ~ 2분, 15% B 12분, 30% B 12.1 ~ 13분, 90% B	0 ~ 1분, 15% B 10.5분, 45% B 10.6 ~ 11.5분, 90% B
컬럼 온도	50°C	80 °C
유속	0.4mL/분	
주입부피	10 ~ 20µL	

표 2. 질량 분석기 설정

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF		
	LC/MS	LC/MS/MS
수집 모드	음이온, 표준(3,200m/z) 질량 범위, 고감도(2Ghz)	
가스 온도	350°C	
가스 유속	12L/분	
Nebulizer	55psig	
Sheath 가스 온도	275°C	
Sheath 가스 유속	10L/분	
Vcap	4,500V	
노즐 전압	2,000V	
Fragmentor	250V	
스키머	65V	
MS1 범위	400 ~ 3,200m/z	
MS1 스캔 속도	2Hz	5 Hz
MS2 범위	해당 없음	50 ~ 3,200m/z
MS2 스캔 속도		3 Hz
MS2 분리 폭		Medium(약 4amu)
충돌 에너지		0, 40, 60V
MS2에 대한 임계값		켜짐; 3회 반복 후 0.2분 동안 제외
전구 이온 존재비 기반 스캔 속도		예
표적(카운트/스펙트럼)		25,000
MS2 누적 시간 제한 사용		예
순도		100% 엄격성, 30% 컷오프
전구체 정렬		존재비만 기준; +3, +2, +1
기준 질량	1,033.9881	

표 3. Deconvolution 설정

Agilent MassHunter BioConfirm B10.0 설정		
올리고뉴클레오타이드 길이	≤30nt	≥90nt
Deconvolution 알고리즘	최대 엔트로피	
베이스라인 제거	1	
첨가 이온	양성자 손실	
질량 범위	3,000 ~ 10,000Da	30,000 ~ 60,000Da
질량 단계	0.05 Da	0.05 Da
제한된 m/z 범위 사용	1,040 ~ 3,200	800 ~ 2,500

결과 및 토의

이 첫 번째 테스트에서는 1mM ATP와 함께 10개의 반복된 A 뉴클레오티드(A_{10})로 구성된 합성 RNA 프라이머에서 PAP에 의해 확장된 poly-A 서열을 분석했습니다. 그림 2에서 볼 수 있듯이 이로부터 poly-A 서열의 양봉 분포가 얻어졌는데, 한 집단은 2.5 ~ 6분 지점에서 용출되는 짧은 올리고뉴클레오티드로 구성되고 다른

집단은 약 10.6분 지점의 넓은 피크에서 용출되는 더 긴 뉴클레오티드로 구성됩니다. 질량 분석법을 실시한 결과, 짧은 집단의 범위는 11에서 22nt(그림 3D)인 반면, 긴 집단의 범위는 108에서 149nt (35,492.89에서 48,990.17 Da, 그림 4C)인 것으로 나타났습니다.

짧은 올리고뉴클레오티드 집단에서 선택된 세 피크의 추출 및 deconvoluted 질량 스펙트럼을 그림 3에 나타냈습니다.

질량 스펙트럼은 주로 양성자 손실로 생성된 2가 및 3가 전하 이온과 소수의 나트륨 첨가 이온으로 구성되었습니다. 동위 원소 분리된 deconvoluted 질량 스펙트럼은 각각의 단일 동위 원소 피크를 기준으로 오차가 5ppm 미만인 A_{20} , A_{21} 및 A_{22} (그림 3B ~ 3D)의 ID가 할당되었습니다.

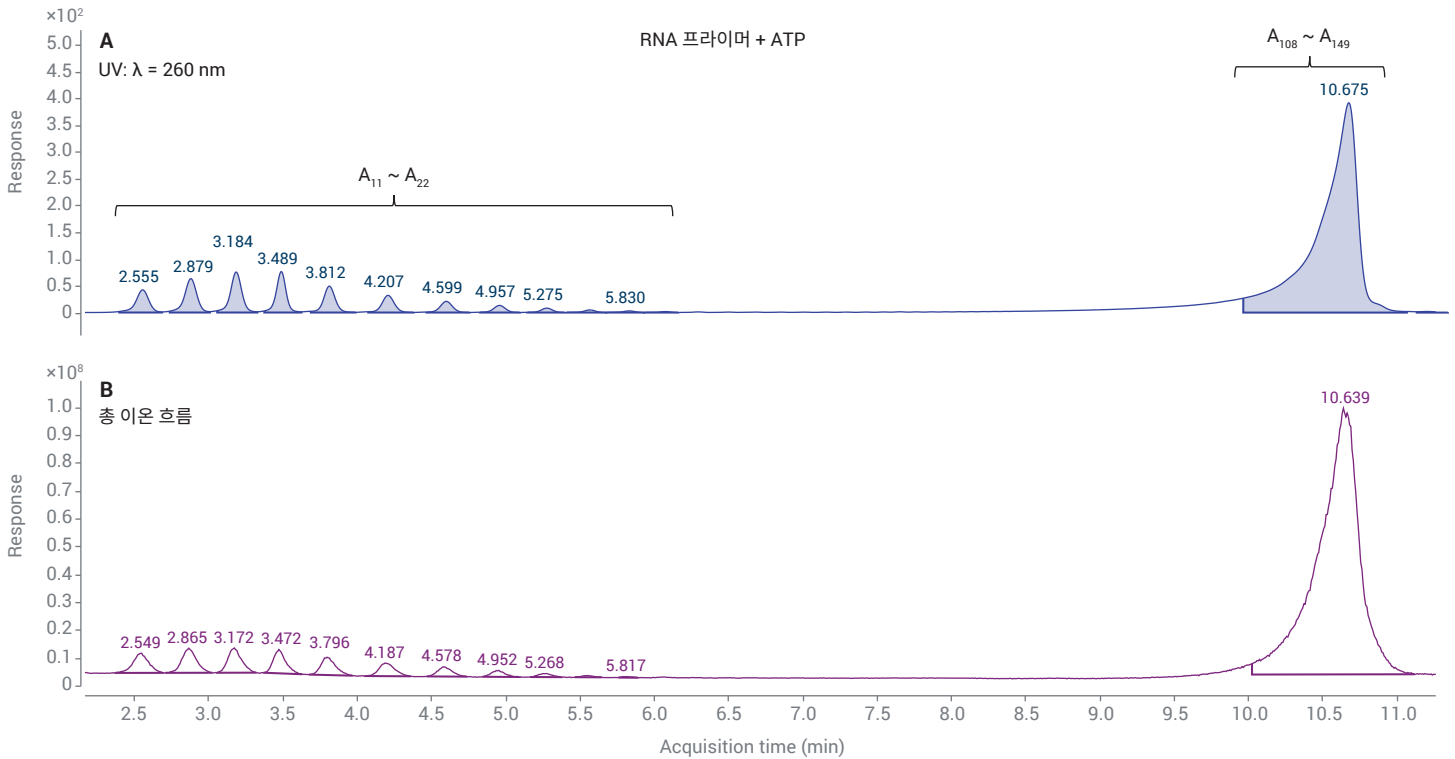


그림 2. ATP만 있는 조건에서 PAP로 확장된 RNA 프라이머의 260nm(A: 기준 = 360nm) UV 흡광도 및 총 이온 크로마토그램(B). PLRP-S 컬럼에서 분리를 수행했습니다.

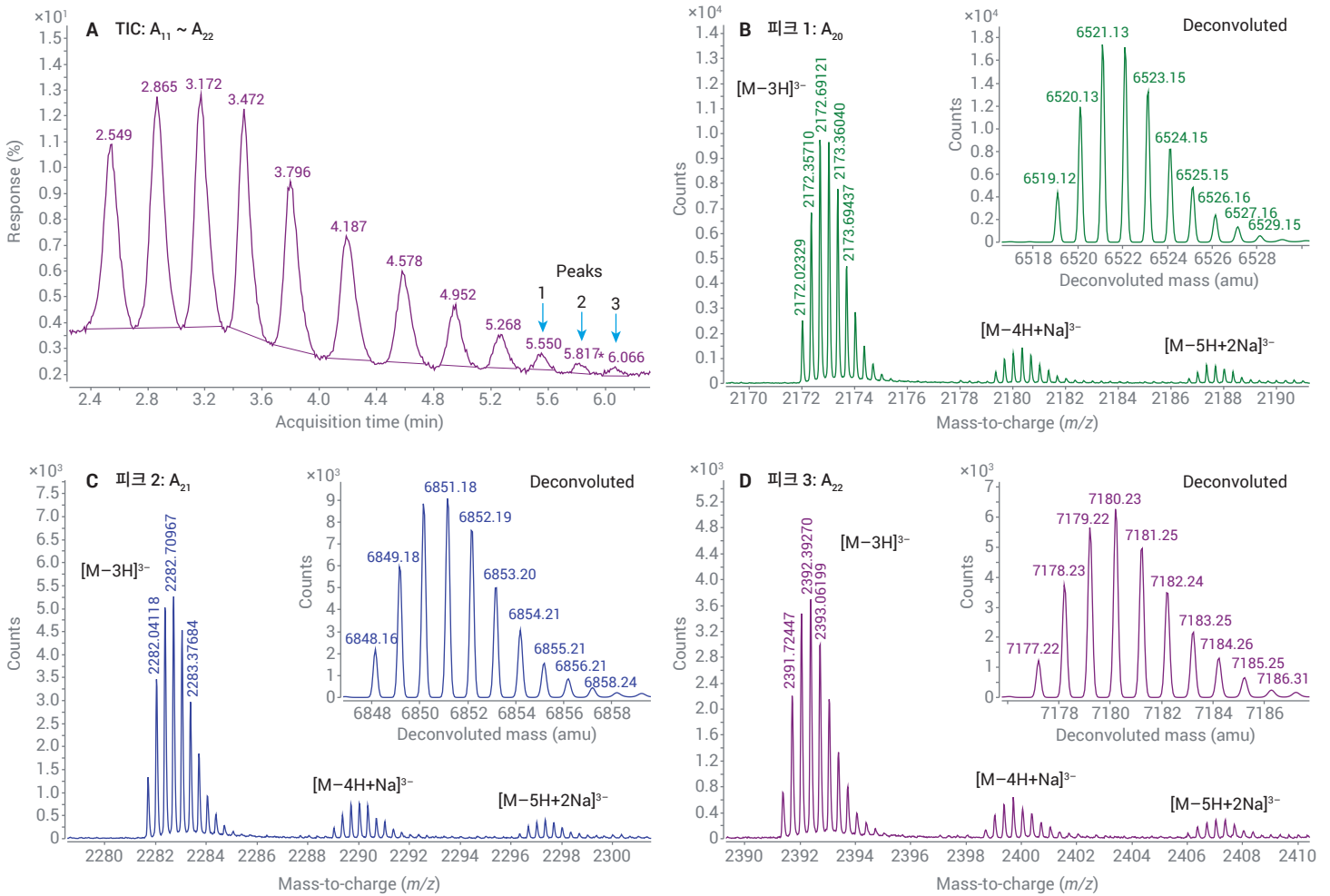


그림 3. PAP에 의해 형성된 A₁₁ ~ A₂₂ 올리고뉴클레오타이드. (A) 선택된 세 개의 피크를 보여주는 총 이온 크로마토그램으로, 추출된 질량 스펙트럼을 (B ~ D)에 나타냈습니다. 안쪽 그래프는 A₂₀(M_{obs} = 6,519.12 Da, M_{theo} = 6,519.09 Da), A₂₁(M_{obs} = 6,848.16 Da, M_{theo} = 6,848.15 Da) 및 A₂₂(M_{obs} = 7,177.22 Da, M_{theo} = 7,177.20 Da)의 deconvoluted 질량 스펙트럼입니다. M_{obs}: 관찰된 단일 동위원소 질량; M_{theo}: 이론상의 단일 동위원소 질량

Deconvolution을 위해 긴 올리고뉴클레오타이드의 일부를 추출했습니다 (그림 4A). 10 ~ 10.3분 범위의 추출된 질량 스펙트럼의 하전 상태 엔벨로프는 주로 800 ~ 2,500m/z(그림 4B) 사이에 들어왔고 30 ~ 60kDa의 대상 질량 범위로 deconvolution되었습니다. Deconvoluted 질량 스펙트럼(그림 4C)은 329.2 ± 1Da로 균등하게 분리된 34 ~ 50kDa의 시료 피크가 이중 집단(그림 4D)을 이루는 모습을 명확하게 보여주었습니다. 이러한 질량 증가는 A 뉴클레오타이드의 단일 첨가 이온과

일치하여 이론적 평균 질량이 329.209Da 증가했습니다. 표 4는 그림 4D의 질량 피크가 A₁₂₁ ~ A₁₃₈로 신뢰성 있게 표시되었고 이론상의 질량과 관찰된 질량의 차이는 ≤1.16Da임을 보여줍니다.

ATP에 대한 PAP의 선택성을 평가하기 위해 1mM의 CTP, UTP 또는 GTP만 있는 상태에서 PAP를 RNA 프라이머에 추가하는 중복 실험을 수행했습니다. 긴 중합체 사슬의 연장은 관찰되지 않았지만, 최대 2개의 C 뉴클레오타이드 단량체(그림 5A) 또는 하나의 U 뉴클레오타이드(그림 5B)를

크로마토그래피로 분해되는 양으로 RNA 프라이머에 첨가해 보니 PAP가 ATP에 대해 완전히 선택적이지 않은 것으로 나타났습니다. Guanosine monophosphate의 첨가 이온은 이 실험에서 관찰되지 않았지만(그림 5C), 더 긴 반응 시간 또는 더 높은 GTP 농도로 상당한 양이 추가될 가능성을 배제할 수 없었습니다. 전반적으로 PAP는 ATP에서 가장 높은 활성을 보였고 활성이 내려가는 순서로 CTP, UTP 및 GTP가 그 뒤를 이었습니다.

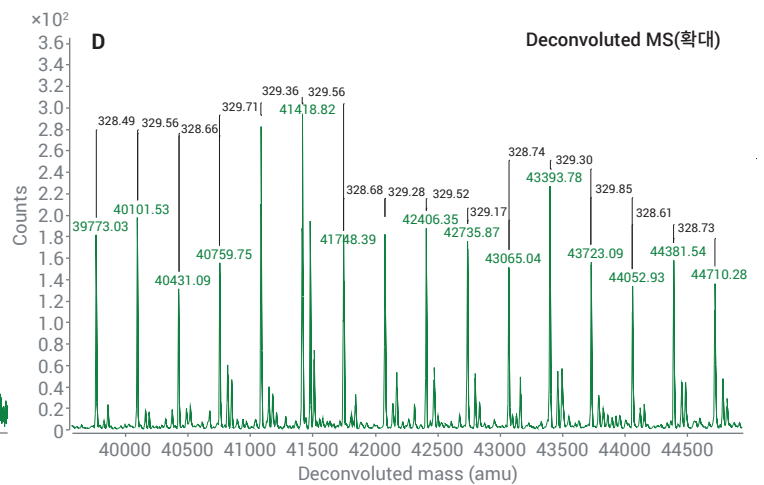
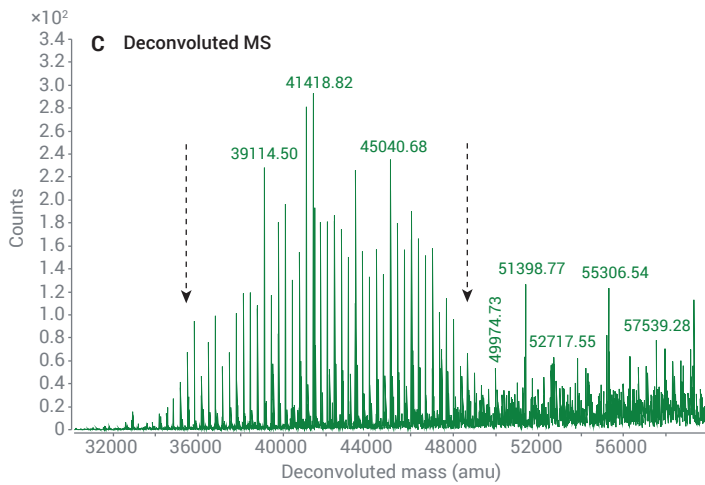
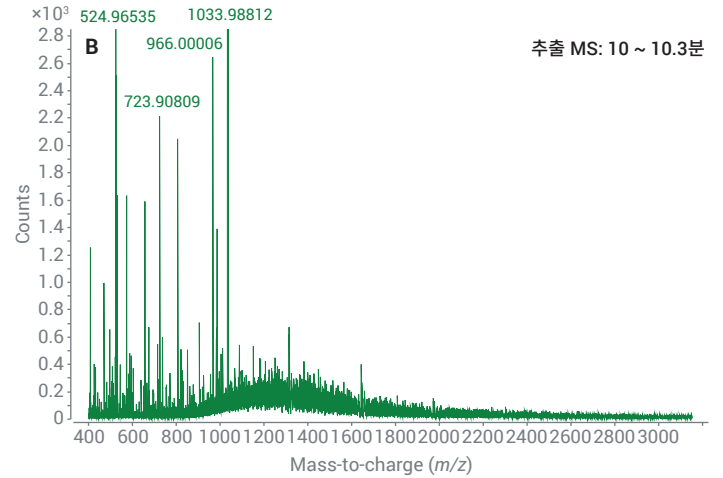
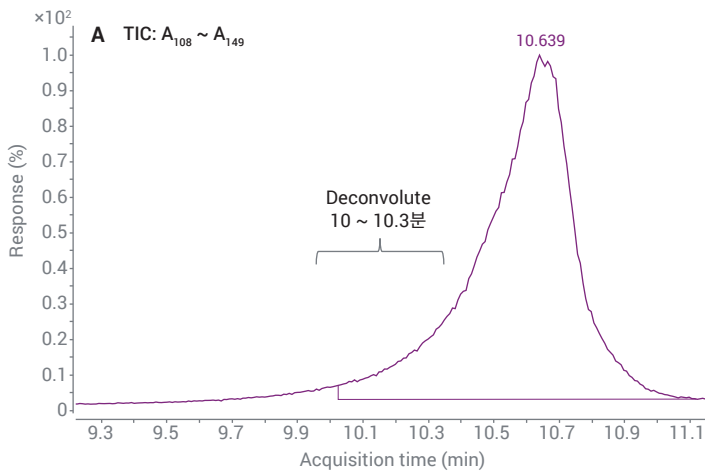
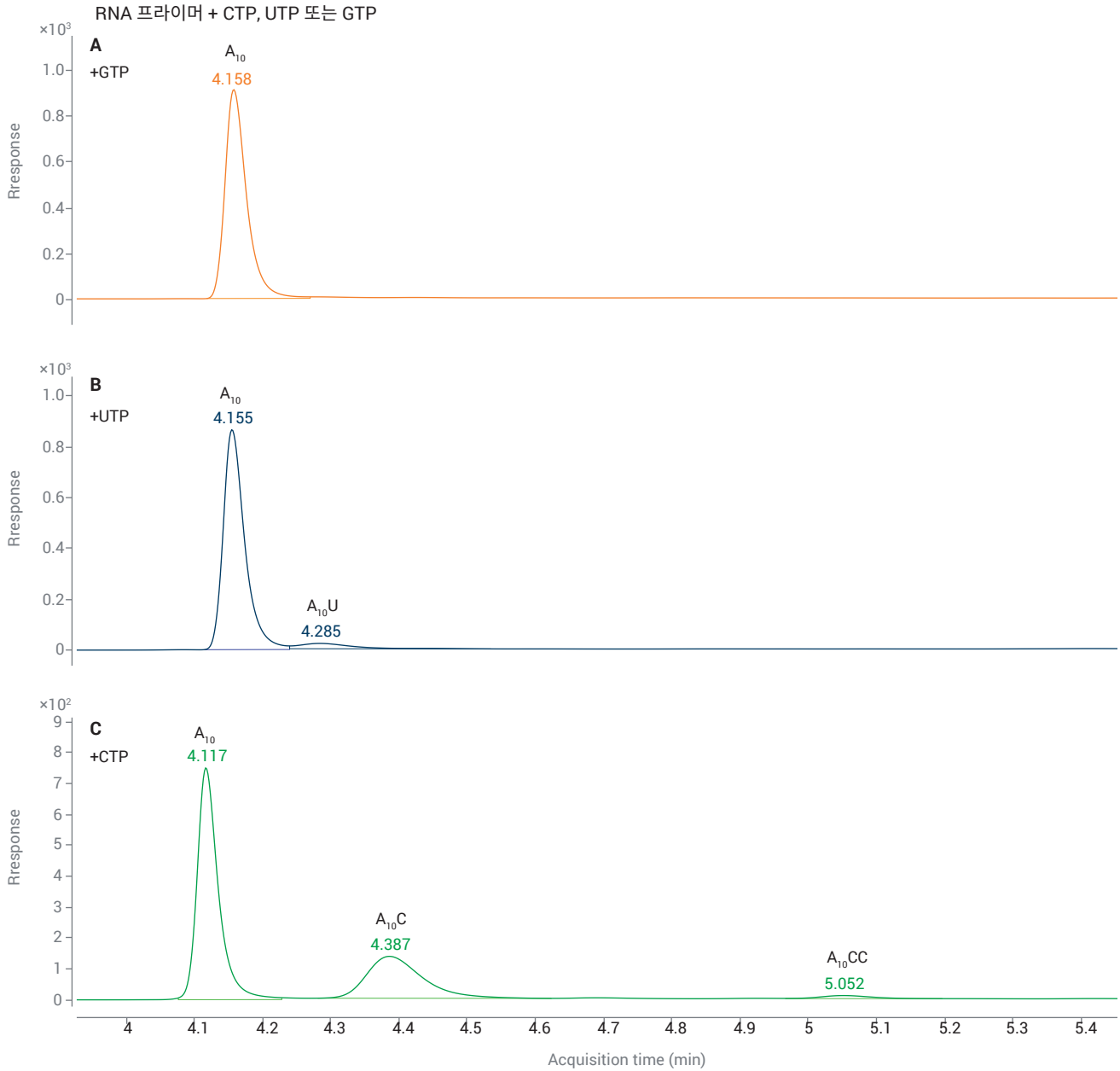


그림 4. PAP에 의해 형성된 $A_{108} \sim A_{149}$ 올리고뉴클레오타이드. (A) Deconvolution을 위해 추출된 영역 10 ~ 10.3분을 보여주는 총 이온 크로마토그램. (B) 하전 상태 엔벨로프 및 (C) 추출된 영역의 deconvoluted 질량 스펙트럼. 점선 화살표(왼쪽 = 35,492.89 Da, 오른쪽 = 48,990.17 Da)는 ID를 $A_{108} \sim A_{149}$ 로 높은 신뢰성으로 할당할 수 있는 질량 피크 범위를 나타냅니다. (D) 39,773.03에서 44,710.28 Da까지의 피크 사이에 규칙적인 간격을 보여주는 확대한 deconvoluted 질량 스펙트럼

표 4. 주석을 붙인 그림 4D의 질량 피크

Oligonucleotide	관찰된 질량(Da)	이론상의 질량(Da)	질량 차이(Da)
A_{121}	39,773.03	39,772.08	0.95
A_{122}	40,101.53	40,101.28	0.25
A_{123}	40,431.09	40,430.49	0.6
A_{124}	40,759.75	40,759.70	0.05
A_{125}	41,089.46	41,088.90	0.56
A_{126}	41,418.82	41,418.11	0.71
A_{127}	41,748.39	41,747.32	1.07
A_{128}	42,077.06	42,076.52	0.54
A_{129}	42,406.35	42,405.73	0.62
A_{130}	42,735.87	42,734.94	0.93
A_{131}	43,065.04	43,064.15	0.89
A_{132}	43,393.78	43,393.35	0.43
A_{133}	43,723.09	43,722.56	0.53
A_{134}	44,052.93	44,051.77	1.16
A_{135}	44,381.54	44,380.97	0.57
A_{136}	44,710.28	44,710.18	0.1



D

General				% Quantitation				
Mass	RT	Height	Area	Use for %Quant	Area (MS)	%Quant (Area)	Height (MS)	%Quant (Height)
3228.59365	3.998	1575689	6629732	<input checked="" type="checkbox"/>	3250164	61.36	1575689	65.19
3533.6394	4.281	760517	5139482	<input checked="" type="checkbox"/>	1896979	35.82	760517	31.47
3838.681	4.938	80709	3274129	<input checked="" type="checkbox"/>	149355	2.82	80709	3.34

그림 5. UV 흡광도(Abs = 260nm, 참조 = 360nm) 크로마토그램은 (A) GTP, (B) UTP 및 (C) CTP에 대한 PAP의 무차별적 활성을 보여줍니다. Guanosine monophosphate의 첨가이온은 검출되지 않았습니다. (D) 패널 (C)에 표시된 A₁₀, A₁₀C 및 A₁₀CC의 상대적 정량. Agilent Poroshell 120 HPH-C18 컬럼에서 분리를 수행했습니다.

변형되지 않은 RNA 프라이머와 C 또는 U 뉴클레오티드로 확장된 프라이머의 deconvoluted 질량 스펙트럼이 그림 6에 나와 있습니다. 동위 원소 분리된 deconvoluted 질량 스펙트럼은 각각의 단일 동위 원소 피크를 기준으로 오차가 13ppm 미만인 A_{10} , $A_{10}C$, $A_{10}CC$ 및 $A_{10}U$ 의 ID가 할당되었습니다. MS/MS 실험은

C 및 U 뉴클레오티드가 실제로 RNA 프라이머의 3' 말단에 추가되어(그림 7) 특징적인 2가 전하의 y-이온 1601.271m/z 및 1601.758m/z를 형성하는 모습을 보여주었습니다. 이와 대조적으로, 변형되지 않은 RNA 프라이머는 3' A 뉴클레오티드로 말단화되어 조각하 시 2가 전하의 y-이온 1448.749m/z를 발생시켰습니다.

다음으로, RNA 6000 Nano 키트가 장착된 Bioanalyzer와 LC/MS로 전체 길이의 시험관 내 전사된 mRNA를 분석했습니다. 꼬리를 붙이기 전, 전사된 mRNA는 PAP와의 반응 후 약 4,200nt까지 증가한 약 3,800nt의 예상 길이를 보여주어(그림 8A) 성공적인 poly-A 꼬리 붙이기가 달성되었음을 나타냈습니다.

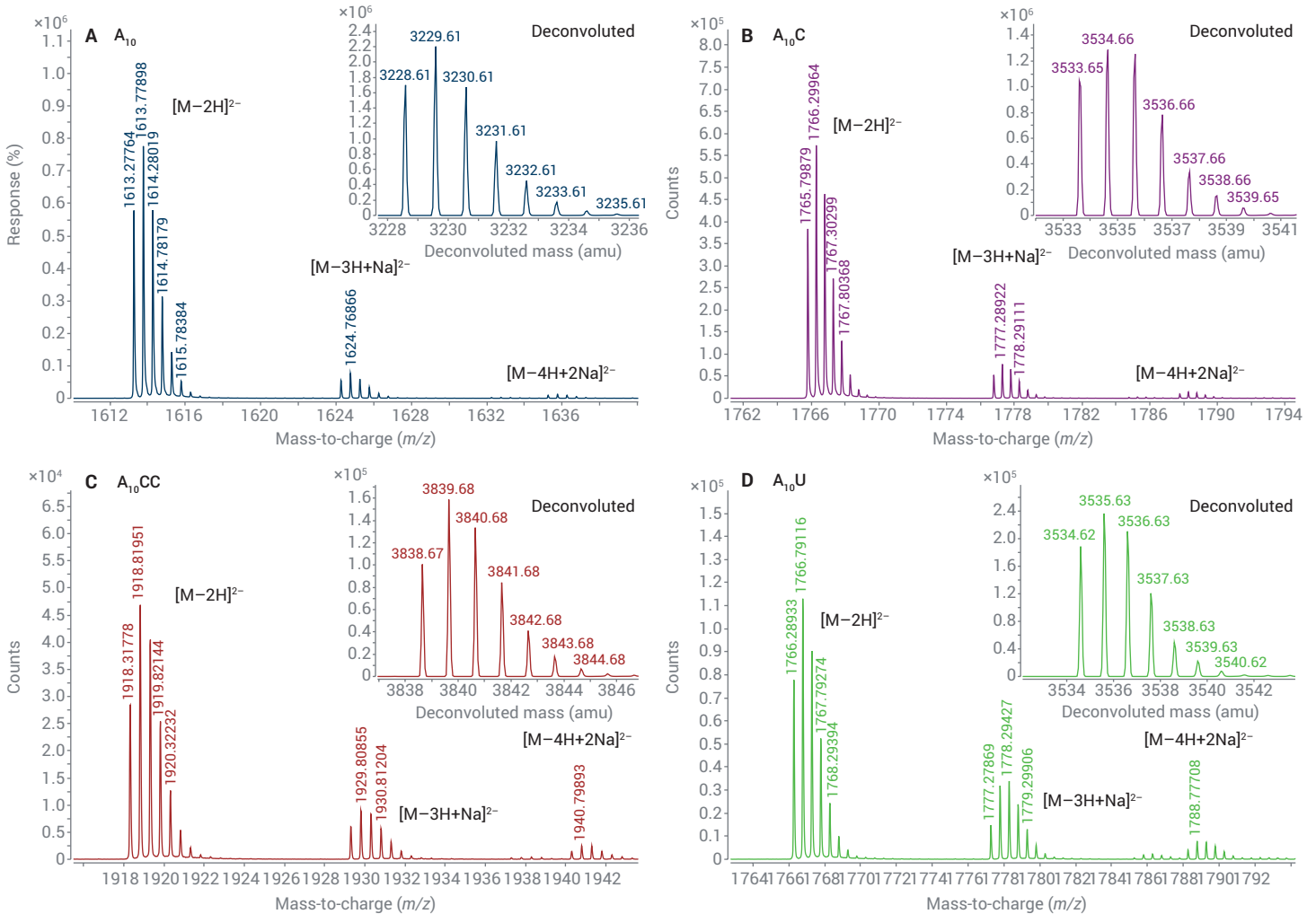


그림 6. 추출 및 deconvoluted 질량 스펙트럼: (A) 변형되지 않은 A_{10} RNA 프라이머($M_{obs} = 3,228.61$ Da, $M_{theo} = 3,228.57$ Da), (B) 하나의 C 뉴클레오티드로 확장($M_{obs} = 3,533.65$ Da, $M_{theo} = 3,533.61$ Da), (C) 두 개의 C 뉴클레오티드로 확장($M_{obs} = 3,838.67$ Da, $M_{theo} = 3,838.65$ Da), (D) 하나의 U 뉴클레오티드로 확장($M_{obs} = 3,534.62$ Da, $M_{theo} = 3,534.59$ Da). M_{obs} : 관찰된 단일 동위원소 질량; M_{theo} : 이론상의 단일 동위원소 질량

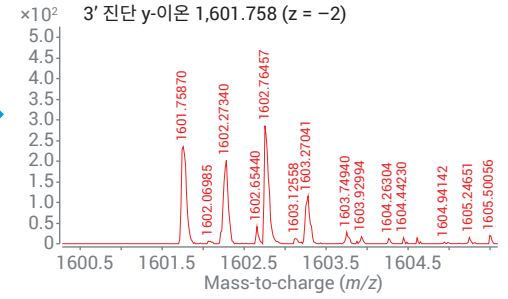
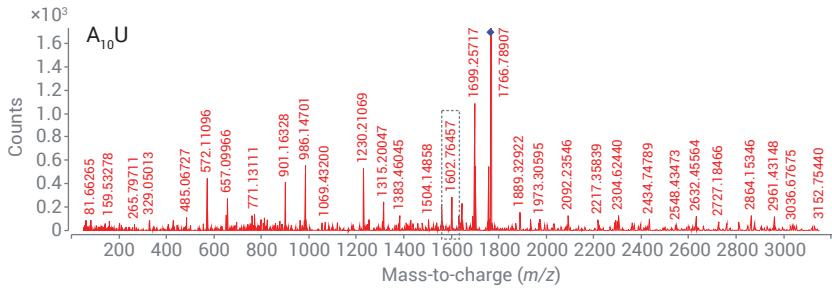
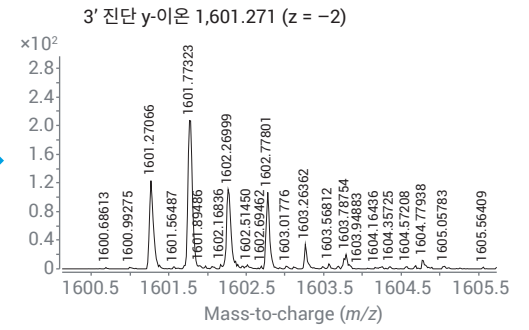
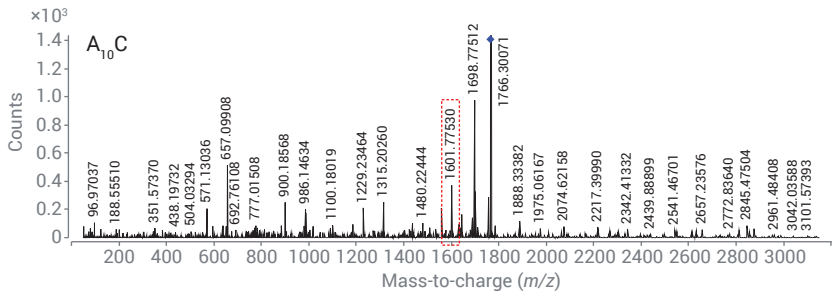
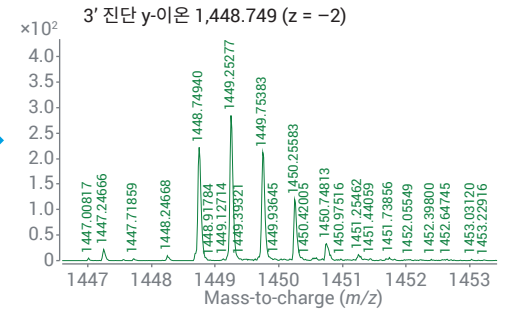
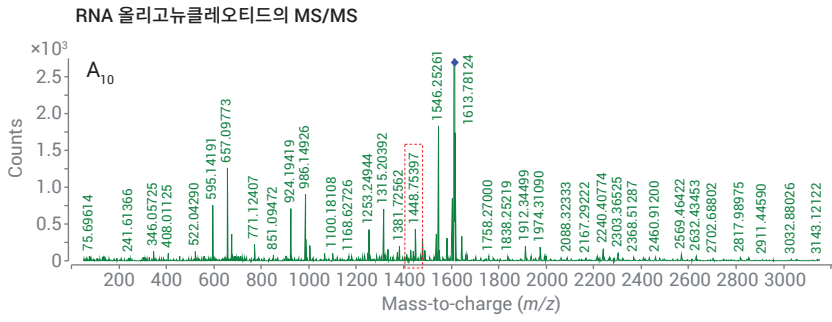


그림 7. 상이한 3' 말단에 특징적인 진단 이온을 나타내는 선택된 RNA 올리고뉴클레오타이드의 MS/MS

전체 길이 mRNA 시료를 RNase T1로 분해한 다음 올리고 dT 마그네틱 비드로 풀다운을 반복하여 정제된 꼬리 서열을 생성했습니다. PAP-확장 RNA 프라이머와 마찬가지로 *시험관 내* 전사된 mRNA에서 유도된 꼬리 서열은 3.7 ~ 7.5분 사이에 용출되는 짧은 올리고뉴클레오타이드 집단과 약 10.6분에 용출되는 긴 집단으로 구성되었습니다(그림 8B). 짧은 집단의

선택된 피크에서 추출 및 deconvoluted 질량 스펙트럼을 통해 길이가 16 ~ 27nt인 poly-A 서열이 드러났으며, 각각은 오펜입된 단일 U 뉴클레오타이드를 포함하고 있습니다(그림 9). 이 데이터 세트에서는 볼 수 없지만 다른 실험에서도 오펜입된 C 뉴클레오타이드가 관찰되었습니다.

M. Beverly 등⁷에 의해 언급된 바와 같이, PAP에 의해 형성된 꼬리 서열은 유전적으로

주형화된 poly-A 서열에 비해 길이가 훨씬 더 이질적입니다. 결과를 보면, 4개의 전구체 nucleoside triphosphate가 모두 존재하는 표준 조건에서 꼬리 붙이는 반응이 발생할 때 서로 다른 수의 C 및 U 뉴클레오타이드가 오펜입되는 문제로 이러한 이질성이 더욱 복잡화되어 긴 꼬리 서열의 질량 스펙트럼을 deconvolution하기가 매우 어려운 것으로 나타났습니다.

Bioanalyzer RNA 6000 Nano 키트

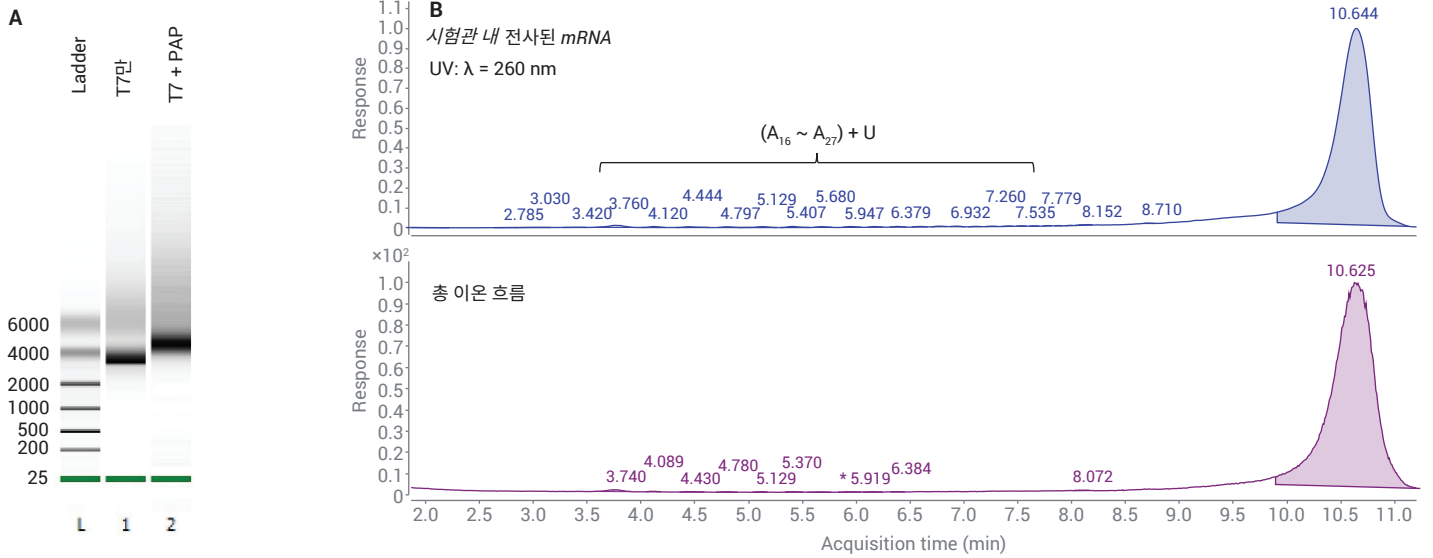


그림 8. (A) PAP로 꼬리를 붙이기 전(레인 1)과 후(레인 2)에 *시험관 내* 전사된 mRNA의 Bioanalyzer 분석. (B) 4개의 nucleoside phosphate 전구체가 모두 존재하는 조건에서 *시험관 내* 전사된 mRNA에 추가된 poly-A 서열의 260nm UV 흡광도(상단 패널) 및 총 이온 크로마토그램(하단 패널). PLRP-S 컬럼에서 분리를 수행했습니다.

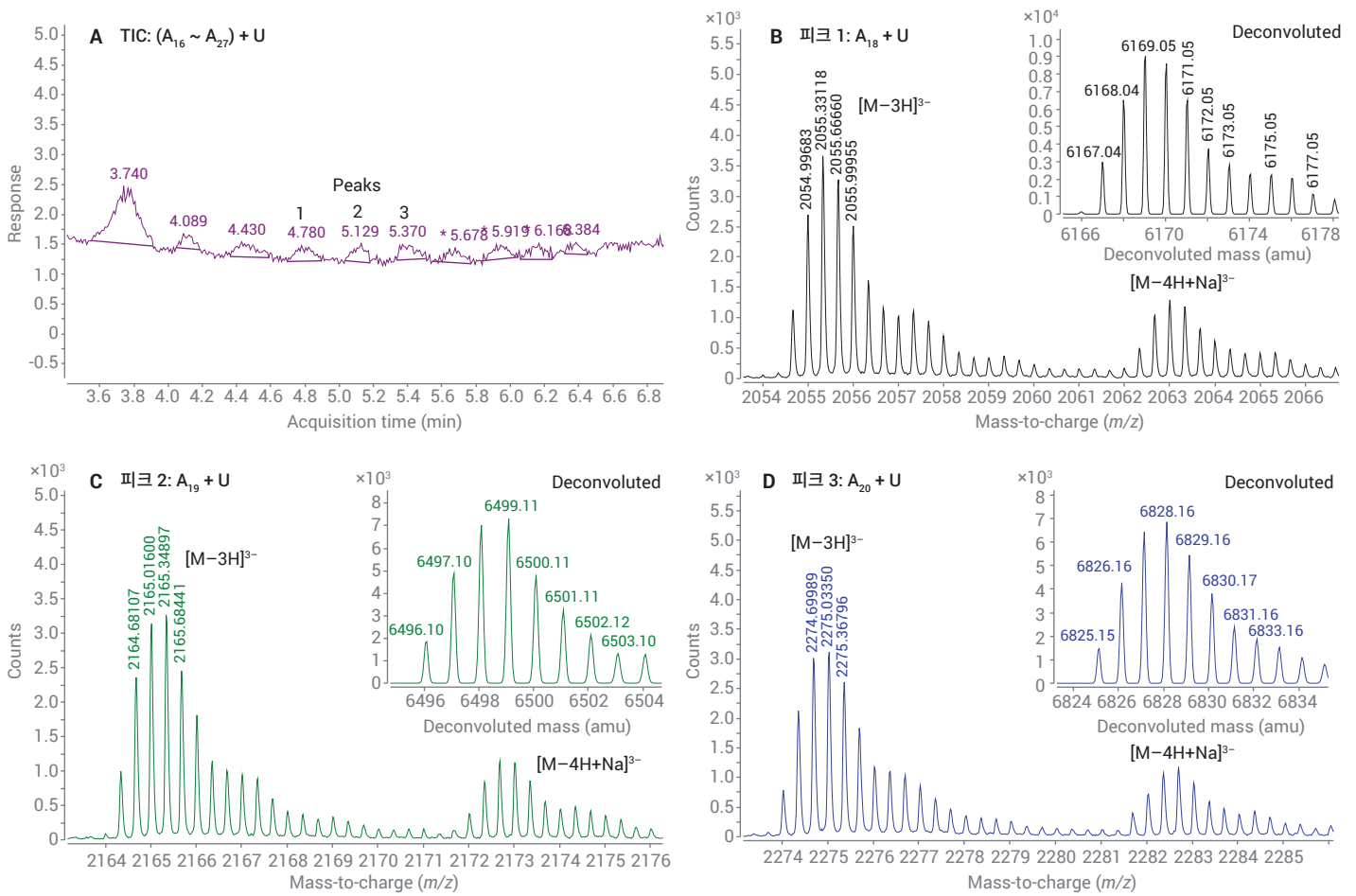


그림 9. 잘못 편집된 U 뉴클레오타이드의 $A_{16} \sim A_{27}$ 올리고뉴클레오타이드. (A) 선택된 세 개의 피크를 보여주는 총 이온 크로마토그램으로, 추출된 질량 스펙트럼을 (B ~ D)에 나타냈습니다. 안쪽 그래프는 $A_{18} + U$ ($M_{\text{obs}} = 6,167.04 \text{ Da}$, $M_{\text{theo}} = 6,167.01 \text{ Da}$), $A_{19} + U$ ($M_{\text{obs}} = 6,496.10 \text{ Da}$, $M_{\text{theo}} = 6,496.07 \text{ Da}$) 및 $A_{20} + U$ ($M_{\text{obs}} = 6,825.15 \text{ Da}$, $M_{\text{theo}} = 6,825.12 \text{ Da}$)의 deconvoluted 질량 스펙트럼입니다. M_{obs} : 관찰된 단일 동위원소 질량; M_{theo} : 이론상의 단일 동위원소 질량

결론

본 연구의 결론은 다음과 같습니다. (1) 긴 (121 ~ 136nt), 이중 poly-A 서열의 온전한 질량은 쌍을 이루는 해당 질량 스펙트럼의 deconvolution으로 정확하게 측정할 수 있고, (2) PAP는 표준 시험관 내 전사 조건에서 ATP에 대해 완전히 선택적이지 않아 C 및 U 뉴클레오타이드 모두가 poly-A 꼬리 서열에 추가되었습니다.

이러한 서열 변이는 *시험관 내* 연구에 중요하지 않을 수 있지만 규제 관점에서 보면 매우 중요합니다. 특히, T7 중합효소와 같은 다른 *시험관 내* 전사 효소는 미끄러짐 또는 전사 정지와 같은 메커니즘을 통해 서열 변이를 생성할 수 있으므로⁹ 이러한 불순물을 검출하기 위한 매우 민감하고 선택적인 분석법이 요구됩니다.

이러한 감도와 선택성을 얻기 위해, 이전에 실시된 한 연구에서는 방사성 표지된 뉴클레오타이드를 사용하여 PAP의 비표적 활성을 입증했습니다.¹⁰ 이러한 기술은 위험할 수 있으며 생산 환경에 적합하지 않습니다. LC/MS는 이러한 시약 없이도 단일 뉴클레오타이드 선택성을 달성할 수 있습니다. 또한, LC/MS는 편향과 아티팩트를 도입시키는 것으로 알려진 RNA-seq에 특징적인 긴 역전사, 결찰 및 증폭 단계 없이 서열 변이를 검출하고 정량화할 수 있습니다.

참고 문헌

1. Jackson, L. A. *et al.* An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* **2020**, 383, 1920–1931.
2. Mulligan, M. J. *et al.* Phase I/II Study of COVID-19 RNA Vaccine BNT162b1 in Adults. *Nature* **2020**, 586, 589–593.
3. Pfizer and BioNTech Announce Vaccine Candidate Against COVID-19 Achieved Success in First Interim Analysis from Phase 3 Study.
4. Promising Interim Results from Clinical Trial of NIH-Moderna COVID-19 Vaccine.
5. Wadhwa, A. *et al.* Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics* **2020**, 12, 102.
6. Kahvejian, A. *et al.* Mammalian Poly (A)-Binding Protein Is a Eukaryotic Translation Initiation Factor, Which Acts via Multiple Mechanisms. *Genes Dev.* **2005**, 19, 104-113.
7. Beverly, M.; Hagen, C.; Slack, O. Poly A Tail Length Analysis of *In Vitro* Transcribed mRNA by LC/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410, 1667–1677.
8. Birdsall, R. E. *et al.* Reduction of Metal Adducts in Oligonucleotide Mass Spectra in Ion-Pair Reversed-Phase Chromatography/Mass Spectrometry Analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2016**, 30, 1667-1679.
9. Tateishi-Karimata, H.; Isono, N.; Sugimoto, N. New Insights into Transcription Fidelity: Thermal Stability of Non-Canonical Structures in Template DNA Regulates Transcriptional Arrest, Pause, and Slippage. *PLOS ONE* **2014**, 9.
10. Yehudai-Resheff, S.; Schuster, G. Characterization of the E.Coli Poly(A) Polymerase: Nucleotide Specificity, RNA-Binding Affinities and RNA Structure Dependence. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 1139-1144.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

RA44231.5456365741

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 03월 08일, 한국에서 인쇄
5994-3005KO

한국애질런트테크놀로지스(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