

올리고 워크플로 리소스 가이드

짧은 핵산 및 mRNA 분석을 위한 엔드-투-엔드 워크플로 솔루션

R&D부터 QC/생산까지



짧은 간섭 RNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 압타머, CRISPR 가이드와 같은 짧은 합성 올리고뉴클레오타이드는 유전자 치료에서 새로운 유형의 약물로 많은 주목을 받으며 빠르게 성장하고 있습니다. 지난 3년 동안 코로나19에 대한 mRNA 백신의 성공은 학계와 제약업계 모두에서 폭발적인 관심을 불러일으켰습니다. 따라서 이러한 핵산과 mRNA 백신 제품의 개발 및 특성 분석에서 강력한 QC 분석법에 대한 요구와 기회가 늘어나고 있습니다. 일반적인 속성에는 핵산 시료의 크기, 순도 및 녹는 온도(Tm)가 포함됩니다. 또한, mRNA의 5'-말단 디뉴클레오타이드 변형(캡핑), 3' poly(A) 꼬리와 그 시퀀스는 모두 전사 과정에 매우 중요하여 그 특성을 잘 규명해야 합니다.

모세관 전기영동(CE)을 통한 핵산(짧은 길이) 분석

microRNA(miRNA), 짧은 간섭 RNA(siRNA) 및 piwi 상호작용 RNA(piRNA)와 같은 다양한 작은(짧은) RNA 유형은 유전자 침묵, 및 잠재적으로 다른 유전자 조절 메커니즘에 관여하는 것으로 알려져 있습니다. 따라서, 이러한 시료의 품질을 정확하게 측정하면 이후 단계 응용에서 성공을 보장하고 짧은 RNA에 대한 분리 및 정제 프로토콜을 최적화하는 데 잘 활용할 수 있습니다.

Agilent Fragment Analyzer 시스템은 안정적이고 정확한 핵산 시료 평가를 위해 설계된 병렬 모세관 전기영동 기기입니다 (그림 1). 광범위한 응용 키트를 사용할 수 있습니다. 이러한 키트는 짧은 RNA 및 miRNA 품질 관리에 초점을 맞추고 200 뉴클레오타이드(nt) 이하의 좁은 범위에 중점을 두며 짧은 RNA의 분리능을 높입니다.

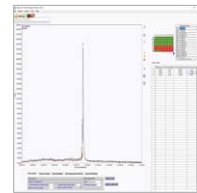
Agilent Oligo Pro II 시스템은 단일 가닥 DNA(ssDNA) 및 RNA 올리고뉴클레오타이드의 고처리량 분리 및 순도 분석을 위해 설계된 자동화된 병렬 CE 기기입니다. Oligo Pro II 시스템은 단일 가닥 핵산 시료가 캐필라리를 통과해 이동하며 크기에 따라 분리될 수 있도록 변성 겔을 사용하여 올리고에 대한 높은 분리능 및 직접 검출을 제공합니다. 시료의 염색 없는 검출을 위해 UV 흡수 분광법이 사용됩니다. 이 시스템은 교체 가능한 어레이를 통해 다양한 처리량을 수용할 수 있어 12개, 24개 또는 96개 시료를 동시에 분석할 수 있습니다. 사용자 개입 없이 최대 3개의 96-well plate까지 로드하고 분석할 수 있습니다.



Fragment Analyzer
(짧은 RNA 키트의 경우 < 200nt)



Oligo Pro II
(< 60mer ssDNA 및 ssRNA)



워크플로 1: 모세관 전기영동에 의한 핵산(짧은 길이) 분석.

모세관 전기영동(Agilent Fragment Analyser 및 Agilent TapeStation) 및 UV-Vis (Agilent Cary 3500 UV-Vis)를 통한 mRNA 순도 분석

체외 전사(IVT)에 의해 생산된 mRNA는 백신, 유전자 치료, 암 치료, 만성 감염 치료, 자가면역 질환 치료 등 다양한 응용 분야에 사용할 수 있습니다. 정밀하고 정확한 품질 관리(QC) 분석은 IVT mRNA 워크플로에서 중요한 부분을 차지합니다 (그림 2).

Agilent Fragment Analyzer 시스템은 mRNA 백신 개발의 다양한 체크포인트에서 여러 QC 단계에 사용되어 정확하고 정밀한 크기 결정과 순도 분석을 제공합니다. 이러한 QC 단계에서는 선형화된 플라스미드의 품질과 크기, IVT mRNA의 크기와 순도, poly(A) 꼬리의 길이, 최종 mRNA 백신 제품의 순도를 결정합니다.

마찬가지로, Agilent TapeStation 시스템은 PCR 증폭 DNA 템플릿과 중간 IVT mRNA 생성물의 크기를 결정할 수 있습니다. DNA 템플릿의 QC는 IVT 반응에 적절한 템플릿이 사용되도록 보장하여 시간과 비용을 절약합니다. Fragment Analyzer 및 TapeStation 시스템은 DNA와 RNA 분석 사이를

쉽게 전환할 수 있어 빠르고 안정적인 품질 검사가 가능하며 DNA 및 IVT mRNA 제품의 크기 결정이 가능하여 워크플로를 최적화하고 후반 응용을 위한 우수한 최종 제품을 보장할 수 있습니다.

UV-Vis 분광 광도계는 핵산이 260nm에서 최대 흡광도를 갖는다는 사실을 이용한 핵산 정량과 QC에 널리 사용됩니다. UV-Vis 측정은 mRNA 시료의 농도를 결정할 뿐만 아니라 시료에 오염 물질이 있는지 여부에 대한 정보를 제공할 수 있습니다. UV-Vis 분광 광도계는 이 작업을 간단하고 강력하게 수행할 수 있어 QC에 널리 사용됩니다. Agilent Cary 3500 멀티셀 UV-Vis 분광 광도계는 폭이 1.5mm 미만인 집속된 빔을 가지고 있으며, 필요한 경우 정확한 온도 제어를 위해 4개의 독립된 펠티에 블록으로 최대 7개 시료를 측정할 수 있어 소량의 핵산 시료를 매우 빠르고 정확하게 측정하는 데 이상적입니다. Agilent Cary UV Workstation 소프트웨어를 사용하면 시료 농도를 보고할 수 있습니다.

Agilent BioTek 마이크로플레이트 리더를 사용한 고처리량 mRNA 정량화 및 순도 평가

Agilent BioTek Synergy H1 멀티모드 리더는 UV/Vis 흡광도, 형광 및 발광을 포함하여 다양한 검출 모드를 사용할 수 있는 모듈식 멀티모드 마이크로플레이트 리더입니다. 이 시스템은 조정 가능한 모노크로매터 기반 광학 장치를 사용하여 230~999nm의 UV/Vis 흡광도를 측정할 수 있습니다. 핵산 정량화 및 순도 측정은 UV 투명 마이크로플레이트와 Agilent BioTek Take3 마이크로볼륨 플레이트에서 수행할 수 있습니다. Take3 플레이트를 사용하면 매우 작은 용량(2µL)과

큐벳의 핵산을 검출하고 순도를 평가할 수 있습니다. 핵산의 형광 측정은 핵산 염료를 삽입하는 Synergy H1을 사용하여 수행할 수도 있습니다. 마이크로플레이트 리더 형식의 이점에는 더 높은 처리량(최대 384웰 마이크로플레이트)에서의 측정이 포함됩니다. 또한 마이크로플레이트 기반 형식을 사용하면 자동화된 표준 마이크로플레이트 로딩 플랫폼을 사용하여 핵산 정량화 워크플로를 자동화할 수 있습니다.

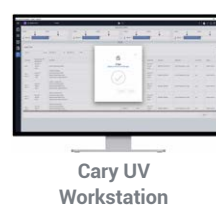
Fragment Analyzer
(< 9000nt)



TapeStation
(< 6000nt)



Cary 3500
(큐벳 기반 UV)
또는 BioTek
(마이크로플레이트 기반
UV 및 형광)



워크플로 2: 모세관 전기영동 또는 UV-Vis를 통한 mRNA 순도 분석.

mRNA 5' 캡핑 효율성 및 3' Poly-A 시퀀스 워크플로

mRNA 3' poly(A) 꼬리와 5'-캡핑은 번역 과정에 중요합니다. 성공적으로 캡핑된 물질의 비율, 캡핑 구조 유형 및 poly(A) 꼬리의 길이는 모두 번역 효율성과 mRNA 분해 속도에 영향을

미치는 것으로 나타났습니다. 따라서 5' 캡핑 및 3' poly(A) 시퀀스는 철저히 특성화하고 모니터링해야 하는 중요한 품질 속성(CQA)입니다(그림 3).



그림 3. mRNA를 코딩하는 전형적인 인간 단백질의 구조.

시료 분취

분리

검출

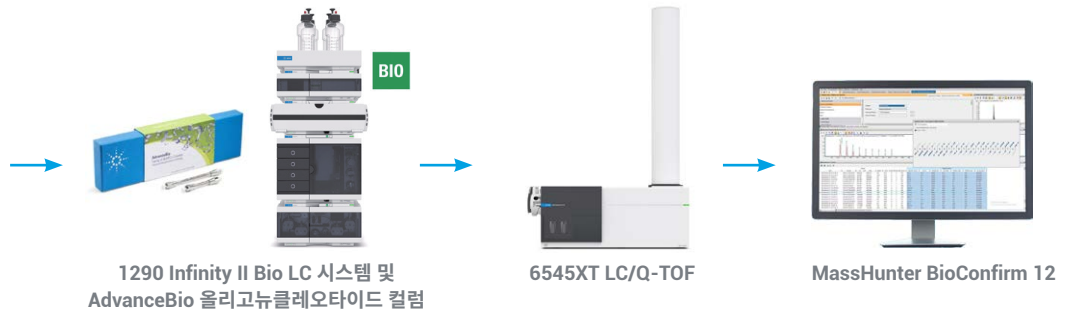
분석

5' 캡핑
올리고뉴클레오타이드
LC/MS

- 위치 지정
RNase-H 절단
- 시료 클린업

3' Poly-A 시퀀스
LC/MS

- RNase T1 분해
- oligo-dT 마그네틱 비드를
이용한 Poly-A 시료 농축



Fragment Analyzer

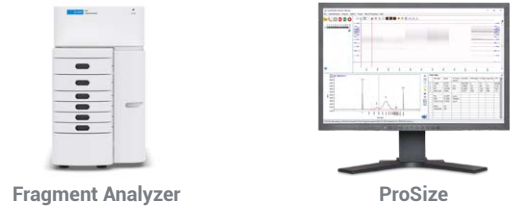


그림 4. 워크플로 3: mRNA 5' 캡핑 효율성 및 3' Poly-A 시퀀스 워크플로.

참고 문헌

CE에 의한 짧은 핵산 분석

- 1) Comparison of Small RNA Analysis using the Agilent Bioanalyzer and Agilent Fragment Analyzer Systems. Agilent Technologies 기술 개요, 발행 번호 [5994-4860EN](#), 2022.
- 2) Agilent Oligo Pro II 시스템의 성능 특성. Agilent Technologies 기술 개요, 발행 번호 [5994-3667KO](#), 2021.
- 3) Nucleic Acid Analysis for Sample Quality Assessment Using the Agilent Fragment Analyzer Systems. Agilent Technologies 응용 개요, 발행 번호 [5994-2813EN](#), 2022.
- 4) Single-Guide RNA Quality Assessment with the Agilent 5200 Fragment Analyzer System. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 [5994-0523EN](#), 2019.
- 5) 정확한 Oligonucleotide 순도 평가. Agilent Technologies 브로셔, 발행 번호 [5994-0421KO](#), 2021.

mRNA 순도 분석




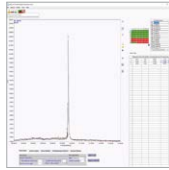
- 1) Best Practices for Analysis of IVT mRNA Using the Agilent Fragment Analyzer Systems. Agilent Technologies 기술 개요, 발행 번호 [5994-6568EN](#), 2023.
- 2) Best Practices for Analysis of In Vitro Transcribed (IVT) mRNA Using the Agilent Fragment Analyzer Systems. Agilent Technologies 기술 개요, 발행 번호 [5994-5927EN](#), 2023.
- 3) Quality Control in IVT RNA Workflow using Agilent TapeStation Systems. Agilent Technologies 기술 개요, 발행 번호 [5994-4882EN](#), 2022.
- 4) Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계를 용한 핵산 열 안정성 측정 모범 사례. Agilent Technologies 백서, 발행 번호 [5994-4028KO](#), 2022.
- 5) Assessment of Long IVT mRNA Fragments with the Agilent 5200 Fragment Analyzer system. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 [5994-0878EN](#), 2019.
- 6) Benefits of Quality Control in the IVT RNA Workflow Using the Agilent 5200 Fragment Analyzer System. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 [5994-0512EN](#), 2023.
- 7) TekTalk Newsletter: [Nucleic Acid Quantification](#)

mRNA 5' 캡핑 효율성 및 3' Poly-A 시퀀스 워크플로







- 1) Best Practices for Analysis of In Vitro Transcribed (IVT) mRNA Using the Agilent Fragment Analyzer Systems. Agilent Technologies 기술 개요, 발행 번호 [5994-5927EN](#), 2023.
- 2) Analyzing Poly(A) Tails of In Vitro Transcribed RNA with the Agilent Fragment Analyzer System. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 [5994-5325EN](#), 2022.
- 3) Rapid Analysis of mRNA 5' Capping with High Resolution LC/MS. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 [5991-3984EN](#), 2021.
- 4) 고분해능 LC/MS를 사용한 mRNA Poly-A 서열 변이 분석. Agilent Technologies 응용 자료, 발행 번호 [5994-3005KO](#), 2021.

최적화된 워크플로: 구성 및 주문 정보








워크플로 1: 모세관 전기영동을 통한 짧은 핵산 분석

변들	Fragment Analyzer		Oligo Pro II	
기기		5400 Fragment Analyzer (M5312AA) 5300 Fragment Analyzer (M5311AA) 5200 Fragment Analyzer (M5310AA)		Oligo Pro II(M5340AA) Oligo Pro II 12-Capillary Array Long (A2500-1275-5580) Oligo Pro II 24-Capillary Array Long (A2500-2475-5580) Oligo Pro II 96-Capillary Array Long (A2500-9675-5580)
소프트웨어		ProSize		Oligo Pro II 소프트웨어
시약	Small RNA Kit	DNF-470-0275		모세관 컨디셔닝 용액 (DN-475-1000) Oligo ssDNA 겔 (DN-415-0250) ssDNA Oligel 완충액 (DN-465-1000)

워크플로 2: mRNA 순도 분석

변들	Fragment Analyzer	TapeStation	Cary 3500(UV-Vis) (큐벳 기반 UV)	BioTek (마이크로플레이트 기반 UV 및 형광)
기기	 5400 Fragment Analyzer(M5312AA) 5300 Fragment Analyzer(M5311AA) 5200 Fragment Analyzer(M5310AA)	 4200 TapeStation (G2991BA)	 Cary 3500 멀티셀 UV-Vis 분광 광도계 (G9874A #001) 옵션: G9874A #002: Purge kit	BioTek Take3 플레이트 (TAKE3-SN) BioTek Synergy H1 멀티모드 리더 (UV-Vis 및 형광) (SH1M-SN) 옵션: BioTek Epoch 2 마이크로플레이트 분광 광도계 (UV-Vis) (EPOCH2NS-SN)
소프트웨어	 ProSize	 TapeStation 분석 소프트웨어	Cary UV Workstation 소프트웨어 G5194AA: Cary UV Workstation Plus(PC 미포함) G5195AA: Cary UV Workstation Plus(PC 포함) G6894AA: Cary UV Networked Workstation 소프트웨어(PC 미포함) G6896AA: Cary UV Networked Workstation 소프트웨어(PC 포함)	 BioTek Gen6 소프트웨어 (GEN6)
시약	RNA Kit(15nt)	RNA ScreenTape 5067-5576 RNA ScreenTape 시료 완충액 5067-5577 RNA ScreenTape Ladder 5067-5578		

워크플로 3: mRNA 5' 캡핑 효율성 및 3' Poly-A 시퀀스 워크플로

번들	LC/Q-TOF(5' 캡핑)	LC/Q-TOF(3' Poly-A)	Fragment Analyzer (3' Poly-A)
컬럼	 <p>AdvanceBio 올리고뉴클레오타이드 (659750-702)</p>	 <p>InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18(699675-702) Agilent PLRP-S (PL1912-1502)</p>	
LC	 <p>1290 Infinity II BioLC 필수: G7131A 또는 G7123A, G7137A, 및 G7116B 옵션: G7114B(VWD) 또는 G7117B(DAD)</p>		 <p>5400 Fragment Analyzer (M5312AA)</p> <p>5300 Fragment Analyzer (M5311AA)</p> <p>5200 Fragment Analyzer (M5310AA)</p>
MS	 <p>6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6549AA)</p>		
소프트웨어	 <p>BioConfirm 12 (M6025AA) 단일 워크스테이션: M6026AA 또는 M6027AA 네트워크 워크스테이션: M6025AA 또는 M6026AA 또는 M6027AA</p>		 <p>ProSize</p>

추가 정보:

www.agilent.com/oligonucleotides

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

Agilent Community에서 기술적 질문에 대한 해답을 얻고 리소스에 액세스하세요.

community.agilent.com

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

DE40332016

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2023, 2024
2024년 01월 23일, 한국에서 발행
5994-6933KO

한국애질런트테크놀로지스㈜
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

