

オリゴワークフローリソースガイド



短鎖核酸および mRNA 分析の 包括的なワークフローソリューション

研究開発から QC/製造まで



低分子干渉 RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマ、CRISPR ガイドなどの短鎖合成オリゴヌクレオチドは、遺伝子治療における新しいタイプの薬剤として大いに注目され、急速に成長してきました。過去3年間にわたり、mRNA ワクチンは COVID-19 に対して成功を収めてきましたが、このことは学术界と医薬品業界の両方で大きな関心を集めています。そのため、このような核酸および mRNA ワクチン製品の開発および特性解析において、堅牢な分析 QC メソッドのニーズが高まっており、多くのビジネスチャンスがあります。一般的な属性として、核酸サンプルのサイズ、純度、融解温度 (Tm) などがあります。さらに、5'-末端ジヌクレオチド修飾 (キャッピング)、mRNA の 3' ポリ (A) テール、およびその配列はすべて、転写プロセスにとって非常に重要であり、十分に特性解析をする必要があります。

キャピラリー電気泳動 (CE) による核酸 (短鎖) 分析

マイクロ RNA (miRNA)、低分子干渉 RNA (siRNA)、PIWI-interacting RNA (piRNA) といった、さまざまな種類の small (短鎖) RNA が、遺伝子サイレンシングや、その他の遺伝子調節メカニズムに関与している可能性があることが知られています。そのため、これらのサンプルの品質を正確に測定することは、ダウンストリームのアプリケーションを成功に導くと同時に、small RNA の分離および精製プロトコルを最適化します。

Agilent Fragment Analyzer System は、パラレルキャピラリー電気泳動装置であり、信頼性が高く正確な核酸サンプル評価向けに設計されています (図 1)。また、幅広いアプリケーションキットが用意されています。これらのキットは、small RNA および miRNA の品質管理に重点を置き、200 ヌクレオチド (nt) 以下の狭い範囲に集中しており、small RNA を高分解能で分離することができます。

Agilent Oligo Pro II System は、一本鎖 DNA (ssDNA) および RNA オリゴヌクレオチドのハイスループット分析および純度分析向けに設計された自動パラレルキャピラリー電気泳動システムです。Oligo Pro II System は高分離能分析およびサンプルの直接検出を特長とし、変性ゲルを用いてキャピラリー内で一本鎖核酸サンプルのサイズ分離を行うことができます。サンプルの検出は色素が不要の UV 吸収分光分析を行い、このシステムは、12、24、または 96 サンプルを同時に分析できる交換可能なキャピラリーアレイにより、さまざまなスループットニーズに対応できます。ユーザーが操作せずに最大 3 枚の 96 ウェルプレートの連続分析が可能です。

検出

解析

Fragment Analyzer
(< 200 nt、Small RNA キットと
ともに使用)



Fragment Analyzer

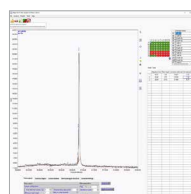


ProSize

Oligo Pro II
(< 60 mer ssDNA および ssRNA)



Oligo Pro II System



Oligo Pro II
ソフトウェア

ワークフロー 1: キャピラリー電気泳動による核酸 (短鎖) 分析

キャピラリー電気泳動 (Agilent Fragment Analyzer および Agilent TapeStation) および UV-Vis (Agilent Cary 3500 UV-Vis) による mRNA 純度分析

in vitro 転写 (IVT) により生成された mRNA は、ワクチン、遺伝子治療、がん治療、慢性感染症治療、自己免疫疾患治療など、さまざまな用途に使用できます。精密で正確な品質管理 (QC) 分析は、IVT mRNA ワークフローの重要な部分です (図 2)。

Agilent Fragment Analyzer System は、mRNA ワクチン開発のさまざまなチェックポイントにおける複数の QC ステップに使用することができます。正確で精密なサイズと純度分析が実施できます。これらの QC ステップは、直線化したプラスミドの品質とサイズ、IVT mRNA のサイズと純度、ポリ (A) テールの長さ、最終 mRNA ワクチン製品の純度を測定するためのものです。

同様に、Agilent TapeStation システムでは、PCR 増幅 DNA テンプレートおよび IVT mRNA 中間産物のサイズ測定が可能です。DNA テンプレートの QC により、IVT 反応に適切なテンプレートが使用されるようになるため、時間とコストを節約できます。Fragment Analyzer System と TapeStation システムは、DNA 分析と RNA 分析を簡単に切り替えることができるため、迅速で信頼性の高い品質チェックが可能になり、DNA と IVT mRNA 製品のサイジングを行うことで、ワークフローを最適化し、下流アプリケーションに適した最終製品を確実に提供することができます。

UV-Vis 分光光度計は、核酸が 260 nm で最大吸光度を示すことを利用して、核酸の定量および QC に広く使用されています。mRNA サンプルの濃度を測定するだけでなく、UV-Vis 測定を実施することにより、サンプル中に汚染物質が含まれているかどうかに関する情報を得ることができます。UV-Vis 分光光度計は、シンプルかつ堅牢にこの測定を実施することができるため、QC で広く使用されています。Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計は、1.5 mm 未満の幅の集束度の高いビームを備えており、必要に応じて正確な温度制御を行うために 4 個の独立したペルチェブロックを使用して最大 7 個のサンプルを測定できるため、少量の核酸サンプルを非常に高速かつ高精度で測定するのに最適です。Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアにより、サンプルの濃度をレポートすることができます。

Agilent BioTek マイクロプレートリーダーを用いたハイスループット mRNA 定量および純度評価

Agilent BioTek Synergy H1 マルチモード・プレートリーダーは、モジュール式のマルチモードマイクロプレートリーダーであり、UV/Vis 吸光度、蛍光、発光などのさまざまな検出モードが使用できます。このシステムは、チューニング可能なモノクロメータベースの光学系により、230 ~ 999 nm の UV/Vis 吸光度を測定できます。核酸の定量や純度の測定は、UV 透明マイクロプレートや Agilent BioTek Take3 微量サンプル測定プレートで実施することができます。Take3 微量サンプル測定プレートを使用することにより、非常に少量 (2 µL) においてキュベットで、核酸の検出や純度評価を実施できます。核酸の蛍光測定は、

核酸色素を挿入した Synergy H1 でも可能です。マイクロプレートリーダーフォーマットの利点は、より高いスループット (最大 384 ウェルマイクロプレート) での測定が可能なことです。マイクロプレートベースのフォーマットでは、標準的な自動マイクロプレートローディングプラットフォームを用いた、核酸定量ワークフローの自動化も可能です。

検出

解析

Fragment Analyzer
(< 9000 nt)



TapeStation
(< 6000 nt)



Cary 3500
(キュベットベースの UV)
または BioTek
(マイクロプレートベースの
UV および蛍光)



ワークフロー 2 : キャピラリー電気泳動または UV-Vis による mRNA 純度分析

mRNA 5' キャッピング効率および 3' ポリ (A) 配列ワークフロー

mRNA の 3' ポリ (A) テールおよび 5' キャッピングは、翻訳プロセスにとって重要です。キャッピングに成功した物質の割合、キャッピング構造の種類、およびポリ (A) テールの長さはすべて、翻訳効率と mRNA の

分解速度に影響を与えることが示されています。そのため、5' キャッピングと 3' ポリ (A) 配列は重要な品質特性 (CQA) であり、十分に特性解析を行い、モニタリングする必要があります (図 3)。



図 3. 代表的なヒトタンパク質コーディング mRNA の構造

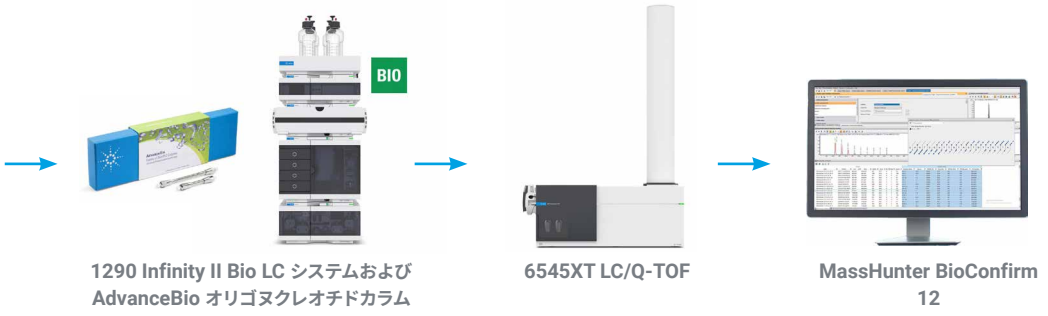


5' キャッピング
オリゴヌクレオチドの
LC/MS

- 部位特異的
RNase-H 切断
- サンプルクリーンアップ

3' ポリ (A) 配列
LC/MS

- RNase T1 消化
- Oligo-dT 磁気ビーズによる
ポリ (A) サンプル濃縮



Fragment Analyzer

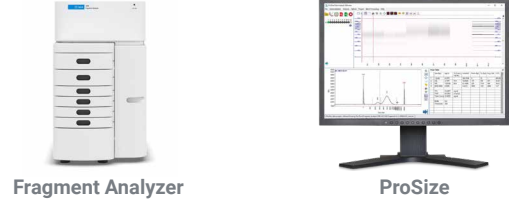


図 4.ワークフロー 3：mRNA 5' キャッピング効率および 3' ポリ (A) 配列ワークフロー

参考文献

CE による短鎖核酸分析

- 1) Comparison of Small RNA Analysis using the Agilent Bioanalyzer and Agilent Fragment Analyzer Systems. Agilent Technologies technical overview, publication number [5994-4860EN](#), 2022.
- 2) Performance Characteristics of the Agilent Oligo Pro II System. Agilent Technologies technical overview, publication number [5994-3667EN](#), 2021.
- 3) Nucleic Acid Analysis for Sample Quality Assessment Using the Agilent Fragment Analyzer Systems. Agilent Technologies application compendium, publication number [5994-2813EN](#), 2022.
- 4) Single-Guide RNA Quality Assessment with the Agilent 5200 Fragment Analyzer System. Agilent Technologies application note, publication number [5994-0523EN](#), 2019.
- 5) Accurate Assessment of Oligonucleotide Purity. Agilent Technologies brochure, publication number [5994-0421EN](#), 2021.

mRNA 純度分析




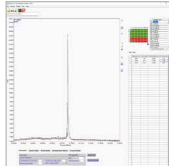
- 1) Best Practices for Analysis of IVT mRNA Using the Agilent Fragment Analyzer Systems. Agilent Technologies technical overview, publication number [5994-6568EN](#), 2023.
- 2) Best Practices for Analysis of In Vitro Transcribed (IVT) mRNA Using the Agilent Fragment Analyzer Systems. Agilent Technologies technical overview, publication number [5994-5927EN](#), 2023.
- 3) Quality Control in IVT RNA Workflow using Agilent TapeStation Systems. Agilent Technologies technical overview, publication number [5994-4882EN](#), 2022.
- 4) Cary 3500 UV-Vis 分光光度計による核酸の熱安定性測定のベストプラクティス. Agilent Technologies white paper, publication number [5994-4028JAJP](#), 2022.
- 5) Assessment of Long IVT mRNA Fragments with the Agilent 5200 Fragment Analyzer system. Agilent Technologies application note, publication number [5994-0878EN](#), 2019.
- 6) Benefits of Quality Control in the IVT RNA Workflow Using the Agilent 5200 Fragment Analyzer System. Agilent Technologies application note, publication number [5994-0512EN](#), 2023.
- 7) TekTalk Newsletter: [Nucleic Acid Quantification](#)

mRNA 5' キャッピング効率および 3' ポリ (A) 配列ワークフロー

- 1) Best Practices for Analysis of In Vitro Transcribed (IVT) mRNA Using the Agilent Fragment Analyzer Systems. Agilent Technologies technical overview, publication number [5994-5927EN](#), 2023.
- 2) Analyzing Poly(A) Tails of In Vitro Transcribed RNA with the Agilent Fragment Analyzer System. Agilent Technologies application note, publication number [5994-5325EN](#), 2022.
- 3) 高分解能 LC/MS を用いた mRNA 5' キャッピングの高速分析. Agilent Technologies application note, publication number [5991-3984JAJP](#), 2021.
- 4) 高分解能 LC/MS を用いた mRNA ポリ A 配列変異体の分析. Agilent Technologies application note, publication number [5994-3005JAJP](#), 2021.

最適化されたワークフロー：構成と詳細情報








ワークフロー 1: キャピラリー電気泳動による短鎖核酸分析

バンドル	Fragment Analyzer		Oligo Pro II	
機器		<p>5400 Fragment Analyzer (M5312AA)</p> <p>5300 Fragment Analyzer (M5311AA)</p> <p>5200 Fragment Analyzer (M5310AA)</p>		<p>Oligo Pro II (M5340AA)</p> <p>Oligo Pro II 12-Capillary Array Long (A2500-1275-5580)</p> <p>Oligo Pro II 24-Capillary Array Long (A2500-2475-5580)</p> <p>Oligo Pro II 96-Capillary Array Long (A2500-9675-5580)</p>
ソフトウェア		ProSize		Oligo Pro II ソフトウェア
試薬	Small RNA キット	DNF-470-0275		<p>Capillary Conditioning Solution (DN-475-1000)</p> <p>Oligo ssDNA Gel (DN-415-0250)</p> <p>ssDNA Oligel Buffer (DN-465-1000)</p>

ワークフロー 2: mRNA 純度分析

バンドル	Fragment Analyzer	TapeStation	Cary 3500 (UV-Vis) (キュベットベースの UV)	BioTek (マイクロプレートベースの UV および蛍光)
機器	<p>5400 Fragment Analyzer (M5312AA)</p> <p>5300 Fragment Analyzer (M5311AA)</p> <p>5200 Fragment Analyzer (M5310AA)</p>	<p>4200 TapeStation (G2991BA)</p>	<p>Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計 (G9874A #001)</p> <p>オプション: G9874A #002: パージキット</p>	<p>BioTek Take3 微量サンプル測定プレート (TAKE3-SN)</p> <p>BioTek Synergy H1 マルチモード・プレートリーダー (UV-Vis および蛍光) (SH1M-SN)</p> <p>オプション: BioTek Epoch 2 吸光度プレートリーダー (UV-Vis)</p>
ソフトウェア	ProSize	TapeStation アナリシソフトウェア	<p>Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェア</p> <p>G5194AA: Cary UV Workstation Plus, PC なし</p> <p>G5195AA: Cary UV Workstation Plus, PC 付</p> <p>G6894AA: Cary UV ネットワークワークステーションソフトウェア, PC なし</p> <p>G6896AA: Cary UV ネットワークワークステーションソフトウェア, PC 付</p>	<p>BioTek Gen6 ソフトウェア (GEN6)</p>
試薬	RNA kit (15 nt)	<p>RNA ScreenTape 5067-5576</p> <p>RNA ScreenTape サンプル緩衝液 5067-5577</p> <p>RNA ScreenTape ラダー 5067-5578</p>		

ワークフロー 3:mRNA 5' キャッピング効率および 3' ポリ(A) 配列ワークフロー

バンドル	LC/Q-TOF (5' キャッピング)	LC/Q-TOF (3' ポリ(A))	Fragment Analyzer (3' ポリ(A))
カラム	 <p>AdvanceBio オリゴヌクレオチド (659750-702)</p>	 <p>InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18 (699675-702) Agilent PLRP-S (PL1912-1502)</p>	
LC	 <p>1290 Infinity II Bio LC 必須: G7131A または G7123A、G7137A、および G7116B オプション: G7114B (VWD) または G7117B (DAD)</p>		 <p>5400 Fragment Analyzer (M5312AA) 5300 Fragment Analyzer (M5311AA) 5200 Fragment Analyzer (M5310AA)</p>
MS	 <p>6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6549AA)</p>		
ソフトウェア	 <p>BioConfirm 12 (M6025AA) 1 台のワークステーション: M6026AA または M6027AA ネットワークワークステーション: M6025AA、M6026AA、または M6027AA</p>		 <p>ProSize</p>

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE40332016

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023, 2024

Printed in Japan, January 23, 2024

5994-6933JAJP

