Waters™

アプリケーションノート

BioAccord LC-MS システムおよび INTACT Mass waters_connect アプリケーションを使 用した RNA の CQA 分析

Rebecca J. D'Esposito, Catalin E. Doneanu, Heidi Gastall, Scott J. Berger, Ying Qing Yu

研究目的のみに使用してください。診断用には使用できません。

要約

このアプリケーションノートでは、リボ核酸(RNA)ベースの医薬品の重要品質特性(CQA)を分析するための新しい インフォマティクス機能を紹介します。BioAccord[™] LC-MS システムを使用し、waters_connect[™] インフォマティク スプラットホームの制御下で、イオン対逆相(IP-RP)液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)データを取り込み ました。mRNA Cleaver マイクロアプリ(*in silico* フラグメント生成用)、INTACT Mass アプリ(RNA 消化産物の検出 および割り当て用)、Coverage Viewer マイクロアプリ(消化データのカバレッジの視覚化用)などのアプリケーショ ン固有のソフトウェアが開発されました。このワークフローは、新世代の医薬品およびワクチンに一般的なシングルガ イド RNA(sgRNA)およびメッセンジャー RNA(mRNA)の両方の CQA について実証されています。

アプリケーションのメリット

- データ解析用の新しいバージョンの INTACT Mass アプリおよび消化物フラグメントの in silico 生成とキュレーションのための追加のマイクロアプリツールを使用した、RNA 消化フラグメントマッピング、核酸消化産物の質量確認のためのデータ分析ワークフロー
- mRNA の 5' キャッピング効率および 3' ポリ(A) テールの不均一性を評価するための INTACT Mass アプリを使用 する追加のワークフロー

はじめに

ここ 10 年で、RNA ベースの医薬品およびワクチンの開発が急増しました¹⁻³。 新型コロナウイルスに対する最近の 2 種類の mRNA ベースのワクチンの開発および承認により、RNA ベースの医薬品がバイオ医薬品業界の最前線に押し出 されました⁴⁻⁶。 そのため、RNA ベースの医薬品の製造プロセスを適切に管理し続けるために、CQA をモニターするた めの分析法の開発の優先度が高くなっています。核酸医薬品の CQA には、配列確認、5' キャッピングの効率(mRNA)および構造、3' ポリ(A)末端の不均一性(mRNA)の分析、修飾ヌクレオチドの位置決定、活性 RNA 生成物 の純度評価などが含まれています。

LC-MS システムは、RNA ベースの医薬品の CQA を特性解析する際の有効なツールとして確立されています⁷⁻¹⁰。ただ し、データ解析が共通のボトルネックであり、これに対処する必要があります。このアプリケーションノートでは、 waters_connect インフォマティクスプラットホームで開発されたツール(特に INTACT Mass、mRNA Cleaver、 Coverage Viewer の各アプリケーション)を使用した RNA の CQA 分析のためのデータ解析ワークフローについて説明 します。

実験方法

試薬およびサンプル前処理

今回報告する実験条件は、sgRNA の消化および配列マッピング実験用のものです。このアプリケーションノート内の mRNA の CQA データ生成に適した実験の詳細およびサンプル情報は、関連するウォーターズのアプリケーションノー ト(mRNA マッピングデータ(Gaye ら)、3' Poly(A)テールのデータ(Doneanu ら)、5' キャップのデータ(Ngyuen ら))に記載されています^{13,14,18}。

データ解析ワークフローの例:

N,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA、純度 99.5%、カタログ番号 387649-100ML)、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオ ロ-2-プロパノール(HFIP、純度 99%、カタログ番号 105228-100G)、エタノール(HPLC グレード、カタログ番号 459828-2L)、重炭酸アンモニウム(LiChropur LC-MS Supelco 試薬、カタログ番号 5330050050)は Millipore Sigma(ミズーリ州セントルイス)から購入しました。アセトニトリル(LC-MS グレード、カタログ番号 34881-1L) およびメタノール(LC-MS グレード、カタログ番号 34966-1L)は、Honeywell(ノースカロライナ州シャーロット) から入手しました。HPLC グレードのタイプ I 脱イオン水(DI)は、Milli-Q システム(Millipore、マサチューセッツ州 ベドフォード)を使用して精製しました。移動相は毎日新しく調製しました。sgRNA 消化用のヌクレアーゼフリー超 高純度水(カタログ番号 J71786.AE)は、Thermo Fisher Scientific(マサチューセッツ州ウォルサム)から購入しま した。 100 mer の sgRNA は IDT(Integrated DNA Technologies、アイオワ州コーラルビル)から購入し、ヌクレアーゼフリ ー水 100 µL に再溶解しました。sgRNA には、配列の末端の位置 1、2、3 および 97、98、99 に、6 つの安定性を高め る修飾ヌクレオチドが含まれています(図 1A)。含まれている修飾ヌクレオチドは 2'O-メチルグアノシン、2'O-メチ ルウリジン、2'O-メチルアデノシンで、各修飾にチオリン酸基が含まれています(図 1B)。RNase T1 リボヌクレアー ゼは Worthington Biochemical Corporation(ニュージャージー州レイクウッド)から購入しました。sgRNA の消化 では、5 µL の再溶解した sgRNA を消化バッファー(100 mM 重炭酸アンモニウム)1 µL、ヌクレアーゼフリー水 43 µ L、および 1 mg/mL RNase T1 溶液(ヌクレアーゼフリー水中で調製)1 µL と混合しました。この消化混合液を QuanRecoveryTM MaxPeakTM 300 µL バイアル中で調製し、37 °C で 15 分間インキュベートした後、直ちに LC-MS で分 析しました。

A #:JGAUCUCUCAACUUUAACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCJJJ



図 1. 分析した sgRNA の配列。「#」は 2'O-メチルグアノシン、「:」は 2'O-メチルアデノシン、「J」は 2'O-メチルウ リジンをそれぞれ表します。すべての修飾ヌクレオチドにチオリン酸基が含まれています。

データセットはすべて、UNIFI™ アプリケーション(バージョン 3.6.0)を使用して waters_connect インフォマティ クスプラットホーム(バージョン 3.2.0)内で取り込み、INTACT Mass アプリケーション(バージョン 1.6.0)を使用 して解析しました。バージョン 1.0.0 の mRNA Cleaver およびバージョン 1.0.0 の Coverage Viewer マイクロアプリを 使用しました。

LC 条件

LC-MS システム:

ACQUITY[™] Premier UPLC[™] (バイナリー)を搭載し

た BioAccord LC-MS システム

プレカラム:	VanGuard FIT カートリッジホルダー(製品番号 : 186007949)付きの、1.7 μm BEH™ C18 粒子を充 塡した 2.1 × 5 mm ACQUITY Premier FIT カートリ ッジ(製品番号: 186009459)
カラム:	ACQUITY Premier OST カラム 1.7 μm、130 Å、2.1 × 150 mm(製品番号:186009486)
カラム温度:	60 °C
流速:	300 µL/分
移動相: 移動相 A:	8 mM DIPEA(N,N-ジイソプロピルエチルアミン)、 40 mM HFIP(1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパ ノール)含有脱イオン水(pH 8.8)
溶媒 B:	4 mM DIPEA、4 mM HFIP 含有 75% エタノール
サンプル温度:	6 °C
サンプルバイアル:	QuanRecovery MaxPeak HPS バイアル(製品番号 :186009186)
注入量:	5 μL

sgRNA 実験のグラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	組成 A (%)	組成 B (%)	曲線
0	0.3	100	0	初期条件
45	0.3	85	15	6
50	0.3	85	15	6
50.5	0.3	15	85	6
51.5	0.3	15	85	6
52	0.3	100	0	6

MS 条件

取り込みモード:	フルスキャン
イオン化モード:	ESI (-)
キャピラリー電圧:	0.8 kV
コーン電圧:	45 V
イオン源温度:	120 °C
脱溶媒温度:	500 °C
脱溶媒ガス(N ₂)圧力:	6.5 bar
ToF 質量範囲:	<i>m/z</i> 400 ~ 5000
取り込み速度:	2 Hz
ロックマス:	waters_connect ロックマス溶液(製品番号 : 186009298)
データ取り込みおよび解析用インフォマティクスプラ	waters_connect v.3.2.0

ットホーム

データ取り込み:

データ解析:

UNIFI アプリ、バージョン 3.6.0

INTACT Mass アプリ、バージョン 1.6.0

結果および考察

オリゴマッピングのデータ解析ワークフロー

核酸の CQA 分析を行う必要性の高まりに対処するために、LC-MS ベースのオリゴマッピング手法が過去数十年にわた って開発されてきました¹⁹⁻²³。オリゴマッピングは、酵素消化と精密質量決定によりターゲットの核酸の一次構造 (配列)が得られることから、ペプチドマッピングに類似しています。オリゴマッピングで使用される一般的な酵素に は、RNase T1、RNase A、MazF などがあります。今回説明する酵素消化では、すべてのグアノシンの 3' 末端の後で オリゴヌクレオチドを切断する RNase T1 を使用しました。RNase T1 のメカニズムはよく研究されており、以前に報 告されています²⁴⁻²⁷。使用した酵素が1種類のみであったため、100%のシーケンスカバレッジは期待しませんでした 。通常、オリゴマッピング実験では複数の酵素を並行して使用します。これは、各酵素が異なる特異性を持ち、異なる セットの消化フラグメントが生じるためです。これにより、各酵素によって得られる消化フラグメントの配列がオーバ ーラップして、シーケンスカバレッジが高まるはずです。しかし、このアプリケーションノートの説明を簡潔にするた め、ここでは1種類の酵素に限定しています。

オリゴマッピング実験の別の戦略として、酵素消化の条件を変更することで、オリゴヌクレオチドを意図的に部分消化 するやり方があります。部分消化を使用することで、核酸の消化フラグメントの平均長が長くなるため、配列と質量の 両方においてより一意になります。このアプローチでは、カバー率は向上しますが、部分消化の制御が困難であり、重 複が予測される追加の *m/z* ピークや不完全消化フラグメントの共溶出により、すでに複雑なサンプルがさらに複雑にな る可能性があります。今回示したデータでは、対象の RNA を完全に消化することが目的であり、そのために最適化し た酵素条件を使用しました。

1. in silico 消化成分の生成

オリゴマッピングおよびその他の核酸の CQA のデータ解析ワークフローを図 2 に示します。in silico 消化フラグメント は、mRNA Cleaver マイクロアプリを使用して生成しました。このマイクロアプリのグラフィックユーザーインターフ ェース(GUI)を図 3A に示します。このソフトウェアの操作性を向上させるためのユーザーガイドが GUI の左手側に あります。mRNA Cleaver マイクロアプリは、オリゴマッピング調査のための柔軟な消化カリキュレーター兼ライブラ



図 2. RNA の CQA の特性解析用ワークフローのスキーム

ユーザーは、3 つの埋め込みファイルを変更して、固有のニーズに合わせてカリキュレーターツールをカスタマイズす ることができます。例えば、対象の配列に修飾ヌクレオチドが含まれている場合は、質量および化学組成、並びにこれ らを表す1文字(または記号)を residues.csv ファイル(ファイルパスはユーザーガイドにあります)に追加するこ とができます。修飾ヌクレオチドを表す文字(または記号)を使用することで、調整済み質量および化学組成を使用し て関連する消化産物を算出するように、プログラムが指示されます。同様に enzymes.csv ファイルおよび modifications.csv ファイルを変更することで、ユーザーの目的に合わせて、さまざまな酵素や mRNA 固有の修飾(別 の 5' キャップや 3' ポリ(A)の分布など)を追加することができます。

消化固有の設定は配列フィールドの下にあります(図 3A)。これには、消化産物の末端の調整、特定の消化産物を生 成すべきかどうか、含める切れ残りの数、mRNA 固有の修飾を考慮すべきかどうかなどが含まれます。生成した消化産 物のリストのフィルターが右手側にあり、ここで生成された消化産物が長さの設定に基づいてフィルタリングされます 。さらに、Filter Duplicate Sequences(重複配列のフィルタリング)ボックスにチェックを入れるかどうかを選択す ることができます。重複配列とは、同じ配列のアイデンティティーを持つ消化フラグメントのことです。mRNA Cleaver では既定でこのボックスが選択されています。つまり、重複配列がある場合、その配列は一度だけリストされ 、その配列がある別の場所は別の列にリストされます。このワークフローでは、後続のデータ分析ステップでの Coverage Viewer の使用においては、このボックスは選択していません。MS 固有の設定がフィルターの下にあり、こ こでユーザーは、予想質量イオンの極性、生成されたリストでモノアイソトピック質量または平均質量を参照するかど うか、各消化産物について生成する荷電状態の範囲、生成する *m/z* の範囲を指定することができます。Calculate(計 算)をクリックすると、消化産物のリストが生成され、このリストがカンマ区切りファイル(.csv)として出力されま す。出力の例を図 3B に示します。この .csv ファイルは、ターゲットを絞った検索成分解析として INTACT Mass にイ ンポートされます。

	Digestion Settings:	Filters:			
mRNA Cleaver 1.0.0	Sequence	Min Length		Max Length	
An in-silico digestion calculator and library generator for Oligo Mapping of mRNA.	#JGAUCUCUCAACUUUAACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC	3	- +	200	
111111111		Min a-specific Length		Max a-specific Length	
user guide	Enzyme	3	- +	200	
See user guide ^	RNase T1	Filter Duplicate Sequences			
Overview	Terminus	MS Settings:			
Enter an mRNA sequence into the Sequence text box, select an enzyme	Enzyme default terminus	Polarity		Mass	
from the drop-down and click the	a-specific digestion	O Negative O Positive		O Monoisotopic 🔿 Average	
containing predicted digestion	Missed Cleavages	Min Charge		Max Charge	
products and the following properties:	2 - 4	. 1	- +	10	
 Item Name: The sequence of the digestion product suffixed with "p" 	Modification	Min m/z		Max m/z	
or "cP" to indicate a linear	None	100	- +	4000	
terminus and a modification prefix/suffix where appropriate.	Calculate				
 Formula: The elemental composition of the digestion 		#	2'0-	・メチルグアノシン + S	
product.			2'0-	メチルアデノシン+S	
Location: Location in the original converse of the first occurrence of			20		_

図 3. (A) mRNA Cleaver マイクロアプリのユーザーインターフェース (GUI)

A h	B	c	D	E	F	G	H	1	J	K	L	M	N	0	P	Q	R	\$
Item Name	Formula	Location	Tag "Fragment#"	Tag "Precursor"	Additional	neutral mass (Monoisotopic)	start	end	length	1.	2-	3-	4-	5-	6-	7-	8-	9-
#JGp	C42H55N17O26P4S3	#1:G4	R1	R1	-	1433.161675	1	1 4	4	1432.2	715.57	476.71	-		-	-	-	-
AUCUCUCAACUUUAACGp	C159H200N57O121P17	A5:G21	R2	R2	-	5369.678846	3	5 21	17	-	2683.8	1788.9	1341.4	1072.9	893.9	766.1	670.2	595.
UUUUAGp	C56H70N18O46P6	U22:G27	R3	R3	-	1916.211727	2	2 27	6	1915.2	957.1	637.73	478.05	382.24	-	-	-	-
CUAGp	C38H49N15O29P4	C30:G33	R5	R5	-	1303.177108	30	33	4	1302.2	650.58	433.39	-	-	-	-	-	- 2
AAAUAGp	C59H73N27O40P6	A34:G39	R6	R6	-	1985.293381	34	1 39	6	1984.3	991.64	660.76	495.32	396.05	-	-	-	- 1
CAAGp	C39H50N18O27P4	C40:G43	R7	R7	-	1326.204326	4) 43	4	1325.2	662.09	441.06	-	<u>-</u>	-	-	-	-
UUAAAAUAAGp	C97H119N41068P10	U44:G53	R8	R8	-	3255.449025	4	4 53	10	3254.4	1626.7	1084.1	812.85	650.08	541.6	464.1	405.9	360.
CUAGp	C38H49N15O29P4	C55:G58	R10	R10	-	1303.177108	5	5 58	4	1302.2	650.58	433.39	-	-	-	-	-	-
UCCGp	C37H49N13O30P4	U59:G62	R11	R11	2	1279.165875	5	9 62	4	1278.2	638.58	425.38	21	20	2	27	-	20 C
1 UUAUCAACUUGp	C103H129N36O80P11	U63:G73	R12	R12	-	3490.424643	6	3 73	11	3489.4	1744.2	1162.5	871.6	697.08	580.7	497.6	435.3	386.
2 AAAAAGp	C60H74N30O38P6	A74:G79	R13	R13	2	2008.320599	7	1 79	6	2007.3	1003.2	668.43	501.07	400.66	2	-	-	20
CACCGp	C47H62N19O35P5	C83:G87	R16	R16	2	1607.23438	8	87	5	1606.2	802.61	534.74	400.8	-	-	-	-	-
4 UCGp	C28H37N10O23P3	U90:G92	R18	R18	-	974.124588	9	92	3	973.12	486.06	-	-	-	-	-	-	-
5 CJJJU	C48H63N11O34P4S3	C96:U100	R21	R21	-	1557.165149	9	5 100	5	1556.2	777.58	518.05	388.28	-	-	-	-	-

図 3. (B) mRNA Cleaver からの出力例

2. オリゴフラグメントの質量確認

in silico 消化産物のリストが生成され、消化済みサンプルについて実験データが収集されたら、ワークフローの次のス テップは、waters_connect 内の INTACT Mass アプリを使用してデータを解析することです。mRNA Cleaver マイク ロアプリからの出力により、消化産物の予想質量およびその分子 ID が得られます。これらをアプリケーション内の Expected Masses(予想質量)列に直接コピーすることができます。修飾を追加して、一般的な付加イオンおよび配列 の修飾を含めることができます。図 4A には分析で解析が終了した後の結果の画面が含まれ、図 4B には代表的なデコ ンボリューション済みスペクトル出力が示されています。INTACT Mass で得られる結果、MS、UV、TIC の各テーブル は、テーブルの右手側にあるダウンロードボタンを使用してダウンロードすることができます。



図 4. (A) INTACT Mass アプリケーションの結果のダッシュボード



図 4. (B) デコンボリューションしたスペクトルの出力例

INTACT Mass アプリによって生成された表形式のデータは、フラグメントのマッピングデータを示す重要な結果です が、Coverage Viewer マイクロアプリを使用して、配列に対するこれらの結果の視覚化およびシーケンスカバレッジの 計算を行うことができます。Coverage Viewer マイクロアプリの GUI を図 5 に示します。対象の RNA 分子の配列が配 列フィールドに入力されており、ワークフローの最初のステップで生成された mRNA Cleaver の出力をインポートして 、ターゲット消化フラグメントリストに入力することができます(左下隅)。左側の Import(インポート)ボタンを 使用して INTACT Mass の結果ファイルをインポートすることができます。ターゲットが確認されると、シーケンスカ バレッジが計算され、GUI の右手側に表示されます。INTACT Mass の結果ファイルをインポートすると、キーワード Pass(合格)が付いた消化フラグメントは Confirmed(確認)と見なされます。ユーザーがチェックを外すことで、 手動で割り当てた産物も Confirmed(確認)と見なされるようにすることができます。関連する配列の下の赤色の領 域が緑色に変わり、配列の特定の部分が精密質量測定によって確認されたことが示されます。完了後は、Confirmed(確認)列のターゲットとする消化フラグメントの部分を .csv としてエクスポートし、後で使用することができます。 さらに、Capture image to clipboard(画像をクリップボードにキャプチャー)をクリックしてカバレッジマップの画 像をコピーし、別のプログラムに保存することができます。

Sequence:								- a ×
								Courses 810%
#JGAUCUCUC	AACUUUA	AACGUUUUAG	AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGC	UAGUCCGUUAUCAACUUG	SAAAAAGUGG	CACCGAGUCGGUGCIJJU		Coverage: 9100%
#JGAUCUCUC	AACUUUA	AACGUUUUAG	AccurdanulaceAcuuaaauaaco	UAGUCCGUUAUCAACUUG	AAAAAGUGG	CACCOAGUCGUGCIJU		1:3 0AU CUC UCA ACU UUA ACG UUU UAG AGC UAG AAA UAG CAA OUU AAA AUA AGG CUA GUC GUU UAU CAA CUU OAA AAA OUG GCA COO AGU GOG UGC 333 U
Load target I Confirmation	st C:\Us s: Impor	Isers\usrdeso\0 nt Export. Description	OneDrive - Waters Corporation\Documen	ts\projects\CONFIRM-sequ Formula	vencesupport\ Fragment	robtestcase\1aa_2missed.cs Start End Average neutra	Clear all confirmation	
Load target I Confirmation	st C:\Us s: Impor Location H1:G21	Isers\usrdeso\0 nt Export. Description	OneDrive - Waters Corporation\Documen	ts\projects\CONFIRM-sequ Formula C201H253N740146P2153	Fragment	robtestcase\1aa_2missed.cs	Clear all confirmation mass Monoisotopic neutra 6784.8299569	
Load target I Confirmation Confirmed	st C:\Us s: Impor location H1:G21 H1:G27	Isers\usrdeso\0 art Export. Description	OneDrive - Waters Corporation/Documen	ts\projects\CONFIRM-sequ Formula C201H253N740146P2153 C257H321N920191P2753	Fragment	robtestcase\1aa_2missed.cs Start End Average neutra 1 21 1 27	Clear all confirmation mass Monoisotopic neutra 6784.8299569 8683.0311199	
Load target I Confirmation	st C:\Us s: Impor location H1:G21 H1:G27 H1:G4	Isers\usrdeso\(artExport. Description	OneDrive - Waters Corporation/Documen	ts\projects\CONFIRM-sequ Formula C201H253N74O146P2153 C257H321N92O191P2753 C42H55N17026P453	Fragment 3 8 R1-2 1 8 R1-3 1 R1 1	robtestcase\1aa_2missed.cs Start End Average neutra 21 27 4	Clear all confirmation mass Monoisotopic neutra 6784.8299569 8683.0311199 1433.1616749	
Load target I Confirmation Confirmed I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	st C:\Us s: Impor Location H1:G21 H1:G27 H1:G4 A28:G33	isers\usrdeso\C art Export. Description	OneDrive - Waters Corporation/Documen Item name #JGAUCUCUCAACUUUAACGp #JGp #JGp #GCUAGp	Formula C201H253N74O146P2153 C257H321N92O191P2753 C42H55N17026P453 C58H73N25O42P6	Fragment 3 8 R1-2 1 8 R1-3 1 R1 1 R4-5 2	robtestcase\1aa_2missed.ce Start End Average neutra 1 21 2 7 1 4 8 33	Clear all confirmation mass Monoisotopic neutra 6784.8299569 8683.0311199 1433.1616749 1977.277063	
Load target I Confirmation Confirmed I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	st C:\Us s: Impor Location H1:G21 H1:G27 H1:G4 L28:G33 L28:G39	isers\usrdeso\C art Export. Description	IneDrive - Waters Corporation/Documen Inem name #JGAUCUCCAACUUUAACGp #JGG AGCUAGAUUCAACUUUAACGUUUUAG #JGG AGCUAGAUAUGp	Formula C201H253N740146P2153 C257H321N920191P2753 C42H55N17026P453 C58H73N25042P6 C117H144N52081P12	Fragment 3 8 R1-2 1 3 R1-3 1 R1 1 R4-5 2 R4-6 2	Start End Average neutra 21 27 1 4 8 33 8 39	Clear all confirmation mass Monoisotopic neutra 6784.8299569 8683.0311199 1433.1616749 1977.277063 3944.559860000001	
Load target I	st C:\Us s: Impor Location H1G21 H1G27 H1G4 L28:G33 L28:G39 L34:G39	Isers\usrdeso\C ort Export. Description	OneDrive - Waters Corporation/Documen Rem name #JGAUCUCUCAACUUJAACGp #JGA #JGAUCUCUCAACUUJAACGD #JGA ACULAGP ACULAGP ACULAGP	Formula C201H253N74O146P2153 C257H231N92O191P2753 C42H55N17020P433 C58H73N25042P6 C117H144N52081P12 C59H73N27040P6	Fragment 3 3 R1-2 1 3 R1-3 1 R1-3 2 R4-5 2 R4-6 3	robtestcase\faa_2missed.cs Start End Average neutra 21 27 18 23 28 39 4 4 39	Clear all confirmation mass Monoisotopic neutra 6784.8299569 1433.1616749 1977.277063 3944.559880000001 1965.293381	
Load target I	st C:\Us s: Impor Location H1:G21 H1:G27 H1:G4 A28:G33 A28:G39 A34:G39 A34:G43	Isers\usrdeso\0 ntExport Description	Chebrine - Waters Corporation/Documen 	Formula C201H253N74O146P2153 C257H321N92O191P2753 C42H55N17020P453 C42H55N17020P453 C42H57N82C94P6 C117H144N52081P12 C59H72N82C94P6 C117H144N52081P12 C59H72N82C94P6	Fragment 3 8 R1-2 1 8 R1-3 1 R1-3 1 R4-5 2 R6 3 R6-7 3	Start End Average neutra 1 21 1 2 2 1 4 23 2	Clear all confirmation mass Monoisotopic neutra 6784.8299569 6883.031199 1433.1616749 1977.277063 3944.55980000001 1985.293381 3294.847143000007	
Load target I Confirmation Confirmed V V V V V V V V V V V V V V V V V V V	st C:\Us s: Impor Location H1G21 H1G27 H1G4 L28:G33 L28:G39 L34:G39 L34:G43 L34:G53	Isers\usrdeso\(nt Description	OndPrive - Waters Corporation/Documen Imme - Market Corporation/Documen #ISANJCUCCAACUULAACGP #ISG ACCUACAAAUAGP AAAUAGCAACUULAAACGP AAAUAGCAAGUULAAAUAAAGP	Formula C201H253N74O146P2153 C257H231N92O191P273 C297H231N92O191P273 C59H73N25O42P6 C179H144N52081P12 C59H73N25O42P6 C199H73N12040P6 C39H73N27O40P6 C39H73N27O40P6 C39H73N27O40P6	Fragment 3 8 R1-2 1 8 R1-2 1 R1 1 R4-5 2 R4-6 2 R6-7 3 R6-8 3	Start End Average neutra 1 21 1 27 1 4 8 39 1 14 39 1 14 39 1 14 39 1 14 33 1	Clear all confirmation mass Monoisotopic neutra 6784.8299569 663.0311199 1433.1616749 1977.277063 3944.57988000001 1985.293381 3293.4871430000007 653.02526.0400001	
Load target 1 Confirmation Confirmation V V V V V V V V V V V V V V V V V V V	st C:\Us s: Impor 1:621 1:627 1:64 1:627 1:64 1:633 1:28:633 1:34:633 1:34:653 1:34:653 1:5:621	Isers\usrdeso\0 ortExport. Description	Ondrive - Waters Corporation/Document Item name #IGAUCUCCACUULAACGP #IGB ACCUACP ACCUACP ACCUACP AAUACCACUULAACGP AAUACCACUULAACGP AAUACCACUULAACGP	Es/projects/CONFRM-sequ Formula C201H253N740146P2153 C42H55N17026P453 C42H55N17026P453 C42H55N17026P453 C43H52N42042P6 C117H144N52081P12 C59H72N18206P10 C195H22018750133P20 C159H22018750121P17	Fragment 8 R1-2 1 8 R1-3 1 8 R4-6 2 8 R6-7 3 8 R6-7 3 8 R2 3	robtestcase\1aa_2missed.cs Start End Average neutra 21 27 4 28 33 29 29 4 39 4 4 3 4 4 3 4 4 3 4 5 2 1	Clear all confirmation 6784 8299569 6883.031199 1433.1616749 1977.27063 3944.559880000001 1985.293381 3293.487143000007 6533.925604000001 5366.67884600001	
Load target i	st C:\Us cocation 11:621 11:627 11:64 128:633 128:639 134:639 134:633 134:643 134:653 15:621	Export. Export. Description	OndPive - Waters Corporation/Documen Intern name = pSALUCIUCAACUULAACG0 = pSACUACUULAACGUUULAG = pSACUACG ACCUACAAUUGA ACCUACAAUUGA AAUIAGCAAUUAAG AAUIAGCAAUUAAGUUUAAUUAAG AAUIACCAACUUUAACGUUUAAGU	Exprojects/CONFIRM-sequ Formula C201H251N12O146P2153 C225H321N92O191P2753 C42H55N1702C6H453 C42H55N1702C6H453 C42H55N1702C6H52 C117H14N02C081P12 C159H20N15C04P6 C159H200N570121P17 C159H200N570121P17 C159H200N570121P17	Fragment 8 R1-2 1 8 R1-3 1 8 R4-6 2 8 R6-7 2 8 R2-3 2	Start End Average neutra 1 21 1 2 1 21 1 27 1 18 33 1 18 39 1 14 39 1 14 43 1 15 21 2	Clear all confirmation mass. Monoisotopic neutra 6784.829569 1433.1616749 1977.277063 3944.55980000001 1965.293381 2939.4871430000007 633.02564000001 3569.6788.46000001 7267.80009	
Load target i	st C:\Us st C:\Us st. Impor location H1:G21 H1:G27 H1:G4 K28:G33 K28:G39 K34:G53 K34:G53 K34:G53 K34:G53 K35:G21 K5:G29 K34	isers\usrdeso\0 nt Export.	Ondrive - Waters Corporation/Documen 	Formula C001e350174014692153 C001e350174014692153 C6245501740214692153 C6245501710264453 C63477382204096 C11701448452081912 C3947201820497 C1954208015701692 C394720182068710 C19542080157016925	Fragment 3 R1-2 1 3 R1-2 1 3 R1-2 1 3 R1-2 1 3 1 1 R4-5 2 8 1-3 1 1 R4-5 2 8 1-3 1 1 R4-5 2 8 1-3 1	robitestcase(1aa_2missed.cc 21 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27	Clear all confirmation mass Monoisotopic neutra 6784.829569 1433.1616749 1977.227063 3944.5598000001 1965.293381 329.4671.43000007 653.02560400001 7366.7884600001 7267.880009 7941.579964	
Load target I	st C:\Us s: Impor Location H1:G21 H1:G27 H1:G4 K28:G39 K28:G39 K34:G53 K34:G53 K34:G53 K3:G21 K3:G21 K3:G22 K3:G29 K34:G79	isers\usrdeso\(nt Export. Description	OneDrive - Waters Corporation/Documen Besiducus/CuckacuuuAacGp Perioducus/CuckacuuuAacGp Perioducus/CuckacuuuAacGp AccuracaAuuuGp AacuracaAuuuGp AacuracaAuuuAacGp AacuracaAuuuAacGp AacuracaAuuuAacGp Auucus/CuckacuuuAacGuuuuAacGp Auucus/CuckacuuuAacGuuuuAacGp Auucus/CacuuuAacGuuuuAacGp	Formula Contraction CONFIRM-seque Contraction Contract	Fragment 3 R1-2 5 8 1-3 1 7 8 1-3 1 7 8 1-3 1 7 8 1-3 1 7 4 6 2 7 2 8 4-5 4 6 2 7 2 8 4-5 4 6 6 2 7 2 8 6-7 2 8 6-6 2 8 7 2 8 7 7 6 6 2 7 2 8 6-7 2 8 6-7 2 8 6-7 2 8 7 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 2 2 4 2 3 2 3 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	Rate End Average neutral 21 21 21 21 21 22 22 22 22 22 22 22 22 2	Clear all confirmation Clear all confirmation 0748.429944 0748.429944 143.161749 197.27063 3944.5398000001 1982.29381 229.48714500000 5306.2550400001 5466.788460001 5267.88460001 2003.20599	
Load target	st C:\Us s: Impor cocation 11:621 11:624 128:633 128:639 134:653 134:653 134:653 134:653 134:653 15:621 15:527 15:529 174:679	isers\usrdeso\(art Export. Description	Ondrive - Waters Corporation/Documen 	Formula Contrasts/N2014692153 Contrasts/N2014692153 Costnazs/N2014692153 Costnazs0426 Costnazs04	Fragment 3 R1-2 1 8 R1-2 1 1 1 8 R1-2 1	robitestcave(1aa_2missed.ct Start End Average neutra 21 27 4 8 39 4 4 39 4 4 39 4 4 39 5 21 5 27 5 5 27 5 5 27 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	Clear all confirmation or 744.295969 8886.0011199 1433.1616749 1972.27063 3944.55588000001 1986.293381 2925.4871.40300007 5396.6738.46600001 7267.880009 7341.979964 2008.320599	
Load target Confirmation Confirmation Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	st C.\Us st C.\Us scation 11:621 11:621 11:634 128:633 128:639 134:653 134:653 134:653 134:653 134:653 135:627 15:627 15:629 174:679 174:681	isers\usrdeso\(ort Export.	OneDrive - Waters Corporation/Documen Bername #GAUCIUCICACUUUAACGP #GAUCIUCICACUUUAACGP #GAUCIUCICACUUUAACGP #GAUCIUCACUUUAACGP AACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	tsiprojects/CONFIRM-sequ Formale C2011e233N24014692153 C2511e233N24014692153 C2611e233N24014692153 C261128202496 C261128202496 C261128202496 C261128202496 C261128202496 C261128202495 C2611282002495 C2611282002495 C2611282002495 C2611282002495 C2611282002495 C2611282002495 C2611282002495 C2611282002495 C261128200240000000000000000000000000000000	Fragment 8 R1-2 8 R1-3 8 R1-3 8 R1-3 8 R1-3 8 R1-3 8 R1-3 8 R1-3 8 R1-3 8 R1-3 8 R2-5 8 R2-6 8 R2-8 8 R2-4 8 R2-4 8 R1-3 8 R1-3 8 R2-4 8 R1-3 8 R2-4 8 R1-3 8 R2-4 8 R3 8 R2-4 8 R3 8 R2-4 8 R3 8 R3 8 R3-7 8 R3 8 R3-7 8 R4-5 8 R4-5	robtestcase(1as_2missed.cs Start_End_Average neutra 21 21 23 24 29 24 25 27 24 27 24 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27	Clear all confirmation mass Monitotopic rests 6453.01119 6453.01119 9453.01119 9454.01119 1972.27083 1972.27083 1972.27083 1972.27083 1972.27083 1972.27083 2964.2014 1972.27083 2964.2014 1972.27083 2974.97083 1972.27083 2083.05099 244.979964 2093.35909009 294.4977100001	
Load target Confirmation Confirmation V V V V V V V V V V V V V V V V V V V	st C-\Us s: Impor location H1:G21 H1:G21 H1:G4 H28:G39 H34:G53 H	Isers\usrdeso\(ortExport. Description	OndPive - Waters Corporation/Documen 	Formula Contressin:X4014692153 Costine2501X4014692153 Costine2501X40214692153 Costine2502696 Costine25042002483 Costine2502686 Costine21045000810 Costine250400000 Costine21045000000 Costine20040000000 Costine20040000000 Costine20040000000 Costine20040000000 Costine20040000000 Costine200400000000 Costine20040000000000000000000000000000000000	Fragment 8 8 R1-2 1 8 R1-2 1 8 R1-3 1 8 R2 2 8 R2-4 1 8 R13 1 8 R13-14 1 8 R17-18 6	Rate Tas_2missed.cs Start End Average neutra 21 27 4 8 39 4 4 39 4 4 30 21 4 30 5 27 5 29 5 27 5 29 5 27 5 29 5 5 29 5 5 29 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	Clear all confirmation (764,42954) 6850,01119 1433,161749 1972,27063 1972,27063 1982,29331 2934,4971,400000 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600001 1566,7884600000000000000000000000000000000000	
Load target Confirmation Confirmation V V V V V V V V V V V V V V V V V V V	st C\Us s: Impor 11:621 11:621 11:627 11:64 128:633 134:639 134:639 134:633 134:6553 134:653 134:653 134:653 134:653 134:653 134:653 134:653 134:653 134:653 134:653 134:653 134:655 134:655 134:655 134:655 134:655 134:655 134:655 134:655 134:655 134:655 134:655 134:655 134:655 134:655 134:6555 134:65555 134:6555555555555555555555555555555555555	isers\usrdeso\/ art Export. Description	OneDrive - Waters Corporation/Documen Item name #GAUCICUCAACUUUAACGP #GAUCICUCCAACUUUAACGP #GAUCICUCCAACUUUAACGP #GCUACGAAUAGP AGCUAGAAUAGP AGCUAGAAUAGP AGCUAGAAUAGAAUAGP AGCUAGAUUAACGUUUAACGP AUCICICCAACUUUAACGUUUAGAGP AAAAAGUGA AAAAAGUGA AAAAAGUGA AGUCGGP AGUCGGP	tsi jarojectsi (CONFIRM-sequi Formula C2014233N74014692153 C231423N74014692153 C231423N74014692153 C234723204296 C354734204296 C354734204296 C354734204296 C35474240045131920 C354824045045131920 C3548240450450131920 C3548240450450131920 C3548240450031920 C35482400450131920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C35482400450031920 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C354824000499 C3548200049 C35482000000000000000000000000000000000000	Fragment 1 8 R1-2 8 9 R1-3 8 8 R1-3 8 8 R4-5 2 8 R4-6 2 8 R5-7 2 8 R5-7 2 8 R2-3 2 8 R2-4 8 8 R13-14 7 8 R13-14 7 8 R13-14 8 8 R17-18 8 8 R17-18 8	robtestcase(1a)_missed.cs Start End Average neutra 21 21 23 24 25 24 25 27 24 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27	Clear all confirmation mass Monitotopic rejetz 645331119 645331119 945331119 945331119 1997 27083 1997 27083 1997 27083 1997 27083 1997 27083 1997 27083 2904 2017 2018 1996 2018 2018 2019 2019 1996 2018 2018 2019 2019 1996 2018 2018 30599 2018 30599 2019 30599 2018 30599 2019 30599 2018 30599 2019 30599 2018 422453 1992 2178 1992 2178	
Load target Confirmed V V V V V V V V V V V V V V V V V V V	st C\Us s: Impor Location H1:G21 H1:G27 H1:G4 K28:G39 K34:G53 K34:G53 K3627 K5:G21 K5:G27 K5:G29 K74:G79 K74:G82 K88:G92 K88:G92 K88:G93 K84:G93	Isers\usrdesci\(Description	CmDive - Waters Corporation/Documen 	teliprojects/CDNFIRM-sequi Formula Contrastinovani Con	Fragment 8 R1-2 1 9 R1-3 1 8 R1-3 1 8 R1-3 1 8 R1-3 1 8 R4-5 2 8 R6 2 8 R2 2 8 R2-3 2 8 R2-3 2 8 R2-4 1 8 R1-14 1 8 R1-14 1 8 R1-14 1 8 R17-18 8 8 R17-18 8 8 R17-19 8	robtestcasel (1as_2missed ca Start End Average neutra 1 21 2 4 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 39 4 39 4 4 33 5 21 5 29 6 29 7 4 8 30 9 - 14 4 53 5 21 6 29 7 4 8 30 9 - 14 8 30 9 - 14 9 - 14 8 30 9 - 14 8 30 8 30	Clear all confirmation (74.42956) 665.01119 143.166749 1972.27063 1972.27063 1985.29381 2293.4271.4300009 1566.7818460000 1566.7818460000 1566.7818460000 2565.3813300009 2565.3813300009 1542.21578 1542.21578	
Load target Confirmation Confirmation V V V V V V V V V V V V V V V V V V V	st C(U) s: Impor cocation h1:621 h1:64 128:633 128:639 134:653 128:639 134:653 15:621 15:627 15:5227 15:5629 174:681 174:682 188:692 188:693 130:633 130:633 130:639	sers/usrdeso\/ prtExport.	Ondrive - Waters Corporation/Document 	talprojects/CONFIRM-seque Formula Contests/N4014692155 Contests/N4014692155 Contests/N4014692155 Contests/N402469	Fragment 8 R1-2 8 R1-3 R1-3 R1 R4-5 R6-7 R6-8 R2-4 R3-8 R2-4 R1-3 R2-3 R2-4 R1-3 R3-14 R1-3 R3-15 R1-3 R1-3 R1-3 R3-15 R1-3 R3-15 R1-3 R3-15 R1-3 R3-15 R3-1	robtestcase(1aa,2missed.cs) Start, End Average neutra 21 21 4 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	Clear all confirmation mass Monoiotopic neutra 674.429559 863.011199 143.161749 1432.55980 1432.55980 1597.27708 1234.42714000007 1530.92550400001 1265.42714000007 1530.82550400001 1265.42714000007 1596.4784600001 1265.42714000007 1545.329594 2003.32559 1004.440771000001 1164.824543 1199.271778 1922.17978 1292.5493.9000006	
Load target Confirmation Confir	st C:(Us cocation 11:G21 11:G27 11:G4 128:G33 128:G39 134:G53 134:G53 134:G53 134:G53 134:G53 135:G21 135:G27 135:G29 174:G79 134:G48 146:G92 148:G92 148:G93 130:G33 13	sers/usrdeso/t ntExport. Description	Checking Corporation/Document Intern name Intern name Intern name International Control (International International Control (International International Control (International International Control (International International) International Internat	teliprojects/CDN/IRM-sequi Formula Co191433074014822155 Co191433074014822155 Co19143201922733 Co19143201922733 Co19143403001922733 Co19143403001922 Co19143201800501922 Co1914320180501922 Co1914320180501922 Co1914320180501922 Co1914320180501922 Co1914320180501922 Co1914320180501922 Co1914320180501922 Co1914320180501922 Co1914320180501922 Co191432018050192 Co191432000000000000000000000000000000000000	Fragment 8 R1-2 8 R1-2 8 R1-3 8 R1-3 8 R1-3 8 R1-6 8 R5-7 8 R6-8 8 R2-8 8 R2-3 8 R2-3 8 R2-4 8 R13-15 R13-15 R17-18 R13-15 R7-19 R5 85-7	robtestcasel (tas_2missed ca Start End Average neutra 1 21 2 4 2 8 3 3 3 9 4 39 4 39 5 21 5 21 5 29 4 79 9 4 4 79 9 4 8 9 9 1 1 4 79 9 1 1 4 79 9 1 1 4 79 1 7 1 7 1 7 1 7 1 7 1 7 1 7 1 7	Clear all confirmation (74.42956) 685.031199 1433.161749 1972.27063 1972.27063 1982.29381 1982.29381 2923.471.460000 1596.67384460000 1597.673844600000 1597.673844600000000000000000000000000000000000	
Load target Confirmation Confir	st. C(U) coulon 11:521 11:527 11:5	Sers/usrdeso\0 ert Description	Ondrive - Waters Corporation/Document 	talprojects/CONFIRM-seque Formula Contraston/40148/2153 Contraston/40148/2153 Contraston/40148/2153 Contraston/40148/2019 Contrasto	Fragment 8 R1-2 8 R1-2 8 R1-3 8 R1	robtestcase/las_2missed.cs	Clear all confirmation (744 25956) 664 201119 1433.1616749 1477.277063 1394.55980000007 2519.2530400007 2519.2530400007 2519.2530400007 2519.2530400007 2519.2530400007 2625.25330400007 2625.25333000005 204.44077100000 1648.224543 1992.217978 1992.217978 2010.2575 2010.45929000000 2010.45929000000 2010.45929000000 2010.45929000000 2010.45929000000 2010.45929000000 2010.217577 2010.217577 2010.21757 2010.21757	

図 5. Coverage Viewer マイクロアプリのユーザーインターフェース

3. テストケース: sgRNA の消化およびマッピング

CRISPR ベースの遺伝子編集プロセスはシンプルであることから、ここ数年で一般的になっています¹⁶。このプロセス では、ガイド RNA と CRISPR 関連(Cas)ヌクレアーゼという 2 つの主要成分を使用します¹⁶。ガイド RNA は、対象 のターゲット DNA を認識し、Cas ヌクレアーゼを正しい編集部位に導く特異的 RNA 配列です¹⁶。Cas ヌクレアーゼは 、特定の DNA 部位に作用するガイド RNA に完全に依存する非特異的ヌクレアーゼです¹⁶。元々、ガイド RNA は、タ ーゲットに相補的な Crispr RNA と Cas ヌクレアーゼの結合スキャフォールドとして機能する tracr RNA という 2 つの 別々のオリゴヌクレオチドで構成されていました¹⁶。テクノロジーが進化して、crisper RNA と tracr RNA は「リンカ ーループ」と呼ばれる領域で 1 つに融合され、シングルガイド RNA(または sgRNA)になりました¹⁶。合成で生成さ れた sgRNA の重要な CQA は、分子の特定の部位に組み込まれた修飾残基を含む、その配列の確認です。

ワークフローを使用して RNase T1 消化を行い、消化産物を分析することで、消化産物を同定し、MS1 レベルで(追加 の MS フラグメンテーションを行うことなく)、sgRNA 配列のマッピングカバレッジを確認することができます。まず 、sgRNA の修飾ヌクレオチドを residuals.csv ファイルに追加して、mRNA Cleaver が sgRNA の*in silico* 消化産物を正 しく決定できるようにしました。次に、mRNA Cleaver マイクロアプリの消化および MS の設定を調整して実験条件を 反映するようにしました。具体的には、使用する酵素が RNase T1 であり、mRNA Cleaver が 2 箇所の切れ残りを含む 消化フラグメントを生成するように設定しました。完全消化であっても、切れ残りの変数を 2 に増やすことで、酵素が すべての G で切断しない可能性があるため、この可能性を考慮します。次に、*in silico* 消化産物のリストを生成し、. csv ファイルにエクスポートしました。2 つの非特異的な配列(配列 CUAG を持つ 4 mer のオリゴ)が同定されました 。非特異的な配列は、消化フラグメントで、異性体および/または同重体です。このことは、これらの配列の *m/z* ピー クおよび荷電状態エンベロープがオーバーラップしていることを意味します。分析において重要な RNA の一部が含ま れる非特異的な配列には、気相でのフラグメンテーションなど、配列のアイデンティティーを確認するためのさらなる 実験的ステップが必要になる場合があります。一方、その他の 19 種の消化フラグメントには、マススペクトルで区別 できるはずの固有の予想質量および配列のアイデンティティーがあります。この仮定は、BioAccord によって得られた 予想質量の精度、および mRNA Cleaver マイクロアプリで得られた各消化フラグメントの> *in silico* で生成された *m/z* の範囲に基づいています。

実験方法の記載に従って *in vitro* 消化を行い、消化済み sgRNA および消化されていないインタクト sgRNA のデータを 両方、BioAccord LC-MS システムで waters_connect を使用して収集しました。図 6A に、インタクト sgRNA および 後続の消化済み sgRNA のトータルイオンクロマトグラムを示します。消化済みフラグメントはグラジエントの 5 ~ 40 分の間に溶出しています。sgRNA は完全に消化されています。それは、インタクト sgRNA は 35.6 分で溶出しており 、消化サンプルのトレースにはこれに対応するピークがないことからわかります。

LC-MS データと *in silico* 消化成分のリストの両方が INTACT Mass アプリに送信され、一致の許容誤差 10 ppm の質量 マッチに基づいてさまざまな消化成分が割り当てられました。次に、INTACT Mass の結果を Coverage Viewer のマイ クロアプリにインポートしてシーケンスカバレッジを視覚化しました(図 6B)。その結果、MS1 シーケンスカバレッ ジ 91% が得られました。このテストケースでは、非特異的な配列の配列アイデンティティーが同じであり、配列アイ デンティティーを確認するための衝突誘起フラグメンテーションは不要になるため、行いませんでした。ただし、非特 異的な配列が多い場合や対象の非特異的な配列の配列アイデンティティーが異なる場合は、これらの非特異的な配列の 配列アイデンティティーがフラグメンテーションによって確認できない限り、非特異的な配列をシーケンスカバレッジ の計算から除外することもできます²⁸。シーケンスカバレッジ 100% を達成するため、RNase T1 とは異なる切断特異 性を示す MasF や RNase A などの別のエンドリボヌクレアーゼを使用して、sgRNA 配列の未同定部分をカバーするこ ともできます。



図 6.(A)消化済み sgRNA の TIC(黒色のトレース)および消化されていないインタクト sgRNA(赤色のトレース)の TIC。(B)Coverage Viewer マイクロアプリで視覚化した、LC-MS によって得られたシーケンスカバレッジ。

mRNA の消化およびマッピング

このワークフローは、メッセンジャー RNA(mRNA)などのより大きな RNA にも適用できます。ただし、大きな RNA を MS1 レベルでマッピングすることは、追加で多くの非特異的な配列と共溶出する分子種が存在し、データの複雑さ が指数関数的に増加するため、大掛かりな作業になります。Gaye らは、IP-RP LC-MS および waters_connect プラッ トホームを使用して mRNA 配列のマッピングを最適に行うための方法に関するアプリケーションノートを以前に公表 しています¹⁸。今回、更新したワークフローを使用してデータを再解析しました。

図 7A に、Gaye らから転載した RNase T1 mRNA 消化物の TIC クロマトグラムおよび Coverage Viewer の結果を示し ます¹⁸。挿入図は、8.58 分に溶出するピークからの抽出質量スペクトル(XIC)です。この代表的な XIC では、複数の 分子種がピークの下で共溶出しており、データの複雑さが浮き彫りになっています。このワークフローに従い、mRNA Cleaver マイクロアプリを使用して、2 つの in silico 酵素消化産物のリスト(1 つは非特異的な配列を含み、1 つは含 まない)を作成しました。これらのリストおよび取り込まれた LC-MS データを INTACT Mass アプリに送信し、データ 解析を行いました。次に、INTACT Mass の結果を Coverage Viewer マイクロアプリにインポートしました。 次に、INTACT Mass の結果を Coverage Viewer マイクロアプリにインポートしました。MS1 レベルの消化フラグメン トマップから、一意のシーケンスカバレッジは 38.87%、全体的なシーケンスカバレッジ(非特異的な配列は含まれて いません)。これらのマップをそれぞれ図 7B および図 7C に示しています。このシーケンスカバレッジは、別のエン ドリボヌクレアーゼを並行して使用することで改善できますが、データの複雑さ(共溶出する分子種、非特異的な配列 など)が、データを解釈する上で引き続き課題となります。このような複雑なサンプルでは、データの解析にかかる時 間が分析するピークの数とともに長くなり、分析のスループットを制限するようになる可能性があります。



図 7. (*A*) Gaye らから転載した *mRNA* 消化物の *TIC*⁽¹⁸⁾。挿入されているスペクトルは、共溶出する複数のオリゴヌ クレオチド分子種が含まれている 8.58 分に溶出するピークから得られた代表的な *XIC* です。



図 7. (*B*) Coverage Viewer マイクロアプリで可視化した、*MS1* によって可能になった一意のシーケンスカバレッジ(非特異的な配列が含まれていない)

С					J	M	S1	L	バ	い	で	ወ	力,	バ	レ	リジ	7	' 5	.18	8%	6									
	GGG	AGA	ccc	AAG	CUU	GGU	ACC	GAG	CUC	GGA	UCC	GCC	ACC	AUG	AAG	ACC	UUA	AUU	CUU	GCC	GUU	GCA	UUA	GUC	UAC	UGC	GCC	ACU	GUU	CAU
	UGC	CAG	GAC	UGU	ccu	UAC	GAA	ccu	GAU	CCA	CCA	ААС	ACA	GUU	CCA	ACU	ucc	UGU	GAA	GCU	ААА	GAA	GGA	GAA	UGU	AUU	GAU	AGC	AGC	UGU
	GGC	ACC	UGC	ACG	AGA	GAC	AUA	CUA	UCA	GAU	GGA	CUG	UGU	GAA	AAU	ААА	CCA	GGA	ААА	ACA	UGU	UGC	CGA	AUG	UGU	CAG	UAU	GUA	AUU	GAA
	UGC	AGA	GUA	GAG	GCC	GCA	GGA	UGG	υυυ	AGA	ACA	uuc	UAU	GGA	AAG	AGA	UUC	CAG	υυc	CAG	GAA	ccu	GGU	ACA	UAC	GUG	UUG	GGU	CAA	GGA
	ACC	AAG	GGC	GGC	GAC	UGG	AAG	GUG	ucc	AUC	ACC	CUG	GAG	ААС	CUG	GAU	GGA	ACC	AAG	GGG	GCU	GUG	CUG	ACC	AAG	ACA	AGA	CUG	GAA	GUG
	GCU	GGA	GAC	AUC	AUU	GAC	AUC	GCU	CAA	GCU	ACU	GAG	AAU	ccc	AUC	ACU	GUA	AAC	GGU	GGA	GCU	GAC	ccu	AUC	AUC	GCC	AAC	CCG	UAC	ACC
		-	-																		-									
	AUC	GGC	GAG	GUC	ACC	AUC	GCU	GUU	GUU	GAG	AUG	CCA	GGC	UUC	AAC	AUC	ACC	GUC	AUU	GAG	UUC	UUC	AAA	CUG	AUC	GUG	AUC	GAC	AUC	CUC
	GGA	GGA	AGA	υςυ	GUA	AGA	AUC	GCC	CCA	GAC	ACA	GCA	AAC	ААА	GGA	AUG	AUC	υсυ	GGC	CUC	UGU	GGA	GAU	CUU	AAA	AUG	AUG	GAA	GAU	ACA
	GAC	UUC	ACU	UCA	GAU	CCA	GAA	САА	cuc	GCU	AUU	CAG	ссυ	AAG	AUC	AAC	CAG	GAG	υυυ	GAC	GGU	UGU	CCA	cuc	UAU	GGA	AAU	ccu	GAU	GAC
	GUU	GCA	UAC	UGC	ААА	GGU	cuu	CUG	GAG	CCG	UAC	AAG	GAC	AGC	UGC	CGC	AAC	ccc	AUC	AAC	UUC	UAC	UAC	UAC	ACC	AUC	ucc	UGC	GCC	UUC
				AUG	COU			C 10										200					COL			A CH			100	
	GCC	CGC	000	AUG	GGU	GGA	GAC	GAG	CGA	GCC	UCA	CAC		COG		GAC	OAC	AGG	GAG	ACG		GCU	GCO		GAA	ACO	AGA	GGA	ACC	
	GUU	UUG	UCU	GGA	CAU	ACU	UUC	UAC	GAU	ACA	UUU	GAC	AAA	GCA	AGA	UAC	CAA	UUC	CAG	GGU	CCC	UGC	AAG	GAG	AUU	CUU	AUG	GCC	GCC	GAC
	UGU	UUC	UGG	AAC	ACU	UGG	GAU	GUG	AAG	GUU	UCA	CAC	AGG	AAU	GUU	GAC	υсυ	UAC	ACU	GAA	GUA	GAG	ААА	GUA	CGA	AUC	AGG	ААА	CAA	UCG
	ACU	GUA	GUA	GAA	cuc	AUU	GUU	GAU	GGA	ааа	CAG	AUU	CUG	ឲបប	GGA	GGA	GAA	GCC	GUG	ucc	GUC	ccg	UAC	AGC	ucu	CAG	AAC	ACU	ucc	AUC
	UAC	UGG	CAA	GAU	GGU	GAC	AUA	CUG	ACU	ACA	GCC	AUC	CUA	сси	GAA	GCU	CUG	GUG	GUC	AAG	UUC	AAC	υυc	AAG	CAA	CUG	cuc	GUC	GUA	CAU
	A 11 11		GAU	CCA		GAU	GGU	AAG	ACII	UGC	GGU		UGC	GGU	AAC	UAC		CAG	GAU		AGU	GAU	GAU	нен		GAU	GCU	GAA	661	600
	AUU	AGA	GAU	CCA		GAU		AAG	ACU			AUU			AAC	UAC	AAC	CAG	GAU		AGU	GAU	GAU			GAU	900	GAA	GGA	
	UGU	GAU	CUG	ACC	CCC	AAC	CCA	CCG	GGA	UGC	ACC	GAA	GAA	CAG	AAA	сси	GAA	GCU	GAA	CGA	CUC	UGC	AAU	AGU	CUC	UUC	GCC	GGU	CAA	AGU
	GAU	cuu	GAU	CAG	ААА	UGU	AAC	GUG	UGC	CAC	AAG	ccu	GAC	CGU	GUC	GAA	CGA	UGC	AUG	UAC	GAG	UAU	UGC	CUG	AGG	GGA	CAA	CAG	GGU	UUC
	UGU	GAC	CAC	GCA	UGG	GAG	UUC	AAG	ААА	GAA	UGC	UAC	AUA	AAG	CAU	GGA	GAC	ACC	CUA	GAA	GUA	CCA	GAU	GAA	UGC	ААА	UAG	GC		

図 7. (C) Coverage Viewer マイクロアプリで可視化した、MS1 によって可能になった全体的なシーケンスカバレッジ

BioAccord でのマッピング実験の一環としてデータ非依存的(MSE)フラグメンテーションデータを収集する場合は、 CONFIRM Sequence アプリを使用して、非特異的なフラグメントのさらなる配列解析を行うことができます。このタ イプの分析の例を Gaye らから転載して図 8 に示します¹⁸。 この追加の段階の分析に関するワークフローの自動化が進 行中です。



図 8. (A) 位置 623 ~ 631 (ACAUCCUCGp) および 551 ~ 559 (UCACCAUCGp) に消化フラグメント成分が予測され 、Gaye らから転載した TIC 中の同じ RT のピークに割り当てられています。インタクト質量情報を使用して正しい割り 当てを決定することはできません。 (B) 同じ注入で得られた MS^E データを使用することで、この割り当ての正しい配 列を明らかにすることができます。waters_connect CONFIRM Sequence アプリケーションを用い、各配列に対して高 エネルギーフラグメントイオンを予測し、カスタマイズされたアルゴリズムで波形解析した生データの同位体クラスタ ーにマッチングしました。このソフトウェアにより、確認済みのフラグメントイオンがドットマップに表示され、シー ケンスカバレッジが迅速に評価されます。

5' キャッピングの有効性の測定

mRNA に固有の CQA は、5' キャッピングの効率および構造を評価することです。mRNA 分子の 5' キャップは、核外 輸送の制御、エキソヌクレアーゼによる分解の防止、翻訳の促進、5' に近いイントロン除去の促進などのいくつかの生 物学的機能に不可欠です¹⁴。以前のアプリケーションノートで Nguen らは、BioAccord LC-MS システムを使用した合 成 mRNA キャップ構造の迅速分析法(5 分以内)について報告しています¹⁴。 図 9A に示すように、ワークフローを使用して、デコンボリューションしたスペクトルに基づいて 5' キャップ不純物を 検出し、割り当てることができました。このデータを分析するため、INTACT Mass アプリの(バージョン 1.6.0 のリリ ース時点における)新機能であるカスタムチャージデコンボリューションを適用しました。自動デコンボリューション では、ピーク検出およびデコンボリューション解析向けに最適化された設定を使用しており、複雑さがさまざまなレベ ルの多くのサンプルのルーチン分析を簡素化するのに適しています。ただし、このデータでは分析種のダイナミックレ ンジが大きく、頑健な同定を行いたい分析の検出下限近くに複数の低強度の不純物が含まれているため、この場合は、 自動デコンボリューションアルゴリズムの設定は適さないことが判明しました。カスタムデコンボリューションを使用 することで、スペクトルのデコンボリューション設定を最適化し、分子に存在する 5' キャップ構造の完全な集団をよ り適切に表すことができます。

このデータでは、BayesSpray チャージデコンボリューションアルゴリズムを適用して、保持時間の範囲、入力した m/z の範囲、予想される出力質量の範囲、チャージの範囲をデータに合わせてカスタマイズしました。5' キャップ分析 の INTACT Mass データを図 9B に示します。1:10 希釈サンプル中の不純物(ppG、pppG、GpppG、 m7GpppG(Cap-0))をすべて同定し、Ngyuen らからの 1:100 希釈サンプル中に前述の 3 種類の不純物(pppG 以 外)を同定することができました¹⁴。



図 9. (A) 3.37 分(丸印)のピークの TIC スペクトル、デコンボリューション済みスペクトル、生スペクトル、および モックスペクトル

В	Resul	ts TIC TUV 260	MS								Ŧ	
	Identi	ty: Pass Purity: Pass								∑.	JII ≣‡	
		থ Component	★ Expected mass (Da) ▼	е. Т	Mass error (ppm)	ћ. т	Identity result	[®] € MS response ▼	4	K Molecule %		
	1					Pass						
	2	uncapped+ All Forms				Pass			9,074,941			
	3	uncapped+ 5' ppG	8,138.02	9	-8.6	Pass			318,414		1.7	
	4	uncapped+ 5' GpppG	8,483.07	5	-8.3	Pass			183,164		1	
	5	uncapped+ 5' m7GpppG	8,497.09	2	-7.6	Pass			314,099		1.6	
	6	uncapped+ 5' m7GpppGm Car	0-1 8,511.10	7	-7.4	Pass			18,259,263		95.7	

図 9.(B)Cap-1 フラグメントおよびその生成物関連の不純物フラグメントに関する INTACT Mass アプリの結果テーブ ル

効果的な翻訳は mRNA の 5' キャップに大きく依存するため、正しくキャップされた mRNA 生成物の割合は、mRNA 医薬品の製造において綿密にモニターされる CQA です。Nguen らによって開発されたアッセイおよびカスタムデコン ボリューション設定を使用したデータ分析ワークフローには、キャッピング過程が不完全である場合に生じる望ましく ない不純物をルーチンに同定するのに十分な感度と頑健性があります¹⁴。

信頼性の高い3'ポリ(A)テールの長さおよび分子量分布の測定

mRNA に固有の別の CQA として、3' ポリ(A)テールの長さの決定があります。3' ポリ(A)テールの長さは、mRNA の安定性と直接相関しています¹⁷。したがって、長さ、あるいはむしろ平均長およびサイズ分布を決定することによっ て、ポリアデニル化のプロセスに関する有用な情報を得ることができます。ホタルルシフェラーゼ(FLuc)mRNA の RNase T1 消化後に得られる 3' ポリ(A)テールオリゴヌクレオチドの分析用に、比較的迅速(実行時間 15 分)な LC-MS アッセイが Doneanu らによって開発されました¹³。図 10A に示すように、この 3' ポリ(A)テールは、TIC にお いて、十分に分離した、遅く溶出する大きなクロマトグラフィーピークとして溶出しています。共溶出する 3' ポリ(A)分子種の集団を含む対応する ESI-MS スペクトルの組み合わせをワークフローに送信し、INTACT Mass アプリで使 用可能な MaxEnt1 チャージデコンボリューションを使用してデコンボリューションしました。入力 *m/z* の範囲、出力 質量の範囲、保持時間の範囲などのカスタムチャージデコンボリューションのパラメーターを調整して、図 10A の挿入 図に示すデコンボリューション済みスペクトルを得ました。このスペクトルは、3' ポリ(A)の不均一性が大きいこと を示しており、オリゴヌクレオチドのサイズは 122 ~ 132 mer で、特徴的な 329.2059 Da のアデノシンーリン酸残基 分、それぞれ質量が異なります。INTACT Mass の結果を図 10B に示します。検出されたすべてのオリゴ成分の ESI-MS シグナルおよびそれらに対応する強度を、図 10C に示すプロットにまとめています。このグラフを使用して、FLuc mRNA の 3' ポリ(A)テールの重量平均質量を算出しました。平均質量の測定値は 126.5 mer の長さに対応しており 、この測定値は直交する SEC の測定値から確認されました¹⁵。INTACT Mass 解析の後、11 種類の 3' ポリ(A)バリア ントを、通常 45 ppm を上回る質量精度で測定しました(図 10B)。

0



図 10.(A)RNase T1 消化 FLuc mRNA に由来する 3' ポリ(A)テールのオリゴヌクレオチド混合物の TIC クロマトグラム。挿入図に、INTACT Mass アプリケーションで得られた MaxEnt1 チャージデコンボリューションを示しています

Ident	tity: Pass P	urity: Pass						₩.
	*. T	Component	*. T	Observed mass (Da)	*. •	Expected mass (Da)	९ Mass error (ppm) ▼	
1	122mer	122mer		40,077.64		40,077.13		
2	122mer n+rA	123mer		40,406.85		40,406.34		
3	122mer n+rA(2)	124mer		40,737.24		40,735.54		
4	122mer n+rA(3)	125mer		41,065.17		41,064.75		
5	122mer n+rA(4)	126mer		41,394.56		41,393.95		
6	122mer n+rA(5)	127mer		41,723.66		41,723.16		
7	122mer n+rA(6)	128mer		42,053.13		42,052.37		
8	122mer n+rA(7)	129mer		42,381.73		42,381.57		
9	122mer n+rA(8)	130mer		42,712.18		42,710.78		
10	122mer n+rA(9)	131mer		43,040.48		43,039.98		
11	122mer n+rA(10)	132mer		43,369.55		43,369.19		

図 10. (*B*) 3' ポリ(*A*) テールの特性である広い分散度を示す *INTACT Mass* アプリケーションの結果テーブル。最初 に検出されたテールバリアント(122 mer)に最大 10 個のアデノシンの質量が追加されています。カスタムデコンボ リューションパラメーターで *INTACT Mass* 解析を使用して、122 ~ 132 mer の範囲の 11 種類のオリゴヌクレオチドを 、45 ppm を上回る質量精度で同定しました。



図 10. (*C*) 3' ポリ(*A*) テールの長さに対する *ESI-MS* スペクトル強度の分布により、平均テール長と分散度を決定することができます。

3' ポリ(A)の分散度と平均質量の測定値はいずれも、医薬品 mRNA 分子において重要な CQA であり、これらによっ てプロセスの頑健性および潜在的な臨床効果を評価することができます。このように、Doneanu らが開発した LC-MS アッセイおよび INTACT Mass アプリを使用したデータ分析ワークフローは、予防/治療用 mRNA から酵素的に切断さ れた 3' ポリ(A)テールの分析に有効であることがわかります。

結論

 BioAccord LC-MS システムおよび waters_connect インフォマティクスプラットホーム上に構築されたワークフロ ーによって、長いオリゴ医薬品および最新の RNA 医薬品の CQA を、配列のマッピングによる確認(オリゴ、 sgRNA、mRNA)、5' キャッピングの有効性(mRNA)、3' ポリ(A)テールの分析(mRNA)などのアプローチで 分析することができます。

- これらのワークフローをサポートするために、INTACT Mass アプリケーションのインフォマティクスを機能強化しました。新規のカスタムデコンボリューション機能により、シグナル強度が低くダイナミックレンジが大きいサンプルであっても、対象分析種のルーチンの自動データ解析が可能になります。
- INTACT Mass アプリケーションのこれらの機能強化は、RNA データの分析用に開発された以下の追加のマイクロア プリによって補完されています。
 - ユーザーが編集できる残基、酵素、mRNA 修飾が含まれる in silico 消化リストを生成する mRNA Cleaver
 - 消化フラグメントマップのシーケンスカバレッジを簡単に視覚化および計算できる Coverage Viewer

参考文献

- 1. Zhu, Y., Zhu, L., Wang, X. & Jin, H. RNA-based Therapeutics: An overview and prospectus.*Cell Death & Disease* 13, (2022).
- 2. Crooke ST, Witztum JL, Bennett CF, Baker BF.RNA-Targeted Therapeutics.*Cell Metab*.2018 Apr 3;27 (4) :714-739.doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.004. Erratum in: *Cell Metab*.2019 Feb 5;29(2):501.PMID: 2961764
- 3. Damase, T. R. *et al*. The Limitless Future of RNA therapeutics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9, (2021).
- 4. Xu, S.; Yang, K.; Li, R.; Zhang, L., mRNA Vaccine Era—Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. International Journal of Molecular Sciences 2020, 21 (18), 6582
- 5. Verbeke, R., Lentacker, I., De Smedt, S. C. &; Dewitte, H. The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *Journal of Controlled Release* 333, 511–520 (2021).
- 6. Jackson, N. A., Kester, K. E., Casimiro, D., Gurunathan, S. &; DeRosa, F. The Promise of mRNA vaccines: A biotech and industrial perspective.*npj Vaccines* 5, (2020).
- 7. Goyon, A. *et al*.Full sequencing of CRISPR/Cas9 single guide RNA (sgRNA) via parallel ribonuclease digestions and hydrophilic interaction liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry analysis.*Analytical Chemistry* 93, 14792–14801 (2021).
- Ivleva, V. B., Yu, Y.-Q. &; Gilar, M. Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) and UPLC/MS^e analysis of RNA oligonucleotides.*Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 2631–2640 (2010).
- 9. Jiang, T. et al. Oligonucleotide sequence mapping of large therapeutic mRNAs via parallel ribonuclease

digestions and LC-MS/MS. Analytical Chemistry 91, 8500-8506 (2019).

- 10. Ross, R., Cao, X. & Limbach, P. Mapping post transcriptional modifications onto transfer ribonucleic acid sequences by liquid chromatography tandem mass spectrometry.*Biomolecules* 7, 21 (2017).
- Shion, H., Boyce, P., Berger, S. & Yu, Y. Q. INTACT Mass[™] A Versatile waters_connect[™] application for Rapid Mass Confirmation and Purity Assessment of Biotherapeutics.Waters Application Note, 720007547, February 2023.
- 12. Jackson, N. A., Kester, K. E., Casimiro, D., Gurunathan, S. & DeRosa, F. The promise of mRNA vaccines: A biotech and industrial perspective.*npj Vaccines* 5, (2020).
- 13. Doneanu, C., Fredette, J. & Yu, Y. Q. Ion-Pairing Reversed Phase LC-MS Analysis of Poly(A) Heterogeneity Using the BioAccord LC-MS System, Waters Application Note, 720007925, 2023.
- 14. Nguyen, J. M. *et al.* Rapid analysis of synthetic mRNA cap structure using ion-pairing RPLC with the BioAccord LC-MS System.Waters Application Note, 720007329, October 2023.
- 15. Gilar, M. Size-exclusion chromatography method for poly(A) tail analysis of mRNA.Waters Application Note, 720007853, October 2023.
- 16. Hu, L., Li, Y., Wang, J., Zhao, Y. & Wang, Y. Controlling CRISPR-Cas9 by guide RNA engineering. *WIREs RNA* 14, (2022).
- 17. Pelletier, J.; Sonenberg, N. The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment. *Annu. Rev. Biochem* .2019, 88, 307–335
- 18. Gaye, M. M. *et al.* Synthetic mRNA oligo-mapping using ion-pairing liquid chromatography and mass spectrometry.Waters Application Note, 720007669, October 2023.
- 19. Fekete, S *et al*.Challenges and emerging trends in liquid chromatography-based analyses of mRNA pharmaceuticals.*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.224 (2022).
- 20. Fountain, K. J., Gilar, M. & Gebler, J. C. Analysis of native and chemically modifed oligonucleotides by tandem ion-pair reversed phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry.*Rapid Commun.Mass Spectrom.* 17, 646–653. https://doi.org/10.1002/rcm.959 (2003).
- 21. Zhang, G., Lin, J., Srinivasan, K., Kavetskaia, O. & Duncan, J. N. Strategies for bioanalysis of an oligonucleotide class macromolecule from rat plasma using liquid chromatography—tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79, 3416–3424. https://doi.org/10.1021/ac0618674 (2007).

- Deng, P., Chen, X., Zhang, G. & Zhong, D. Bioanalysis of an oligonucleotide and its metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm.Biomed.Anal.*52, 571–579.https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.01.040 (2010).
- 23. Gau *et al*.Oligonucleotide mapping via mass spectrometry to enable comprehensive primary structure characterization of an mRNA vaccine against SARS-CoV-2.*Nature Scientific Reports*.13:9038 2023.
- 24. Loverix S, Winqvist A, Stromber R, Steyaert J. Mechanism of RNase T1: concerted triester-like phosphoryl transfer via a catalytic three-centered hydrogen bond *Chem Biol*.2000 Aug, 7(8):651-8 doi: 10.1016/s1074-5521(00)00005-3.
- 25. Loverix S, Steyaert J. Deciphering the Mechanism of RNase T1.*Methods in Enzymology*, Academic Press, Vol.341, 2001, 305-323, doi: 10.1016/S0076-6879(01)41160-8
- 26. Masachika Irie.3- RNase T1/RNase T2 Family RNases.*Ribonucleases, Academic Press*, 1997.101-130, doi: 10.1016/B978-012588945-2/50004-2.
- 27. Sorrentino, Salvatore. The Eight Human "Canonical" Ribonucleases: Molecular Diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Letters*. Vol 584, Issue 11, 2010, 2194-2200, doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.018
- 28. Gaye M.M. *et al*.CRISPR Single Guide RNA Characterization by IP-RP-LC-MS with a Premier Oligonucleotide BEH 300Å C18 Column.Waters Application Note, 720007897, October 2023.

ソリューション提供製品

BioAccord システム with ACQUITY Premier を用いたバイオ医薬品のルーチン分析 < https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135087537> waters_connect <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165> UNIFI 科学情報システム <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134801648>

720008130JA、2023年11月

© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved. 利用規約 プライバシー 商標 キャリア クッキー クッキー環境設定