

低吸着性の流路での IP-RPLC-MS による mRNA マッピング

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムの使用

著者

Helena Vanluchene,
Kris Morreel, Jelle De Vos,
Pat Sandra, and Koen Sandra
RIC group, President
Kennedypark 6, 8500 Kortrijk,
Belgium

Sonja Schneider and
Udo Huber
Agilent Technologies, Inc.

概要

メッセンジャーリボ核酸 (mRNA) ベースの医薬品の開発が加速しており、これらのバイオ医薬品の特性を解析するための新たなメソッドが登場しています。その 1 つが mRNA マッピングです。mRNA マッピングでは、IP-RPLC または HILIC を用いた LC/MS に適したオリゴヌクレオチドを生成するために RNase が使用されます。HILIC では、mRNA 配列、3' ポリ A テールの長さと分布、5' キャッピング構造/キャッピング効率、翻訳後修飾、配列変異体など主な構造特性に関する重要な見識を引き出せます。ところが、LC/MS 流路のステンレス (SS) 表面の悪影響により、オリゴヌクレオチドの測定に偏りが生じます。こういった影響を軽減するため、このアプリケーションノートでは、ウルトラハイナートテクノロジー搭載の Agilent Altura Oligo HPH-C18 カラムと Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムおよび Agilent 6530 LC/Q-TOF を使用して、低吸着性の流路で mRNA 分解物を IP-RPLC-MS 分析した結果を示します。

はじめに

コロナウイルス感染症 19 (COVID-19) の大流行により、mRNA (図 1 を参照) にもとづくワクチン接種技術が世界中に知られることとなりました。COVID-19 は、米国食品医薬品局 (FDA) や欧州医薬品庁 (EMA) などの規制機関が Comirnaty (BioNTech 社/Pfizer 社) および Spikevax (Moderna 社) ワクチンの世界的規模での投与を承認したことで、最終的に抑制されました^{1, 2}。その作用機序では、脂質ナノ粒子 (LNP) にカプセル化された mRNA が重要な役割を果たし、細胞内に入ると重症急性呼吸器症候群 2 (SARS-COV-2) ウイルスのスパイクタンパク質に翻訳され、これによって目的とする免疫反応がトリガーされます^{3, 4}。これらの画期的ワクチンが受け入れられたことで、mRNA 技術の徹底的探求への道が切り拓かれました^{5~7}。

図 1 に示すように、mRNA は、アデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) などのリボヌクレオシド同士がリン酸ジエステル結合し、リボース部分に異なる核酸塩基が結合した構造を持っています。リボシル 2' ヒドロキシル基は隣接するホスホジエステル結合を純粋に化学的に、またはリボヌクレアーゼ (RNase) を触媒として容易に加水分解する可能性があることから、mRNA はやや脆弱です。これらの RNase による分解は、RNA 配列の末端 (エキソリボヌクレアーゼ) または内部部位 (エンドリボヌクレアーゼ) で起こり得ます。そのため、目的タンパク質をコード化する mRNA のオープンリーディングフレーム (ORF、図 1) は、上流の 5' 末端非翻訳領域および下流の 3' 末端非翻訳領域 (それぞれ 5'-UTR および 3'-UTR) で保護されています。これらの 5'-UTR と 3'-UTR は、それぞれキャップおよびポリ A テールを付加することでさらに保護されており (図 1)、これも翻訳のための必要条件となっています。真核生物のキャップ構造は、三リン酸部分により次のヌクレオシドに 5'-5' 結合した 7-メチルグアノシンで構成されます。3'-UTR に隣接するポリ A テールはアデニンヌクレオチドの長鎖です。一般に、その合成によって mRNA プールが生成され、プールではポリ A テール長について一定の分布が示されます^{8, 9}。

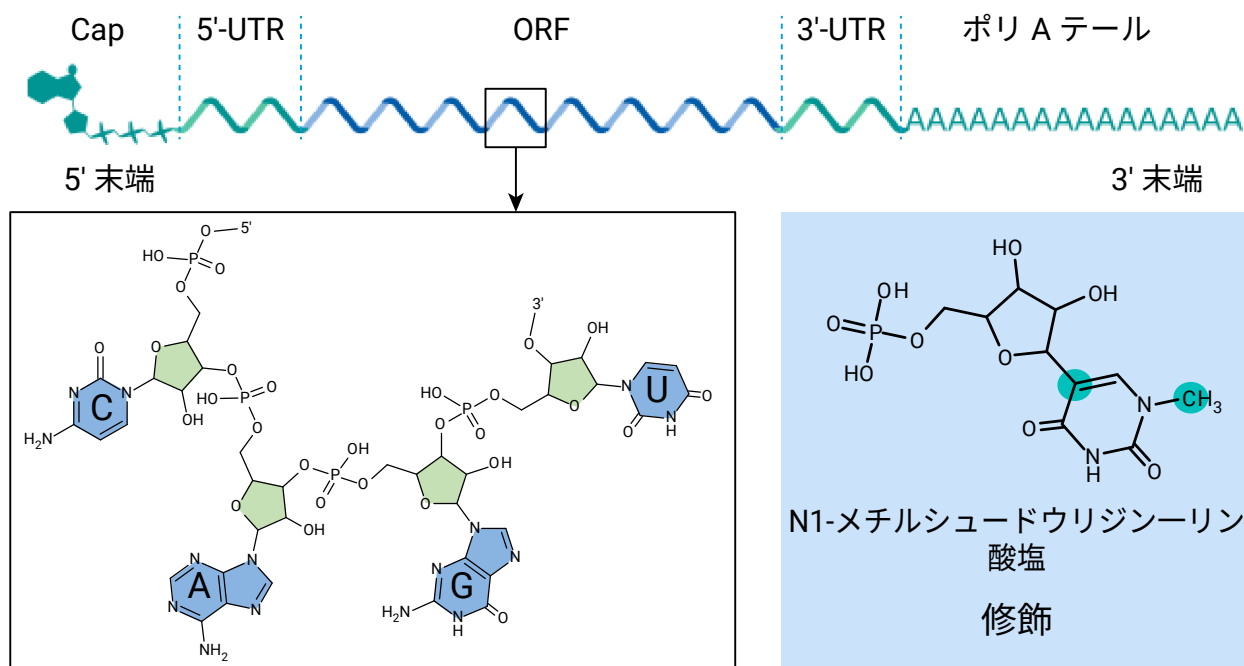


図 1. mRNA の構造とそれを構成するヌクレオチド。RNA の構成要素はリボヌクレオチドと呼ばれ、リボース部分 (緑色の背景) に核酸塩基 (青色の背景、核酸塩基/リボヌクレオチド: A アデニン/アデノシン、C シトシン/シチジン、G グアニン/グアノシン、U ウラシル/ウリジン) がリン酸ジエステル結合を介して接続した構造を持ちます。mRNA の安定性を高め、免疫原性を抑え、タンパク質翻訳を改善するために、一般に、N1-メチルシュードウリジンなど修飾されたヌクレオチドが in vitro での転写中に導入されます。ORF = オープンリーディングフレーム、UTR = 非翻訳領域

外来 mRNA が細胞に取り込まれると、免疫系が直ちにトリガーされます。その働きは、修飾ヌクレオシドを初期 mRNA 構造（図 1）に導入することにより軽減できます^{10, 11}。最も一般的な修飾として、シュードウリジンまたは N1-メチルシュードウリジンによるウリジンの置換があり、Comirnaty および Spikevax ワクチンでも採用されています。また、合成および保管中に酸化または脂質付加物の形成によって mRNA の修飾が意図せず起こり、mRNA が翻訳不可能になることがあります^{13, 14}。これに対する著しい貢献として、シュードウリジンを含む RNA の安定性を高め、抗 RNA 免疫反応を低下させる発見が認められ、Katalin Kariko 氏および Drew Weissman 氏が 2023 年にノーベル賞を受賞しています¹²。

mRNA ベースの医薬品開発では、mRNA 配列、3' ポリ A テールの長さや分布、5' キャッピング構造とキャッピング効率、翻訳後修飾、配列変異体など構造的特徴を詳細に研究することが非常に重要になります¹⁵。これらの特性を評価する手段として、液体クロマトグラフィー（LC）と質量分析（MS）の組み合わせが注目されています^{16~26}。ただし、LC/MS 分析を成功させるためには、RNase によって mRNA をオリゴヌクレオチドに分解する必要があります²³。オリゴヌクレオチドを分離する LC メソッドでは、主に、ヘキシルアミンまたはトリエチルアミン（TEA）とヘキサフルオロイソプロパノールをそれぞれイオンペア試薬（IPR）および対イオンとして使用したイオンペア逆相 LC（IP-RPLC）が使用されています²⁷。この IP-RPLC メソッドは、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）より高い MS 感度が得られ、従来のメソッドに代わる持続可能なオリゴヌクレオチドの LC/MS 分析の選択肢と見なされています²⁴。

高圧下で使用するために、一般的な LC ハードウェア（機器、カラム、チューブ）はステンレス（SS）製ですが、高い負電荷を持つオリゴヌクレオチドを扱う際には、この材質が大きな課題になる可能性があります。実際、オリゴヌクレオチドのリン酸部分は、正電荷を持つ金属酸化物表面に吸着し、固定相に保持された浸出金属イオンと相互作用し、これが目的成分の低回収率やピークテーリングにつながります²⁸。浸出金属は、移動相にエチレンジアミン四酢酸（EDTA）やメドロン酸などの金属キレート剤を添加することにより対処できる場合があります。SS 表面への吸着を防ぐには、クエン酸塩やリン酸塩などの移動相添加剤を使用するかオリゴヌクレオチド自体を使用して、サンプルを繰り返し注入したカラムをコンディショニングすることにより、SS 表面の不活性化を定期的に行います²⁹。不活性化によりオリゴヌクレオチドのピーク形状と回収率は改善しますが、SS 表面のすべての活性点が完全には覆われず、不活性化が十分に長期にわたって持続しない可能性もあります。さらに、移動相添加剤を使用すると、イオン抑制により MS レスポンスが低下することもあります。これらの手段に代わる優れた方法が、SS を排除するか（MP35N など）金属面をポリエーテルエーテルケトン（PEEK）などで不活性化または被覆した、低吸着性と生体適合性を備えた LC 流路を実装することです。

このアプリケーションノートでは、IP-RPLC-MS による低吸着性の流路での、RNase T1 および RNase 4 で分解した IVT-mRNA の mRNA マッピングについて取り上げます。機器として、ウルトラハイナートテクノロジー搭載の Altura Oligo HPH-C18 カラムと、生体適合性を備えた 1290 Infinity II Bio LC システムおよび 6530 Q-TOF MS を組み合わせて使用しました。また、Altura カラムを、高 pH に対する耐性を持つ C18 固定相が充填された従来のステンレス製 HPLC カラムである AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムと比較しました。

実験方法

材料

水（HPLC グレード、ポリエチレン製水ボトルで出荷）およびメタノール（ULC/MS – CC/SFC グレード）は Biosolve 社から入手しました。TEA および HFIP は Sigma-Aldrich 社および Thermo Fisher Scientific 社から入手しました。RNase T1 および RNase 4 は New England Biolabs 社から購入しました。トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン（Tris）pH 7.5 緩衝液およびエチレンジアミン四酢酸（EDTA）は Sigma-Aldrich 社から入手しました。RNA 分解能標準（部品番号 5190-9028）はアジレントから、また CleanCap Firefly Luciferase（FLuc）mRNA は TriLink BioTechnologies 社から入手しました。FLuc mRNA とその ORF の長さは、それぞれ 1,922 および 1,653 ヌクレオチド（nt）です。

サンプル調製

RNA 分解能標準は 1 mL の水に溶解しました。RNA マッピングの前に、FLuc mRNA を RNase T1 または RNase 4 で酵素分解しました。RNase T1 分解混合物を作製するために、40 mM の EDTA を添加した 100 mM の Tris pH 7.5 緩衝液中で 100 µg の FLuc mRNA を 5,000 U の RNase T1 で分解しました。分解は、300 rpm で振とうしながら 37 °C で 30 分間行いました。また、RNase 4 分解混合物を作製するために、100 µg の FLuc mRNA をまず 3 M の尿素と混合して変性させてから、90 °C で 10 分間インキュベートしました。サンプルを室温まで冷却した後、1x NEBuffer r1.1 中で 500 U RNase 4 による分解を、37 °C で 1 時間 300 rpm で振とうして進行させました。最後に、得られた分解物を、冷蔵機能を備えた 4 °C の Centrivap コンセントレータ（Labconco 社）で 3 µg/µL まで濃縮しました。

装置構成

サンプルの分析には、Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)、一体型サンプルサーモスタット付き Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンプラ (G7137A)、標準フローの Agilent InfinityLab クイックコネクト熱交換器 (G7116-60071) を装着した Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、および Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117B) と Agilent InfinityLab Max-Light カートリッジセル、LSS、10 mm (G7117-60020) で構成される 1290 Infinity II Bio LC システムを使用しました。LC/MS は、1290 Infinity II Bio LC を 6530 LC/Q-TOF (G6530A) に接続して実行しました。メソッドパラメータを表 1 および表 2 にまとめます。

表 1. LC メソッドパラメータ

パラメータ	設定値
カラム	Agilent AdvanceBio オリゴスクレオチド、2.1 × 150 mm、2.7 µm (p/n 653750-702) ウルトラライナートテクノロジー搭載 Agilent Altura オリゴ HPH-C18、2.1 × 150 mm、2.7 µm (p/n 227215-702)
流量 (メソッド 1)	0.35 mL/min
流量 (メソッド 2 および 3)	0.2 mL/min
移動相 (メソッド 1)	A) 200 mM HFIP、15 mM TEA 水溶液 B) メタノール
移動相 (メソッド 2 および 3)	A) 1 % HFIP、0.1 % TEA 水溶液 B) 1 % HFIP、0.1 % TEA 水/メタノール (50/50、v/v) 溶液
グラジエント (メソッド 1)	時間 (分) %B 0 3 15 25 18 100
グラジエント (メソッド 2)	時間 (分) %B 0 1 5 1 20 21 60 50 65 100
グラジエント (メソッド 3)	時間 (分) %B 0 1 5 1 120 50 125 100
注入量 (メソッド 1)	1 µL
注入量 (メソッド 2 および 3)	2 µL
ニードル洗浄	フラッシュポート、100 % メタノール
オートサンブラ温度	8 °C
カラム温度	65 °C
DAD 検出	260/4 nm、リファレンス波長 360/40 nm

表 2. LC メソッド 2 および 3 による LC/MS 分析の MS メソッドパラメータ

パラメータ	設定値
イオン化	ネガティブ ESI
ソース*	
ドライガス温度	300 °C
乾燥ガス流量	8 L/min
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	8 L/min
ネブライザ圧力	35 psi
キャピラリー電圧	4,500 V
ノズル電圧	1,000 V
フラグメンタ	250 V
スキマ電圧	65 V
データ取り込み – MS	
取り込みモード	拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)
質量範囲	m/z 500 ~ 3,200
スキャン速度	3 スペクトル/秒
データ保存	プロファイルおよびセントロイドの両方
リファレンス質量	無効
データ取り込み – MS/MS	
取り込みモード	自動 MS/MS
質量範囲	m/z 100 ~ 3,200
スキャン速度	1 スペクトル/秒
選択幅 (MS/MS)	中 (約 4 amu)
コリジョンエネルギー	40 (固定)
Auto MS/MS 優先テーブル	含める (デルタリテンションタイム: 4 分)
1 サイクルあたりの最大プリカーサ数	4
アクティブな排除の有効化	可能
アクティブな排除	2 スペクトル後に排除
アクティブな排除の解除	0.30 分後

* バルブハードウェアのステンレス製コンポーネントとの潜在的な非特異的相互作用を防ぐため、ダイバータバルブをバイパスしました。

データ解析

データの取り込みおよび処理は、Agilent OpenLab CDS ソフトウェア (バージョン 2.7)、Agilent MassHunter Data Acquisition ソフトウェア (バージョン B.10.00)、および Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア (バージョン B.12.00) で行いました。それ以降のソフトウェアバージョンも使用できます。MassHunter Qualitative Analysis により、最大エントロピーデコンボリューションを容易に行えました。また、同じオリゴヌクレオチドの異なる電荷状態や異性体を表す MS スペクトルイオンの情報を組み合わせて、小型および大型分子のフィーチャーを抽出することができました。R バージョン 4.2.1 (R Core Team, 2022) で、(1) RNase の切断部位を考慮した、各フィーチャーの平均またはモノアイソトピック分子量 (MW) と対応する mRNA サブ配列のマッチング、(2) フィーチャーの MW に複数の異性体候補サブ配列が一致した場合の、フィーチャーについて記録された MS/MS スペクトルを使用した正しいサブ配列への注釈付けなど、さらにデータ処理ステップを実行しました。

結果と考察

5' 末端 mRNA フラグメントの HILIC-MS 分析について取り上げた以前のアプリケーションノート²⁴ に示したとおり、オリゴヌクレオチドは LC カラムの SS 表面のほか、程度は低いものの LC 機器にも容易に吸着され、回収率の低下やピークテールリングを招きます。オリゴヌクレオチドの IP-RPLC-MS 分析が同様に金属の吸着の影響を受ける程度を評価するために、Agilent RNA 分解能標準 (4 種類のオリゴヌクレオチドで構成: 14-、17-、20-、21-mer) を、IPR および対イオンとしてそれぞれ TEA および HFIP を使用して、1290 Infinity II Bio LC に取り付けした SS ベースの RPLC カラムに繰り返し注入しました。図 2A に示すように、4 種類の RNA 標準の UV 吸収レスポンスは徐々に増加し、8 回目の注入から横ばいになりました。この状況は、IP-RPLC で金属の吸着が起こっていることを示唆しています。以降の注入では、RNA 標準のアバンダンスに大きな変化が生じています。これは、注入ごとに金属面が徐々に不活性化されて金属面に吸着する RNA が減少し、最終的に、RNA 0.08 pmol の注入に相当する RNA 標準の 8 回目の注入以降に検出器の応答が一定になったためと考えられます。

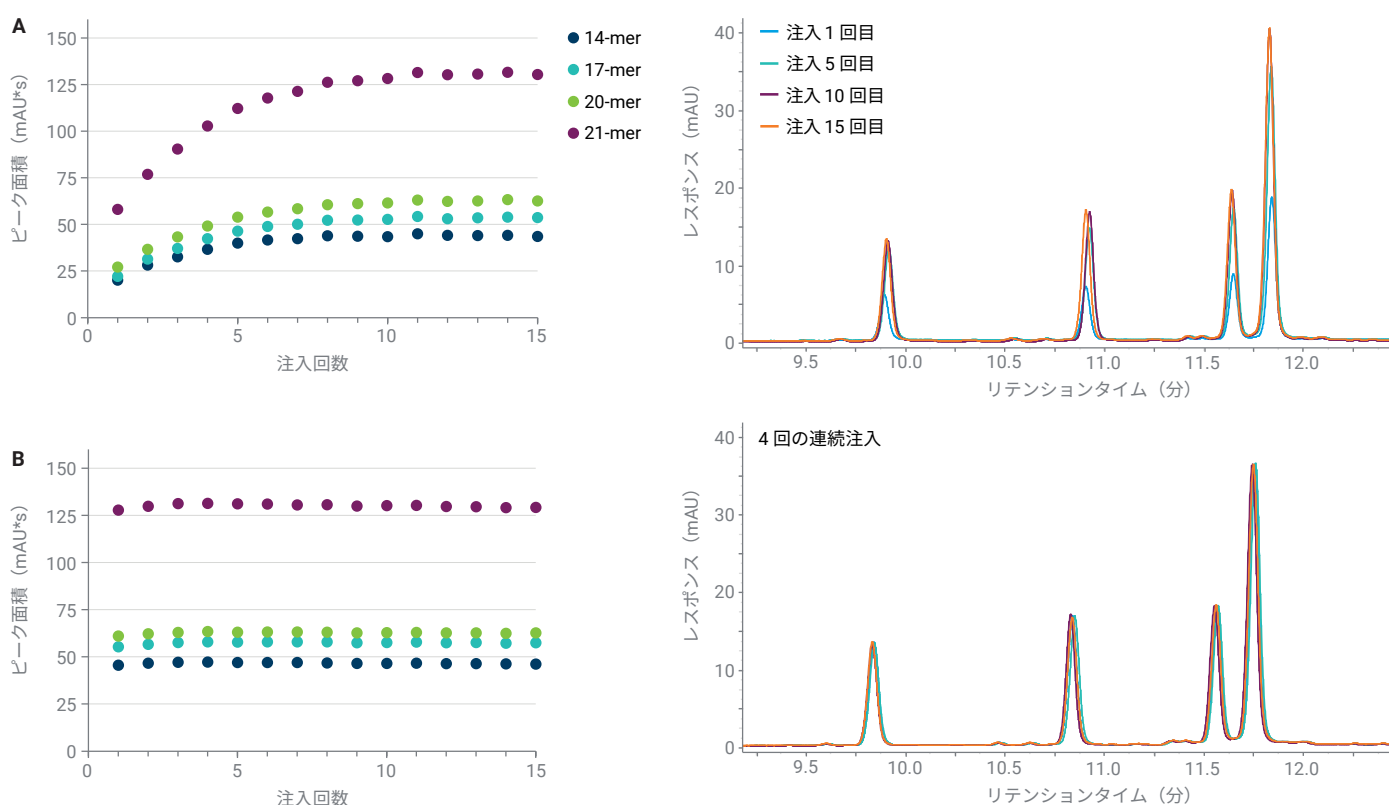


図 2. SS 製 Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラム (A) と不活性な Agilent Altura Oligo HPH-C18 カラム (B) を使用して RNA 分解能標準の繰り返し注入により得られた IP-RPLC-UV クロマトグラム (LC メソッド 1: 表 1 を参照)

複数回の注入を通して、21-mer の最大アバンダンスはほかの 3 種類の RNA 標準の約 2 倍になっています。これは、21-mer の量が 14-、17-、20-mer の量の 2 倍という RNA 標準の仕様と合致しています。HILIC 分析²⁴とは対照的に、IP-RPLC 分析では、オリゴヌクレオチドのピークテーリングはほとんど観察されませんでした。リン酸ジエステル-TEA イオン対の形成により RNA 分子が部分的に中和されたからです。IP-RPLC 分析において従来の SS カラムで生じるオリゴヌクレオチドの金属吸着は、ウルトライナートテクノロジー搭載の Altura RPLC カラム（同じ C18 充填剤）で RNA 標準を分析することによりさらに裏付けられました。この構成では、RNA 標準の連続注入により、安定した UV 吸収レスポンスが 1 回目の注入から得られました（図 2B）。LC カラムを含む LC 流路と LC カラムを含まない LC 流路での標準注入時の検出器のレスポンスを比較することにより、カラムから回収されたオリゴヌクレオチドの量またはカラムに留まった量を推定することができます。ウルトライナートカラムを使用した場合、定常状態でカラムから溶出しなかったオリゴヌクレオチドは総量の 4.2 % であるのに対し、従来の SS 製 HPLC カラムでは 6.2 % でした。両カラムの差異（2.0 %）は、金属吸着によって保持されたオリゴヌクレオチドの割合を表します。

対称のピーク形状、オリゴヌクレオチドの良好な回収率、複数回の注入にわたって達成された精度は、複雑なオリゴヌクレオチド混合物の IP-RPLC-MS 分析における Altura カラムの使用を支持しています。今回の研究では、RNase T1 または RNase 4 で Fluc mRNA を分解した混合物を使用しました。RNase T1 が G ユニットの 3' を切断するのに対し、RNase 4 は UG および UA 二量体部位を認識し、間にあるリン酸ジエステル結合を加水分解します。どちらによる分解でも、3' 末端リン酸塩または環状 2',3' リン酸ジエステルを含む 5' 末端フラグメントが生成されます。両方の分解物を IP-RPLC でプロファイリングすると、RNase T1 分解物では主にクロマトグラムの前半にピークが現れ、RNase 4 分解物ではクロマトグラムの後半に豊富なピークプロファイルが表示されます（図 3）。このことは、RNase 4 よりも RNase T1 で生成されたサブ配列の方が短いことを示します。図 3 に示すように、コンピュータ上での RNase T1 による Fluc mRNA の分解で生成されるサブ配列は、ほとんどが長さ 2 ～ 5 nt です。一方、コンピュータ上での RNase 4 による Fluc mRNA の分解で生成されるサブ配列は明らかに長くなっています。

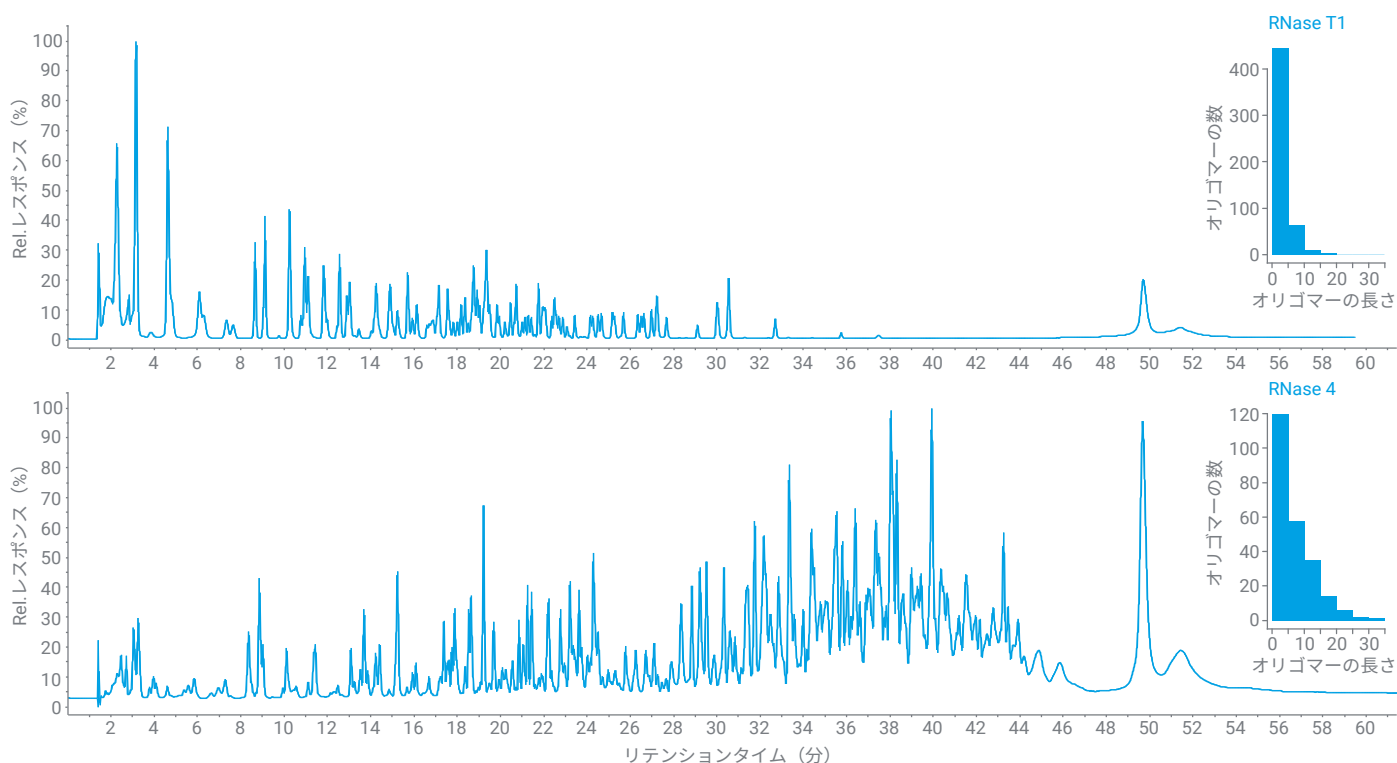


図 3. RNase T1 および RNase 4 により分解した Fluc mRNA の IP-RPLC-UV クロマトグラム（LC メソッド 2）。クロマトグラムの右側に、RNase T1 および RNase 4 による分解についてコンピュータ上で生成されたサブ配列長の分布を示しています。

RNase T1 および RNase 4 による分解で得られたさまざまなピークの同定に関する詳細情報を引き出すため、また mRNA の詳細な特性解析を実行するために、LC/MS 分析を実行しました。RNase T1 分解物の LC/MS クロマトグラム (図 4) から、リテンションタイム範囲 5 ~ 40 分にピークが集中し、より幅広い高アブダンスの 2 つのピークが 50 ~ 55 分の間に、狭いピークが約 65 分に現れていることがわかります。これらの後半の 3 つのピークは高電荷を持ち、高 MW であると考えられます。MS プロファイルデータを使用した最大エントロピーデコンボリューションに従って、これらのピークをそれぞれポリ A テール、大きな mRNA 加水分解物、および RNase T1 酵素に関連付けることができました。

デコンボリュートしたポリ A テールの MS スペクトルでは、118 ~ 133 A ユニットのポリ A テール長が対称 (多分散性がほぼ 1 であることにより裏付け) 分布を示し、分布の最頻値 (最も多く出現しているポリ A テー

ル長) は 124 A ユニットでした。この結果は Morreel らの報告と一致しています¹⁵。デコンボリュートしたクリーンなスペクトルには異常な付加物の形成は見られません。これは、移動相/サンプル流路に使用された材質 (プラスチックボトル、生体適合性 LC 材料、ウルトライナートカラムテクノロジー) によるものと考えられます。また、リテンションタイムが同じで質量が 165 amu だけ異なる 2 つの擬分子イオンを探すことにより、5 ~ 40 分の密集領域の約 20 分の時点で 5' 末端キャップ構造を見つけることができました。この質量差は 7-メチルグアニン核酸基のソース内損失に相当します。Gau ほか²² の報告のとおり、RNase T1 による分解後に IP-RPLC-MS 分析を実行することで、5' 末端構造、3' ポリ A テール、および RNA マッピングに必要なさまざまなサブ配列を同時にプロファイリングすることができました。

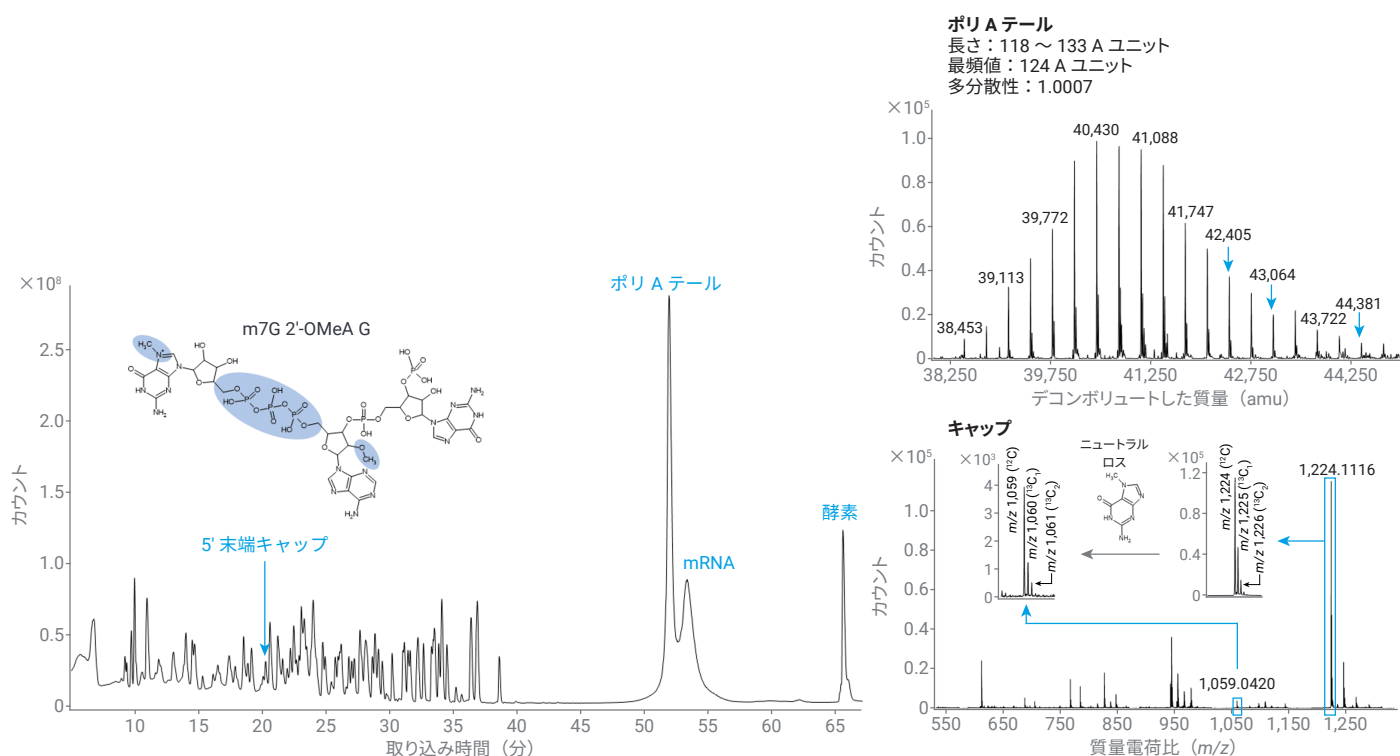


図 4. Fluc mRNA の RNase T1 分解物の mRNA マッピングと 5' キャップおよび 3' ポリ A テールの分析結果。図中に示したキャップを含む三量体は、7-メチルグアノシン (m7G) が三リン酸ブリッジによって 2'-O-メチルアデノシン (2'-OMeA) に結合され、それ自体がグアノシン (G) ユニットに結合された構造を持っています。キャップ構造 m7G 2'-OMeA G が MS イオンソースに入ると、7-メチルグアニンに相当する 165 Da のニュートラルロスが観察されます。mRNA プールにはさまざまなポリ A テール長が示され、多分散性から、その分布が平均長を中心に対称であると判断できます (LC メソッド 2)。

RNase 4 分解物の IP-RPLC-MS 分析では、mRNA 末端への注釈付けと mRNA マッピングの同時分析手順も行えました (図 5)。ここでは、RNase T1 による分解で得られたものと同様のポリ A テール長の分布が得られました。ただし、RNase T1 分解物とは異なり、キャッピングされた 5' 末端はより長い特有の八量体配列 m7G 2'-O-MeA G N N N N U

(N および m7G 2'-O-MeA はそれぞれ明らかになっていない核酸塩基とキャップ構造を表します。追加説明については、図 4 の凡例を参照) で表され、それに対するキャップなしの配列 A G N N N N U を解明することができました (図 6)。キャッピングされた種とキャップなしの種の相対ピーク面積から求めたキャッピング効率は 99.2 % でした。

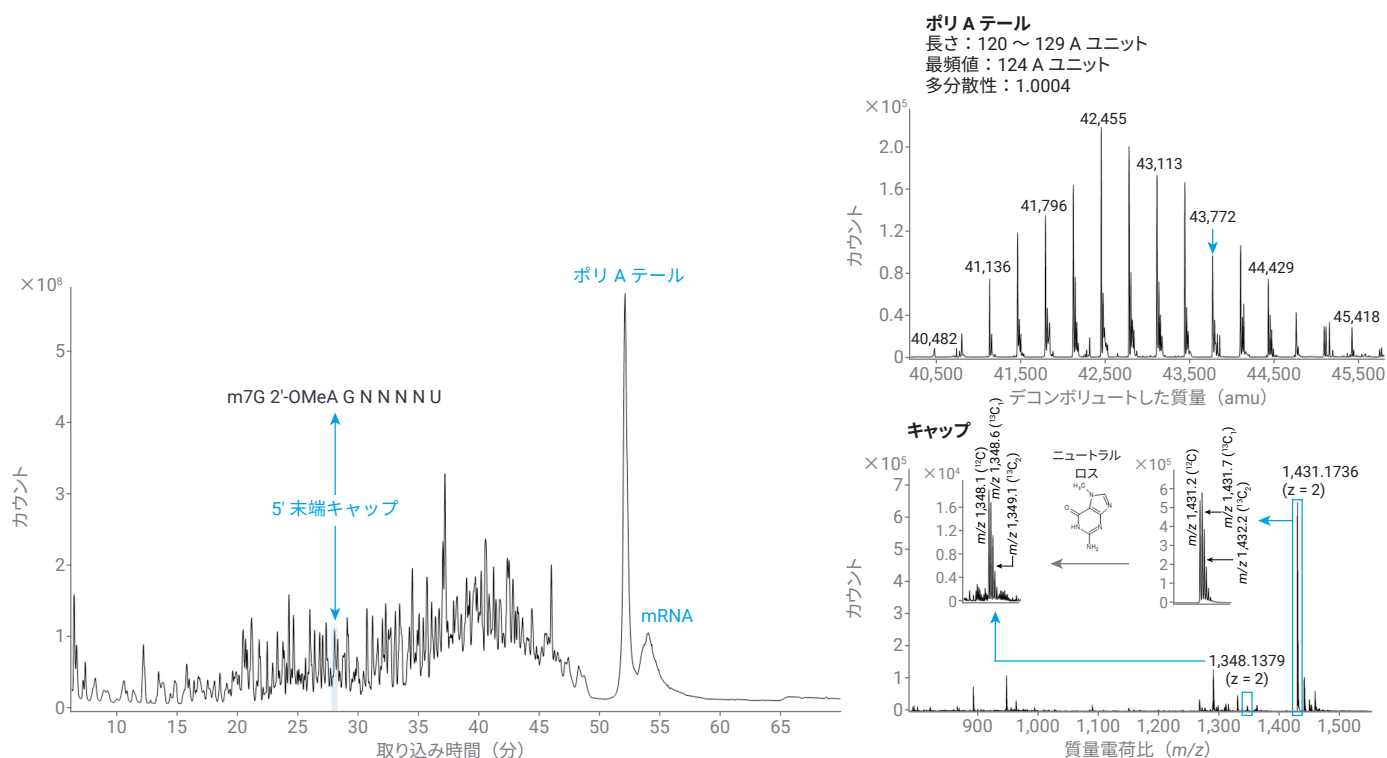


図 5. Fluc mRNA の RNase 4 分解物の mRNA マッピングと 5' キャップおよび 3' ポリ A テールの分析結果 (LC メソッド 2)。キャップを含むオリゴヌクレオチドは RNase T1 分解物で観察されたものより大幅に長くなっています (8 ユニット)。詳細については、図 4 を参照してください。

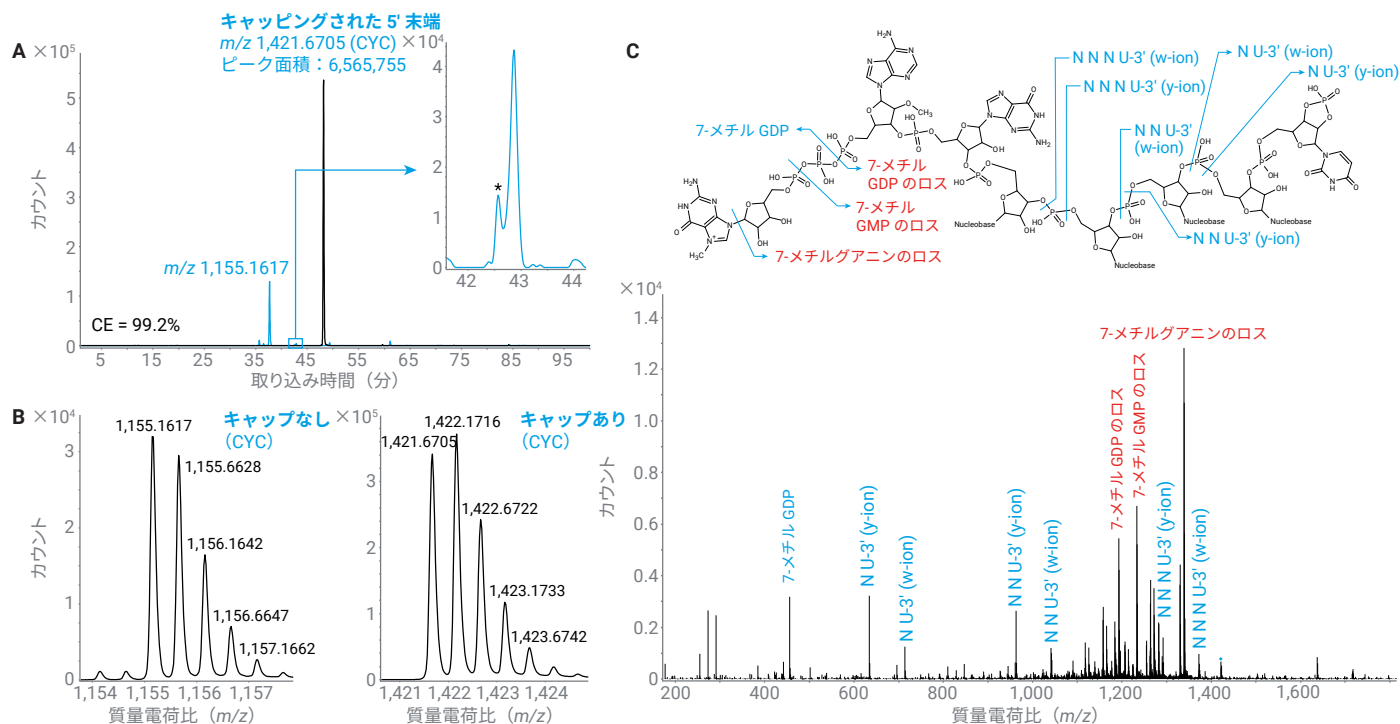


図 6. RNase 4 により得られた FLuc mRNA 分解物の 5' 末端 mRNA 配列の分析結果とキャッピング効率の計算 (LC メソッド 3)。(A) m/z 1,155.1617 (青) および m/z 1,421.6705 (黒) で測定された抽出イオンクロマトグラム (EIC)。それぞれ 2',3' 環状リン酸ジエステル (CYC) 3' 末端を持つキャップなし (A G N N N U) およびキャッピングされた 5' 末端 (m7G 2'-OMe A G N N N U、図 5 を参照) に相当。MS/MS スペクトルの解析により、 m/z 1,155.1617 のラベルが付けられた高アバundランスのピークを、CYC 末端を持つキャップなしの異性体種と区別できました。差し込み図の青色のクロマトグラムは、 m/z 1,155.1617 で測定された EIC を拡大したものです。(B) CYC 末端を持つ二価のキャッピングされた種とキャップなしの種の m/z 異性体エンベロープ。(C) 切断位置が示された、CYC 末端を持つキャッピングされた種の MS/MS スペクトル。w 型および y 型イオンの生成につながる切断位置については、図 7 を参照してください。プロダクトイオンの構造および対応するニュートラルロスの構造にもとづく注釈ラベルをそれぞれ青色または赤色で示しています。*汚染ピークは、内部 mRNA サブ配列の ^{13}C 異性体を表します。後者の汚染物質をキャップなしの 5' 末端からより明確に分離し、正確なキャッピング効率の測定を容易にするために、LC グラジエントを延長しています (メソッド 3)。

さらに配列を確認するために、IP-RPLC-MS データに対して小型および大型分子のフィーチャー抽出を実行したところ、すべてのピークに関連するモノアイソトピック MW または平均 MW が返されました。また、これらの MW を、コンピュータ上での mRNA の分解から導き出された多数の理論的 MW の中で検索するにより、サブ配列への、記録された MW の注釈付けを行うことができました。場合によっては、複数の LC/MS ピークに対して同じ MW が得られることもあります。このようなピークは異なる異性体のサブ配列を表し、考えられるすべての異性体を識別する

には、MS/MS フラグメンテーションが必要です。一般に、リン酸ジエステルの切断により RNA オリゴマーの衝突誘起解離が生じ、5' 末端 a および c イオンと 3' 末端 w および y イオンが生成されます³⁰。これらのイオンを異なる異性体の識別に使用することができます (図 7)。このように MS/MS でサポートされるフル MS を使用して LC/MS ピークに注釈を付ける手順により、図 8 のアバンダンスの高いピークに対して表示されている RNase T1 フラグメントの注釈が生成されました。

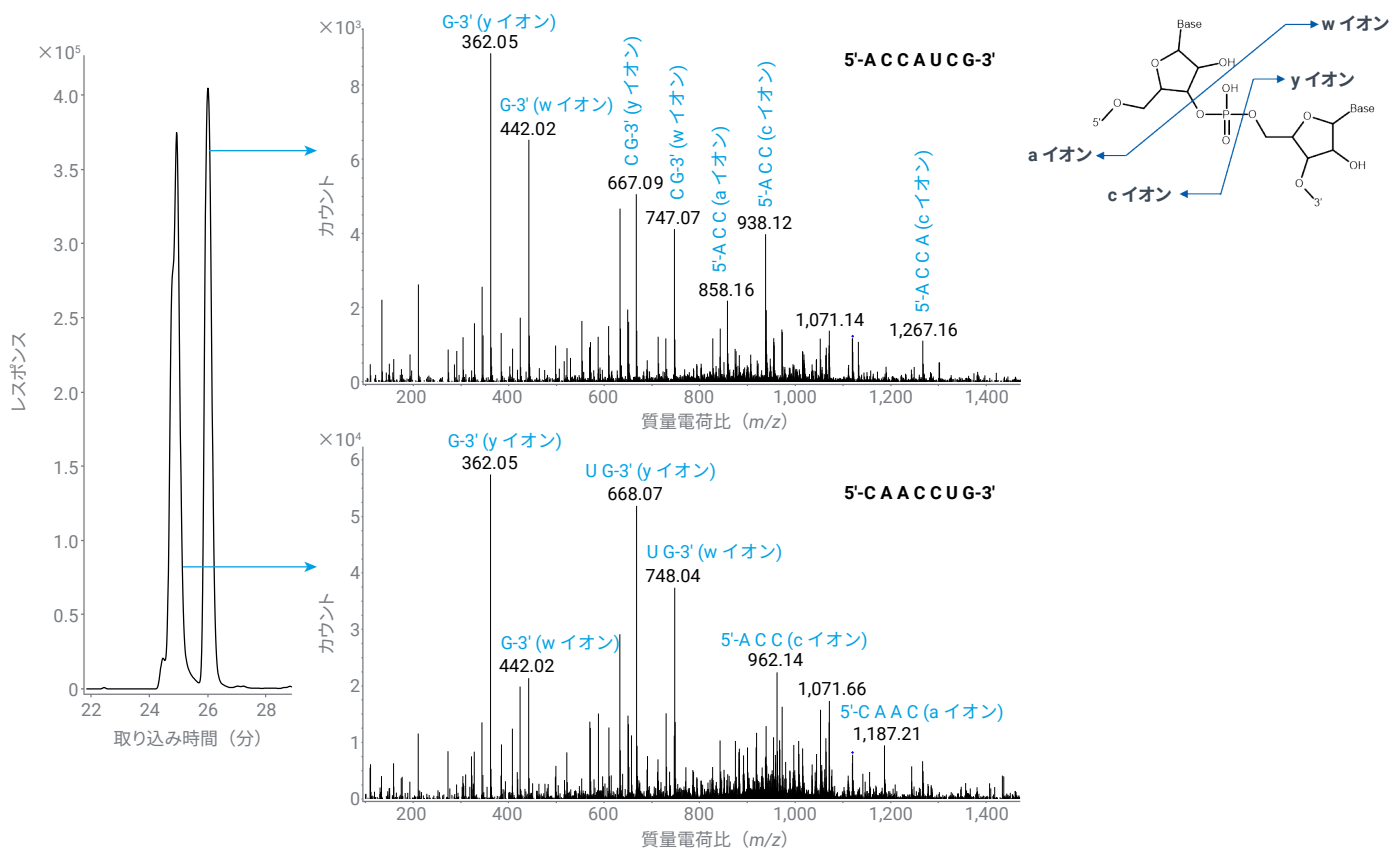


図 7. Fluc mRNA の RNase T1 分解物から得られた 2 つの異性体サブ配列を表す IP-RPLC-MS ピーク (EIC) (LC メソッド 2)。より高アバンダンスの MS/MS プロダクトイオンは、5' 末端、3' 末端、および内部フラグメントを生成する a 型、c 型、y 型、および w 型のリン酸ジエステル切断を表します。

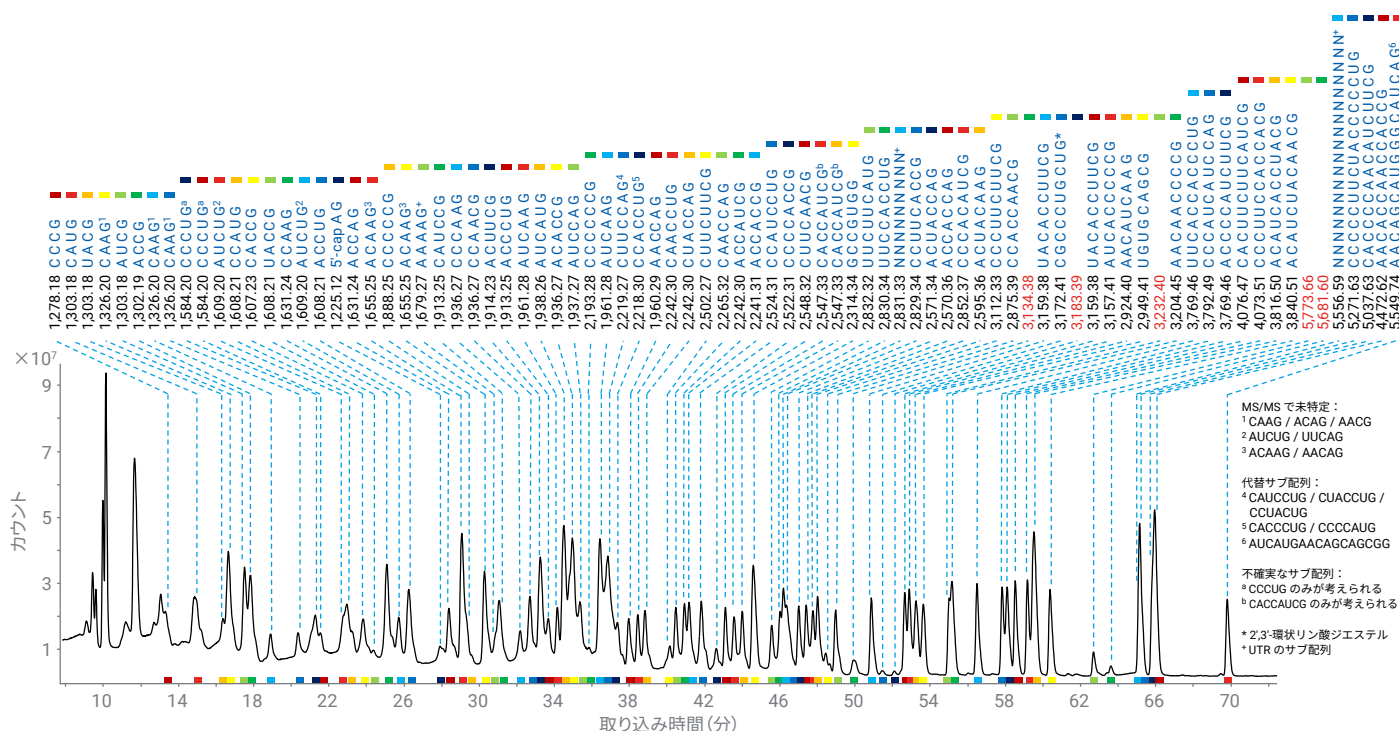


図 8. MS/MS スペクトルの解析にもとづくサブ配列の注釈が示された Fluc mRNA の RNase T1 分解物の mRNA マッピング (LC メソッド 3)。注釈の上およびクロマトグラムピークの下に示された色付きのバーにより、各ピークに対するサブ配列の注釈を視覚的に追跡しやすくなります。各配列の前には、MS により記録されたそれぞれの MW が記載されています。赤色の注釈は未同定のピークです。

mRNA 配列上に注釈付きのサブ配列が複数回出現している (多部位のサブ配列) ピークがあると、ピークと mRNA の特定部位との 1 対 1 の対応関係が成り立たなくなるため、以降の分析ではこれらのピークを破棄しました。例えば、三量体 ACG は Fluc mRNA の ORF に 13 回出現し、そのカバー率は配列の 2 % を超えています。RNase T1 による Fluc mRNA の分解では、残りの部位特異的なピークを、3' 末端リン酸基を含むサブ配列を表すピーク (60 個) と、3' 末端 2',3' 環状リン酸ジエステル部分の特徴とするピーク (52 個) に分けることができました。この合計 112 個のサブ配列のうち ORF に位置するもののカバー率は、mRNA の ORF 領域の 49.4 % でした (図 9)。この値は、完全な RNase T1 分解物の LC/MS 分析により得られた部位特異的なサブ配列を使用して計算された、公開されている Fluc mRNA の配列カバー率にもとづく範囲 12 ~ 56 % の上限に近づいています^{21, 22, 25, 26}。

RNase 4 分解物に対して同じ RNA マッピング手順を実行したところ、mRNA の全配列上で 159 個の部位特異的なサブ配列に注釈が付けられました。これは、3' リン酸塩を持つ 83 個のサブ配列と、3' 末端に 2'-

3' 環状リン酸ジエステルを持つ 76 個のサブ配列を表していました。これらの単一部位のサブ配列のカバー率は Fluc mRNA の ORF の 88.6 % で (図 9)、以前公開された 78 % を上回っています²⁶。RNase 4 で得られるサブ配列がより長いことから、この酵素を使用することにより、明らかに RNase T1 による分解よりもはるかに高い配列カバー率を達成できました。

RNase T1 と RNase 4 の両方による分解から得られた、特定された部位特異的なサブ配列 (図 9) を組み合わせた場合のカバー率は、Fluc mRNA の ORF の 94.7 % となり、RNase T1 による部分的な分解を実行した Vanhinsbergh ら²⁰ の報告値とほぼ一致します。さらに、得られた 94.7 % というカバー率は、mRNA 配列上に複数回出現するサブ配列を含めた場合のカバー率 96.9 % に近い値となっています (表 3)。この観察結果は、RNase 4 による分解で生成された長いユニークなサブ配列から得られたものであり、mRNA の配列カバー率をさらに高めるためにたびたび必要となる多部位のサブ配列の考慮が不要になります。

RNase T1 分解物の RNA マッピング (配列カバー率：49.4%)

```

1      AUGGAGGACG CCAAGAAACAU CAAGAAGGGC CCGGCCCCCU UCUACCCCCU GGAGGACGGC ACCGCCGCG AGCAGCUGCA CAAGGCCAUG AAGCGGUACG
101    CCCUGGUGCC CGGCACCAUC GCCUUCACCG AGCCCCACAU CGAGGUGGAC AUCACCUACG CCGAGUACUU CGAGAUGAGC GUGCGGCUGG CCGAGGCCAU
201    GAAGCGGUAC GGCCUGAAC A CCAACCACCG GAUCGUGGUG UGCAGCGAGA ACAGCCUGCA GUUCUUAUG CCCGUGCUGG GCGGCCUGUU CAUCGGCGUG
301    GCGGUGGCC CCGCCAAACA CAUCUACAAC GAGCGGGAGC UGCUGAACAG CAUGGGCAUC AGCCAGCCCA CCGUGGUGUU CGUGAGCAAG AAGGGCCUGC
401    AGAAGAUCU GAACGUGCAG AAGAAAGCUC CCAUCAUCCA GAAGAUCAUC AUCAUGGACA GCAAGACCGA CUACCAAGGC UUCAGAGCA UGUACACCUU
501    CGUGACCAAG CACCUGCCCC CCGGCUUCAA CGAGUACGAC UUCGUGCCCG AGAGCUUCGA CCGGGACAAG ACCAUCGCC UGAUCAUGAA CAGCAGCGGC
601    AGCAGCGGCC UGCCCAAGGG CGUGGCCUG CCGCACCGGA CCGCCUGCGU CGGCUUACGC CACGCCCGGG ACCCCAUCUU CGGCAACCAAG AUCAUCCCG
701    ACACCGCCAU CCUGAGCGUG GUGCCCUUCC ACCACGGCUU CGGCAUGUUC ACCACCCUGG GCUACCUGAU CUGCGGCUUC CCGGUGGUGC UGAUGUACCG
801    GUUCGAGGAG GAGCUGUUC UGCGGAGCCU GACGACUAC AAGAUCACAG GCGCCUGCU GUGGCCACC CUGUUCAGCU UCUUCGCCAA GAGCAGCCUG
901    AUCGACAAAU ACGACCUGAG CAACCUGCAC GAGAUCCGCA GCGGCGCGCG CCCCUGAGC AAGGAGGUGG GCGAGGCCGU GGCCAAGCGG UUCCACCUGC
1001   CCGCAUCCG GCAAGGCUAC GGCUGACCG AGACCAACAG CGCCAUCCUG AUCACCCCG AGGGCGACGA CAAGCCCGGC GCGUGGGCA AGGUGGUGCC
1101   CUUCUUCGAG GCCAAGGUG UGACCUUGGA CACCGGCAAG ACCUGGGCG UGAACCAAGC GGGCGAGCUG UGCGUGCGGG GCCCAUGAU CAUGAGCGGC
1201   UACGUGAAC ACCCCAGGC CACCAACGCC CUGAUCGACA AGGACGGCUG GCGUACAGC GGGACAUCG CCUACUGGA CGAGGACGAG CACUUCUUA
1301   UCGUGGACCG CUGAAGAGC CUGAUCAAGU ACAAGGCCUA CAGGUGGCC CCGCGCAGC UGGAGAGCAU CCUGGCGAG CACCCCAACA UCUCGACGC
1401   CGCGUGGGCC GGCUGCGCG ACAGCAGCG CCGCGAGCUG CCGCGCCCG UGGUGUGGCU GAGGACGGC AAGACCAUGA CCGAGAAGGA GAUCGUGGAC
1501   UACGUGGCCA GCCAGGUGAC CACCGCAAG AAGCUGCGGG GCGGCGUGGU GUUCGUGGAC GAGGUGCCCA AGGGCCUGAC CCGCAAGCUG GACGCCCGGA
1601   AGAUCGGGGA GAUCCUGAUC AAGGCCAAGA AGGCGGCA G AUCGCCGUG UGA

```

RNase 4 分解物の RNA マッピング (配列カバー率：88.6%)

```

1      AUGGAGGACG CCAAGAAACAU CAAGAAGGGC CCGGCCCCCU UCUACCCCCU GGAGGACGGC ACCGCCGCG AGCAGCUGCA CAAGGCCAUG AAGCGGUACG
101    CCCUGGUGCC CGGCACCAUC GCCUUCACCG AGCCCCACAU CGAGGUGGAC AUCACCUACG CCGAGUACUU CGAGAUGAGC GUGCGGCUGG CCGAGGCCAU
201    GAAGCGGUAC GGCCUGAAC CCAACCACCG GAUCGUGGUG UGCAGCGAGA ACAGCCUGCA GUUCUUAUG CCCGUGCUGG GCGGCCUGUU CAUCGGCGUG
301    GCGGUGGCC CCGCCAAACA CAUCUACAAC GAGCGGGAGC UGCUGAACAG CAUGGGCAUC AGCCAGCCCA CCGUGGUGUU CGUGAGCAAG AAGGGCCUGC
401    AGAAGAUCU GAACGUGCAG AAGAAAGCUC CCAUCAUCCA GAAGAUCAUC AUCAUGGACA GCAAGACCGA CUACCAAGGC UUCAGAGCA UGUACACCUU
501    CGUGACCAAG CACCUGCCCC CCGGCUUCAA CGAGUACGAC UUCGUGCCCG AGAGCUUCGA CCGGGACAAG ACCAUCGCC UGAUCAUGAA CAGCAGCGGC
601    AGCAGCGGCC UGCCCAAGGG CGUGGCCUG CCGCACCGGA CCGCCUGCGU GCGGUUCAGC CACGCCCGGG ACCCCAUCUU CCGCAACCAAG AUCAUCCCG
701    ACACCGCCAU CCUGAGCGUG GUGCCCUUCC ACCACGGCUU CGGCAUGUUC ACCACCCUGG GCUACCUGAU CUGCGGCUUC CCGGUGGUGC UGAUGUACCG
801    GUUCGAGGAG GAGCUGUUC UGCGGAGCCU GACGACUAC AAGAUCACAG GCGCCUGCU GUGGCCACC CUGUUCAGCU UCUUCGCCAA GAGCAGCCUG
901    AUCGACAAAU ACGACCUGAG CAACCUGCAC GAGAUCCGCA GCGGCGCGCG CCCCUGAGC AAGGAGGUGG GCGAGGCCGU GGCCAAGCGG UUCCACCUGC
1001   CCGCAUCCG GCAAGGCUAC GGCUGACCG AGACCAACAG CGCCAUCCUG AUCACCCCG AGGGCGACGA CAAGCCCGGC GCGUGGGCA AGGUGGUGCC
1101   CUUCUUCGAG GCCAAGGUG UGACCUUGA CACCGGCAAG ACCUGGGCG UGAACCAAGC GGGCGAGCUG UGCGUGCGGG GCCCAUGAU CAUGAGCGGC
1201   UACGUGAAC ACCCCAGGC CACCAACGCC CUGAUCGACA AGGACGGCUG GCGUACAGC GGGACAUCG CCUACUGGA CGAGGACGAG CACUUCUUA
1301   UCGUGGACCG GCUAAGAGC CUGAUCAAGU ACAAGGCCUA CAGGUGGCC CCGCGCAGC UGGAGAGCAU CCUGGCGAG CACCCCAACA UCUCGACGC
1401   CGCGUGGGCC GGCUGCGCG ACAGCAGCG CCGCGAGCUG CCGCGCCCG UGGUGUGGCU GAGGACGGC AAGACCAUGA CCGAGAAGGA GAUCGUGGAC
1501   UACGUGGCCA GCCAGGUGAC CACCGCAAG AAGCUGCGGG GCGGCGUGGU GUUCGUGGAC GAGGUGCCCA AGGGCCUGAC CCGCAAGCUG GACGCCCGGA
1601   AGAUCGGGGA GAUCCUGAUC AAGGCCAAGA AGGCGGCA G AUCGCCGUG UGA

```

RNase T1 + RNase 4 分解物の RNA マッピング (配列カバー率：94.7%)

```

1      AUGGAGGACG CCAAGAAACAU CAAGAAGGGC CCGGCCCCCU UCUACCCCCU GGAGGACGGC ACCGCCGCG AGCAGCUGCA CAAGGCCAUG AAGCGGUACG
101    CCCUGGUGCC CGGCACCAUC GCCUUCACCG AGCCCCACAU CGAGGUGGAC AUCACCUACG CCGAGUACUU CGAGAUGAGC GUGCGGCUGG CCGAGGCCAU
201    GAAGCGGUAC GGCCUGAAC CCAACCACCG GAUCGUGGUG UGCAGCGAGA ACAGCCUGCA GUUCUUAUG CCCGUGCUGG GCGGCCUGUU CAUCGGCGUG
301    GCGGUGGCC CCGCCAAACA CAUCUACAAC GAGCGGGAGC UGCUGAACAG CAUGGGCAUC AGCCAGCCCA CCGUGGUGUU CGUGAGCAAG AAGGGCCUGC
401    AGAAGAUCU GAACGUGCAG AAGAAAGCUC CCAUCAUCCA GAAGAUCAUC AUCAUGGACA GCAAGACCGA CUACCAAGGC UUCAGAGCA UGUACACCUU
501    CGUGACCAAG CACCUGCCCC CCGGCUUCAA CGAGUACGAC UUCGUGCCCG AGAGCUUCGA CCGGGACAAG ACCAUCGCC UGAUCAUGAA CAGCAGCGGC
601    AGCAGCGGCC UGCCCAAGGG CGUGGCCUG CCGCACCGGA CCGCCUGCGU GCGGUUCAGC CACGCCCGGG ACCCCAUCUU CCGCAACCAAG AUCAUCCCG
701    ACACCGCCAU CCUGAGCGUG GUGCCCUUCC ACCACGGCUU CGGCAUGUUC ACCACCCUGG GCUACCUGAU CUGCGGCUUC CCGGUGGUGC UGAUGUACCG
801    GUUCGAGGAG GAGCUGUUC UGCGGAGCCU GACGACUAC AAGAUCACAG GCGCCUGCU GUGGCCACC CUGUUCAGCU UCUUCGCCAA GAGCAGCCUG
901    AUCGACAAAU ACGACCUGAG CAACCUGCAC GAGAUCCGCA GCGGCGCGCG CCCCUGAGC AAGGAGGUGG GCGAGGCCGU GGCCAAGCGG UUCCACCUGC
1001   CCGCAUCCG GCAAGGCUAC GGCUGACCG AGACCAACAG CGCCAUCCUG AUCACCCCG AGGGCGACGA CAAGCCCGGC GCGUGGGCA AGGUGGUGCC
1101   CUUCUUCGAG GCCAAGGUG UGACCUUGA CACCGGCAAG ACCUGGGCG UGAACCAAGC GGGCGAGCUG UGCGUGCGGG GCCCAUGAU CAUGAGCGGC
1201   UACGUGAAC ACCCCAGGC CACCAACGCC CUGAUCGACA AGGACGGCUG GCGUACAGC GGGACAUCG CCUACUGGA CGAGGACGAG CACUUCUUA
1301   UCGUGGACCG GCUAAGAGC CUGAUCAAGU ACAAGGCCUA CAGGUGGCC CCGCGCAGC UGGAGAGCAU CCUGGCGAG CACCCCAACA UCUCGACGC
1401   CGCGUGGGCC GGCUGCGCG ACAGCAGCG CCGCGAGCUG CCGCGCCCG UGGUGUGGCU GAGGACGGC AAGACCAUGA CCGAGAAGGA GAUCGUGGAC
1501   UACGUGGCCA GCCAGGUGAC CACCGCAAG AAGCUGCGGG GCGGCGUGGU GUUCGUGGAC GAGGUGCCCA AGGGCCUGAC CCGCAAGCUG GACGCCCGGA
1601   AGAUCGGGGA GAUCCUGAUC AAGGCCAAGA AGGCGGCA G AUCGCCGUG UGA

```

図 9. Fluc mRNA の ORF の配列カバー率。多部位に出現するサブ配列は除外されています。詳細については、説明文を参照してください。

表 3. Fluc mRNA の ORF の配列カバー率

	RNase T1	RNase 4	RNase T1 + 4
部位特異的なサブ配列のみ	49.4 %	88.6 %	94.7 %
すべてのサブ配列 (長さ ≥ 3)	75.7 %	88.9 %	96.9 %

結論

このアプリケーションノートでは、ウルトラライナートテクノロジー搭載の Agilent Altura HPLC カラムと Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムで構成される低吸着性の流路での IP-RPLC-MS による mRNA マッピングについて調査しました。RNase T1 および RNase 4 による Fluc mRNA の分解から得られた複雑なオリゴヌクレオチド混合物に適用したところ、低吸着性の流路により、(1) 高い配列カバー率を達成し、(2) ポリ A テール長の分布を表示し、(3) 5' 末端キャップ構造を確認し、(4) キャッピング効率を計算することができました。さらに注目すべきことは、低頻度 (RNase 4) と高頻度 (RNase T1) のカッターで並行して分解した結果を組み合わせることで、mRNA 配列のカバー率 94.7 % を達成できたことです。

参考文献

- Szabó, G. T.; Mahiny, A. J.; Vlatkovic, I. COVID-19 mRNA Vaccines: Platforms and Current Developments. *Mol. Ther.* **2022**, 30(5), 1850-1868.
- Fortner, A.; Schumacher, D. First COVID-19 Vaccines Receiving the US FDA and EMA Emergency Use Authorization. *Discoveries* **2021**, 9(1).
- Heinz, F. X.; Stiasny, K. Distinguishing Features of Current COVID-19 Vaccines: Knowns and Unknowns of Antigen Presentation and Modes of Action. *NPJ Vaccines* **2021**, 6(1), 104.
- Park, J. W.; Lagniton, P. N.; Liu, Y.; Xu, R. H. mRNA Vaccines for COVID-19: What, Why and How. *Int. J. Biol. Sci.* **2021**, 17(6), 1446.
- Qin, S.; Tang, X.; Chen, Y.; Chen, K.; Fan, N.; Xiao, W.; Zheng, Q.; Li, G.; Teng, Y.; Wu, M.; *et al.* mRNA-Based Therapeutics: Powerful and Versatile Tools to Combat Diseases. *Signal Transduct. Target Ther.* **2022**, 7(1), 166.
- Xiao, Y.; Tang, Z.; Huang, X.; Chen, W.; Zhou, J.; Liu, H.; Liu, C.; Kong, N.; Tao, W. Emerging mRNA Technologies: Delivery Strategies and Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, 51(10), 3828-3845.
- Kwon, S.; Kwon, M.; Im, S.; Lee, K.; Lee, H. mRNA Vaccines: the Most Recent Clinical Applications of Synthetic mRNA. *Arch. Pharmacol. Res.* **2022**, 45(4), 245-262.
- Sahin, U.; Karikó, K.; Tuerceci, Oe. mRNA-Based Therapeutics—Developing a New Class of Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, 13(10), 759-780.
- Pardi, N.; Hogan, M. J.; Porter, F. W.; Weissman, D. mRNA Vaccines—a New Era in Vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, 17(4), 261-279.
- Kariko, K.; Weissman, D. Naturally Occurring Nucleoside Modifications Suppress the Immunostimulatory Activity of RNA: Implication for Therapeutic RNA Development. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **2007**, 10(5), 523.
- Minnaert, A. K.; Vanluchene, H.; Verbeke, R.; Lentacker, I.; De Smedt, S. C.; Raemdonck, K.; Sanders, N. N.; Remaut, K. Strategies for Controlling the Innate Immune Activity of Conventional and Self-Amplifying mRNA Therapeutics: Getting the Message Across. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, 176, 113900.
- Callaway, E.; Naddaf, M. Pioneers of mRNA COVID Vaccines Win Medicine Nobel. *Nature* **2023**, 622(7982), 228-229.
- Blenke, E. O.; Oernskov, E.; Schoeneich, C.; Nilsson, G. A.; Volkin, D. B.; Mastrobattista, E.; Almarsson, Oe.; Crommelin, D. J. A. The Storage and In-Use Stability of mRNA Vaccines and Therapeutics: Not a Cold Case. *J. Pharm. Sci.* **2023**, 112(2), 386-403.
- Packer, M.; Gyawali, D.; Yerabolu, R.; Schariter, J.; White, P. A Novel Mechanism for the Loss of mRNA activity in Lipid Nanoparticle Delivery Systems. *Nat. Commun.* **2021**, 12(1), 6777.
- Morreel, K.; t'Kindt, R.; Debyser, G.; Jonckheere, S.; Sandra, P.; Sandra, K. Diving into the Structural Details of In Vitro Transcribed mRNA Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry-Based Oligonucleotide Profiling. *LCGC Europe* **2022**, 35(2022), 220-236.

16. Beverly, M.; Dell, A.; Parmar, P.; Houghton, L. Label-Free Analysis of mRNA Capping Efficiency Using RNase H Probes and LC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, 408, 5021–5030.
17. 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.
18. Rapid Analysis of mRNA 5' Capping with High Resolution LC/MS. Agilent Technologies application note, 5994-3984EN, **2021**.
19. Analysis of mRNA poly-A Sequence Variants by High-Resolution LC/MS. Agilent Technologies application note, 5994-3005EN, **2021**.
20. Vanhinsbergh, C. J.; Criscuolo, A.; Sutton, J. N.; Murphy, K.; Williamson, A. J.; Cook, K.; Dickman, M. J. Characterization and Sequence Mapping of Large RNA and mRNA Therapeutics Using Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2022**, 94(20), 7339-7349.
21. Goyon, A.; Scott, B.; Yehl, P.; Zhang, K. Online Nucleotide Mapping of mRNAs. *Anal. Chem.* **2024**, 96(21), 8674–8681.
22. Gau, B. C.; Dawdy, A. W.; Wang, H. L.; Bare, B.; Castaneda, C. H.; Friese, O. V.; Thompson, M.S.; Lerch, T. F.; Cirelli, D. J.; Rouse, J. C. C. Oligonucleotide Mapping Via Mass Spectrometry to Enable Comprehensive Primary Structure Characterization of an mRNA Vaccine Against SARS-CoV-2. *Sci. Rep.* **2023**, 13(1), 9038.
23. Xiong, J.; Wu, J.; Liu, Y.; Feng, Y. J.; Yuan, B. F. Quantification and Mapping of RNA Modifications. *Trends Anal. Chem.* **2024**, 117606.
24. Determining mRNA Capping with HILIC-MS on a Low-Adsorption Flow Path. Agilent Technologies application note, 5994-7118EN, **2024**.
25. Jiang, T.; Yu, N.; Kim, J.; Murgo, J. R.; Kissai, M.; Ravichandran, K.; Miracco, E. J.; Presnyak, V.; Hua, S. Oligonucleotide Sequence Mapping of Large Therapeutic mRNAs Via Parallel Ribonuclease Digestions and LC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2019**, 91(13), 8500-8506.
26. Wolf, E. J.; Grünberg, S.; Dai, N.; Chen, T. H.; Roy, B.; Yigit, E.; Corrêa Jr, I. R. Human RNase 4 Improves mRNA Sequence Characterization by LC-MS/MS. *Nucleic Acids Res.* **2022**, 50(18), e106-e106.
27. LC/UV および LC/MS によるオリゴヌクレオチド分析のための各種イオンペア試薬の評価 Agilent Technologies アプリケーションノート, 5994-2957JAP, **2021**.
28. Guimaraes, G. J.; Bartlett, M. G. Managing Nonspecific Adsorption to Liquid Chromatography Hardware: a Review. *Anal. Chim. Acta.* **2023**, 1250, 340994.
29. Lardeux, H.; Goyon, A.; Zhang, K.; Nguyen, J. M.; Lauber, M. A.; Guillaume, D.; D'Atri, V. The Impact of Low Adsorption Surfaces for the Analysis of DNA and RNA Oligonucleotides. *J. Chromatogr. A* **2022**, 1677, 463324.
30. McLuckey, S. A.; Van Berkel, G. J.; Glish, G. L. Tandem Mass Spectrometry of Small, Multiply Charged Oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, 3(1), 60-70.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

DE-003564

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, August 27, 2025

5994-8055JAP