

IP-RP-LC-MS および Premier Oligonucleotide BEH 300 Å C18 カラムを用いた CRISPR シングルガイド RNA 特性解析

Maissa M. Gaye, Chris Knowles, Balasubrahmanyam Addepalli, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

要約

CRISPR/Cas システムは、高速、低コスト、そして動物実験の必要性が低減されることにより、研究および医薬品の両方におけるゲノム編集の頼れるプラットフォームになっています。このシステムを使用すると、ゲノム DNA の正確な領域でゲノムを変化させることができ、独立したシングルガイド RNA の配列によってプログラムが可能になります。

CRISPR リボ核タンパク質複合体が結合した後で、標的となる遺伝子座を切断、変化および/または修飾します。編集の特異性は、ロードされる RNA 分子の設計と品質に直接関連付けられます。

イオンペア逆相液体クロマトグラフィーと質量分析 (IP-RP-LC-MS) の組み合わせを含む高度な分析法は、CRISPR RNA の同定、純度、インテグリティ、意図した修飾の確認に役立ちます。高性能表面およびオリゴヌクレオチドでバッチテスト済みの WidePore BEH C₁₈ 吸着剤を採用したカラムが、インタクト sgRNA および消化 sgRNA の両方の信頼性の高い分離の開始点として提案されました。このカラムで得られる分離能により、インタクト質量測定と MS^E ベースの消化成分のシーケンシングによる分子分析が直接実行できます。

アプリケーションのメリット

- Premier Oligonucleotide BEH C₁₈ 300 Å カラムは、インタクト sgRNA およびヌクレアーゼ消化 sgRNA 成分の両方の分析に適合
- 欠損配列とインタクト RNA の分離物を区別するクロマトグラフィーの分離能により、頑健なインテグリティと純

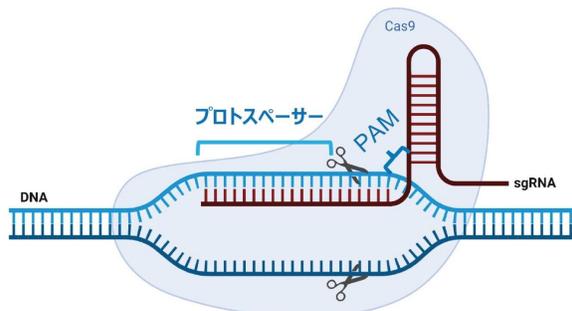
度評価を実現

- 詳細な分子特性解析のための消化成分および修飾末端の優れた IP-RP-LC 分離
- *in silico* 消化カリキュレーター、waters_connect™、UNIFI™、CONFIRM Sequence アプリケーションの使用による精密質量マッチおよび sgRNA オリゴマッピングの注釈

はじめに

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats、クラスター化され、規則的に間隔が空いた短い回文構造の繰り返し) は、侵入するバクテリオファージに対する適応免疫応答として、バクテリアで最初に発見されたゲノム編集システムです¹。天然に存在する CRISPR 配列は、tracrRNA (トランス活性化型 CRISPR RNA)、および crRNA と呼ばれる短い RNA で構成されています²。これら 2 つのオリゴヌクレオチドが連結されて一本鎖ガイド RNA (sgRNA) になります。RNA 以外に、この複合体には、sgRNA と協力して機能するエンドヌクレアーゼである、Cas9 などの Cas タンパク質が含まれており、標的 DNA に二本鎖切断を導入して、プログラム可能なゲノム編集を行うことが可能です (図 1)³。CRISPR/Cas-9 リボ核タンパク質 (RNP) システムによる編集は、(i) ゲノム標的部位の認識、(ii) 両方の鎖の切断、(iii) 修復の 3 つの重要なステップで発生します⁴。編集の正確さと有効性は、変更される遺伝子座の目的位置を一意に特定する sgRNA の能力に依存します。マッチが正しく行われないと、オフターゲット効果や効率の低下につながる可能性があります⁵。CRISPR 研究に多大な関心が集まった結果、複数の Cas タンパク質のエンジニアリングが行われました。また、*ex vivo* の遺伝子編集細胞治療や *in vivo* 遺伝子編集を用いた疾患の治療を目的とした複数の臨床試験が実施されました^{6,7}。

A



B

100-mer: 5'- OMEG* OMEU* OMEG* rC rC rA rC rA rG rC rC rA rC rC rC rC
 rU rC rU rC rG rU rU rU rU rA rG rA rG rC rU rA rG rA rA rA rU rA rG rC rA
 rA rG rU rU rA rA rA rA rU rA rA rG rG rC rU rA rG rU rC rC rG rU rU rA rU
 rC rA rA rC rU rU rG rA rA rA rA rA rG rU rG rG rC rA rC rC rG rA rG rU rC
 rG rG rU rG rC OMEU* OMEU* OMEU* rU -3'

図 1. (A) Cas9 タンパク質および相補的 DNA に一本鎖ガイド RNA (sgRNA) が結合した CRISPR-Cas9 リボ核タンパク質 (RNP) 複合体の概略図。

BioRender.com で作成。

(B) この分析で対象となる合成 sgRNA の配列。OME = 2'-メチル、* はホスホロチオエートのリンカーを表します。sgRNA は、5' crRNA を介して標的 DNA 配列 (プロトスペーサー) を認識するように Cas-9 に指示し、DNA 融解後および RNA-DNA ハイブリッドの形成後に PAM 配列 (5'-NGG-3'、N は任意のヌクレオチド塩基) のアップストリームの領域で DNA を切断します。

オフターゲット効果の可能性があるため、sgRNA の配列、修飾、不純物は、非常に慎重に特性解析およびモニターする必要があります。このために、液体クロマトグラフィーおよび質量分析 (LC-MS) により、インタクト RNA 分析、オリゴマッピング、およびシーケンシングを実行できます。相補的 DNA (cDNA) ベースのサンガーにより間接的な情報が得られたり、次世代シーケンシング (NGS) により修飾情報が失われたりするのは対照的に、この高度な分析法により、RNA 配列の直接的な分子レベルでの観察が可能になります。本研究では、LC、UV、MS 装置、およびデータの取り込み、解析、および結果のレポート用のアプリケーションベースのソフトウェアで構成される単一プラットフォームを用いた、ACQUITY Premier BEH C₁₈ 300 Å、1.7 μm カラムを使用したインタクト RNA および消化 RNA の両方のイオンペア逆相 LC について報告します。このカラムに採用されている高性能表面テクノロジーと WidePore BEH 粒子により、インタクト sgRNA の新しい分離を迅速に立ち上げることができ、信頼性の高い分離が保証されます。このカラムをオリゴマッピングアプローチで使用する場合、ホスホロチオエート変異体の同定にも役立ちます。この試験では、*in silico* 消化ライブラリーカリキュレーター ([Waters Microapp Store <http://microapp-staging.rdeadmin.waters.com:5000/home/showmarkdown/mrna-cleaver>](http://microapp-staging.rdeadmin.waters.com:5000/home/showmarkdown/mrna-cleaver)) を waters_connect™ と組み合わせ

て、内蔵の UNIFI、CONFIRM Sequence、および INTACT Mass アプリケーションと使用することで、IP-RP-LC-MS データに迅速に注釈が付けられました。

実験方法

インタクト sgRNA 分析

マウス GATA2 sgRNA (Integrated DNA Technologies、アイオワ州コーラルビル、5' - OMEG* OMEU* OMEG* rC rC rA rC rA rG rC rC rA rC rC rC rC rU rC rU rC rG rU rU rU rU rA rG rA rG rC rU rA rG rA rA rA rU rA rG rC rA rA rG rU rU rA rA rA rU rA rA rA rG rG rC rU rA rG rU rC rC rG rU rU rA rU rC rA rA rC rU rU rG rA rA rA rA rG rU rG rG rC rA rC rC rG rA rG rU rC rG rG rU rG rC OMEU* OMEU* OMEU* rU -3'、OME=2' -O-メチル、*= ホスホロチオエート) をヌクレアーゼフリーのトリス-EDTA バッファーに再懸濁し、10 pmol/μL のサンプル溶液を調製しました。

LC 条件

LC システム:	ACQUITY UPLC I-ClassFTN (BioAccord™ システムの一部として)
検出器:	ACQUITY UPLC TUV 検出器
波長:	260 nm、280 nm
カラム:	ACQUITY Premier Oligonucleotide BEH C ₁₈ 、300 Å、1.7 μm、2.1 × 100 mm (製品番号: 186010540)
カラム温度:	70 °C
サンプル温度:	4 °C
注入:	1 μL (10 pmol)
流速:	0.3 mL/分

移動相 A: 0.1% N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) を IP 試薬とし、1% 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) を脱イオン水中に調製

移動相 B: 0.0375% DIPEA、0.075% HFIP 含有 65: 35 アセトニトリル: 水

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
初期条件	0.3	97	3	*
13.0	0.3	45	55	6
15.0	0.3	5	95	6
17.0	0.3	97	3	6
30.00	0.3	97	3	6
分析時間 = 30 分				

MS 条件

MS システム: BioAccord LC-MS システム

検出器: ACQUITY RDa 検出器

モード: フラグメンテーションによるフル
スキャン

極性: ネガティブ

コーン電圧: 40 V

フラグメンテーションコーン電圧 : 80 ~ 200 V

質量範囲:	高 (400 ~ 5000 m/z)
スキャンレート:	2 Hz
キャピラリー電圧:	0.80 kV
脱溶媒温度:	400 °C

オリゴマッピングのためのサンプル前処理

約 90 µg のマウス GATA2 sgRNA (IDT) を、24 µg (約 10 kU) のグアノシン特異的リボヌクレアーゼ T1 (Worthington Biochemical Corporation、ニュージャージー州レークウッド) を使用して消化しました。まず、ヌクレアーゼフリーのバッファー (10 mM トリス - HCl pH 7.5、0.1 mM EDTA) で調製した 20 µL の 8M 尿素を使用して、80 °C で 5 分間 RNA を変性させました。変性させた RNA を室温まで冷却した後、ヌクレアーゼフリーバッファーに再懸濁した RNase T1 を添加し、37 °C で 30 分間インキュベーションしました。30 K 分解能 Q-ToF 質量分析計 (Waters Vion MS) による IP -RP-LC-MS 分析用に、消化物に 40 µL のヌクレアーゼフリーバッファーを添加して、消化物を 80 µL にし、ポリプロピレン製オートサンプラーバイアル (300 µL、製品番号: [186002639 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186002639-polypropylene-12-x-32-mm-screw-neck-vial-with-cap-and-preslit-pt.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186002639-polypropylene-12-x-32-mm-screw-neck-vial-with-cap-and-preslit-pt.html)) に移しました。

LC 条件

LC システム:	ACQUITY UPLC Premier BSM システム (BioAccord システムの一部として)
検出器:	ACQUITY UPLC TUV 検出器
波長:	260 nm
カラム:	ACQUITY Premier Oligonucleotide BEH C ₁₈ 、300 Å、1.7 µm、2.1 × 150 mm (製品番号 : 186010541)
カラム温度:	70 °C

サンプル温度:	4 °C
注入:	5 µL
流速:	0.4 mL/分
移動相 A:	0.1% N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) をイオン対 (IP) 試薬とし、1% 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) を脱イオン水中に調製
移動相 B:	0.0375% DIPEA、0.075% HFIP 含有 65: 35 アセトニトリル: 水

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
初期条件	0.4	97	3	*
60.00	0.4	70	30	6
60.50	0.4	5	95	6
61.00	0.4	97	3	6
70.00	0.4	97	3	6
分析時間 = 70 分				

MS 条件

MS システム:	Vion MS システム
モード:	フラグメンテーションによるフルスキャン
極性:	ネガティブ
コーン電圧:	80 V

キャピラリー電圧:	1.5 kV
イオン源温度:	150 °C
コーンガス:	50 L/時間
脱溶媒ガス:	1200 L/時間
脱溶媒温度:	600 °C
低コリジョンエネルギー:	6 V
質量範囲:	高 (m/z 50 ~ 4000)
スキャンレート:	2 Hz
高コリジョンエネルギーランプの開始:	10 V
高コリジョンエネルギーランプの終了:	30 V
フラグメンテーションコーン電圧:	80 ~ 200 V
インテリジェントデータキャプチャーを使用:	はい

インフォーマティクス

mRNA 消化カリキュレーターは [Waters Microapp Store <http://microapp-staging.rdeadmin.waters.com:5000/home/showmarkdown/mrna-cleaver>](http://microapp-staging.rdeadmin.waters.com:5000/home/showmarkdown/mrna-cleaver) からアクセスできます。また、Intact Mass アプリケーションおよび Confirm Sequence アプリケーションは waters_connect に統合されています。

結果および考察

インタクト sgRNA を ACQUITY Premier オリゴヌクレオチド BEH C₁₈ カラム (2.1 × 150 mm、300 Å、1.7 μm) に注入し、DIPEA/HFIP 修飾移動相を使用して、IP-RP-LC にしたがって比較的短いグラジエントで分離されました。インタ

クト RNA 質量分析を実施するために、この実験中に低エネルギーマススペクトルが取り込まれるように質量分析計をプログラミングしました。また、RDa 高分解能質量分析計および検出器を搭載した BioAccord LC-MS システムを用いて、ネガティブイオン化モードで 3 回繰り返しデータを取り込みました。適用されるカラムには、最大長 200 nt の核酸の分析に最適化された WidePore 固定相が含まれているため、通常は長さが約 100 ヌクレオチド程度の sgRNA 分子に非常に適しています。図 2 に示すように、300Å BEH C₁₈カラムを使用して得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) プロファイル (2 ~ 5.5 分の範囲) は、主な RNA 成分に加えて、さまざまなサンプル成分が分離されました。4.95 分のベースピークのマススペクトルにより、多価イオンのエンベロープが明らかになりました。waters_connect Intact Mass アプリケーションによるデコンボリューションの結果、分子量 32,242 Da は、ベンダーが提供している予想質量値 32,240 Da に非常に近いことがわかりました。このクロマトグラフィーでは、失敗配列または sgRNA のより短いバージョン (保持時間が短い)、インタクト sgRNA からの潜在的な付加イオン/拡張子などの複数の成分も解明されています。したがって、合成された sgRNA サンプルの純度、インテグリティ、分離、およびサンプルに存在する不純物の同定において、この分離は非常に適していると考えられます。

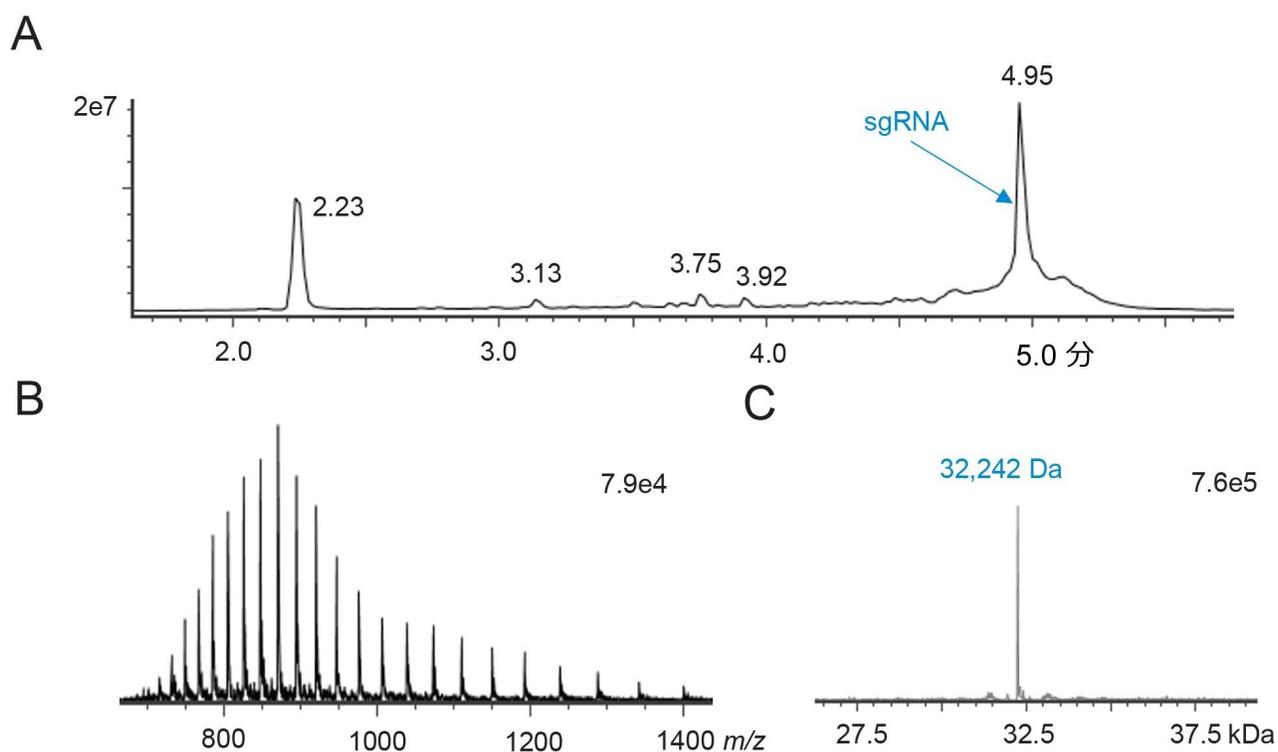


図 2. 10 pmol 量のインタクト sgRNA の IP-RP-LC-MS 分析

(A) ACQUITY PREMIER Oligonucleotide BEH C_{18} 300 Å、1.7 μm 2.1 \times 100 mm カラムおよび BioAccord システムで取り込まれたトータルイオンクロマトグラム

(B) 保持時間 4.95 分のピークの生 ESI ネガティブイオン化モードのマススペクトル

(C) インタクト sgRNA のデコンボリューションされたマススペクトルと実測分子量 32,242 Da (ベンダーの報告によると、分子量は 32,240 Da)

これまでは、合成により sgRNA を製造することが優先されてきました。さらに、分解に対する耐性を向上させるために、5' および 3' 末端に 2'-O-メチル基 (OME) を有するホスホロチオエート (* で表示) ヌクレオチドを含めるのが一般的です。IP-RP-LC-MS で、この種類の修飾を同定およびトラッキングする機能を調査しました。RNase T1 消化物およびオリゴマッピングは、以前に説明されている方法で適用しました⁸。インフォマティクスのアプローチでは、*in silico* mRNA 消化カリキュレーター (Waters Microapp Store <<http://microapp-staging.rdeadmin.waters.com:5000/home/showmarkdown/mrna-cleaver>>) を使用して、RNase T1 消化物に対応するオリゴヌクレオチド消化産物を予測することから始まりました。「修飾なし」、酵素 (RNase T1)、許容される切れ残り (1 または 0) などのいくつかのパラメーターを指定しました。このカリキュレーターの既定値には、*m/z* の範囲、モノアイソトピックまたはカリキュレーター質量の値に基づいて、チャージ状態が提供されています。さまざま

まなレベルのピーク同定が容易にできるように、カリキュレーターによって生成された csv ファイルが UNIFI、waters_connect ソフトウェア、CONFIRM Sequence アプリケーションに追加されました。ホスホロチオエート、5' および 3' 末端オリゴヌクレオチドを含む 2'-O-メチル基が予測され、CONFIRM Sequence アプリケーションを使用して、手動で検索スペースに追加されました。まとめると、個々の分析種の消化産物のライブラリーが組み立てられ、UNIFI サイエンスライブラリーにインポートされました。LC ピーク同定を裏付けるために、低エネルギーイオンのスキャンに加えて、高エネルギーフラグメンテーションイオンのスペクトルを取り込むように MS がプログラムされています。この作業段階では、質量分解能 30 K の QToF 装置を使用しました。図 3 は、RNase T1 で消化した sgRNA の TIC プロファイルを示しています。得られたオリゴヌクレオチド消化産物は、3 回の繰り返し注入で、保持時間のばらつきが最小 (0.01 分以下) のピークが示されました。予想される消化産物は、すべて 3 ~ 47 分の間に溶出しました。UNIFI 内で使用できる HRMS スクリーニング分析メソッドを適用して、マススペクトルをスクリーニングし、定義された許容範囲内で分析種のライブラリーで検索することにより、オリゴヌクレオチド消化産物の同定が行われました。マススペクトルのマッチを手動で検証して、質量精度、チャージ状態、配列情報を提供するフラグメントイオンの存在を確認しました。

ホスホジエステル骨格のみを含むオリゴヌクレオチド消化成分は、左右対称の鋭いピークを示しましたが、ホスホロチオエート結合を含む消化成分は、図 3B および 4 に示すようにピーク割れとして観察されました。これらの 5' および 3' 末端の分子種の抽出イオンクロマトグラムにより、これらはマルチピークパターンに一意に分離されることが確認されました。これはジアステレオマーの分離によるものと考えられます。各オリゴマーの配列を確認するために、CONFIRM Sequence アプリケーションを使用して LC-MS データを解析しました。このアプリケーションでは、MS^E スペクトルにおいて、配列情報を提供するプロダクトイオンの存在をスコアリングするために、最低 500 の強度カウントを考慮しました。図 5 は、sgRNA の 5' 末端および 3' 末端消化成分の同定を示しています。ホスホロチオエート基の位置を特定し、数をカウントするために使用できるフラグメントイオンの信頼度の高い質量マッチが含まれています。これらのマッチのドットマップ表示により、観察されたフラグメントイオンの詳しい説明が得られます。

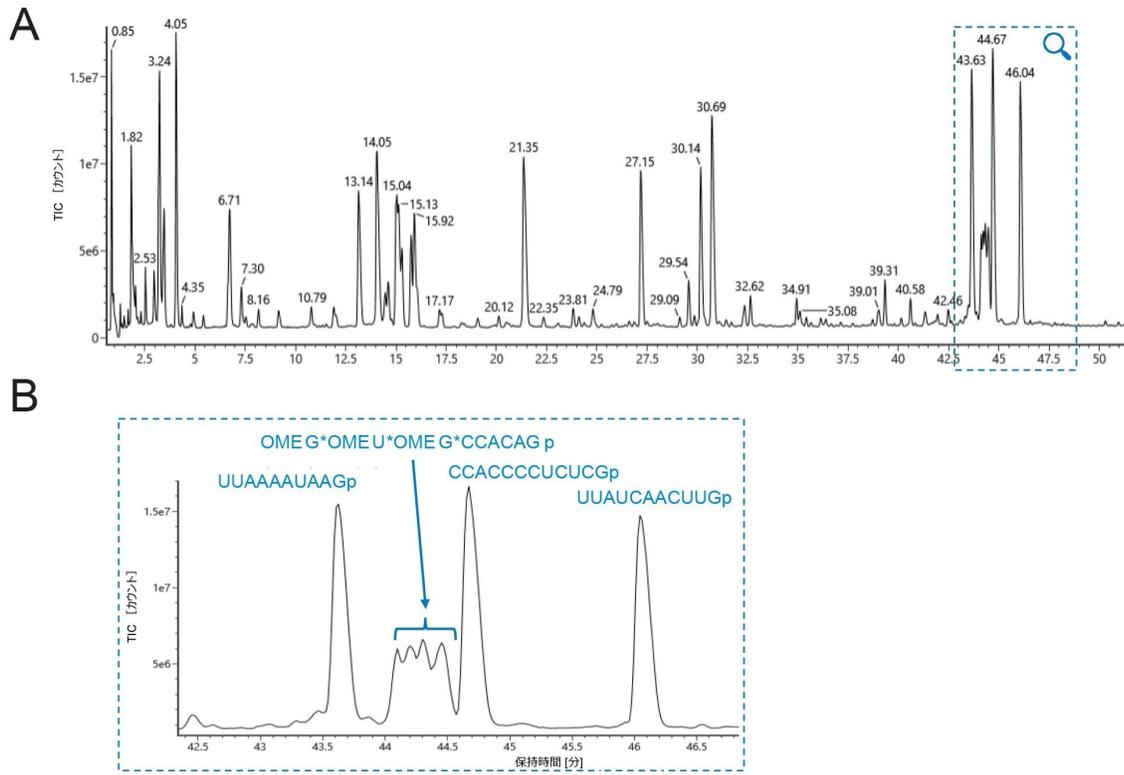


図 3. IP-RP-LC-MS による RNase T1 消化 sgRNA のオリゴマッピング。ACQUITY PREMIER Oligonucleotide BEH C₁₈ 300 Å、1.7 μm 2.1 × 100 mm カラム、および UV と QToF HRMS 検出を使用。

(A) IP-RPLC トータルイオンクロマトグラム (TIC) の全体図

(B) 33 ~ 47 分の溶出ウィンドウおよび 5' ホスホチオエート含有オリゴマー OMEG*OMEU*OMEG*CCACAGp (位置 1 ~ 9) を含むピーク ID の割り当ての拡大図 (わかりやすくするため、リボースの「r」注釈は削除されています)

項目名 : 0925_sgRNA_GATA2AF_RNaseT1_S184
チャンネル名 : 2 : TOF MSe (50-4000) 6V ESI- (TIC)

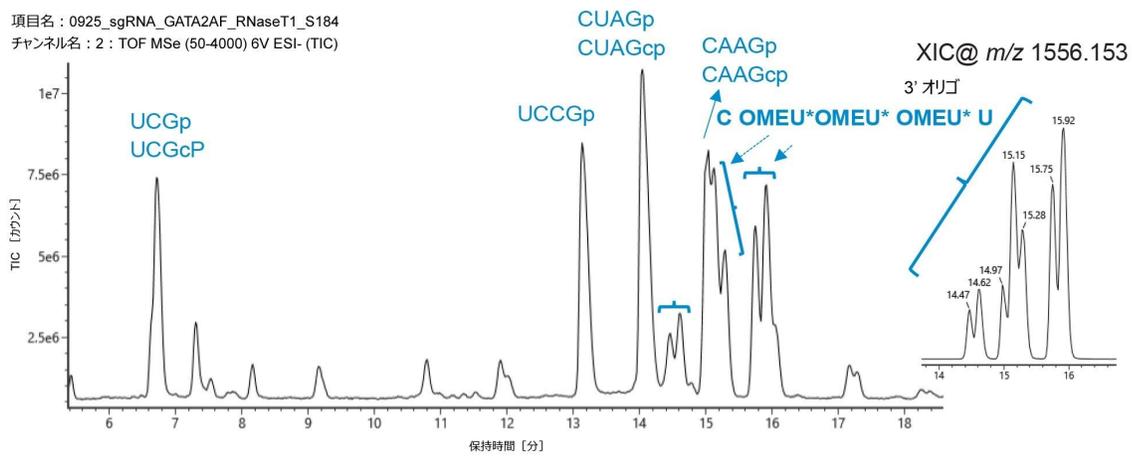


図 4. IP-RP-LC-MS による RNase T1 消化 sgRNA のオリゴマッピング。ACQUITY PREMIER

Oligonucleotide BEH C_{18} 300 Å、1.7 μm 2.1 × 100 mm カラム、および UV と QToF HRMS 検出を使用。6 ~ 18.5 分の溶出ウィンドウおよびピーク ID の割り当ての拡大図。RNA の 3' 末端のホスホロチオエート含有オリゴマー (C OMEU* OMEU* OMEU* U、位置 96-100) のジアステレオ異性体は、波括弧で示されます。挿入図に、 m/z 1556.1537 の抽出イオンクロマトグラム (XIC) が表示されています。

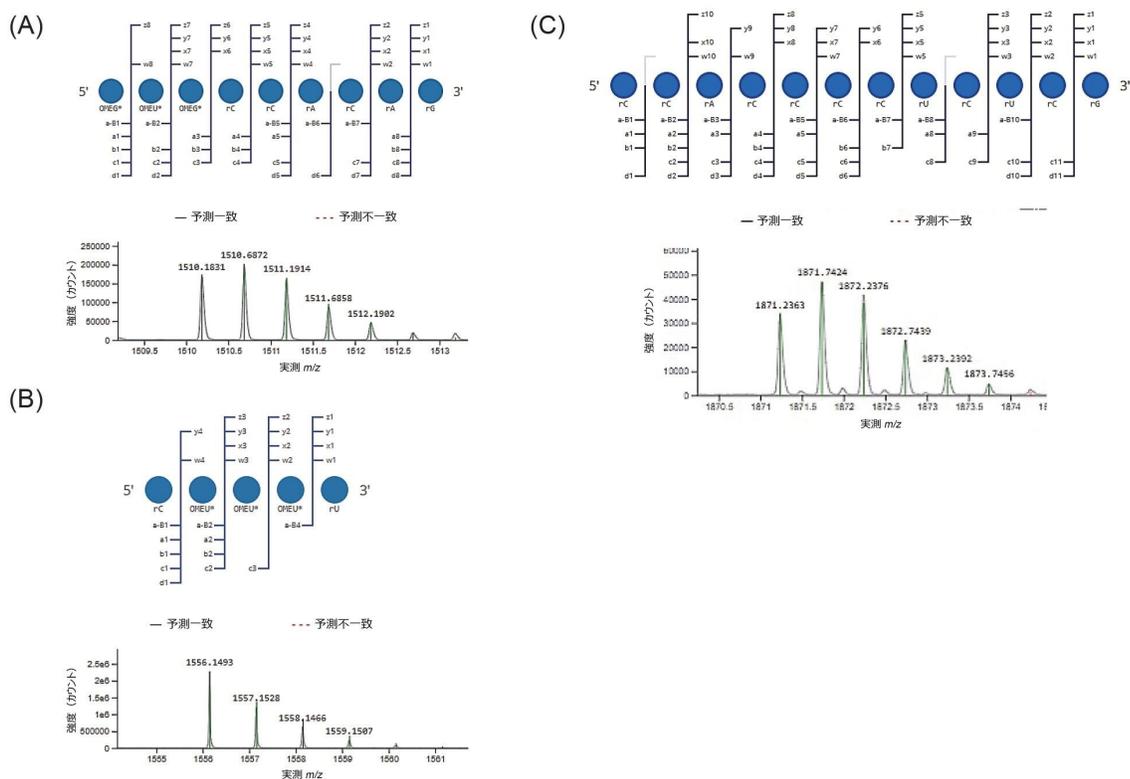


図 5. 5' および 3' 末端オリゴヌクレオチドの MS データの注釈の例。マッチした MS^E フラグメントのドットマップ表示、および同位体がマッチした低エネルギーマススペクトル（緑色で強調表示）が表示されています。5'-オリゴヌクレオチド消化産物（位置 1～9）、*OMEG* OMEU* OMEG* rCrCrArCrArG* (A)、3' 末端オリゴヌクレオチド（位置 96～100）*rC OMEU* OMEU* OMEU* rU* (B)、および CONFIRM Sequence アプリケーションによって同定された位置 10～21 (C) の間に対応する *rCrCrArCrCrCrUrCrUrCrG* が表示されます。

表 1 には、プリカーサーオリゴヌクレオチドの質量精度内（7 ppm 未満）で検出され、配列情報を提供するフラグメントイオンを割り当てることができた消化成分のリストを示しています。マッチを行うには、予想されたフラグメントイオンの 80% 以上（各結合に対して少なくとも 1 つのフラグメントイオン）が必要になりました。消化物では、リン酸基を持つ直線状および環状の複数のオリゴヌクレオチドが検出されました。sgRNA から予想される 15 の異なる理論的消化産物のうち、3 つの成分（rUrGp、rArGp、rCrUrArGp）は配列の由来があいまいになっている可能性があります。残りの消化成分は固有であり、配列の 1 つの場所にのみマッチすることが予想されます。したがって、配列の 82% について、一意の配列同定消化成分として同定できます。一意でないオリゴヌクレオチドも考慮すると、カバーされる範囲は 98% に増加します。ここで、完全な RNase T1 消化から放出されると予測される 2 つの G 残基は、sgRNA の最後の 2% を表します。他のヌクレアーゼおよび/または実験的アプローチにより T1 の切れ残りを探索する

ことにより、100%のシーケンスカバー率を達成できる可能性があります。

消化成分	配列	位置	実測質量	質量誤差 (ppm)	保持時間 (分)
rU(80):rG(81) rU(94):rG(95)	rU rG	80~81, 94~95	669.082	4.4	3.46
rA(28):rG(29) rA(88):rG(89)	rA rG	28~29, 88~89	692.109	3.4	4.05
rU(90):rG(92)	rU rC rG	90~92	974.124	0.4	6.72
rU(59):rG(62)	rU rC rC rG	59~62	1279.17	3.6	13.15
rC(30):rG(33) rC(55):rG(58)	rC rU rA rG	30~33, 55~58	1303.19	-1.3	14.05
rC(96):rU(100)	rC OMEU* OMEU* OMEU* rU	96~100	1557.17	1.7	14.47-15.92
rC(40):rG(43)	rC rA rA rG	40~43	1326.2	-0.4	15.03
rC(83):rG(87)	rC rA rC rC rG	83~87	1607.24	4.5	21.36
rU(22):rG(27)	rU rU rU rU rA rG	22~27	1916.22	2.4	27.16
rA(34):rG(39)	rA rA rA rU rA rG	34~39	1985.3	2.3	30.14
rA(74):rG(79)	rA rA rArA rA rG	74~79	2008.33	6.4	30.7
rU(44):rG(53)	rU rU rA rA rA rA rU rA rA rG	44~53	3255.45	1.7	43.63
OMEG*(1):rG(9)	OMEG* OMEU* OMEG* rC rC rA rC rA rG	1~9	3022.28	-0.2	44.12-44.43
rU(63):rG(73)	rU rU rA rU rC rA rA rC rU rU rG	63~73	3490.44	4.5	44.67
rC(10):rG(21)	rC rC rA rC rC rC rC U rC rU rC rG	10~21	3744.49	0.8	46.05
不完全なチオール化					
rC(96):rU(100)	rC OMEU* OMEU OMEU* rU	96~100	1541.19	4	13.68-15.04
OMEG*(1):rG(9)	OMEG* OMEU OMEG* rC rC rA rC rA rG	1~9	3006.41	0.9	43.47-44.13

表 1. UNIFI サイエンスライブラリー検索と *waters_connect CONFIRM Sequence* アプリケーションを使用して同定されたオリゴヌクレオチド消化成分。2 列目にリストされているオリゴヌクレオチドは、予測される *sgRNA* の *RNase T1* 消化産物と *LC-MS* スペクトルをマッチングさせることによって同定しました。*sgRNA* 配列の 5' および 3' 末端の両方での *RNA* バックボーンの不完全なホスホロチオレーションの *IP-RP-LC-MS* ベースの検出。* はホスホロチオエートリンカーを示し、# は環状リン酸末端種も同定されたことを示します。特定の位置で観察された不完全なチオール化は、斜体のヌクレオチドで示されています。

sgRNA 配列の 5' 末端および 3' 末端の両方での RNA バックボーンの不完全なホスホロチオレーションの IP-RP-LC-MS ベースの検出

また、*IP-RP-LC-MS* のデータにより、図 6 に示すように、*sgRNA* 配列の 5' および 3' 領域の両方で、チオール化が不完全なオリゴヌクレオチドの存在も明らかになりました。2 回ホスホロチオエート化された (2'-O-メチル化が予想される) 消化成分では、相当量のシグナル (強度が $2E4$ を超える) が検出されました。プリカーサー質量の抽出イオンクロマトグラムでは、3 回ホスホロチオエート化された質量と同様のマルチピークパターンが生成されました。さらに、 MS^E フラグメンテーションデータからのこれらの消化成分の配列情報としてのフラグメントイオンのカバレッジは 93% 以

上であり、信頼性の高い割り当てであることが示されています。このバージョンのオリゴヌクレオチドは、保持時間が重複していないため、エレクトロスプレー誘起による酸化ではありませんでした（表1）。プロファイルが重複していないことから、合成に関連した不完全なチオール化、または保存に関連する硫黄から酸素への交換のいずれかが示されます。

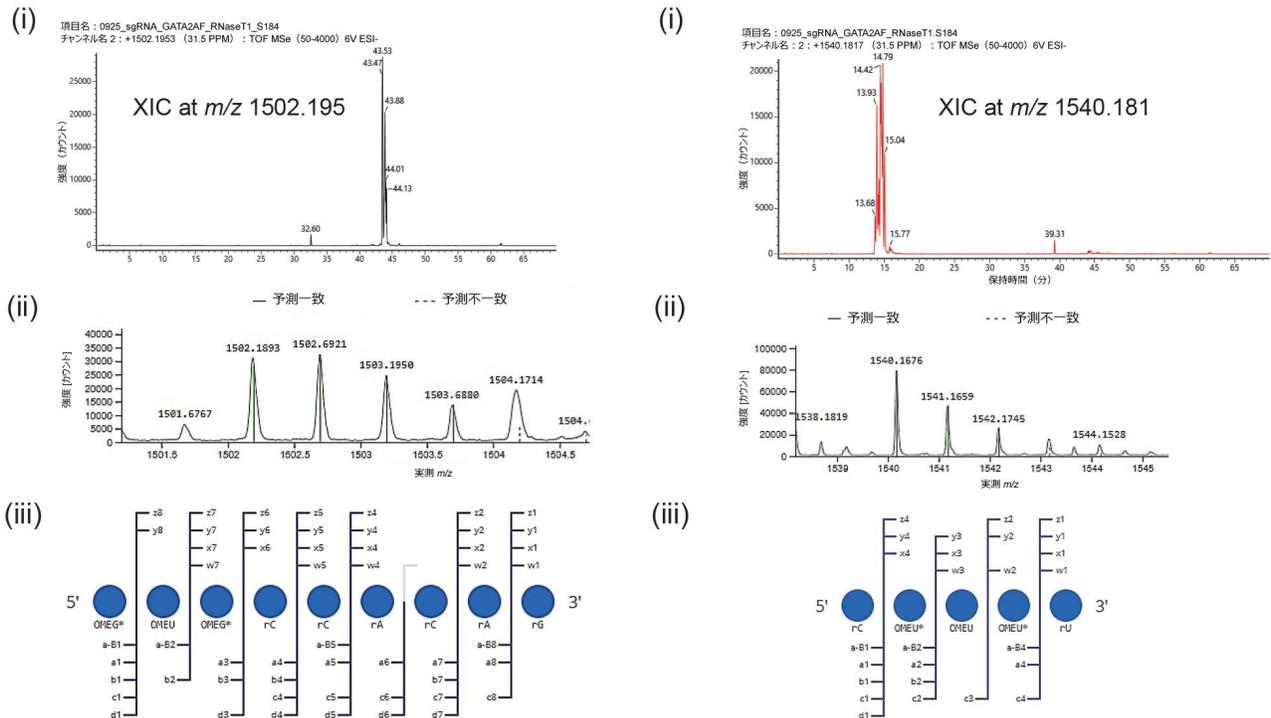


図 6. *sgRNA* 配列の 5' および 3' 末端の両方での *RNA* バックボーンの不完全なホスホロチオレーションの *IP-RP-LC-MS* ベースの検出。(A) チオール化が不完全な 5' 末端オリゴマー、*OMEG* OMEU OMEG* rCrCrArCrArGp* (位置 1 ~ 9) の検出。(i) m/z 1502.1953 の抽出イオンクロマトグラム (XIC)。(ii) CONFIRM Sequence によるオリゴヌクレオチドの予測プリカーサーにおける同位体プロファイルのマッチング。(iii) オリゴヌクレオチドについてスコア付けされたフラグメントイオンのドットマップ表示。ウリジンでの不完全なチオール化が示されています。(B) チオール化が不完全な 3' 末端オリゴヌクレオチド消化産物 *rC OMEU* OMEU OMEU* rU* (位置 96 ~ 100) の検出。(i) m/z 1540.1817 の XIC。(ii) CONFIRM Sequence によるオリゴヌクレオチドの予測プリカーサーにおける同位体プロファイルのマッチング。(iii) オリゴヌクレオチドについてスコア付けされ、マッチした MS^E フラグメントイオンのドットマップ表示。ウリジンでの不完全なチオール化が示されています。

結論

このアプリケーションノートでは、包括的な sgRNA 特性解析の例を紹介します。この特性解析は、医療、診断、農業工学向けの CRISPR/Cas ベースのゲノム編集試薬に適用できます⁹。ここでは、インタクト分析および消化レベルの両方で sgRNA を分析するための頑健な分析ワークフローを示しました。IP-RP-LC-MS で使用する ACQUITY Premier BEH₁₈ WidePore 300 Å カラムは、両方の種類の分析において信頼性の高い出発点となります。

- インテグリティーについて、合成 sgRNA の正しい分析ができました。
- waters_connect Intact Mass アプリケーションを使用してデコンボリューションを行い、sgRNA のインタクト分子量が解析されました。
- sgRNA の RNase T1 オリゴマップが、サンプルのクリーンアップなしで迅速に取得されました。
- 高いクロマトグラフィー分離能が達成されたため、MS^E フラグメンテーションを介して消化成分を簡単に分離し、効率的に配列が決定できました。
- 生成された T1 オリゴマップクロマトグラムは、*in silico* mRNA 消化カリキュレーターと waters_connect™/UNIFI サイエンスライブラリーにより、精密質量マッチングで簡単に注釈を付けることができます。
- 消化成分に割り当てられた配列は、MS^E スペクトルと、waters_connect™ プラットホームの CONFIRM Sequence アプリケーション機能に基づいて、さらにバリデーションされました。これにより、フラグメントイオンのカバレッジが視覚的に表示され、解釈しやすくなります。
- sgRNA のホスホロチオエート化された末端は、診断用ジアステレオマー分離にしたがってデータ中で迅速に検出することができました。さらに、これらの分子種の不完全なチオール化を区別して、検出することができました。

参考文献

1. Barrangou, R., *et al.*, CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007.315(5819): p. 1709-12.
2. Deltcheva, E., *et al.*, CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011.471(7340): p. 602-7.
3. Jinek, M., *et al.*, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012.337(6096): p. 816-21.

4. Shao, M., T.R. Xu, and C.S. Chen, The Big Bang of Genome editing technology: development and application of the CRISPR/Cas9 system in disease animal models. *Dongwuxue Yanjiu*, 2016.37(4): p. 191-204.
5. Mohr, S.E., *et al.*, CRISPR guide RNA design for research applications. *Febs j*, 2016.283(17): p. 3232-8.
6. Pennisi, E., The CRISPR craze. *Science*, 2013.341(6148): p. 833-6.
7. Charpentier, E., A. Elsholz, and A. Marchfelder, CRISPR-Cas: more than ten years and still full of mysteries. *RNA Biology*, 2019.16(4): p. 377-379.
8. Maissa M. Gaye, J.F., Johannes P.C. Vissers, Ian Reah, Chris Knowles, and Matthew A. Lauber, Synthetic mRNA Oligo-Mapping Using Ion-Pairing Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Waters Application Note*, [720007669](#), 2022.
9. Asmamaw, M. and B. Zawdie, Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics*, 2021.15: p. 353-361.

ソリューション提供製品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

[ACQUITY UPLC チューナブル UV 検出器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

[イオンモビリティ質量分析 <https://www.waters.com/waters/Ion-Mobility-Mass-Spectrometry/nav.htm?cid=134656158>](https://www.waters.com/waters/Ion-Mobility-Mass-Spectrometry/nav.htm?cid=134656158)

[バイオ医薬品のための BioAccord LC-MS システム <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818)

[UNIFI 科学情報システム <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134801648>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134801648)

720007897JA、2023 年 3 月

© 2023 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](#)