

酸加水分解法を用いたRNAのシーケンス解析

RNA Sequencing Analysis Using Acid-hydrolysis Method

核酸医薬開発において、アンチセンス効果やRNA干渉効果を有する多様な配列のオリゴヌクレオチドが合成されています。合成オリゴヌクレオチドの品質管理は不可欠ですが、20~30塩基程度の比較的短いオリゴヌクレオチドの塩基配列決定法については標準的な手法が確立されておらず、簡便かつ信頼性の高い分析法が求められています。

今回、酸加水分解法を用いたRNAのシーケンス解析について検討を行いました。

21塩基の合成siRNAおよび2'-O-メチル化修飾を含むsiRNAについて酸加水分解の検討を行いました。試料溶液に低分子マトリクス (3-hydroxypicolinic acid:3HPA) と酸 (trifluoroacetic acid:TFA) の混合溶液を加え、MALDI-TOF-MSにより質量スペクトルを取得しました。結果、3'末端2塩基を除いた19 mer全ての配列を同定する事ができ (Fig. 1), さらには2'-O-メチル化修飾されたRNAにも有効である事を確認しました (Fig. 2)。

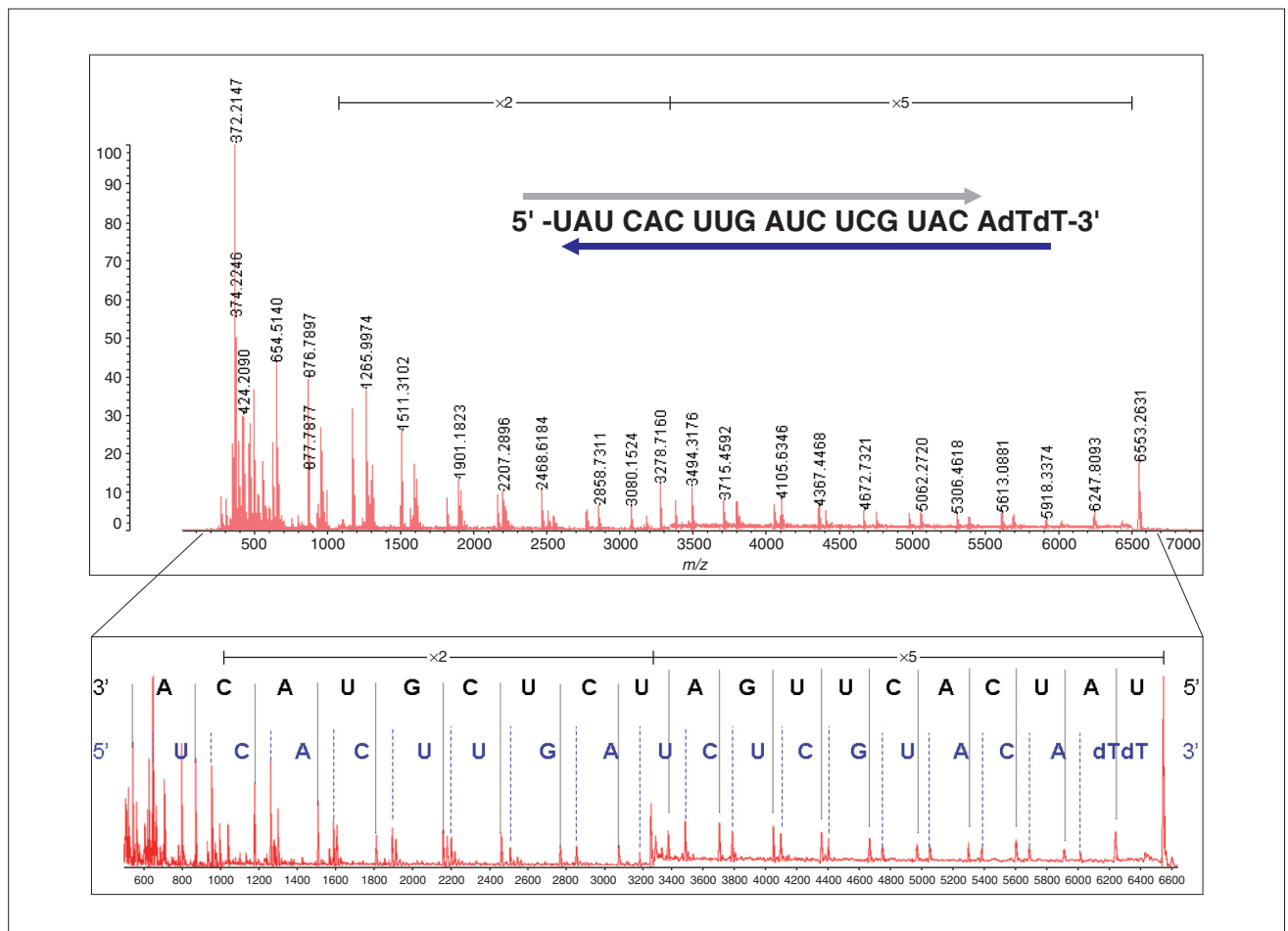


Fig.1 酸加水分解後のsiRNA (21mer) のマススペクトル
Mass Spectra of siRNA (21mer) after Acid Hydrolysis

■測定条件

Measurement Condition

装置：AXIMA Assurance

測定条件：Positive/linear mode

試料：siRNA 21 mer 5'-UAU CAC UUG AUC UCG UAC AdTdT-3' (SIGMA)

マトリクス：50 mg/mL 3HPA in 2.5 % TFA aq. + 10 mg/mL diammoniumhydrogencitrate

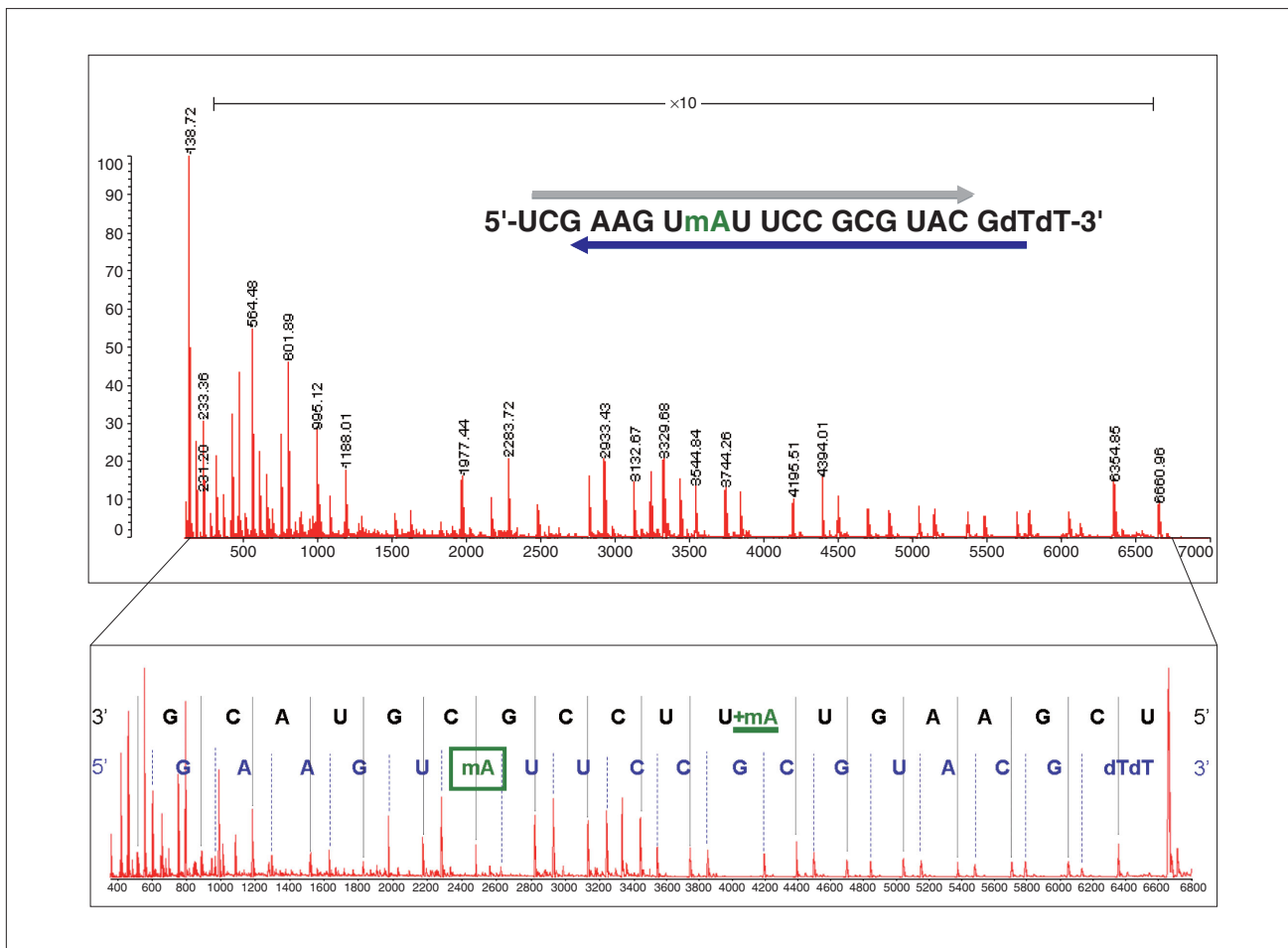


Fig. 2 酸加水分解後のsiRNA (mA: 2'-O-メチル化修飾されたadenosineを含む)のマススペクトル
Mass Spectra of siRNA (mA: Containing 2'-O-methyl adenosine) after Acid Hydrolysis

Fig. 1, Fig. 2共に酸加水分解によってラダー状のピークが検出され、ピーク間の質量差を読み取る事でRNAの塩基配列を読解する事ができます。ラダーは3'末端, 5'末端の両方から順に1塩基ずつ検出されるので、塩基配列情報がより高精度で得られます。

また、条件検討としてTFAの最適濃度を確認しました(Fig. 3)。結果、終濃度2.5%で最も良いスペクトル情報が得られる事が分かりました。

MALDI-TOF-MSと酸加水分解法の組み合わせは、20塩基程度のRNAの塩基配列決定を迅速・簡単に行う事ができる強力な手法であるといえます。

今回の測定はAXIMA Assuranceで行いましたが、AXIMA Confidence, AXIMA Performanceでも同様の測定が可能です。

T. Minohata

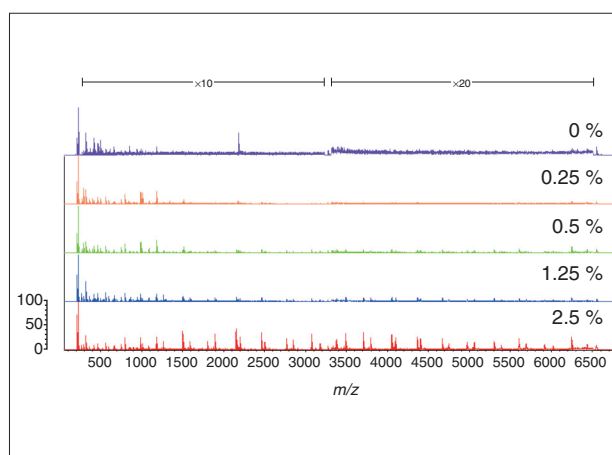


Fig. 3 TFA濃度の検証
Acid Hydrolysis Levels of TFA Concentration

[参考文献]

Anal. Chem., 2009, 81, 3173-3179.

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

初版発行：2010年7月

● 0120-131691 (携帯電話不可)
● 携帯電話専用番号 (075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。