

NanoGel dT20 mRNA 親和性クロマトグラフィー媒体

製品紹介

NanoGel® dT20 親和性充填剤は、特にmRNAの分離精製を目的として設計された単分散の超大孔性ポリマー樹脂です。この充填剤は、PS-DVB（ポリスチレン-ジビニルベンゼン）硬質基材を使用しており、平均粒径は約50µmです。基材表面にはlinker結合によりdT20が配置され、mRNA3'末端にあるポリアデニル酸（polyA）と高い親和性を持ち、mRNAの捕捉を大きく簡略化します。この充填剤は、結合容量が高く、高塩、高pH、高温に耐性を持ち、使用が簡単で可燃性や有毒な試薬を一切使用する必要がありません。通常mRNA分離精製条件下で効率的に捕捉と解離が可能であり、高流速での使用も可能です。そのため、工程開発の時間を短縮し、効率を向上させることができます。また、mRNAとプロセス中で発生した他の成分（例えば逆転写DNAなど）との分離にも有効です。



図1. NanoGel™ dT20 構造図

表1. NanoGel™ dT20 技術仕様

項目	内容
製品名	NanoGel™ dT20
基質	ポリスチレン-ジビニルベンゼン (PS/DVB)
粒径	50 µm
配基	dT-20 メル
動的結合容量	~2 mg/mL (mRNA)
最大耐圧	3 MPa
CIP 定置洗浄	0.1 M NaOH
推奨流速	50-300 cm/h
pH安定性	2~12
化学安定性	一般的な緩衝液、1M 塩酸、2M 酢酸、100% エタノール、イソプロパノールなどの一般的な有機溶剤に対応。強酸化剤、ベンゼン、テトラヒドロフランとの接触を避けてください。
使用温度	2-65° C
保存	20% エタノール、2-8° C

製品の応用

NanoGel™ dT20 親和性クロマトグラフィー充填剤の開発は、ワクチンや遺伝子治療の応用において使用されるさまざまなmRNA構築体の産業チェーンの下流の大規模な精製のニーズに応えるために行われました。この充填剤は、高い選択性と親和性、優れた結合容量を持っています。塩溶液によるサンプルの吸着と水による洗脱という単純な精製ステップで、ポリアデニル化（poly A）尾部が選択的にmRNAを捕捉します。図1に示されているのは、NanoGel™ dT20を使用して1,000塩基対のmRNAを捕獲し、純化した際の親和性クロマトグラフィーの図です。poly A尾部を持つmRNAサンプルは、0.5M NaClの条件でNanoGel™ dT20と塩基対を結合します。緩衝液に塩が含まれていない場合、dT20配基の主鎖上のリン酸基の負電荷とpoly A主鎖上のリン酸基の負電荷が反発し、これによりmRNAが容易に洗脱されます。

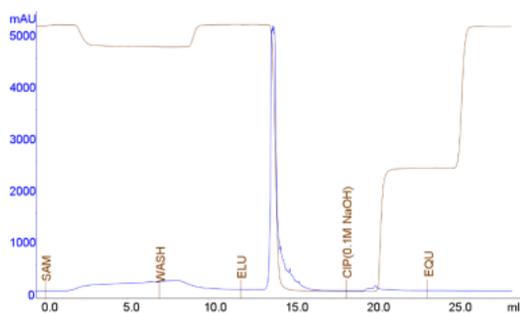


図 2. NanoGel™ dT20 を使用してmRNA（1000 nt）を捕捉・精製した際のクロマトグラフィー図。常温下で水による洗脱を行い、回収率は70%以上。

動的結合容量試験データ

室温条件下で、0.1M NaOHを使用して定置洗浄（CIP）を行い、各サイクルでCIPアルカリ接触時間は30分で、NanoGel™ dT20（L11W281A）の結合容量を測定します。100サイクル目の洗浄後にNanoGel™ dT20の動的結合容量が15.6%低下しました。

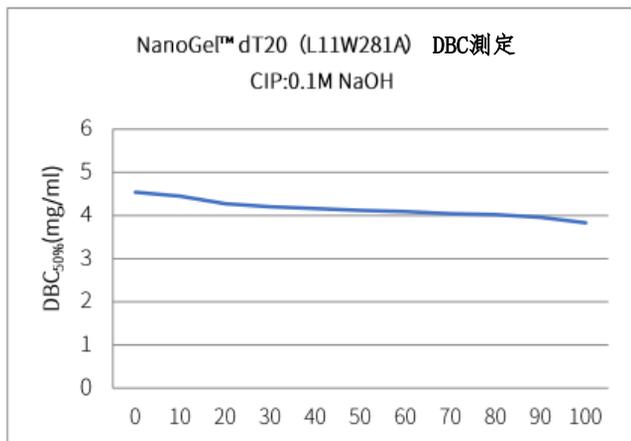


図3. NanoGel™ dT20 (L11W281A) の耐アルカリ性DBC (動的結合容量) データ。
CIP: 0.1M NaOH

操作案内

スラリー濃度測定

NanoGel™ dT20親和性クロマトグラフィメディアは、20%エタノール溶液中に保存されており、約65% (v/v) のスラリー濃度 (Cs) で瓶詰めされています。スラリー濃度は、クロマトグラフィメディアの固定沈降体積がメディア総体積に対する割合を示します。Csを正確に測定する必要がある場合は、メディア容器内のメディアを均一に混合し、その後、10mLのスラリーを量筒に移して一晩静置し、沈殿体積Vrを読み取ってスラリー濃度を計算します。

$$Cs (\%) = 100 \times (Vr / 10) = 10Vr \quad \text{---式1}$$

最適なカラム充填効果を得るためには、0.5 M NaCl溶液で50~70%のスラリーを調製することをお勧めします。

媒体の前処理

1, カラム体積 (Vc) の計算:

$$Vc = h \times \pi r^2 \quad \text{---式2}$$

h: カラムの高さ; r: カラムの半径

2, 必要なスラリー量 (Vs) の計算:

通常、クロマトグラフィ媒体は圧縮されると体積が減少します。最適な充填密度を得るため、スラリー量を多めに用意することを推奨します。圧縮比 (CF) は通常 1.05-1.1 です。

$$Vs = 100 \times (Vc \times CF) / Cs \quad \text{---式3}$$

3, 充填用スラリーの用意:

原容器のスラリーを均一にし、必要な体積Vsを計量し、適切な容器に移し、自然に沈降させます。上澄みを慎重に取り除き、カラムの体積の5倍の溶媒 (例: 0.5 M NaCl) を加えてスラリーを洗浄し、その後、スラリー濃度を目的の濃度 (50-70% v/v) に調整します。

クロマトグラフィカラムの充填方法:

(NmXK 16/20 クロマトグラフィカラムの例)

1. カラム充填溶液を使用して、カラム末端部の接続部を素早く流し、気泡を取り除きます。その後、カラムの出口を閉じ、底部に1~2 cmの充填溶液を残します。
2. 充填溶液を使用して、カラムヘッドの配管内の気泡を除去します。
3. 充填用スラリーを吊るして、ガラス棒等を使用してカラム内壁に沿って連続的に注入し、充填液でカラムの壁を洗浄しながらカラムを充填させます。次にカラムヘッドを取り付けます。操作中に気泡が入らないように注意してください。
4. カラムの底部の出口を開き、クロマトグラフィシステムポンプを起動させ、推奨される圧力範囲内で一定の流速または一定の圧力でカラムを加圧します。カラムベッドが安定した後、媒体と液の境界面にマークを付けます。
5. ポンプとカラム出口を閉じ、カラムヘッドの入口のパイプを緩め、マークした線の2-3 mm下までピストンを押し下げます。その後、カラムヘッド入口のパイプを締めます。

カラム効果の評価

充填したクロマトグラフィカラムをまず2 CVの0.5 M NaCl溶液で平衡化し、その後、2.0 M NaCl溶液を使用し、100 cm/hの流速でカラム効率を評価します。また、脱イオン水でカラムを平衡し、アセトン溶液を用いてテストを行うことも可能です。具体的な試験データについては表2を参照してください。

表2. NanoGel™ dT20クロマトグラフィカラムの効率試験条件

サンプル	5% (v/v) のアセトン水溶液または2M NaCl
サンプル量	1~5%カラム体積
流動相	脱イオン水または0.5 M NaCl
線速度	50~200 cm/h
検出	5%アセトン上サンプル: UV 280 nm 2M NaCl上サンプル: 電気伝導率計測
合格基準	As: 0.8~1.5; Plates (N/m): >2500

サンプルロード条件の推奨

pH: TA 配基の結合および洗脱は中性 pH 条件下で行います。緩衝液: 通常はリン酸塩および Tris-HCl 緩衝液系を使用します。適切な緩衝系の選択にあたっては、分子の活性、結合の最適化、および操作に必要な範囲で緩衝液の pH 値を調整する能力を考慮します。導電率: 通常、少なくとも 250~500 mM NaCl を使用します。高い導電率は、塩基対結合の効率を高めるのに役立ちます。流速: 目標とする運転流速は柔軟ですが、最も良好な親和結合を得るために、推奨される最小滞留時間は5分です。(カラム高さ20cmの場合、線速度は ≤ 400 cm/h と推奨します)。温度: 通常は室温で操作を行いますが、必要がある場合はRNAを65~70°Cまで加熱して二次構造を破壊します。平衡: 5 CV以上の適切な緩衝液で平衡をとることを推奨します。結合容量の最適化: 最大結合容量は複数の要素によって決定されます。RNAの長さ、サンプルの純度、不純物の組成、緩衝液の組成、および導電率などが含まれます。

洗脱条件推奨

pH: 洗脱ステップの開始時のpHは、通常、結合緩衝液および平衡緩衝液と同じにします。必要に応じて、洗脱液のpHを最適化できます。注意: 濃度を決めるmRNAの洗脱液は、そのOD値がpHにより変化します。

洗脱電導率: 洗脱液が塩(低電導率)を含まない状態では、静電反発がpoly Aとpoly T間のアニオン骨格の間に生じ、A-T塩基対が分離し、poly A-mRNAの洗脱が実現します。特定の状況下では、単独で水を使用して洗脱を行うことができ、通常は濃度勾配洗脱は必要ありません。しかし、中間洗浄ステップを追加することで低電導率が低下し、不純物の除去効率を向上させることができます。

再生清洗(CIP)

通常、純水または20%エタノールを使用して、定置洗浄を3~5 CV実施します。必要に応じて、0.1M NaOHを使用して定置洗浄を3~5 CV行い、その後、純水または20%エタノールでアルカリを除去し、カラムの平衡を取るまで行います。

長期保存

長期保存メディアは20%エタノールで密閉保存し、保存温度は2~8°Cを推奨します。エタノールの揮発や微生物の成長を防ぐために、3ヶ月ごとに20%エタノールを交換することをお勧めします。

注意: 使用過程中、サンプルおよび移動相は必ず0.45 μm のフィルターで濾過してください。

故障排除

もし、UniMab® 50HC親和性クロマトグラフィ製品の使用中に問題が発生した場合は、以下の表を参照して解決するか、または私たちにお問い合わせください。

現象	原因分析	対策提案
カラム 圧力上昇	流速が高すぎる	流速を下げる
	機器のオンラインフィルターが詰まっている	汚染物質を除去して洗浄する、またはフィルターを交換する。サンプルと緩衝液を使用前にフィルター処理する
	カラムベッドが圧縮されている	カラムを再充填する
	カラムの使用期間が長すぎる	新しいカラムに交換するか、カラム媒体を交換する
	ポンプと収集器の間のバルブが開いていない	出口を開く

NanoGel dT20親和性クロマトグラフィー媒体製品仕様書

製品型式	包装	品番
NanoGel dT20	10 mL	17030-050150-2010
NanoGel dT20	30 mL	17030-050150-2030
NanoGel dT20	50 mL	17030-050150-2050
NanoGel dT20	100 mL	17030-050150-2100
NanoGel dT20	300 mL	17030-050150-2300
NanoGel dT20	500 mL	17030-050150-2500
NanoGel dT20	1 L	17030-050150-1001

プレバックドカラム仕様書

カラム型式	仕様	品番
NmTRAP 1mL	7.7 × 22 mm	77221-17030-050150
NmTRAP 5mL	16 × 25 mm	16255-17030-050150
NmSCREEN 4.7mL	7.7 × 100 mm	77105-17030-050150
NmVALID 8/100	8 × 100 mm	08101-17030-050150
NmVALID 8/200	8 × 200 mm	08201-17030-050150
NmLOAD 16/100	16 × 100 mm	16101-17030-050150
NmLOAD 16/200	16 × 200 mm	16201-17030-050150
NmLOAD 26/100	26 × 100 mm	26101-17030-050150
NmLOAD 26/200	26 × 200 mm	26201-17030-050150
NmLOAD 50/100	50 × 100 mm	50101-17030-050150
NmLOAD 50/200	50 × 200 mm	50201-17030-050150

注：カスタム要求については、当社にお問い合わせください。

日本販売 三島国際貿易株式会社

〒411-0044 静岡県三島市徳倉三丁目18-5

TEL (055) 988-3590 E-mail: jaina@jaina-msm.com