

---

# NanoGel dT20

mRNA 亲和层析介质

## 产品使用说明书

文件编号：NM-W-DF-0310

版本号：A2



# NanoGel dT20

## mRNA 亲和层析介质

NanoGel™ dT20 亲和层析填料是一种单分散超大孔聚合物树脂，专门为分离信使 RNA (mRNA) 而设计。该填料为 PS-DVB 硬胶基质，平均粒径为 50μm，基质表面通过 linker 键合 dT20 配基，能与体外转录产物 mRNA 3' 端的聚腺苷酸序列 (polyA) 亲和结合，大大简化了 mRNA 的捕获过程。该填料载量高，耐受高盐、高 pH 和高温，使用简单，不需使用任何易燃、有毒的试剂。

在常规 mRNA 纯化条件下提供有效的捕获和释放，而且可以在高流速下使用。因此，它减少了工艺开发时间并提高了生产率。使用这种亲和层析填料可以有效地将 mRNA 与转录反应过程的其它成分（如酶和质粒 DNA 等等）分离。

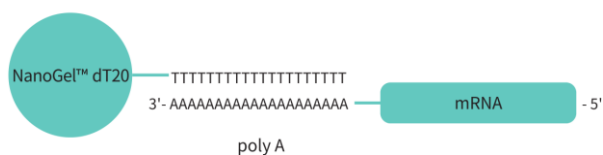


图 1. NanoGel™ dT20 亲和层析介质结构图。

NanoGel™ dT20 的技术参数如表 1 所示。

表 1. NanoGel™ dT20 技术参数。

产品型号	NanoGel™ dT20
基质	聚苯乙烯-二乙烯基苯 (PS/DVB)
粒径	50 μm
配基	dT-20 mer
动态结合载量	~ 2 mg · mL <sup>-1</sup> (mRNA)
最大耐压	3 MPa
CIP 在位清洗	0.1 M NaOH
推荐流速	50-300 cm/h

pH 稳定性	2-13
化学稳定性	所有常用缓冲液，1M 盐酸、2 M 醋酸、100%乙醇、异丙醇等常用有机溶剂；避免接触强氧化剂、苯甲醇、四氢呋喃。
使用温度	2-65 °C
存储	20% 乙醇，2-8 °C

### 产品应用

NanoGel™ dT20 亲和层析填料的开发是为了满足疫苗和基因治疗应用中使用的各种 mRNA 构建体大规模下游纯化的需求，具有良好的选择性和亲和结合载量。该亲和层析使用简单的盐溶液上样吸附和水洗脱纯化步骤，通过聚腺苷酸化 (polyA) 尾部选择性地捕获 mRNA。图一中显示的是使用 NanoGel™ dT20 捕获纯化一个 mRNA (1000 nt) 的亲和层析图谱。尾部带有 poly A 的 mRNA 样品在 0.5M NaCl 条件下与 NanoGel™ dT20 碱基配对结合。当缓冲液没有盐时，dT20 配基主链上的磷酸根负电荷和 poly A 主链上的磷酸根负电荷产生排斥，从而使 mRNA 顺利洗脱下来。

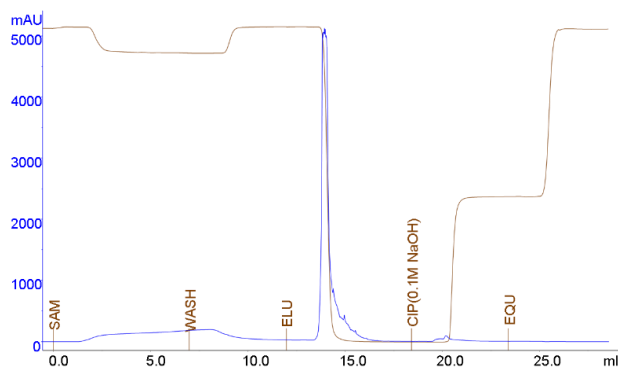


图 2. NanoGel™ dT20 捕获纯化 mRNA (1000 nt) 的色谱图。mRNA 在常温下水洗脱 (回收率 > 70%)。

### 动态载量测试数据

室温条件下,用0.1M NaOH在位清洗,每个循环中CIP碱接触时间30min,测试 NanoGel™ dT20 (L11W281A) 的载量;经 100 循环清洗后 NanoGel™ dT20 动态载量下降 15.6%。

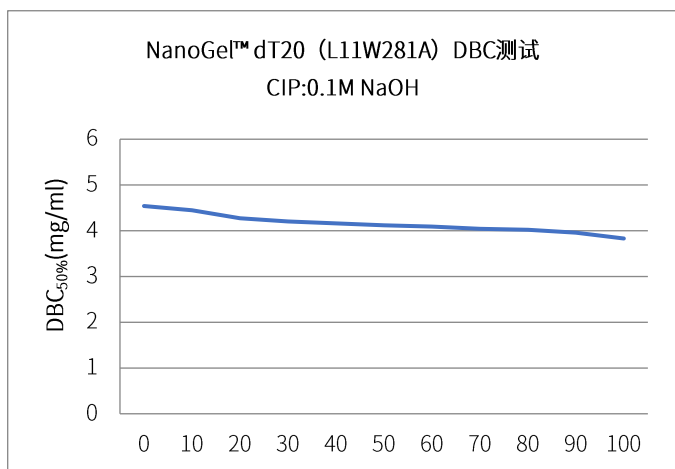


图 3. NanoGel™ dT20 的耐碱 DBC 数据。

## 操作指南

### 匀浆浓度测定

NanoGel™ dT20 亲和层析介质保存在 20%乙醇溶液装瓶出售,匀浆浓度 (Cs) 大约 65% (v/v)。匀浆液浓度是指层析介质恒定沉降体积与匀浆液的总体积的比值。如需准确测定 Cs, 可以将原容器内介质摇匀, 然后转移 10mL 匀浆到量筒里静置过夜, 读出沉降体积 Vr, 计算匀浆浓度:

$$\text{Eq. 1 } C_s (\%) = 100 \times (V_r/10) = 10 V_r$$

为了获取最佳的装柱效果, 推荐使用 0.5 M NaCl 溶液配制 50~70% 的介质匀浆液。

### 介质前处理

计算所装色谱柱的柱体积 (Vc) :

$$\text{Eq. 2 } V_c = h \times \pi r^2$$

h: 色谱层析柱高度; r: 色谱层析柱半径

计算所需匀浆体积 (Vs): 一般情况下, 层析介质在压力作用下都会被压紧导致体积收缩, 为了获得紧密的柱床, 推荐填料的体积过量一些, 压缩比 (Compression factor, CF) 一般为 1.05-1.1。

$$\text{Eq. 3 } V_s = 100 \times (V_c \times CF) / C_s$$

制备装柱介质匀浆: 将原容器中层析介质摇匀, 量取所需原液体积 Vs 至适当容器中, 静置让介质颗粒自然沉降后, 倾斜倒去上清液; 用 5 倍柱体积以上的装柱溶液, 如 0.5 M NaCl, 清洗介质以去除原保存液, 再用装柱溶液调整匀浆浓度到 50-70% (v/v)。

## 层析柱装填方法: (以 NmXK 16/20 层析空柱为例)

使用装柱溶液快速冲洗柱子末端的接头以除去气泡, 然后关闭柱子出口, 并在柱子底部保留 1-2 cm 装柱液。

用装柱溶液排除上柱头管路中的气泡。

重悬介质, 用玻璃棒紧靠柱内壁引流, 将胶悬液连续倒入层析柱中, 用装柱溶液清洗柱壁并填满柱管, 然后安装上柱头。注意操作过程中避免混入气泡。

打开柱子底部的出口, 开动层析系统泵, 在建议压力范围内用恒流或恒压方法进行压柱。待柱床稳定后, 在胶液界面作标记。

关闭泵和柱子出口, 旋松上柱头入口管线, 用上柱头推压柱床至标记线下 2-3 mm, 然后旋紧上柱头入口管线。

## 柱效评价

装好的层析柱先使用 2 CV 0.5 M NaCl 溶液平衡, 再用 2.0 M NaCl 以 100 cm/h 流速进行柱效测试; 亦可使用去离子水平衡层析柱并用丙酮溶液做测试。具体测试参数详见表 3:

表 2. NanoGel™ dT20 层析色谱柱的柱效测试条件。

样品	5% (v/v) 丙酮的水溶液或 2 M NaCl
上样量	1 ~ 5% 柱体积
流动相	去离子水或 0.5 M NaCl
线性流速	50 ~ 200 cm/h
检测	5% 丙酮上样: UV @ 280 nm 2 M NaCl 上样: 电导检测仪
合格标准	As: 0.8-1.5; Plates (N/m) : >2500

## 使用方法

### 上样条件推荐

pH: T-A 配对结合和洗脱都是在中性 pH 条件下进行;

缓冲液: 通常使用磷酸盐和 Tris-HCl 缓冲液体系。选择缓冲系统时, 应考虑分子稳定性、结合优化以及缓冲液将 pH 值控制在所需操作范围的能力;

电导率: 通常使用至少 250–500 mM NaCl。高电导有助于提高碱基配对结合能力;

流速: 目标运行流速是灵活的, 但为了达到最佳亲和结合, 建议保留时间  $\geq 5$  min (柱高 20 cm 的色谱柱中, 线性流速  $\leq 400$  cm/h);

温度: 亲和结合是在室温下进行。如有必要, 总 RNA 负载可以加热到 65–70°C 以破坏二次结构;

平衡: 建议使用 5 CV 以上的平衡缓冲液平衡层析柱;

载量优化: 最大载量取决于几个因素, 包括 mRNA 大小、样品浓度、杂质组成、缓冲液组成, 和电导率。

### 洗脱条件推荐

pH: 洗脱步骤的起始 pH 通常和载量缓冲液以及平衡缓冲液相同。如果需要, 洗脱液的 pH 可以优化;

注意: 用于确定浓度的 mRNA 洗脱液, 它的 OD 值会随着 pH 的不同而变化。

洗脱电导率: 洗脱液在没有盐 (低电导) 的情况下, 静电排斥发生在 poly A 和 poly T 阴离子骨架之间, 导致 A-T 碱基对分离, 实现 polyA-mRNA 的洗脱。在某些情况下, 可以单独使用水进行洗脱; 通常不需要盐浓度梯度洗脱。然而, 中间洗涤步骤时降低电导率可以提高杂质去除率。

回收率: mRNA 洗脱回收率依赖于特定洗条件的优化以及分子特征。

### 再生清洗 (CIP)

通常使用纯水或者 20%乙醇在位清洗 3 - 5 CV; 如果有需要可使用 0.1M NaOH 在位清洗 3 - 5CV, 再用纯水或者 20%乙醇洗掉碱液后, 直至柱子平衡即可。

## 长期储存

介质密封保存在 20 %乙醇, 建议保存温度为 2~8 °C。注意防止乙醇挥发以及微生物生长, 建议 3 个月更换一次 20 %乙醇。

注意: 使用过程中, 所用样品及流动相必须用孔径为 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤。

## 故障排除

如果您在使用 NanoGel dT20 产品遇到任何问题, 请参考下表进行解决或联系我们。

现象	原因分析	建议措施
柱压升高	流速过高	降低流速
	仪器的在线滤器堵塞	去除杂质并清洗, 或者替换, 在使用前对样品和缓冲液进行过滤
	柱床被压缩	重新填充柱子
	层析柱使用过久	更换层析柱或更换层析介质
	泵和收集器之间的阀门未打开	打开出口

## 订货信息

产品型号	包装	货号
NanoGel dT20	10 mL	17030-050150-2010
	30 mL	17030-050150-2030
	50 mL	17030-050150-2050
	100 mL	17030-050150-2100
	300 mL	17030-050150-2300
	500 mL	17030-050150-2500
	1 L	17030-050150-1001

预装柱:

柱子型号	规格	货号
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：更多规格型号或定制需求，请联系我们。

## 苏州纳微科技股份有限公司

全国咨询热线：400-828-1622

邮箱：info@nanomicrotech.com

(本公司产品仅限科研或工业使用)

中文网站：www.nanomicrotech.com

英文网站：en.nanomicrotech.com

2022-苏州纳微科技股份有限公司版权所有

总部地址：苏州工业园区百川街2号 215123

2022年6月第一版

