



*Sepax Technologies*

## **Sepax Application Note**

### **Aufreinigung einer 300–600 kDa mRNA mit SEC und RP**

Bei der Probe handelte es sich um einzelsträngige mRNA von 300 kDa ~ 600 kDa, welche in einer Konzentration von 0,5 mg/ml eingesetzt wurde. Die Probe lag in DEPC-Wasser vor. Sie wurde pH-neutral (pH=7) bei -20°C gelagert. Vorhandene Verunreinigungen waren Aggregate, Fragmente und Doppelstrang-RNA.

Mit Hilfe der SEC wurden zunächst verschiedene Porengrößen (500 Å, 1000 Å und 2000 Å) zur Abtrennung von Verunreinigungen getestet.

Aus den entsprechenden Chromatogrammen ging hervor, dass die SRT SEC-1000 Phase mit der Porengröße von 1000 Å am besten für die Aufreinigung dieser mRNA geeignet war.

Im Anschluss wurde eine RP Chromatographie als orthogonale Methode für die weitere Charakterisierung jedes SEC-Peaks durchgeführt.

Hierfür wurde die Proteomix RP-1000 Phase verwendet.

Durch die Kombination von SEC und RP konnte die mRNA sehr gut von den vorhandenen Verunreinigungen abgetrennt werden.

### **Verwendete Säulen**

#### a) SEC-Säulen

SRT SEC-1000, 5 µm, 1000 Å, 7.8 x 300 mm, Artikelnummer: SEP215950-7830

SRT-SEC-2000, 5 µm, 1000 Å, 7.8 x 300 mm, Artikelnummer: SEP215980-7830

SRT-C SEC-500, 5 µm, 500 Å, 7.8 x 300 mm, Artikelnummer: SEP215500-7830

#### b) RP-Säule

Proteomix RP-1000, 5 µm, 1000 Å, 2.1 x 100 mm, Artikelnummer: SEP465950-2110

### 1a) mRNA-1 mit SRT SEC-1000

Säule: SRT SEC-1000, 5 µm, 1000 Å, 7.8 x 300 mm (SEP215950-7830);

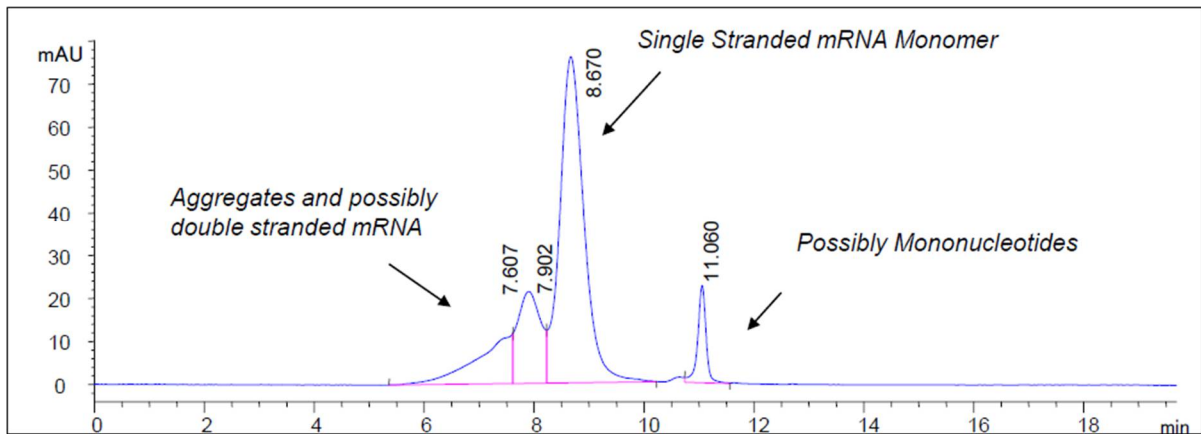
Mobile Phase: 150 mM PB, pH 7.0

Flussrate: 1.0 mL/min; Detektion: UV 260 nm

Säulentemperatur: 25 °C

Injektionsvolumen: 5 µL

Probe: mRNA-1 0.5 mg/mL



RT [min]	Height	Area	Area%	Plates	Tailing	Resolution
7.607	11	517.2	13.952	832	0.50	
7.902	21	623.2	16.812		-1.74	
8.670	76	2329.6	62.847	2055	1.23	
11.060	23	236.9	6.390	31503	0.78	4.71

## 1b) mRNA-1 mit SRT SEC-2000

Säule: SRT SEC-2000, 5  $\mu\text{m}$ , 1000  $\text{\AA}$ , 7.8 x 300 mm (SEP215980-7830);

Mobile Phase: 150 mM PB, pH 7.0

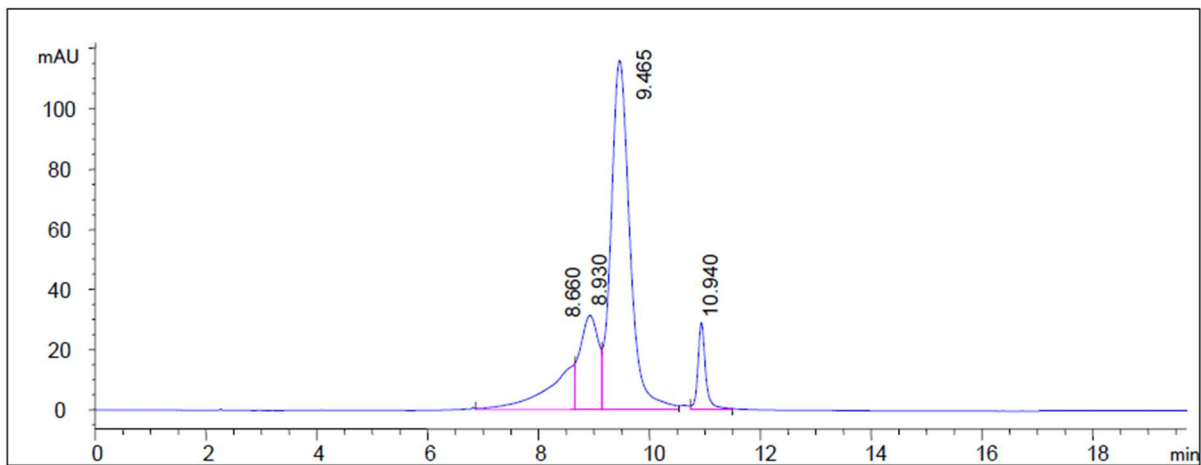
Flussrate: 1.0 mL/min

Detektion: UV 260 nm

Säulentemperatur: 25  $^{\circ}\text{C}$

Injektionsvolumen: 5  $\mu\text{L}$

Probe: mRNA-1 0.5 mg/mL



RT [min]	Height	Area	Area%	Plates	Tailing	Resolution
8.660	15	523.5	12.297	2397	0.50	
8.930	31	713.4	16.759	1967	-1.83	0.36
9.465	116	2745.1	64.487	4149	1.26	0.77
10.940	29	274.9	6.457	37511	1.22	3.62

### 1c) mRNA-1 auf SRT-C SEC-500

Säule: SRT-C SEC-500, 5 µm, 500 Å, 7.8 x 300 mm (SEP215500-7830);

Mobile Phase: 150 mM PB, pH 7.0

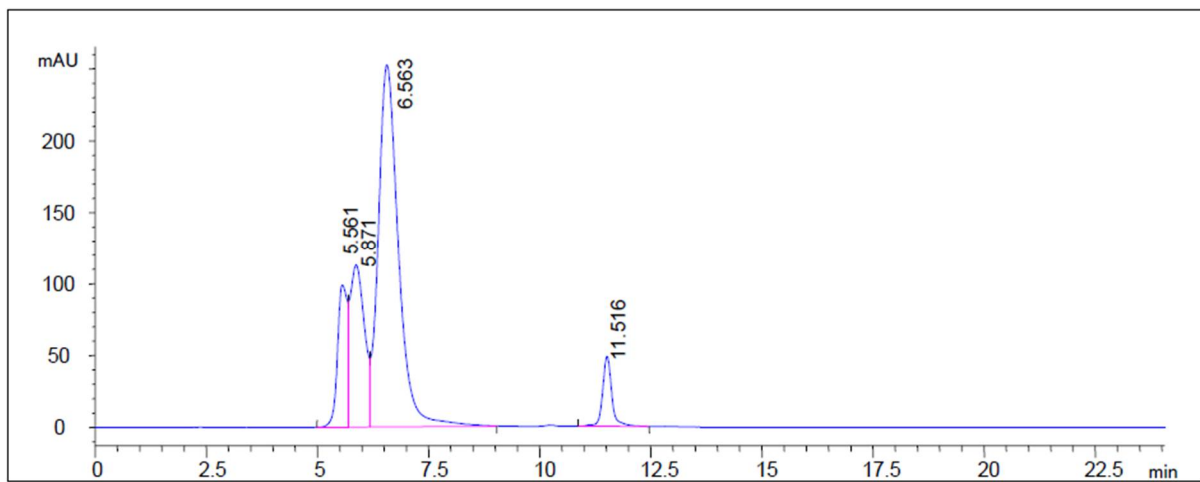
Flussrate: 1.0 mL/min

Detektion: UV 260 nm

Säulentemperatur: 25 °C

Injektionsvolumen: 5 µL

Probe: mRNA-1 0.5 mg/mL



RT [min]	Height	Area	Area%	Plates	Tailing	Resolution
5.561	99	1498.5	11.772	2801	0.76	
5.871	113	2557.6	20.092	1101	-2.80	0.55
6.563	252	7959.4	62.527	1122	1.40	0.93
11.516	49	714.0	5.609	17461	1.25	8.74

## 2) Weitere Analytik der mRNA-Peaks aus 1a auf Proteomix RP-1000

Säule: Proteomix RP-1000, 5 µm, 1000 Å, 2.1 x 100 mm (SEP465950-2110);

Mobile Phase: A: 100 mm TEAA B: 100 mm TEAA / 25% ACN

Flussrate: 0.3 mL/min

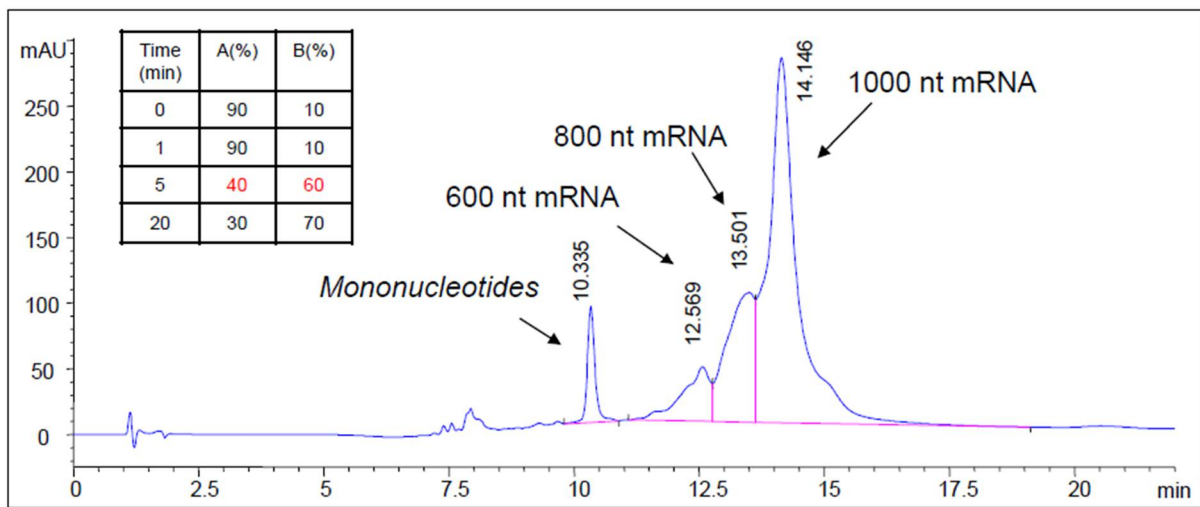
Detektion: UV 260 nm

Säulentemperatur: 50 °C

Injektionsvolumen: 10 µl

Probe: mRNA-2

Druck: 95 bar



Compound Name	RT [min]	Height	Area	Area%	Plates	Tailing	Resolution
	10.335	88.1	940.2	5.32	25906	1.30	
	12.569	41.4	1590.2	9.00	2275	0.58	3.40
	13.501	98.2	3762.6	21.30	2173	-0.68	0.84
	14.146	278.1	11371.9	64.38	4812	1.70	0.65