

# ミニメイトEVO TFFシステム タンジェンシャルフローフィルトレーションの応用



TFFは、液体サンプルをメンブレン表面と平行にフローすることでメンブレン側に一定の圧力を与え、溶質や小分子をメンブレンに透過させるろ過手法です。ミニメイトは、このTFFの技術と限外ろ過膜を併用するシステムです。



## ミニメイトEVO TFFシステム

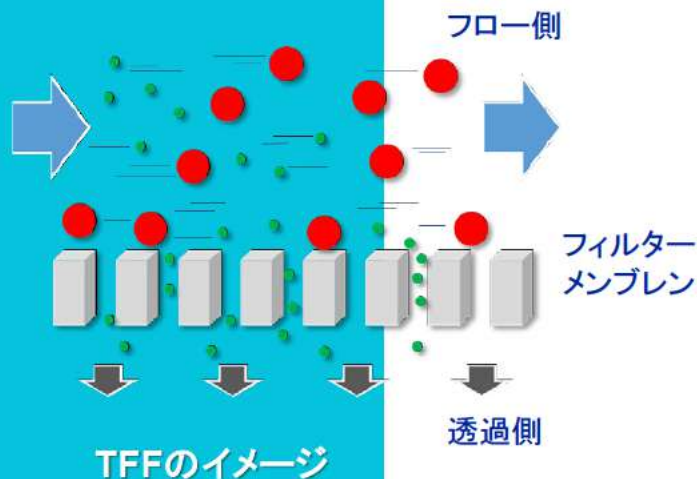


ミニメイトTFFカプセルは、丈夫なポリエーテルスルホン製の限外ろ過膜であるオメガUFメンブレンを搭載しています。このメンブレンは非特異的吸着性が低く、高い回収率が得られます。

## ミニメイトTFFカプセル (オメガメンブレン)

## TFFの用途

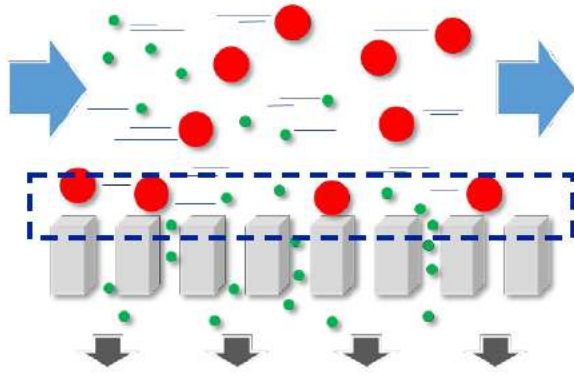
- タンパク質、ペプチド、核酸(DNA、RNA、オリゴヌクレオチド)の濃縮と脱塩
- エクソソームの精製・濃縮
- 菌体(細胞)分離後の培養液からの抗体、組換え体タンパク質の回収
- 金属感受性の高い酵素や分子の分離プロセス
- ウイルス、遺伝子治療ベクターの濃縮
- カラムクロマトグラフィー前のサンプルの前処理
- ゲルろ過後のサンプル濃縮
- 水、緩衝溶液、培地溶液の脱ピロジェン



## TFFと直接ろ過の違い

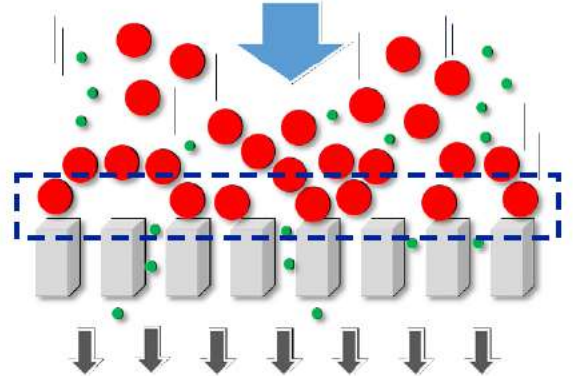
TFFは、メンブレン表面に対して常時平行方向にサンプルを流すため、メンブレンの目詰まりが起こりにくく、大容量のろ過に向いています。

TFF



メンブレン表面にサンプルを平行にフローすることで一定圧を生み出しろ過する方法

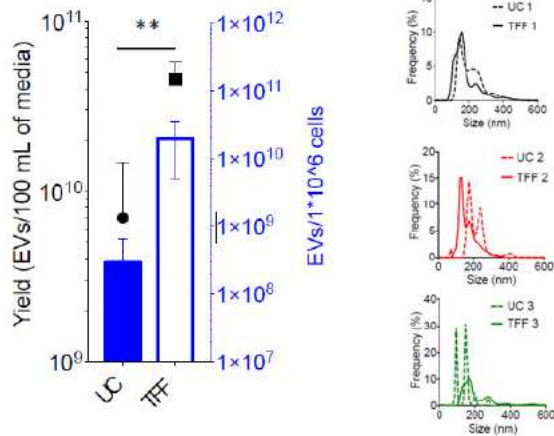
直接ろ過



一般的なろ過方法で上から下に向かってサンプルをメンブレンに透過する方法

## TFFと遠心ろ過の細胞外小胞の回収効率

MDA-MB-231乳がん細胞を培養した培養液からUC (超遠心法) 及びTFF (タンジェンシャルフローろ過)を用いて細胞外小胞を回収した回収率と粒子径分布の比較



- (1) UCとTFFの細胞外小胞の回収率
- (2) UCとTFFの細胞外小胞の粒子径分布 (n=3)

回収した細胞外小胞はUCよりもTFFを用いたほうが回収率が高く、広範な粒子径が得られました。

Busatto, S, et al., Tangential Flow Filtration for Highly Efficient Concentration of Extracellular Vesicles from Large Volumes of Fluid. *Cells* 7,273–283 (2018).

## TFFの利点

### TFFの特長

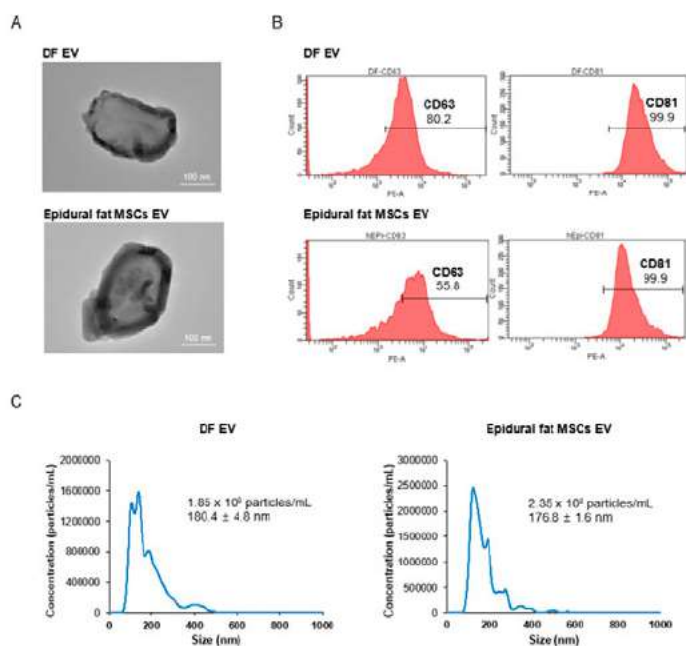
- 効率的な大容量 (~1L) のサンプルのろ過
- 常時フローによる一定圧のため、サンプル負荷が少ない



ウィルスや遺伝子ベクター、細胞外小胞などの精製・抽出に適している



## 限外ろ過TFFデバイスによるエクソソームの分離



### エクソソームの精製方法

- MSC細胞の培養液を48時間ごとに回収し、4°Cで保存、総量が50 mLになるまで回収した。
- 培養液を300g, 10分間遠心し、細胞のデブリスを除去した。
- TFFシステム (MWCO 100K) で流量12.5 mL/minでろ過した。
- 最後にろ液を2500g, 25分間遠心し、マイクロ粒子を除去した。

- DF MSCとEpidural fat MSCからエクソソームを精製した。
- フローサイトメトリーからエクソソームのマーカであるCD63とCD81を検出した。
- 粒子径分布より、30-200 nm付近の粒子サイズを確認した。

Sung, SE, et al., Comparisons of Extracellular Vesicles from Human Epidural Fat-Derived Mesenchymal Stem Cells and Fibroblast Cells. *Int J Mol Sci.* 22, 2889-2900 (2021)

## 限外ろ過TFFデバイスのレンチウイルスの濃縮

Sample details	Volume	Titre IVP/mL	Total IVP	Recovery (%)
pre TFF 48hr unconcentrated 03Oct19	497mL	$6.35 \times 10^5$	$3.2 \times 10^8$	100
48hr 5x TFF reduced 03Oct19	80mL	$3.95 \times 10^6$	$3.2 \times 10^8$	100
48hr waste/permeate 03Oct19	470mL	TLD	-	-
CalH Quantum#3 TFF VCM conc. 48hr, 03Oct19	18.4mL	$1.57 \times 10^7$	$2.9 \times 10^8$	91
48hr TFF flush (post VCM conc) 03Oct19	12mL	$2.27 \times 10^6$	$2.7 \times 10^7$	9
pre TFF 72hr unconcentrated 04Oct19	400mL	$1.01 \times 10^6$	$4.0 \times 10^8$	100
72hr waste/permeate 04Oct19	500mL	TLD	-	-
CalH Quantum#3 TFF VCM conc. 72hr, 04Oct19	13mL	$1.98 \times 10^7$	$2.4 \times 10^8$	60
72hr TFF flush (post VCM conc) 04Oct19	13mL	$1.98 \times 10^6$	$2.6 \times 10^7$	7

Note: % recovery is relative to pre TFF unconcentrated. TLD = Too Low to be Determined.

Pall, Scientific and Laboratory Services: Report: Bench scale ultrafiltration study of a Lentivirus process using Pall Omega TFF modules

- レンチウイルス精製プロセスにおけるウイルス濃縮のための遠心分離ステップをTFFシステムに置き換えられるかを評価した。
- 現在の遠心分離によるプロセスでは、ウイルス回収率は約10%であったが、
- Pall オメガ (PES) 300 kD膜を用いた場合、約20倍の濃度係数を達成し、ウイルス回収率は67~100%となりました。

## 限外ろ過TFFデバイスによるナノ粒子の分画

Table III. Comparison of Nanoparticle Purification by Different Processes

Purification process/mode	TMP (psi)	$T_{90}$ (h)	PVA remained with nanoparticles after purification (% w/w)	PVA distribution (%)			Total PVA removed <sup>a</sup> (%)
				Removed in filtrate	Remained with nanoparticles	Adsorbed onto the membrane	
TFF diafiltration	2.75	49.4	$25.5 \pm 1.4$	$39.4 \pm 2.6$	$31.7 \pm 1.7$	$28.9 \pm 3.6$	$68.3 \pm 1.7$
TFF concentration	2.75	5.0	$30.4 \pm 1.7$	$44.6 \pm 6.7$	$37.8 \pm 2.1$	$17.5 \pm 2.5$	$62.1 \pm 2.1$
TFF concentration	100	2.8	$7.5 \pm 2.7$	$84.6 \pm 8.9$	$9.3 \pm 3.4$	$6.1 \pm 7.2$	$90.7 \pm 3.4$
DCD Macrosep 300R	N/A	9.6 <sup>b</sup>	$8.8 \pm 2.0$	$79.9 \pm 3.2$	$11.0 \pm 2.5$	$9.1 \pm 5.6$	$89.0 \pm 2.5$
Ultracentrifugation	N/A	3.3 <sup>c</sup>	$1.0 \pm 0.01$	$98.7 \pm 0.01$	$1.3 \pm 0.01$	N/A	$98.7 \pm 0.01$

All purifications were performed with triplicate batches ( $n = 3$ ) of 200 ml nanoparticle dispersion (0.5 mg/ml) with free PVA level of  $80.4 \pm 3.1$  % w/w. Values are mean  $\pm$  SD.  $T_{90}$ , the time taken to remove 90% of initial PVA in nanoparticle dispersion, is calculated using the mathematical equation obtained from the line or curve of best fit to the data in Figs 4, 6, and 7. N/A: not applicable.

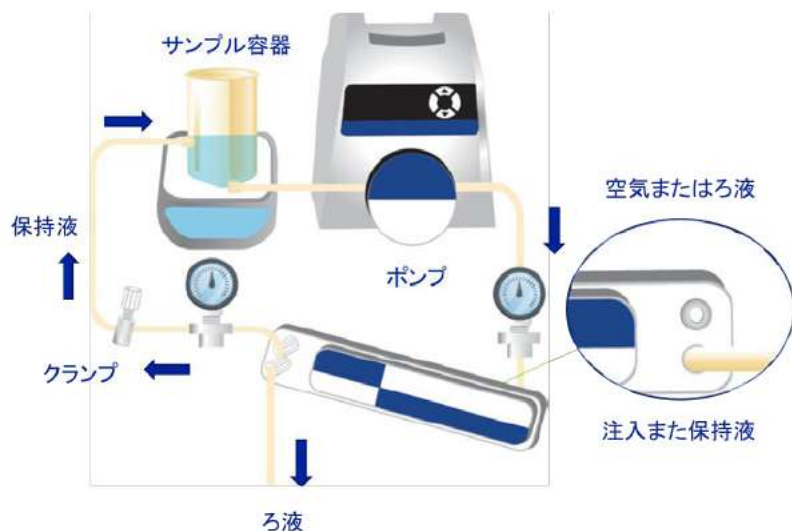
<sup>a</sup>Total PVA removed is obtained from percent PVA retained on nanoparticles subtracted from 100% PVA level.

<sup>b</sup>This value was calculated based on centrifugation capacity of eight DCD devices (8 ml per device) per run.

<sup>c</sup>This value was estimated based on centrifugation capacity of 100 ml per run.

- TFF (TMP 10psi)ではPVA除去率は $90.7 \pm 3.4$ %だった。またその精製時間は2.8時間だった。
- 透析ろ過(還流無し)ではPVA除去率は $68.3 \pm 1.7$ %だった。またその精製時間は49.4時間だった。
- 限外ろ過遠心ろ過デバイスではPVA除去率は $89.0 \pm 2.5$ %だった。またその精製時間は9.6時間だった。
- 超遠心ではPVA除去率は $98.7 \pm 0.01$ %だった。またその精製時間は3.3時間だった。

## TFFの流路図



- ポンプのヘッドにチューブを接続し、サンプル容器とカプセルフィルターのポートにつなげます。
- カプセルフィルターのFeed or Retentate ポートから、液体はチューブを介して、リザーバーに戻されます。
- 膜にかかる平均的な圧力は、膜間圧力 (TMP) と呼び、クランプを利用して、TMPを制御します。
- ろ液は、Vent or Filtrateポートより回収します。

## 分子量カットオフ (MWCO) セレクションガイド

### タンパク質アプリケーション

MWCO	メンブレンの公称孔径*	生体分子のサイズ	生体分子の分子量
3K	—	—	10K - 30K
10K	—	—	30K - 90K
30K	—	—	90K - 300K
100K	10 nm	30 - 90 nm	300K - 900K
300K	35 nm	90 - 200 nm	900K - 3,000K

### ウィルスアプリケーション

MWCO	メンブレンの公称孔径*	ウィルスまたは粒子の直径
100K	10 nm	30 - 90 nm
300K	35 nm	90 - 200 nm

\*\*公称孔径は電子顕微鏡で測定したものです。

## その他限外ろ過製品もあります！



限外ろ過に使える遠心ろ過デバイスやフィルタープレートもありますのでご興味があればお問い合わせください。

## 注文情報

### ミニメイトEVO TFFシステム

型式	製品概要	包装
OAPMPUNV	ペリスタポンプ、ポンプヘッド、圧力計x2、リザーバー、スターラー、ドリフトレイ、各種フィッティング	1/包装

### ミニメイト TFFカプセル (オメガメンブレン)

型式	製品概要 (MWCO)	包装
OA001C12	1K	1/包装
OA003C12	3K	1/包装
OA005C12	5K	1/包装
OA010C12	10K	1/包装
OA030C12	30K	1/包装
OA050C12	50K	1/包装
OA070C12	70K	1/包装
OA100C12	100K	1/包装
OA300C12	300K	1/包装
OA500C12	500K	1/包装
OA990C12	1000K	1/包装



ラボラトリー事業部

〒163-1325 東京都新宿区西新宿6-5-1

TEL. 03 (6386) 0993

FAX. 03 (6386) 0994

ポールのWebサイトはこちらから: <https://www.pall.com/jp/ja/laboratory.html>

お問い合わせは、<https://www.pall.com/jp/ja/laboratory.html>のサイトの下にある「問い合わせ」をクリックしてください。

© Copyright 2021, Pall Corporation. Pall, PALL, Minimate, Omega は、Pall Corporationの商標です。® は米国で登録された商標を示します。