

使用 Stunner 对 LNP 进行计数、定量与粒径检测

简介

脂质纳米颗粒 (LNP) 的三个最重要的特征是样品中有多少颗粒、它们的大小是多少以及含有多少 RNA——而收集这些数据可能会面临许多障碍。

纳米颗粒浓度是评估每批产品的关键参数,但当前的方法无法跟上合成的高通量,可能需要稀释而影响准确性,或速度太慢。保持颗粒适当的大小是研发 LNP 的共同目标,但当仅在单角度进行测量时,很难检测到样品中所有的聚集物。因为许多动态光散射 (DLS) 仪器被困在单通道测量的低效状况中,仅收集诸多样品的粒径数据就是一个挑战。

目前有各种不同的分析方法来量化 RNA、DNA、蛋白质或小分子荷载,但大多依赖复杂的破乳工作流程、昂贵的染料和浪费的标准曲线。UV/Vis 吸光度一直被用于纯化样品中 RNA、DNA、蛋白质和小分子的定量,但纳米颗粒的高浑浊度使得大多数 UV/Vis 分光光度计无法对样品进行测量,并且阻碍获得准确的读数。

Stunner 是一款将高通量 UV/Vis 与旋转角动态光散射 (RADLS) 相结合的平台,可以在每个 2 μ L 样品上提供总 RNA 浓度、纳米颗粒浓度、大小和多分散性信息,而无需稀释、标准曲线或荧光染料 (图 1)。Stunner 的所有 RADLS 和 UV/Vis 数据都是以板格式产生的,每个样品检测最多只需 2 分钟,一次最多可处理 96 个样品。

本应用展示了 Stunner 如何使用 RADLS 对 LNP 进行粒径测量和计数,并使用 UV/Vis 对两种 LNP 样品量化 RNA 荷载。



图 1：Stunner 是一款将 UV/Vis、RADLS 和 MALS 集于一体的系统，仅需 2 μL 样品

结果

粒径

Stunner 的 RADLS 测量报告了三种不同的尺寸分布：强度、质量和数量。这三种分布于 RADLS 之所以独特，是因为它们不是归一化值——而是样品中测得的光散射强度、质量浓度和颗粒数量的实际读数。

强度分布（图 2A）显示了每种大小的颗粒产生的光散射量，因此您可以看到那些大聚集物了产生大量的光散射，但只有少数漂浮在样品中。光散射强度是在 0° 散射角 ($\theta=0^\circ$) 处计算的，这意味着它与角度无关，并且自动调整为瑞利或米氏光散射表现。质量分布（图 2B）顾名思义，将强度分布转换为质量浓度对粒径的图表。

数量分布（图 2C）将相同的方法延伸到颗粒浓度对粒径的图表。如果您有两个每毫升含有不同数量 LNP 的样品，那么这里峰值高度会开始出现差异。

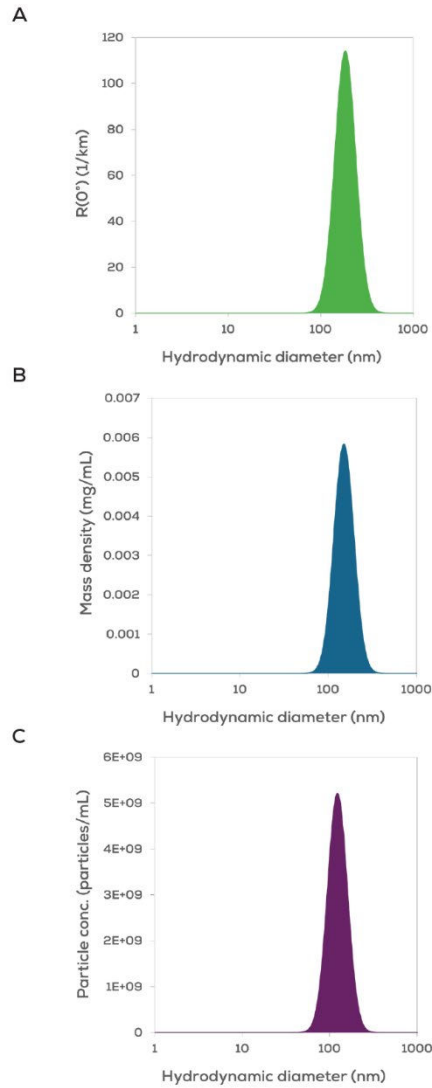


图 2: 均匀 LNP 样品的强度分布 (A), 质量分布 (B), 以及数量分布 (C)

我们用 Stunner 对两种 LNP 进行了表征分析。将包含可电离脂质 SM102 和 PolyA RNA 的小型 LNP 与含有阳离子脂质 DDAB 和纯化小牛肝 RNA 的大型 LNP 进行了比较。大型 LNP 样品在未经过滤、经 0.45 μm 和 0.2 μm 滤器过滤处理后进行了分析。

小型 LNP 使用 RADLS 进行重复测量，以展示 Stunner 自优化光学系统的高重复性。Stunner 为每个样品优化光散射的重叠，使得重复样品的读数可以完全重叠 (图 3)。大型 LNP 的质量分布平均直径在五台仪器上四次重复测量时为 159 nm, CV 为 4%，而小型 LNP 的测量结果为 82 nm, CV 为 5%。

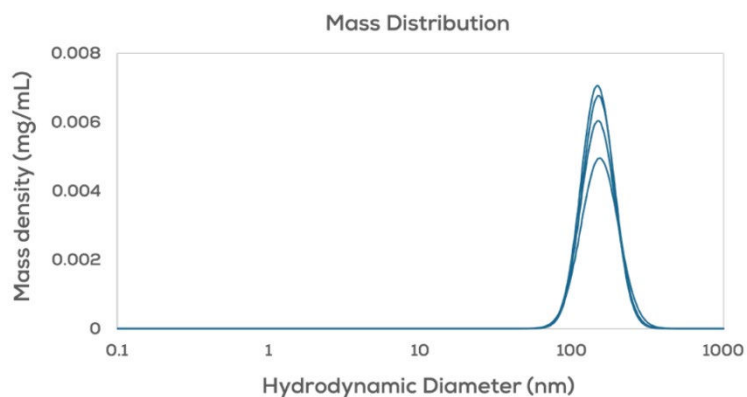


图 3: 大型 LNP 的四次重复测量的质量分布叠加

小型和大型 LNP 的数量分布叠加显示了数量加权平均直径的差异: 分别为 47.8 nm 和 127 nm (图 4)。这些分布曲线下的面积表示了两个样品中存在的颗粒浓度。

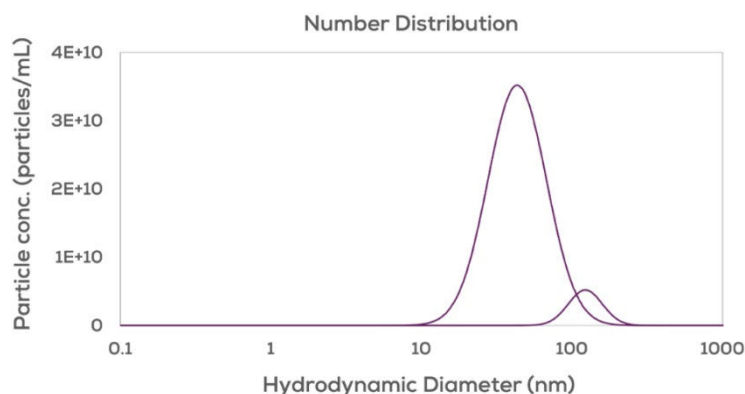


图 4: 对小型 LNP (左峰) 和大型 LNP (右峰) 的数量分布进行比较。曲线下的面积表示每个样品的颗粒浓度

质量或数量分布是可视化样品中最常见颗粒的尺寸的一种良好方法, 而 Z-平均直径是在关注聚集时常用的指标, 因为它对聚集物的存在更为敏感。对于存在聚集的样品, Z-平均直径会在质量或数量分布开始显现变化之前逐渐上升。RADLS 在 $\theta = 0^\circ$ 处计算样品的 Z-平均直径, 使其成为与角度无关的尺寸度量, 对因检测角度不足而未测量到的大颗粒具有独特的敏感性。

表 1 显示随着逐步过滤去除大型 LNP 样品中的过大颗粒, Z-平均直径减小。正如预期, 随着使用较小孔径的滤器, Z-平均直径进一步减小。此外, 随着较大的聚集物被去除, Z-平均直径周围的变异性也减小。正如表格所示, 与数量分布的

主峰相比, Z-平均直径通常会报告较大的平均尺寸, 因为它对大颗粒更为敏感。数量平均直径可以更好地体现样品中最常见颗粒的尺寸。

| Sample | Average of Z-Avg Dia. (0°) (nm) | %CV | Number Mean Dia (nm) | %CV |
|-----------------------------|---------------------------------|-----|----------------------|-----|
| Unfiltered | 206 | 27% | 136 | 5% |
| 0.45 μm filtered | 189 | 7% | 129 | 4% |
| 0.2 μm filtered | 161 | 5% | 124 | 4% |

表 1: 大型 LNP 样品的 Z-平均直径相对于数量平均直径在 0° 处的读数与精度数据, 分别在未过滤、经过 0.45 μm 滤器过滤以及经过 0.2 μm 滤器过滤后进行测量。%CV 值是在 5 台仪器上运行的四次复制样品测得的

计数

当样品中存在的 LNP 数量增加时, 可以预想光散射的强度也会增加 – 但是当 LNP 变得较大时, 光散射的强度也会增加, 并且该强度会根据每台仪器的测量角度而改变。

作为 RADLS 测量的一部分, 详细的多角度光散射 (MALS) 测量并计算与角度无关的粒径和强度, 以获得更准确的纳米颗粒浓度。

在上述测量小型和大型 LNP 尺寸的同一样品中进行了颗粒浓度测算。Stunner 的估计颗粒浓度度量标准用于从数量分布中测量 LNP 峰的颗粒浓度。小型 (SM102) LNP 的平均颗粒浓度为 7.5×10^{11} 颗粒/mL, CV 为 30% (图 5A), 而大型 (DDAB) LNP 的平均颗粒浓度为 8.5×10^{10} 颗粒/mL, CV 为 28%。颗粒浓度的约 8.8 倍差异也可以通过图 4 中所示的数量分布曲线下的面积来可视化。

在五台仪器上对颗粒浓度测量的中间精密度进行了评估 (图 5B)。所有仪器的均值都在总测量平均值的 30% 以内。颗粒大小的均匀性对于颗粒浓度测量的精度非常重要。大型 LNP 样品通过 0.2 μm 滤器过滤, 同一样品也在未过滤和 0.45 μm 滤器过滤条件下进行了测试。去除较大颗粒对提高颗粒浓度测量的精度产生了明显的效果。

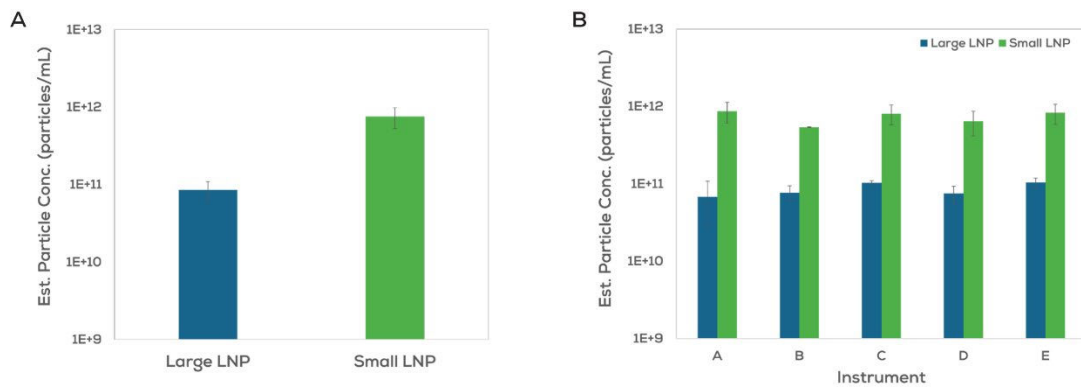


图 5：大型和小型 LNP 样品的颗粒浓度。误差条是在每台仪器上进行的 4 次重复测量的标准偏差 (A)。相同两个样品在各仪器的颗粒浓度读数。误差条是每个仪器上进行的 4 次重复测量的标准偏差。所有五台仪器的读数均值均在各颗粒的平均浓度值的 20% 以内 (B)

将小型 LNP 样品连续稀释 5 倍，最终稀释至 625 倍，这里展示了颗粒浓度数据的良好线性和极宽的动态范围 (图 6)。起始浓度为 1.0e12 颗粒/mL，最终稀释后的测量值为 1.2e9 颗粒/mL。在整个稀释范围内，未加权的线性回归拟合具有 0.9983 的 R^2 值。对于最低浓度，CV 仅为 32%，表明尚未达到下限。值得注意的是，LNP 颗粒浓度的下限会因各种颗粒之间和样品之间的平均大小、组成和缓冲液的不同而有所变化。例如，对于 81 纳米的聚苯乙烯微珠，观察到了六个数量级的动态范围 (1e7–1e13 颗粒/mL)(未展示数据)。

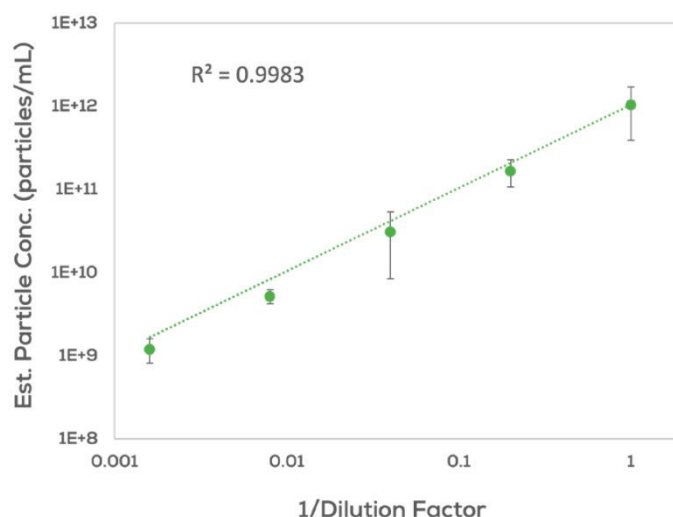


图 6：小型 LNP 样品的估计颗粒浓度，经过五倍系列稀释，最终稀释至 625 倍。误差条是在每台仪器上进行的 4 次重复测量的标准偏差

定 量

对于 LNP 样品, Stunner 的内置应用程序可用于 RNA-LNP、DNA-LNP 或蛋白质-LNP 的荷载定量, 使得定量变得简单而轻松。Stunner 通过 Unmix 分析避开 LNP 的浑浊度, 将每个预设荷载的吸收与其他颗粒或缓冲液的吸收分离开来。对于装载有任何类型 RNA 的 LNP, RNA-LNP 应用程序将帮助定量样品中存在的 RNA 总量 (图 7), 而无需任何样品预处理、标准曲线或试剂。Stunner 测得的 RNA 总量是 LNP 中包裹以及颗粒以外存在的 RNA 之和。

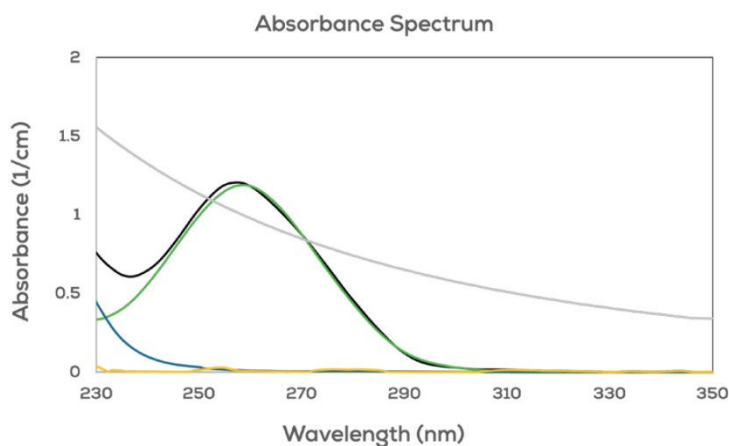


图 7: Stunner 的 RNA-LNP 应用程序能够分离来自 RNA、脂质、浑浊度和其他因素的 UV/Vis 信号。对于此 RNA-LNP 样品, RNA 吸光度 (绿色) 指示 LNP 样品中 RNA 的总浓度。浑浊度显示为灰色, 不包含浑浊度的总吸光度显示为黑色, 颗粒和缓冲液成分的吸光度显示为蓝色, 拟合残差误差显示为黄色

使用 Stunner 的 RNA-LNP 应用程序测试前述的大型和小型 LNP 样品。经过上述的颗粒浓度和尺寸测量, Stunner 报告了大型 LNP 样品的平均荷载浓度为 26.5 ng/ μ L, CV 为 2.5%, 而小型 LNP 样品的平均荷载浓度为 32.7 ng/ μ L, CV 为 1.7% (图 8A)。在五台仪器上比较这些读数 (图 8B), 对于大型 LNP, 与均值的差异小于 1.5%, 而对于小型 LNP 样品, 差异小于 1.1%。

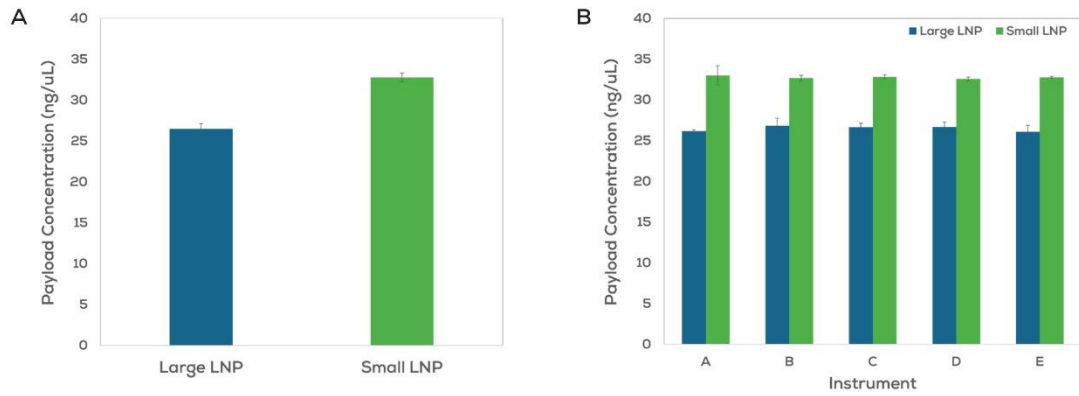


图 8: 大型和小型 LNP 样品的总 RNA 浓度。误差条是在每台仪器上进行的 4 次重复测量的标准偏差 (A)。相同两个样品的仪器间 RNA 浓度数据。误差条是每个仪器上进行的 4 次重复测量的标准偏差(B)

通过不到两分钟的单个样品读取, Stunner 现在知道了样品中的颗粒浓度和 RNA 的总荷载浓度。在设置 Stunner 实验的过程中, 可以输入样品中的 RNA 序列的一些细节, 以便将 RNA 浓度转换为总分子计数。有了这些信息, Stunner 会自动报告每个颗粒含有的平均 RNA 分子数。

使用 Sunscreen 制备不同总流速 (TFR) 的系列 LNP 样品, 流速为 6–12 mL/min, 然后对这些样品进行了 Stunner 表征。随着流速的增加, LNP 的平均直径逐渐减小 (图 9A), 这是符合预期的, 因为较高的 TFR 会导致混合过程中的剪切速率增加。在恒定的脂质浓度和流速比 (FRR) 的条件下, 较高 TFR 下形成的较小直径 LNP 也与颗粒浓度的增加相关 (图 9B)。TFR 与 RNA 浓度不相关 (图 9C), 因为 FRR 和水相中的 RNA 浓度都保持不变。最后, 在 RNA 浓度恒定和较高颗粒浓度的情况下, Stunner 计算每个颗粒的 RNA 分子数 (图 9D), 以便轻松可视化不同 LNP 配方和工艺条件的影响。

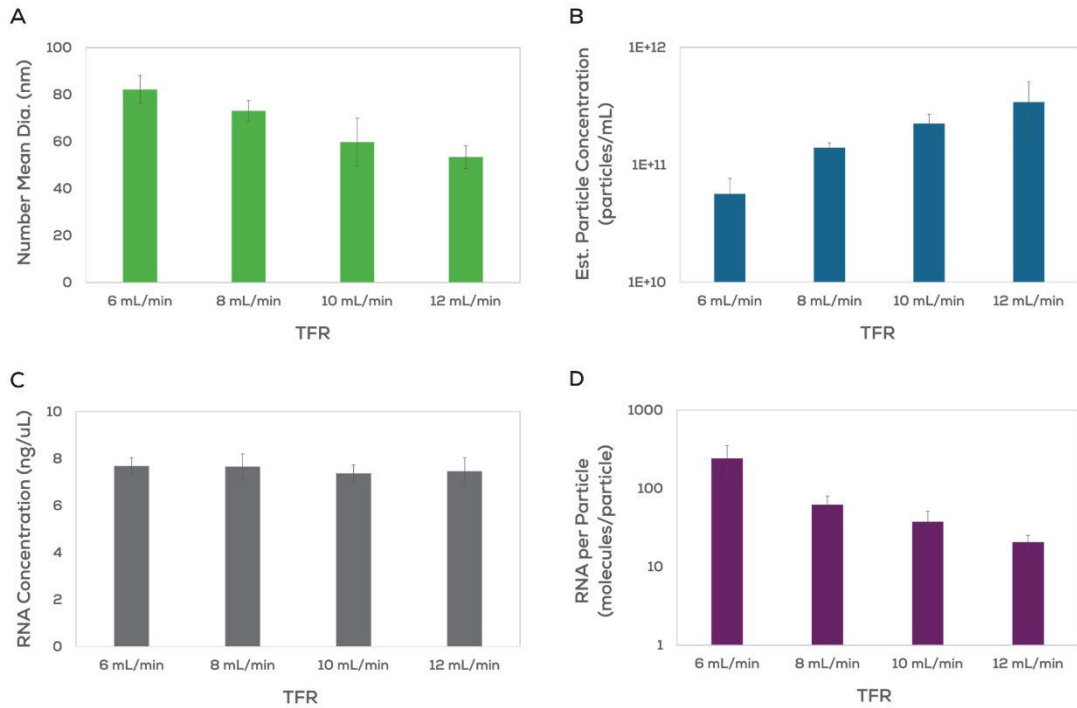


图 9: Sunscreen 在多个总流速 (TFR) 条件下合成 LNP。Stunner 同时在每个样品上收集颗粒直径 (A)、颗粒浓度 (B) 和总 RNA 浓度 (C), 并计算每个颗粒的平均 RNA 分子数 (D), 假设封装效率为 100%

结 论

通过对每个样品进行 RADLS 和 UV/Vis 数据的处理, Stunner 一次性提供了有关颗粒浓度、尺寸、PDI 和总 RNA 荷载的高通量答案。摆脱一次只处理一个样品或仅从大颗粒的单个角度获取数据的 DLS, 简单易行的 UV/Vis 测量提供了无试剂、无标准品和无复杂操作的定量分析。LNP 应用程序以及自定义纳米颗粒应用程序帮助您分析纳米颗粒, 无论内部装载的是什么: RNA、DNA、蛋白质或小分子。从此摆脱复杂的烦人工作流程、昂贵的染料、浪费的标准曲线以及单通道的低效 DLS。

材料与amp;方法

1,2-二油酰-3-三甲基铵丙烷 (氯化盐) (DOTAP)、2-油酰-1-棕榈酰-甘油-3-磷酸醇胺 (POPE)、胆固醇 (Chol) 和 1,2-二肉豆蔻酸-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000 (DMG-PEG) 脂质母液均溶于乙醇。

小牛肝 RNA 和小牛胸腺 DNA 通过 10 kD MWCO 滤器过滤，滤液用于 LNP 生产。

使用 Unchained Labs 的 Sunscreen 制备 LNP。LNP 的脂质部分由 DOTAP:POPE:Chol:DMG-PEG 乙醇溶液以 50:10:38.5:1.5 的摩尔比组成，总流速 (TFR) 为 12 mL/min，水相/有机相流速比 (FRR) 为 3:1。RNA 和 DNA-LNP 采用 5、10 和 50 的氮磷比 (N/P)，分别向水相中添加 100、50 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 核酸，溶液中还包含 100 mM 柠檬酸缓冲液 (pH 4)，最终脂质浓度为 4 mM。制备完成后，LNP 更换缓冲液为 pH 7.4 的 PBS，以减少有机溶剂残留。使用 Stunner RNA-LNP 应用程序评估 LNP 颗粒浓度、RNA 荷载定量、流体动力学直径和多分散性。以 PBS 用作空白对照。如果由软件的自动角度选择功能排除了 2 个或以上角度，或者使用数量分布指标分析时发现了多于 1 个峰值，就会排除该异常值。RADLS 使用 20°C 下的 1.002 cP 的缓冲液黏度和 1.334 的折射率，默认 7 个角度、每个角度 5 次采集，每次采集长度为 1 秒。



Unchained Labs
4747 Willow Road
Pleasanton, CA 94588
Phone: 1.925.587.9800
Toll-free: 1.800.815.6384
Email: info@unchainedlabs.com

© 2024 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo, Stunner the Stunner logo are trademarks and/or registered trademarks of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev A