

用 Stunner 实现简易的无染料 LNP 载荷定量

简介

每个处理过脂质纳米颗粒 (LNP) 的人都曾使用荧光染料法来确定其配方和生产过程中 RNA 的含量和包封效率 (EE%)。而且几乎每个人都对这些检测感到厌倦；昂贵的试剂、两组不同的校准曲线以及每个孔中要添加的许多试剂，使这些检测既耗时又繁琐。

现在有了 Stunner (图 1)。使用 Stunner 进行测量时，您不仅可以获得颗粒大小和 PDI，还可以全面量化样品中的 RNA。在这份应用说明中，我们将详细介绍如何使用 Stunner 减少染料法检测的负担，从而在日常工作流程中为您节省时间、金钱和不必要的麻烦。



图 1：Stunner——定量和粒径测量工具

常规荧光实验方法

典型 LNP 中的 RNA 定量通常涉及使用如 RiboGreen 或 SYBR Gold 等染料，这些染料在与 RNA 结合时荧光会变得高亮。

EE%测定要求将样品稀释到染料的适宜浓度范围。在添加至空白缓冲液后，定量游离 RNA；在添加含有表面活性剂的缓冲液以裂解 LNP 并释放 RNA 负载后，定量总 RNA (图 2)。

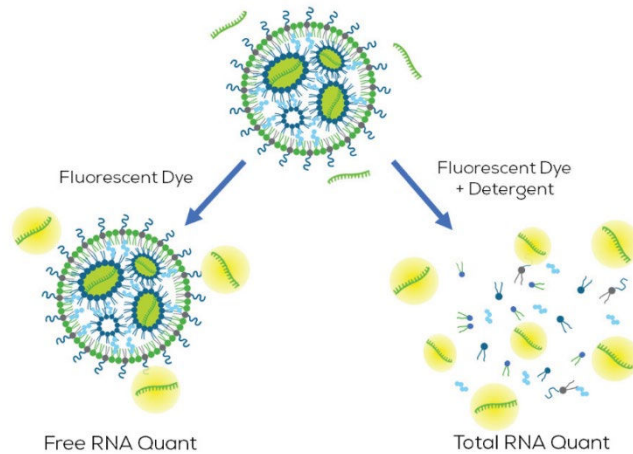


图 2: LNP 的荧光染料检测示意图

不要产生任何气泡，否则你得用针逐个刺破它们以获得干净的读数！含表面活性剂和无表面活性剂的样品需要各自的校准曲线和空白，因为表面活性剂（常用的是 Triton X-100）本身具有固有的荧光（图 3）。样品必须经过孵育以使表面活性剂发挥作用，之后将荧光染料加入每个待测孔中。样品再次孵育以使染料与 RNA 结合，然后终于可以进行测量，处理校准曲线并获得结果。真是大费周章！

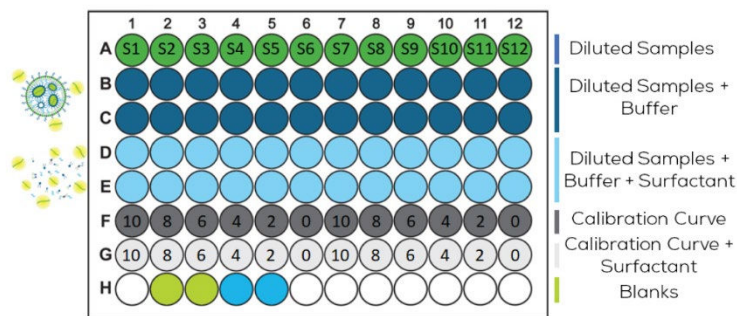


图 3: 荧光染料检测的典型板布局

计算总 RNA 和游离 RNA 浓度后，通过以下公式得出包封效率 (EE%):

$$\frac{(RNA_{total} - RNA_{free})}{RNA_{total}} \times 100\% = EE\%$$

这种方法下一个 96 孔板只能检测至多 12 个样品 (含副孔)，并可能需要一个经验丰富的操作员一小时或更长时间，仅染料的成本就超过 50 美元，并涉及 266 次不同的移液操作——想想都累。想要检测更多的样品？你将不得不从头运行整个实验，包括校准曲线和所有步骤。

Stunner 解决方案

让 Stunner 来帮您解决这一困扰！由于利用了先进的旋转角动态光散射技术 (RADLS), Stunner 能提供市面上最敏感的动态光散射。标准的 LNP 分析将使用 7 个角度, 包括背向和前向散射, 提供比以往更多的样品信息以计算粒径以及颗粒计数。你还可以获得溶液中 RNA 的 UV/Vis 定量, 通过 Unmix 算法将 RNA 的吸光度从其他颗粒成分中分离出来 (图 4)。所有工作都在 Stunner 96 孔微流控板中完成, 每个样品只需 2 μL , 即可实现快速筛选 LNP 而不遗漏任何信息。这意味着可以将基于染料检测的工作量减半——加样数减半, 校准曲线减半, 孵育时间减半, 总时间减少一半以上——而且不再需要处理产生气泡的表面活性剂! 只需要在稀释样品中加入染料并使用一组校准曲线来测量游离 RNA, 然后利用 Stunner 提供的总 RNA 浓度进行计算。你甚至可以在 Stunner 收集数据时同步检测以加快工作流程 (表 1 和表 2)。EE% 的计算方法与之前相同, 但麻烦减少一半, 数据却多得多! 请查看附录中的标准操作程序 (SOP), 该方法能将移液操作的次数从 266 次减少到 114 次。

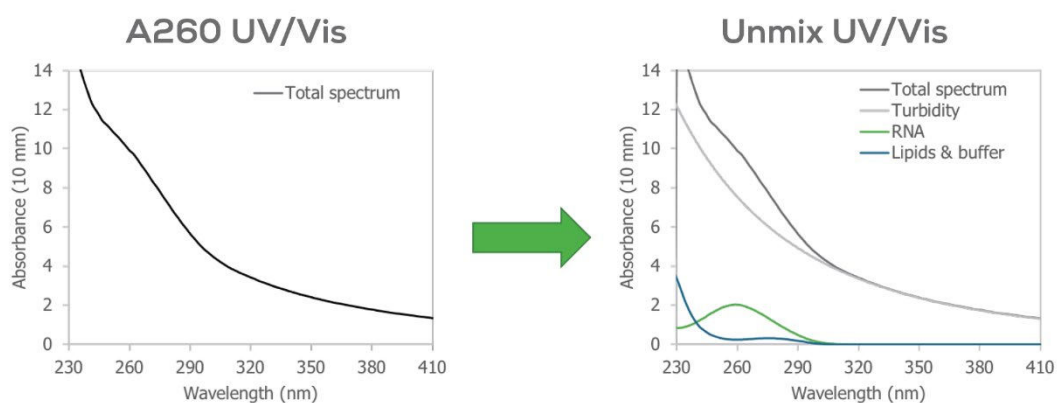


图 4: Stunner 的 RNA-LNP 应用能够分离 RNA、脂质、浊度和其他因素的紫外/可见光信号。对于此 RNA-LNP 样品, RNA 吸光度 (绿色) 用于计算 LNP 样品中 RNA 的总浓度。浊度以灰色显示, 总吸光度以黑色显示, 颗粒和缓冲液成分的吸光度以蓝色显示

Hybrid method	Data	Total Time (12 samples)	Hands-on Time
Stunner – UV/Vis and RADLS	Size, PDI, Particle Concentration, Total RNA	35 minutes	5 minutes
Reduced Based-RNA Assay	Free RNA	15 minutes	12 minutes
Total	Size, PDI, Particle Concentration, Total RNA, EE%	35 minutes	<20 minutes

表 1: Stunner——染料混合分析法同时运行所需的预计时间

Standard method	Data	Total Time (12 samples)	Hands-on Time
One-by-one DLS	Size, PDI	60+ minutes	30-60 minutes
Dye-Based Assay	Total RNA/EE%	45-60 minutes	40 minutes
Total	Size, PDI, Total RNA, EE%	~120 minutes	<70 minutes

表 2: 传统 DLS 和整套染料分析方法所需的预计时间

检测过程

筛选 PolyA-LNP

让我们看看具体操作——使用 Sunscreen (Unchained Labs 的自动化高通量微流控脂质纳米颗粒配方筛选解决方案) 对 3 种 LNP 配方进行重复制备。使用了两种不同的反应缓冲液，20 mM 柠檬酸盐和 20 mM 醋酸盐，以评估哪一种更有效。使用了 PolyA 作为低成本 RNA 类似物，然后将颗粒透析至 1XPBS 中。Stunner 生成的 DLS 数据突出了使用不同反应缓冲液时颗粒大小和分布的差异——醋酸盐缓冲液在所有三种配方中都形成了更小的颗粒，尽管在 LNP-X 中这一差异较小。LNP-Z 在醋酸盐缓冲液中形成了质量更高的 LNP，具有更低的 PDI 和不到柠檬酸盐缓冲液中颗粒平均粒径的一半。所有样品的 PDI 均小于 0.2，除了在柠檬酸盐缓冲液中制备的 LNP-Y 和 LNP-Z 之外，所有颗粒的平均粒径均小于 100 nm (图 5)。

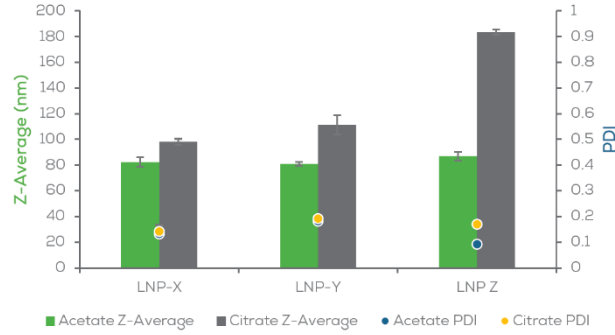


图 5: 在 Sunscreen 上制备的 LNP 的粒径和 PDI。进行了 2 次技术重复
透析后的颗粒总数约为 $9E+11$ ，随着颗粒大小的不同略有变化。显著的例外是 LNP-Z，其中在柠檬酸盐缓冲液中制备的样品颗粒数量显著较少，这是由于颗粒非常大 (图 6)。

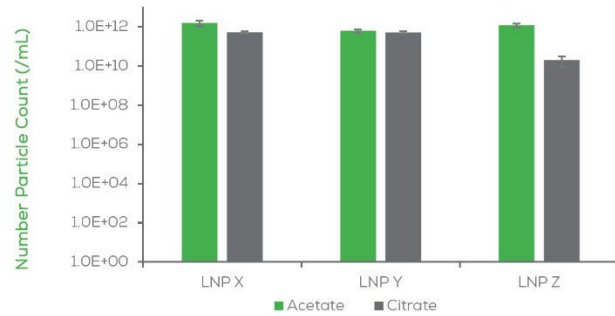


图 6: 在 Sunscreen 上制备的 LNP 的颗粒数量计数。进行了 2 次技术重复
上述样品的浓度数据计算，使用了基于 Poly A 序列自定义的 RNA 分析物，以从 Unmix 算法中获得最准确的数据，并消除由脂质引起的浑浊和干扰 (图 7)。通过 Stunner 测得的总 RNA 和 RiboGreen 测得的游离 RNA，可以按照之前的公式 1 计算 EE%。
两种方法的比较显示，总 RNA 和 EE% 的数值非常一致，两者的差异通常在 1% 以内。两种方法都突出了 LNP-Z 的总 RNA 浓度比其他配方高，且当使用柠檬酸反应缓冲液时，包封效率较低 (图 7 和图 8)。

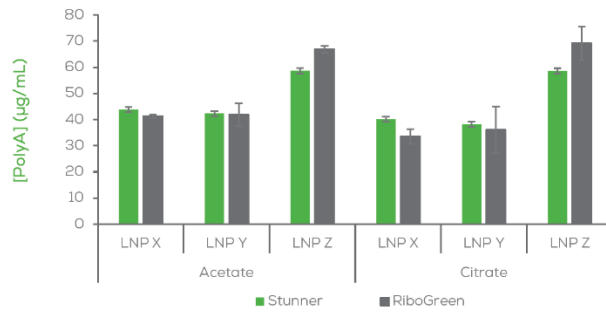


图 7：由 Stunner 和 RiboGreen 分布测量的 LNPs X、Y 和 Z 中 PolyA 的总浓度。进行 2 次技术重复

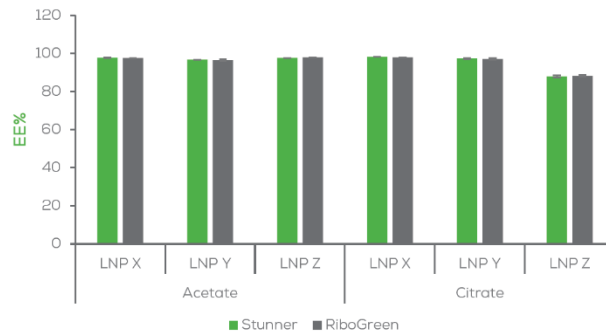


图 8：使用 Stunner-RiboGreen 混合检测和标准 RiboGreen 检测测量的 EE%，进行 2 次技术重复

可靠的结果

使用荧光素酶 (FLuc) mRNA 合成的颗粒

使用最优缓冲液 (pH 4.00, 20 mM 醋酸盐) 的三种配方用于包裹萤火虫荧光素酶 RNA (mFLuc)，并保留之前实验中的其他条件。最终生产的颗粒与使用 PolyA 载荷的颗粒相似。所有颗粒的多分散指数 (PDI) 均为 0.2 或以下，表明颗粒粒径分布较窄 (图 9)。

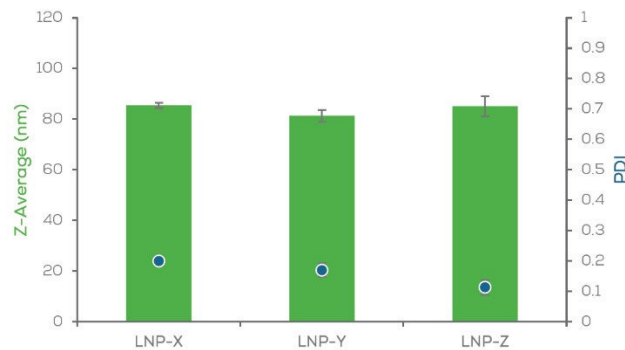


图 9：RNA-LNP 颗粒粒径数据。误差棒为三次重复的标准差

总 RNA 测量结果再次表明 RiboGreen 和 Stunner 的结果非常相似——Stunner 软件中的 RNA 分析物设置为 2 kb (图 10)。三次重复的 Stunner 数据的变异系数 (CV) 小于 1%, 显示了出色的精确度。RiboGreen 数据的 CV 在 0.2% 到 5.2% 之间。

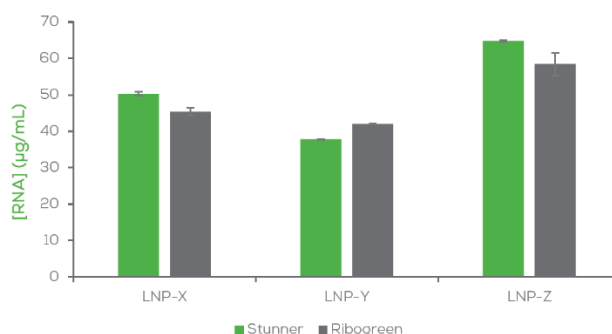


图 10: Ribogreen 和 Stunner 分布定量 mFLuc mRNA 浓度的比较。误差棒为三次重复的标准差

所有配方的 EE% (包封效率) 都很高, 无论使用哪种测量方法, EE% 均在 90% 以上 (图 11)。LNP-Z 的 EE% 最低, 在 Stunner/RiboGreen 混合测定法中测得为 91%。

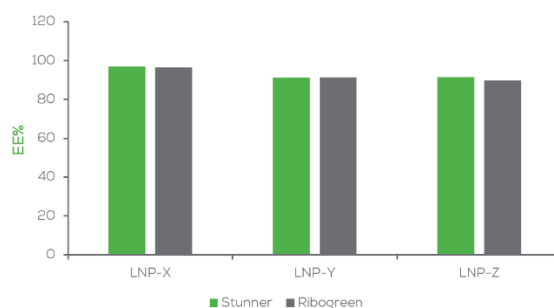


图 11: LNPs X、Y 和 Z 的封装效率, 由 Stunner 混合检测法或标准 Ribogreen 检测法测量

独特的是, Stunner 还能轻松追踪您的 RNA 浓度在整个生产过程中的变化 (图 12)。当比较 LNP Y 和 Z 的过程收率时, 两者都显示了预期中由于与脂质有机相混合而导致的投料浓度与初始未经透析和稀释的 LNP 之间下降约 25%。然而, LNP-Z 在透析后显示出 98% 的材料保留, 而 LNP-Y 则总体下降了 22%。这给出了 LNP-Z 的总体、最终封装收率为 85%, 而 LNP-Y 为 71%, 表明配方或工艺存在改进的潜力。

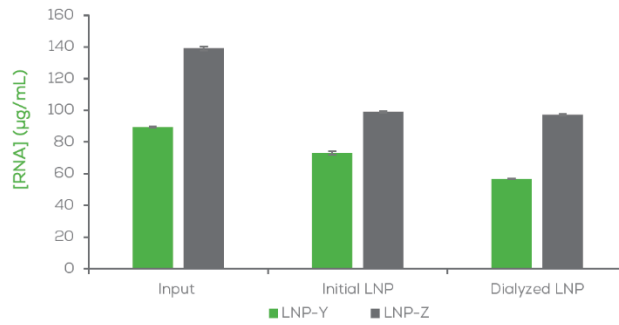


图 12: 初始水相溶液中, 经过透析前的 LNPs 和透析后的 LNPs 中的总 RNA

结 论

Stunner 是一款强大的 LNP 分析工具, 搭载 RADLS 功能以揭示以前看不见的聚集物的存在, 以及 UV-Vis 功能可以提供荷载信息。

现在您已经看到通过 Stunner 进行总 RNA 定量可以节省多少时间、金钱和精力, 以及如何用它来替代一半的荧光染料测定工作流程。将 12 个样品加载到 Stunner 板上仅需 5 分钟, 而使用典型的 DLS 仪器则需要大量的人工操作时间。简化的 RiboGreen 测定方法仅需要 114 次的移液操作, 而标准的 RiboGreen 板则需要 266 次, 而且该板的准备时间仅需 15 分钟或更短, 而经典的测定方法则需要 45 分钟以上。

不需要表面活性剂, 减半的加样数, 以及快速生成数据使得高通量筛选成为可能, 不仅不影响准确性, 且能提供比以往更多的信息!

附 录

1. LNP 样品制备

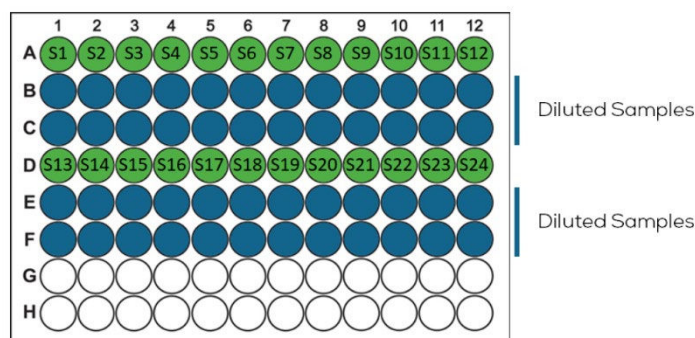
Sunscreen 的 LNP 合成参数:

Parameter	Setting
Sunny	100X
Total Flow Rate	8000 µL/min
Flow Rate Ratio (Aqueous:Organic)	3:1
Collection Volume	800 µL
Head + Tail Cuts	100 µL

配方信息:

将 100 μL 稀释后的样品加入到原始样品稀释下方的 B 行和 C 行中（对于第 13–24 个样品，加入到 E 行和 F 行中）。

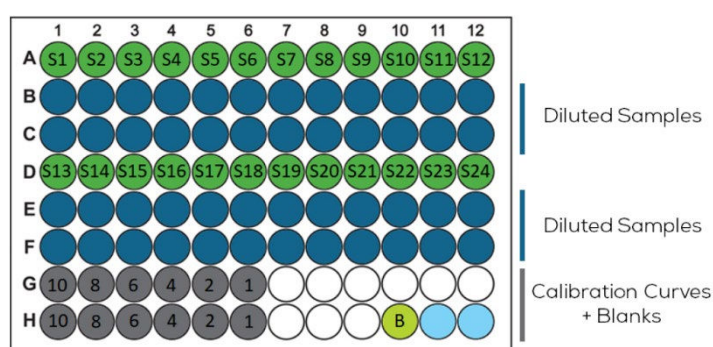
注意：如果样品不在同一板上进行稀释，A 行和 D 行还可以额外用作样品测量孔，将板的通量增加到 36 个样品。



2.3 RiboGreen 设置校准曲线和空白对照

在 G 行和 H 行中以重复方式构建校准曲线——将 10、8、6、4、2 和 0 μL 的 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA 储备液以 TE 缓冲液稀释到 100 μL ，分别加入到 G1–6 孔中，并在 H1–6 孔中重复。

在 H10 孔中加入 10 μL 样品缓冲液和 240 μL TE 缓冲液。然后将 100 μL 此溶液分别加入到 H11 和 H12 孔中。这是样品空白对照。



RiboGreen 标准品的浓度：

20 µg/mL RNA Stock to Add	TE buffer to add (µL)	Final RNA Conc. (µg/mL)
10	90	1
8	92	0.8
6	94	0.6
4	96	0.4
2	98	0.2
1	99	0.1

2.4 制备和添加 RiboGreen 溶液

为了计算所需的 RiboGreen 试剂量，将要测量的孔总数乘以 100 µL。例如，上述的整板需要 48 个孔用于样品测量，12 个用于校准曲线，2 个用于空白，总共 62 个孔，因此需要 6.2 mL 的 RiboGreen 溶液。再加上 500 µL 以弥补损耗。制备 RiboGreen 溶液时，将 RiboGreen 染料以 1:100 的比例稀释在 1x TE 缓冲液中，并涡旋混合。向每个要测量的孔中加入 100 µL 稀释后的 RiboGreen 溶液。

2.5 样品测量

避光孵育 5 分钟，保持室温，然后使用荧光读板仪进行测量，设置如下：

Parameter	Setting
Excitation	485 nm
Emission	528 nm
Optics	Top Read

2.6 样品分析

将空白平均值从所有校准曲线和样品孔中减去。绘制校正后的校准曲线，并将截距设为 0。使用梯度计算板上每个样品的平均浓度 (RNA_{plate} ，公式 1)，并考虑稀释因素 (公式 2)：

$$1 \quad \frac{\text{Sample Fluorescence}}{\text{Calibration Curve Gradient}} = RNA_{plate}$$

$$2 \quad RNA_{plate} \times 56 = RNA_{free}$$

接下来可以使用公式（公式 3）评估封装效率（EE%）：

$$3 \quad \frac{(RNA_{total} - RNA_{free})}{RNA_{total}} \times 100\% = EE\%$$

RNA_{total} 由 Stunner 提供，而 RNA_{free} 由 RiboGreen 检测提供。



Unchained Labs
4747 Willow Rd.
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, Sunscreen, Sunshine, Sunny and Sunnies 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