

## 通过 Stunner AF 单次检测获得 LNP 的包封率、粒径及更多信息

### 简介

包封率 (EE%) 是脂质纳米颗粒 (LNP) 表征的关键步骤，但传统的荧光染料检测法速度慢、操作繁琐且通量低，严重拖累研发进程。若再进行逐个样品的粒径检测，研发效率更是雪上加霜。

Stunner AF 将荧光检测、紫外/可见光谱法吸收 (UV/Vis) 和旋转角度动态光散射 (RADLS) 技术整合到同一平台中，可在低体积、高通量的微孔板平台上一次获取 EE%、总 RNA、游离 RNA、粒径、多分散指数 (PDI) 及颗粒浓度等数据 (图 1)。



图 1：Stunner AF——LNP 定量与粒径分析的理想工具

本应用报告详述 Stunner AF 如何简化 LNP 表征流程、节省时间，并实现无需表面活性剂或颗粒破坏的高精度单次检测。

### Stunner AF 一体化解决方案

Stunner AF 是一款能在同一 2  $\mu\text{L}$  微孔板中同步完成荧光、UV/Vis 和动态光散射检测的系统 (图 2)。荧光检测旨在与核酸荧光染料配合使用, 以定量样品中存在的游离 RNA。总 RNA 通过测量紫外/可见吸光度, 然后使用先进的 Unmix 算法从其他成分 (如胆固醇或浊度) 中解析出 RNA 吸光度来检测。Stunner AF 配备了 RADLS, 可在每次读取中从多个角度收集静态和动态光散射数据。在动态光散射中, 多个角度有助于检测较大颗粒 (如 LNP) 的粒径和多分散指数 (PDI), 并对存在的较大聚集体高度敏感。收集静态光散射的多角度数据是一种基于多角度光散射 (MALS) 的方法, 为 Stunner AF 提供计算 LNP 颗粒浓度所需的信息。

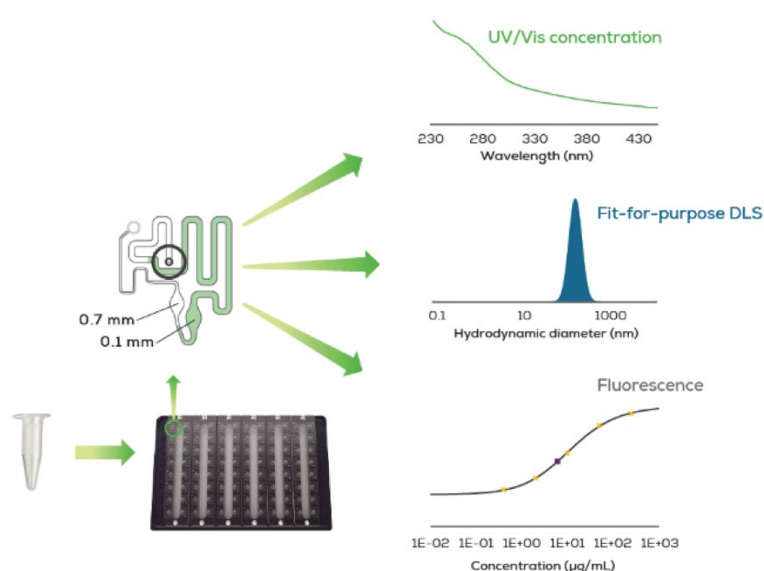


图 2: 96 孔板中的微流路设计使 Stunner AF 能同步获取 EE%、粒径、PDI、游离及总 RNA 数据

## 单次检测

使用多种阳离子脂质的 12 个 LNP 样品在“RNA-LNP 包封效率”应用程序上运行, 在获取粒径、多分散指数和颗粒浓度的基础上还能通过游离和总 RNA 的定量同时表征包封率 (图 3)。对于 12 个样品, 制作 6 点标准曲线、稀释样品和上样的总准备时间为 26 分钟, 读取数据的无人操作时间为 1 小时 15 分钟。

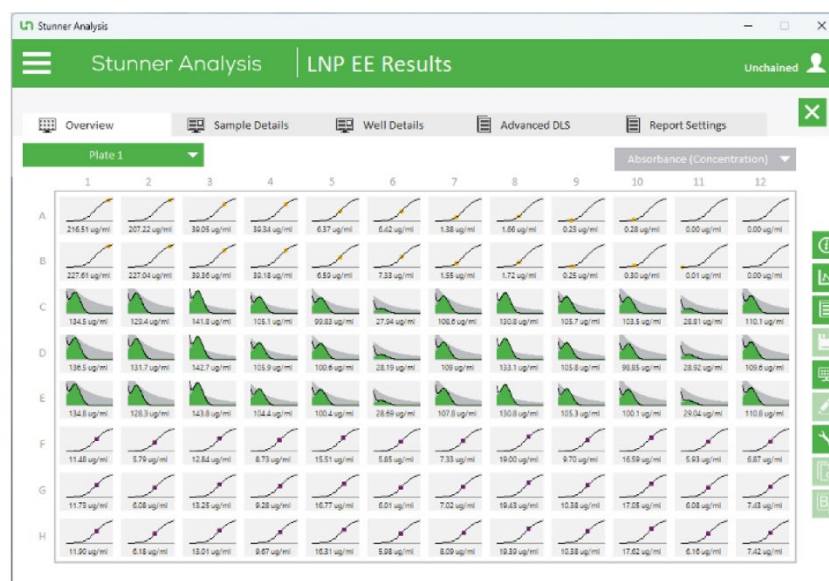


图 3：12 个 LNP 样品检测结果。前两行为四重复标准曲线，C、D、E 行是通过紫外/可见光谱法检测测量总 RNA 浓度的三重复孔。F、G、H 行是通过荧光光检测测量游离 RNA 浓度的三重复孔

游离 RNA 通过 RiboGreen® 荧光染料法得到 6 浓度点标准曲线进行定量（见方法部分）。每个孔的绿色荧光信号被测量，并根据参考标准样品进行 4 参数拟合自动评估。12 个三重复样品的中位变异系数 (% CV) 为 2.7%。

总 RNA 浓度通过紫外/可见光谱法检测确定，无需使用任何表面活性剂或进行颗粒破坏。有效载荷浓度（总 RNA-游离 RNA）的中位变异系数为 0.6% (图 4)。

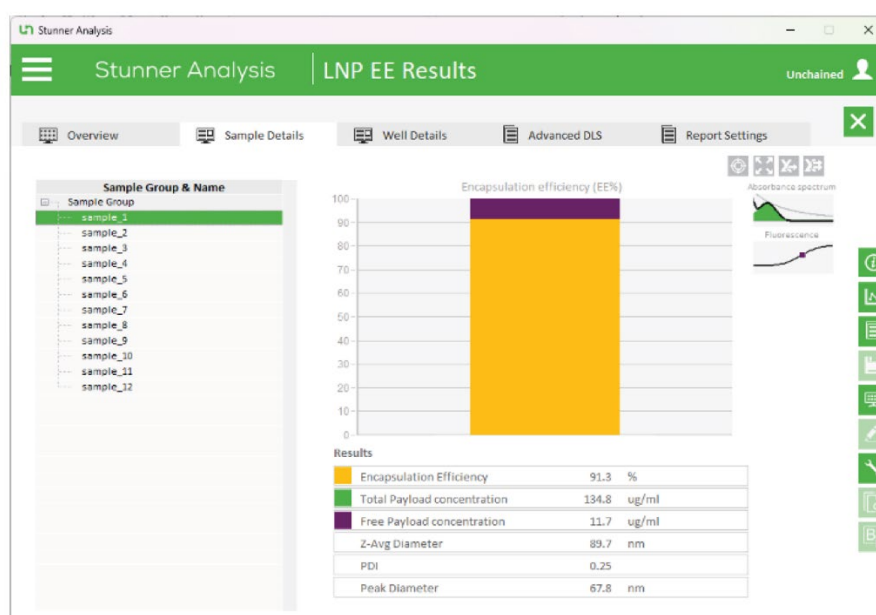


图 4：每个 LNP 样品的表征截图，在单一视图中汇总了 EE%、总有效载荷和游离有效载荷、浓度和粒径结果

通过荧光和紫外/可见光谱法检测进行定量后，Stunner AF 能轻松为每个样品计算包封率（图 5）。Stunner AF 使用为游离和总 RNA 确定的中位浓度值来计算包封率。由于每个样品都通过多种生物物理技术进行分析，Stunner AF 会对所有信息进行汇总，同时显示包封率以及定量和粒径数据。只需一次点击，即可深入了解每个孔的详细信息，这些信息也可在结构化的 Excel 报告中获取。

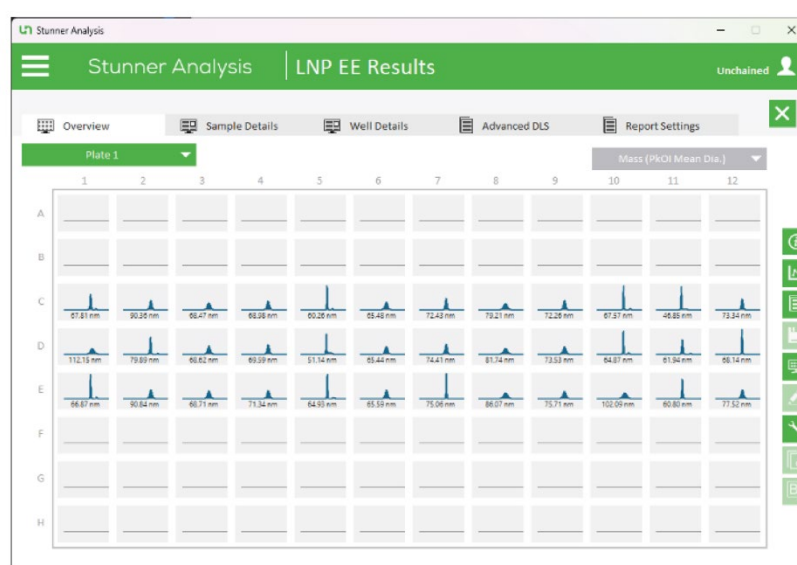


图 5：12 个 LNP 样品（三重复）的质量粒度分布，这些样品不需要稀释，也无需加入荧光染料

Stunner AF 采用最先进的旋转角动态光散射技术，拥有市场上最灵敏的动态光散射功能。对 LNP 的完整旋转角动态光散射分析使用 7 个角度来捕捉后向和前向散射光，为您提供样品粒径的角度无关分析以及颗粒计数。为了快速筛选颗粒粒径，Stunner AF 仍能简化操作，通过单一角度快速获取粒径数据。

## Stunner AF 与传统方法的对比

与 Stunner AF 类似，读取包封率的传统方法也依赖于使用荧光染料对游离 RNA 进行定量，但需要表面活性剂破坏颗粒以测量总 RNA 浓度。在三种 LNP 制剂上，一种包含 SM-102，一种包含 MC3，以及一种阳离子 LNP，将 Stunner AF

与在荧光平板读数仪上进行的传统包封率检测进行了测试比对。此外，SM-102 制剂还加入了不同量的游离 RNA（低量和高量），这直接反映在包封率测量中。两种系统上的包封率值（图 6）具有可比的结果。

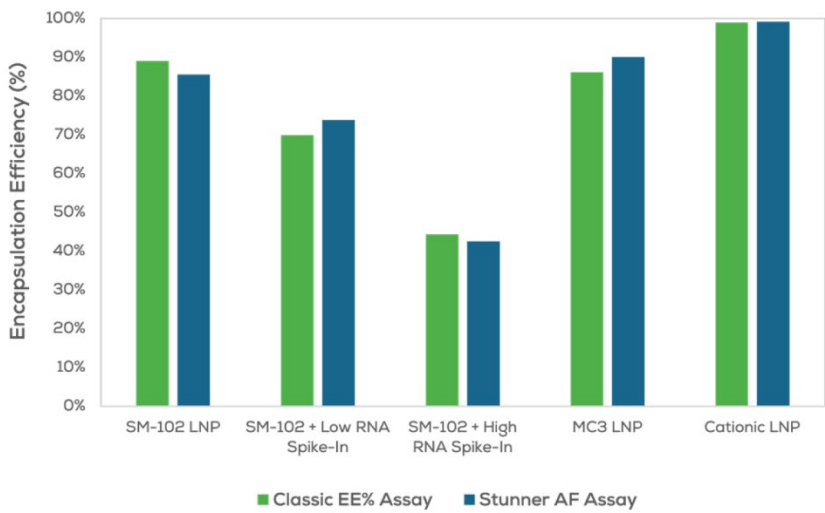


图 6：三种 LNP 制剂以及两种游离 RNA 加标条件下，在荧光平板读数仪上进行的传统包封效率检测与 Stunner AF 测量的对比

除了与传统的逐个进行的包封率方法相当外，使用 Stunner AF 进行表征所需的实际操作时间和总时间显著减少（表 1 和表 2 显示了 12 个样品节省的时间）。实际操作时间的大部分节省来自于将浓度测量与板式旋转角动态光散射相结合 Stunner AF 可将实际操作时间减少数小时。由于 Stunner AF 包封率检测的超简单设计，并且无需添加表面活性剂和孵育步骤，即使是 Stunner AF 上包封率检测所需的实际操作时间也更少——Stunner AF 方法大约节省了 1 小时。

| Classic Method           | Hands-on Time | Total Time |
|--------------------------|---------------|------------|
| One-by-One DLS           | 1-2 hours     | >2 hours   |
| Full Dye-Based EE% Assay | 1.5 hours     | 1.5 hours  |
| Total                    | > 2 hours     | ~3 hours   |

表 1：12 个样品三重检测包封效率、粒径、有效载荷浓度和颗粒浓度的估计时间

| Stunner AF | Hands-on Time | Total Time |
|------------|---------------|------------|
| EE% & Size | 30 minutes    | 1.5 hours  |

表 2：12 个样品三重检测包封效率、粒径、有效载荷浓度和颗粒浓度的时间

## LNP 生产的全面呈现

为了展示 Stunner AF 的实际应用，使用“RNA-LNP 包封率”应用程序对三种不同的 LNP 制剂进行了表征（图 7）。两种可电离（SM-102 和 ALC-0315）脂质制剂显示颗粒的 Z 平均直径约为 67 nm，而阳离子（DDAB）LNP 制剂产生的颗粒更大，直径为 106 nm。所有三种制剂的包封效率都在 90% 以上。然而，对于此次制备的 LNP，DDA 的 RNA 有效载荷浓度明显较低，仅包封了约 13  $\mu\text{g/mL}$  的 RNA，约为两种可电离 LNP 制剂平均包封 41  $\mu\text{g/mL}$  RNA 的三分之一。颗粒浓度与平均直径呈反比关系，较小的可电离 LNP 具有较高的颗粒浓度，反之亦然。

此外，这三种制剂被用来比较荧光平板读数仪和 Stunner AF 获得的包封率之间的差异。在这三种制剂中，包封率相差在 4% 以内，两种方法都表明包封率大于 90%（图 8）。

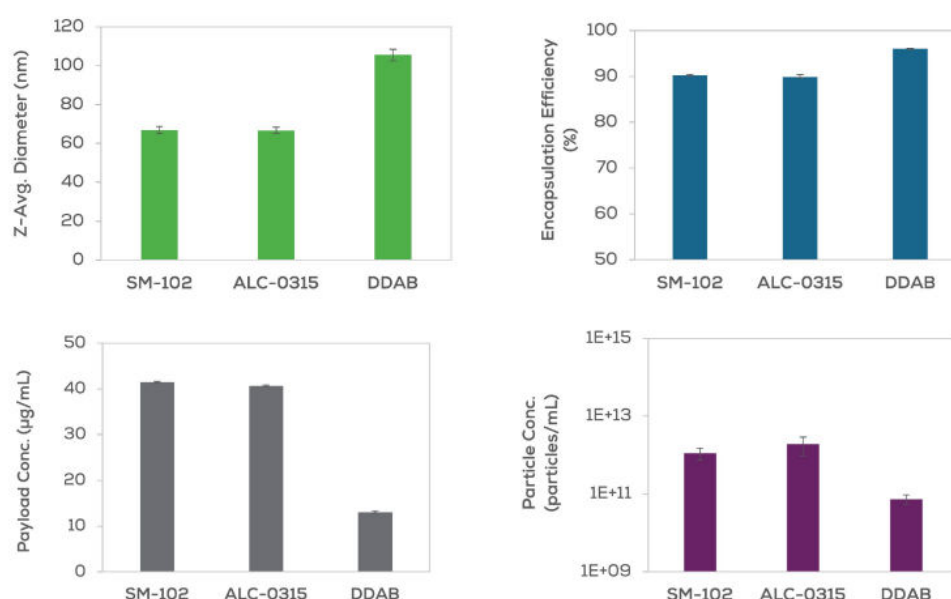


图 7：三种 LNP 制剂在粒径、包封率、有效载荷浓度和颗粒浓度方面的比较

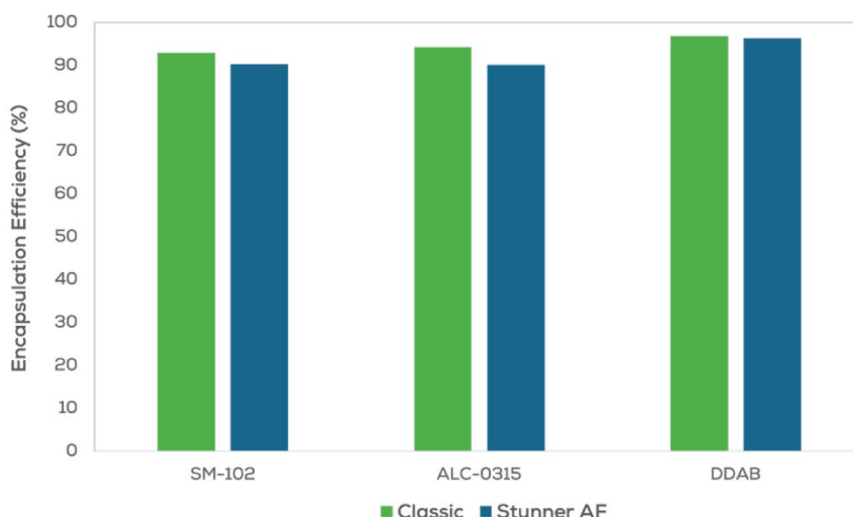


图 8：荧光平板读数仪上的传统包封率检测或 Stunner AF 测量的三种 LNP 制剂的包封率

## 结 论

Stunner AF 是 LNP 分析的无与伦比的工具，凭借旋转角动态光散射可检测到以前看不见的聚集体，通过紫外/可见光谱法和荧光检测可提供包封率和有效载荷信息。Stunner AF 将粒径检测和 RNA 定量整合到单一仪器中，旨在取代 LNP 表征工作流程中的限速检测，从而节省时间和精力。无需表面活性剂、设置简单且能快速生成数据的完整表征，使高通量筛选成为现实，并且能获得比以往更多的信息。

## 方 法

本文的数据是通过 Stunner AF 的“纳米颗粒”选项中提供的“RNA-LNP 包封率”或“RNA-LNP 包封率筛选”应用程序生成的。

每个实验的样品布局各不相同。作为平板布局的一个示例，图 9 所示的平板有三重复紫外/可见光谱法样品（绿色）、三重复荧光样品（紫色）和获取带有 5 个点和 1 个零点的标准曲线所需的四重复参考样品（黄色）。使用自动空白扣除，可省略紫外/可见光谱法空白（蓝色）。如有需要，所有样品可采用单次重复（包括零荧光和非零荧光样品）。如果需要更高的通量（例如，每个实验 > 44 个样品），

标准曲线的参考样品、荧光样品、紫外/可见光谱法样品和空白可以位于单一实验中的多个微流控板中。

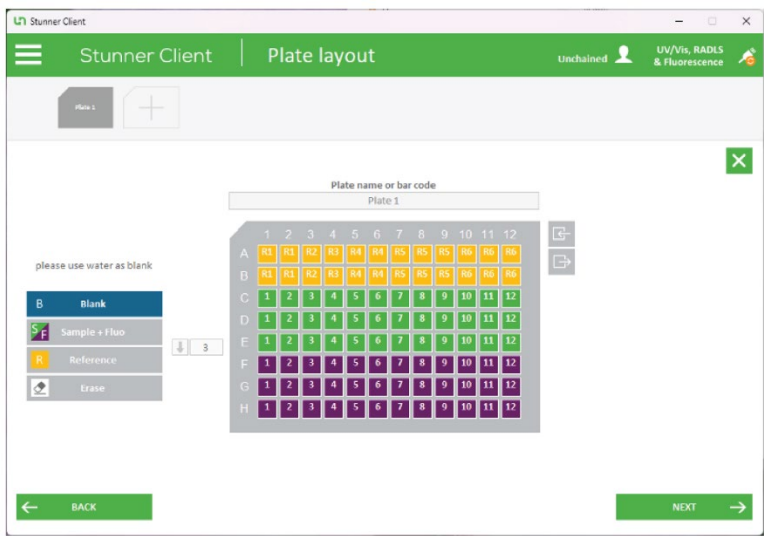


图 9：Stunner AF 微孔板布局，展示了三重复紫外/可见光谱法样品（绿色）、三重复荧光样品（紫色）和四重复参考样品（黄色）

所使用的 RNA 载荷包括：5’-甲氧基假尿苷 eGFP mRNA（浓度系数=41.65 (ng/μL)\*cm)、polyA（浓度系数= 29.4 (ng/μL)\*cm) 或 RNA 适配体 Broccoli（浓度系数= 40 (ng/μL)\*cm)。当通过紫外/可见光谱法进行定量时，Stunner AF 会自动针对包封对 RNA 的影响所导致的减色效应进行调整。对于 6 点标准曲线，通常使用高范围或中范围稀释系列：

|                       | High Range | Mid Range  | Low Range  |
|-----------------------|------------|------------|------------|
| Dilution Factor (1/x) | 5          | 4          | 3          |
| Standard 1            | 250 μg/mL  | 100 μg/mL  | 20 μg/mL   |
| Standard 2            | 50 μg/mL   | 25 μg/mL   | 6.67 μg/mL |
| Standard 3            | 10 μg/mL   | 6.25 μg/mL | 2.22 μg/mL |
| Standard 4            | 2 μg/mL    | 1.56 μg/mL | 0.74 μg/mL |
| Standard 5            | 0.4 μg/mL  | 0.39 μg/mL | 0.25 μg/mL |
| Standard 6            | 0 μg/mL    | 0 μg/mL    | 0 μg/mL    |

将 Unchained Master Mix 与 RiboGreen®以 1:60 的稀释比例混合以创建工作溶液。对于包含 12 个 LNP 样品的 1 个微流控样品板，您至少需要 360 μL 的工作溶液。要制备 390 μL 过量的工作溶液：向 383.5 μL 的 Master Mix 中加入 6.5 μL 的 RiboGreen®。

向 20  $\mu\text{L}$  的混合工作溶液中加入 5  $\mu\text{L}$  每个荧光样品（平板图中的紫色）或参考标准样品（黄色），以制备用于荧光定量的样品。紫外/可见光谱法样品（绿色）既不添加 Master Mix 也不添加染料，直接使用原液浓度测定总 RNA 载药量和粒径参数。

LNP 在 Sunscreen 上制备，使用多种制剂，包括 SM-102、ALC-0315、DLinMC3-DMA 和阳离子脂质，以及 PEG 化脂质、胆固醇和辅助脂质。



Unchained Labs  
4747 Willow Rd.  
Pleasanton, CA 94588  
Phone: 1.925.587.9800  
Toll-free: 1.800.815.6384  
Email: [info@unchainedlabs.com](mailto:info@unchainedlabs.com)

© 2025 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo, Stunner, Sunscreen and 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