

用 Stunner AF 同步获取 pDNA-LNP 的粒径与包封率 (EE%)

简介

脂质纳米颗粒 (LNP) 的表征很容易变得难以掌控。通常需要在多台仪器上、通过繁琐复杂的流程，并对 LNP 进行破坏或稀释，方能评估六项甚至更多的关键质量属性 (CQA)。若再叠加逐个样品采集的粒径信息，研发进度将明显放缓。继 COVID-19 mRNA-LNP 疫苗取得成功之后，业界对拓展至其他核酸载荷的关注日益增加。其中包括质粒 DNA (pDNA)：其成本低于 mRNA，却更易于运输，且可沿用相似的 LNP 配方^①。一套平台化的 LNP 表征方案，若能提供多项测量并兼容不同的核酸载荷，将简化研发流程并加速 pDNA-LNP 的应用推广。pDNA-LNP 的包封率 (EE%) 定量尤为困难。用表面活性剂破坏 pDNA-LNP 可能改变载荷的异构体形态 (isoform)，进而改变其与 EE% 检测常用荧光染料之间的亲和力^②。因此，单一标准曲线往往难以同时满足破坏前游离 pDNA 与破坏后总 pDNA 的定量需求，可能导致 EE% 结果失真、延误增加，甚至引发更严重的问题。

Stunner AF 将高通量 UV/Vis、旋转角度动态光散射 (RADLS) 与荧光检测集成于一体，可同时获得 EE%、总核酸、游离核酸、粒径、多分散性及颗粒浓度；全部在一个低样品量、高通量、基于微孔板的平台上完成 (图 1)。尤为重要的是，无需稀释、也无需用表面活性剂破坏 LNP 即可获得结果，且对 RNA 与 DNA 同样适用。表征流程的简化，意味着可在更短时间内检测更多样品，更早确定最优的 pDNA-LNP。



图 1: Stunner AF——LNP 定量与粒径表征的理想工具

本应用文章详细阐述 Stunner AF 如何简化 pDNA-LNP 的表征：无需表面活性剂、无需破坏样品，单次读取即可获得 5 项 CQA 的精确结果。

方 法

为制备 LNP，将 SM-102、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DSPC)、胆固醇和 DMG PEG-2000 按 50:10:38.5:1.5 的比例配制，在乙醇中的浓度为 6.2 mg/mL。质粒 DNA (pAAV-Helper, GenScript) 溶于 50 mM、pH 4 的乙酸盐缓冲液中，最终浓度为 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，氮磷比 (N/P) 为 6.4。LNP 在 Sunscreen 上使用 Sunny 190X，以 3:1 (水相:有机相) 的流速比 (FRR) 和 10 mL/min 的总流速 (TFR) 一式三份合成。合成后，每个 LNP 样品于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下隔夜透析至 1X 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中。所有指标均一式三份测量，在 Stunner AF 的 Nanoparticle EE 或 DNA-LNP 应用上，使用纯水或自动空白扣除 (auto-blanking) 完成。

将透析前的平均总 pDNA 浓度与每个 LNP 样品 67.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的预期产出浓度相比较，按下式计算产率 (% yield)：

$$\text{产率 (\%)} = [\text{总 pDNA}] / [\text{预期产出 pDNA}] \times 100$$

LNP 样品的流体力学粒径、多分散性，以及总 pDNA、游离 pDNA 和颗粒浓度均于透析后测定。包封 pDNA 与 EE% 由 Stunner Analysis 软件根据总 pDNA 和游离 pDNA 的中位数计算得出。为制备用于荧光法测量游离 pDNA 的 LNP，将 Unchained Master Mix 与 RiboGreen® 按 1:60 稀释混合，配成工作液

(Working Solution)。取每个 LNP 样品或参比标准品 5 μL ，加入 20 μL 工作液中。总 pDNA 则由未稀释的 LNP 样品测定，使用经解卷积 (deconvoluted) 的 A260 值和 50 (ng/ μL)*cm 的浓度系数。Stunner AF 将自动校正增色效应 (hyperchromicity)，以补偿包封对 UV/Vis 定量 pDNA 时所带来的影响。

所有粒径、PDI 和颗粒浓度数据均由 RADLS 采集。所用缓冲液的黏度和折射率分别为 20 $^{\circ}\text{C}$ 下的 1.002 cP 和 1.334，并采用 7 个角度、5 次采集、每次 1 秒的默认采集设置。所示的 Z-average 直径取自 162 $^{\circ}$ 的最大角度，颗粒浓度则取自数量分布 (numbers distribution) 的目标峰 (PkOI)。

结 果

Stunner AF 在单台仪器、单个应用中即可提供 5 项 CQA，缩短手动操作时间、简化工作流程，从而显著加快 pDNA-LNP 的表征。一式三份 pDNA-LNP 样品的流体力学粒径与多分散性 (图 2A) 为 115 ± 2.7 nm，PDI 为 0.15 ± 0.02 。粒径的相对标准偏差 (RSD) 为 2.3%，PDI 低于 0.2，表明 pDNA-LNP 中不含大粒径聚集体。

不同异构体的质粒 DNA 与荧光染料的相互作用各不相同，从而导致荧光输出的差异^②。而标准 EE%检测所必需的“用表面活性剂破坏 pDNA-LNP”这一步骤，可能改变载荷的异构体形态。这使得 pDNA-LNP 的 EE%测定颇具挑战，因为单一标准曲线对裂解前、后的核酸定量未必都准确。Stunner AF 测量总 pDNA 浓度时无需裂解步骤，因其采用 UV/Vis 定量，即使 pDNA 仍处于包封状态亦可正常测定。由此消除了上述难题，并大幅简化工作流程。以 Sunscreen 制备的一式三份 pDNA-LNP，其 EE%表现优异：三份样品均超过 96%，平均达 $97\pm 0.9\%$ (图 2B)。包封 pDNA 浓度同样保持一致，三批 LNP 制备的平均值为 38.8 ± 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 2C)。

单角度 DLS 可提供粒径和多分散性，而 RADLS 还能测定颗粒浓度——后者与剂量、生物利用度和效力密切相关。Stunner AF 的 LNP 应用提供两种选择：以单角度 DLS 快速获得粒径结果，或在需要更全面表征时采用 RADLS。以 Sunscreen 制备的三批 LNP，其平均颗粒浓度为 $8.0\text{e}10\pm 2.7\text{e}10$ particles/mL

(图 2D)。

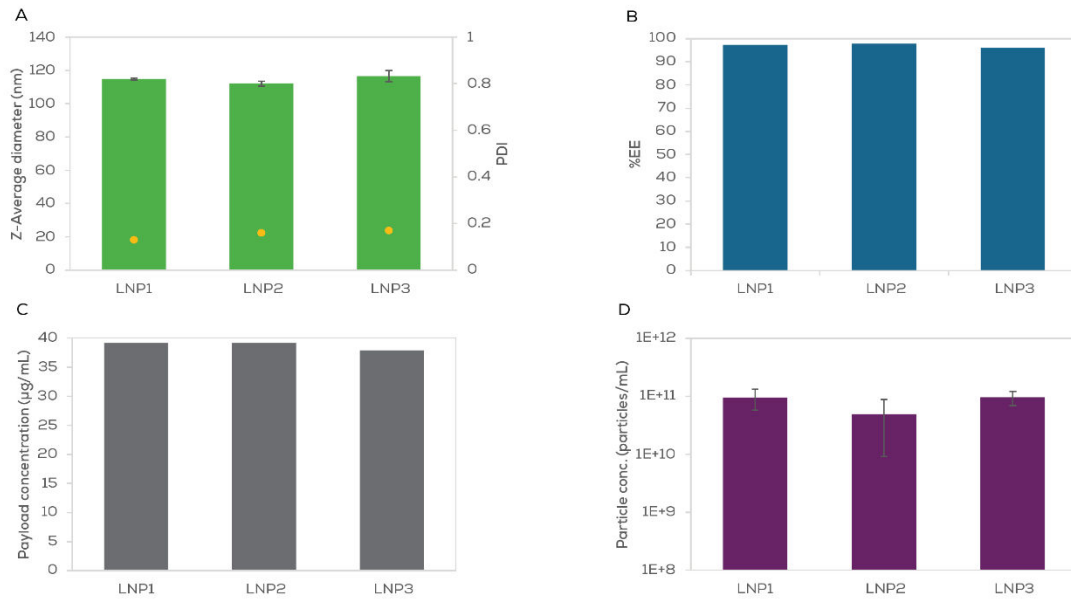


图 2：以 Sunscreen 制备的一式三份 pDNA-LNP 样品的粒径、多分散性 (A)、EE% (B)、包封载荷浓度(C) 和颗粒浓度(D)。误差棒为 Stunner AF 上 3 次重复测量的标准偏差

Sunscreen 能以可重现的高产率稳定制备 pDNA-LNP，从而节省宝贵的核酸载荷。所有 pDNA-LNP 的产率均不低于 80%，平均为 $87 \pm 5.6\%$ (图 3)。

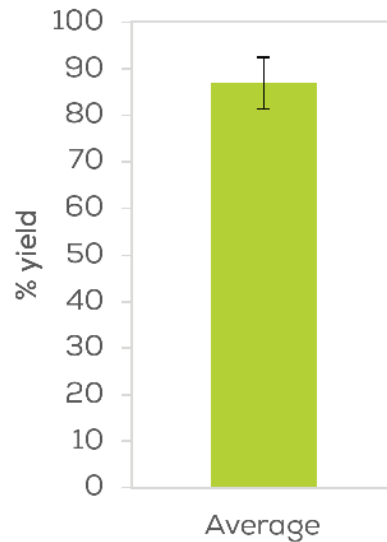


图 3：以 Sunscreen 制备的一式三份 pDNA-LNP 样品的平均产率。误差棒为标准偏差

结 论

当必须使用多台仪器、采用复杂流程时，pDNA-LNP 的表征会相当繁琐，尤其是在需要建立多条荧光标准曲线以测量裂解前后 pDNA 浓度的情况下。而 Stunner AF 仅需单个应用、单台设备、单一流程即可完成粒径、多分散性、载荷浓度、EE%和颗粒浓度的测定，且无需裂解。Sunscreen 则是 Stunner AF 的理想搭档，可高通量稳定地产出 pDNA-LNP。二者协同，能以更少的时间与精力胜任各类 LNP 项目，并适用于任何载荷。

参考文献

1. The Expression Kinetics and Immunogenicity of Lipid Nanoparticles Delivering Plasmid DNA and mRNA in Mice. W Zhang, et al. *Vaccines*. 2023; 11(10):1580.
2. Quantitation of supercoiled circular content in plasmid DNA solutions using a fluorescence-based method. MS Levy, et al. *Nucleic Acids Research*. 2000; 28(12):e57.



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

© 2026 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo and Sunscreen and Stunner AF are trademarks and/or registered trademarks of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.