

# 使用 Agilent BioTek Synergy Neo2 Hybrid 多功能微孔板检测仪测定脂质纳米颗粒表观 pKa

## 作者

Suresh Babu C. V. 和  
Ravindra Gudihal  
安捷伦科技有限公司

Li Zhang 和 Yi Yan Yang  
新加坡科技研究局生物处理  
科技研究院

## 摘要

脂质纳米颗粒 (LNPs) 已被用作各种有效载荷的递送系统。本应用简报展示了 Agilent BioTek Synergy Neo2 Hybrid 多功能微孔板检测仪用于测定 mRNA LNPs 表观 pKa 的实用性。

## 前言

最近, LNPs 作为 mRNA 递送的平台受到极大关注<sup>[1]</sup>。这些基于脂质的 mRNA 纳米颗粒由可电离脂质、辅助脂质、胆固醇和 PEG 脂质构成。可电离脂质在 LNPs 的形成过程中发挥着重要作用。可电离脂质的 pKa 是影响 mRNA LNPs 功效的关键特征之一。pKa 控制组装的 LNPs 在电离和表面电荷方面的行为。LNPs 的表面电荷以及可电离脂质不仅影响核酸的包裹, 而且影响细胞内递送。

为了解 LNPs 的电荷行为, 测量可电离氨基脂质的电荷态并测定其 pKa 至关重要。为测定 LNP 或脂质的 pKa, 使用阴离子荧光染料 6-(对甲苯胺基)-2-萘磺酸 (TNS) 测定法测量表面电离<sup>[2]</sup>。在本应用简报中, 展示了 Synergy Neo2 Hybrid 多功能微孔板检测仪用于测量 mRNA LNP pKa 的用途。

## 实验部分

### 材料与amp;方法

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、柠檬酸、3-(环己基氨基)-2-羟基-1-丙磺酸 (CAPSO)、氯化钠、盐酸、6-(对甲苯胺基)-2-萘磺酸钠盐 (TNS)、甲醇和二甲基甲酰胺 (DMF) 购自 Sigma-Aldrich。6-((2-己基癸酰基)氧基)-N-(6-((2-己基癸酰基)氧基)己基)-N-(4-羟丁基)己烷-1-胺 (ALC-0135)、8-((2-羟乙基)[6-氧代-6-(十一烷氧基)己基]氨基)辛酸 9-十七烷基酯 (SM-102)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DSPC)、1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000 (DMG-PEG 2000)、1,2-二油酰-3-三甲铵-丙烷 (DOTAP) 和胆固醇购自 MedChemExpress。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

### mRNA LNPs 的制备

使用与 Spikevax (Moderna 首创的 COVID-19 疫苗) 相同的组成制备 mRNA LNPs。从 PCR 扩增的 dsDNA 模板体外转录获得 mRNA, 将其用离心柱 (Monarch RNA 净化试剂盒, New England Biolabs) 纯化, 然后溶于 1 mmol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 4.7) 中形成水相。

对于 Spikevax 制剂<sup>[3]</sup>, 将 SM-102、DMG-PEG 2000、DSPC 和胆固醇 (购自 MedChemExpress) 按 50:1.5:10:38.5 的摩尔比溶于乙醇中以形成有机相。将 mRNA 分散于 25 mmol/L 乙酸钠中以形成水相。将两相用台式微流控装置 (NanoAssemblr 平台, Precision NanoSystems) 按 3:1 的体积比混合, 总流速为 12 mL/min。N:P 比为 5.67:1。然后, 用 20 mmol/L tris (pH 7.4) 替换所形成的 mRNA LNPs 的缓冲液, 并通过超速离心管 (截留分子量为 30 kDa) 在 4 °C 和 2500 × g 下浓缩 60 min, 使总脂质浓度约为 4 mg/mL。所形成的 mRNA LNPs 在荧光测量前保存于 -80 °C。

### 荧光检测

荧光测量采用配备 Agilent BioTek Gen5 软件 (版本 3.12.08) 的 BioTek Synergy Neo2 Hybrid 多功能微孔板检测仪。将激发固定在 321 nm (5 nm 带宽) 并以 1 nm 的增量改变发射波长, 来进行发射光谱扫描。采用微孔板检测仪在默认带宽下, 以激发波长 321 nm 和发射波长 445 nm 进行基于单色器的终点测定。孔板移动后, 使用 0 ms 延迟从顶部采集数据。

### TNS 分析

测定由 SM-102/DSPC/胆固醇/DMG-PEG (摩尔比 50:10:38.5:1.5) 构成的 mRNA LNPs 中可电离脂质的 pKa。在蒸馏水中制得 100 μmol/L TNS 储备液。将 20 mmol/L 磷酸钠、20 mmol/L 柠檬酸盐、20 mmol/L CAPSO 和 150 mmol/L NaCl 溶液滴定至 pH 值在 pH 3.0–10.0 的范围内改变 0.5 个单位, 并将其等量加入 96 孔板中。将 LNPs 和 TNS 用这些溶液稀释至最终浓度分别为 30 μmol/L 和 6 μmol/L。在 Synergy Neo2 上, 分别在 321 nm 和 445 nm 的激发和发射波长下测量荧光强度。对归一化荧光数据进行 S 形最佳拟合分析, 并将 pKa 作为引起半数最大荧光强度的 pH 值测量。

## 结果与讨论

TNS 在水溶液中无荧光，而在有机溶剂中则表现出高量子产率。图 1 显示了 DMF 中 TNS 的发射光谱，并示出 426 nm 处的发射峰。选择 DMF 溶剂以获得高荧光强度信号。通常，随着溶剂极性的增加，发射光谱向更长波长移动。

分析 LNP 中的 pH 影响和表面电荷的标准方法是测量脂质-TNS 结合所产生的荧光。当 TNS 与阳离子脂质相互作用时，荧光明显增强。低 pH 引起 TNS 与阳离子表面相互作用增加，从而增强荧光。当所有可电离基团在特定 pH 下均带电荷时，荧光达到最大值。在更高的 pH 值下，LNPs 将不带电荷。荧光水平与 LNP 质子化程度直接相关，最低和最高水平分别对应 LNPs 无质子化和 100% 质子化。由 TNS 测得的表现 pKa 值代表 LNP 表面处可电离脂质的 pKa 特征。

ALC-0135 和 SM-102 为 LNP 制剂中使用的可电离脂质。首先，用这些脂质对 TNS 测定法进行验证，对 pKa 值进行了测定。图 2 显示了 ALC-0135 和 SM-102 的 TNS 荧光滴定曲线。ALC-0135 和 SM-102 脂质均显示可电离，其 pKa 值分别为 6.09 和 6.55<sup>[4]</sup>。

由于存在不可电离的脂质以及可电离脂质电子密度的变化，单个可电离脂质的表面电荷与 LNPs 有所不同。接下来，考察了载有 mRNA 的 LNPs 中包含的可电离脂质的表面 pKa。LNP 脂质组合物由 SM-102/DSPC/胆固醇/DMG-PEG 2000（摩尔比分别为 50:10:38.5:1.5）组成。图 3 显示了不同 pH 值下 mRNA LNPs 的 TNS 荧光滴定曲线。正如预期，在低 pH 下，SM-102 LNPs 含有可电离基团并会带正电荷，从而抑制 TNS 自淬灭并产生强荧光信号。在高 pH 下，SM-102 LNPs 将会不带电荷。发现 mRNA LNP 表面 pKa 值约为 6.75，与文献一致<sup>[5]</sup>。由于 DOTAP 是一种阳离子脂质且含有永久带电基团，因此预期在所有 pH 水平下均具有高荧光。

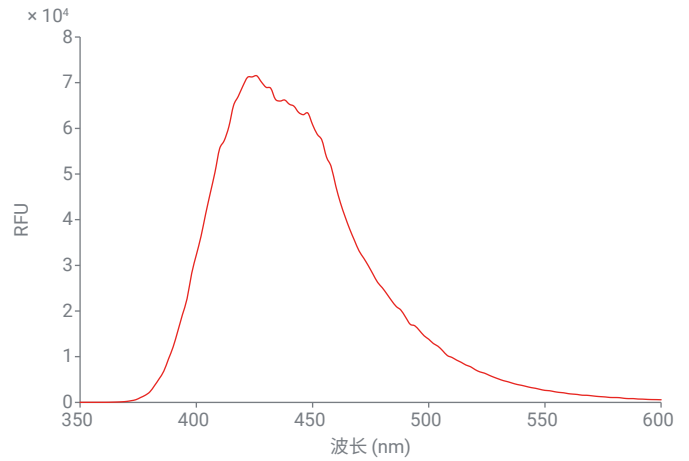


图 1. DMF 中 TNS 的荧光发射光谱

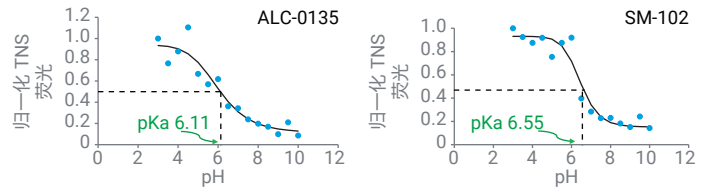


图 2. 可电离脂质的 TNS 荧光滴定曲线

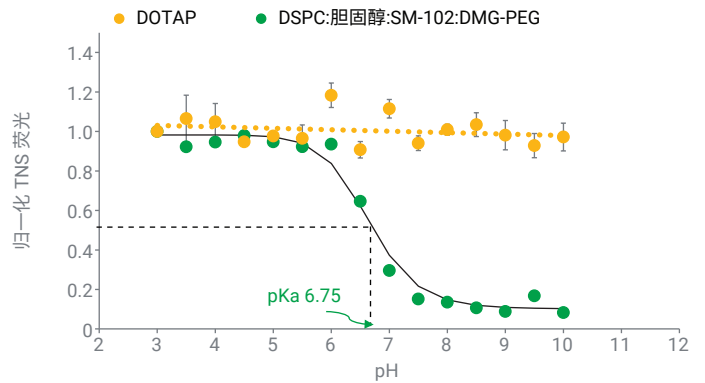


图 3. 不同 pH 值下的 TNS 荧光滴定曲线。绿色圆圈：包裹着萤火虫荧光素酶 mRNA 的 LNP；黄色圆圈：DOTAP。数据表示平均值 ± 标准偏差 (n = 3)

## 结论

本应用简报展示了使用 Agilent BioTek Synergy Neo2 Hybrid 多功能微孔板检测仪测量 mRNA LNP 的表面 pKa。Synergy Neo 2 能够直接测量表面 pKa，所获得的结果与之前的文献高度一致。

## 参考文献

1. Hou, X.; Zaks, T.; Langer, R.; Dong, Y. Lipid Nanoparticles for mRNA Delivery. *Nature Reviews Materials* **2021**, *6*, 1078–1094. DOI: 10.1038/nature01096
2. Patel P.; Ibrahim, N. M.; Cheng, K. The Importance of Apparent pKa in the Development of Nanoparticles Encapsulating siRNA and mRNA. *Trends Pharmacol Sci.* **2021**, *42*(6), 448–460. DOI: 10.1016/j.tips.2021.03.002
3. Hassett, K. J.; Benenato, K. E.; Jacquinet, E.; Lee, A.; Woods, A.; Yuzhakov, O.; Himansu, S.; Deterling, J.; Geilich, B.M.; Ketova, T., et al. Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Molecular Therapy Nucleic Acids* **2019**, *15*, 1–11. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.01.013
4. Maeki, M.; Okada, Y.; Uno, S.; Sugiara, K.; Suzuki, Y.; Okuda, K.; Sato, Y.; Ando, M.; Yamazaki, H.; Takeuchi, M., et al. Mass Production System for RNA-loaded Lipid Nanoparticles Using Piling Up Microfluidic Devices. *Applied Materials Today* **2023**, *31*, 1–11. DOI: 10.1016/j.apmt.2023.101754
5. Suzuki, Y.; Ishihara, H. Difference in the Lipid Nanoparticle Technology Employed in Three Approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 Vaccine) Drugs. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2021**, *41*, 100424. DOI: 10.1016/j.dmpk.2021.100424

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE67998072

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2024  
2024 年 1 月 31 日, 中国出版  
5994-7054ZH-CN