

LNP 包封试剂盒说明书

【产品名称】复方磷脂 M 试剂盒（用于纳米脂质颗粒 LNP 包封）

【英文名称】Ionizable Lipid Mix-M Kit (for Liposome nanoparticle encapsulation)

【简介】

上海澎赞生物科技有限公司提供复方磷脂，由可电离脂质、基础脂质、长循环脂质和胆固醇组成，可用于装载核酸、蛋白、药物的脂质纳米颗粒制备。所制备的脂质纳米颗粒生物相容性好，包封效率高，适用于细胞转染、实验动物注射。

【试剂盒清单】

产品名称	规格
复方磷脂 M, 16 mM (约 10mg/mL)	1 mL
100 mM 柠檬酸缓冲液 (DEPC treated; pH 4.0)	10 mL

【组分信息】

复方磷脂 M (#1) 成分	mol%
DLin-MC3-DMA	50%
Cholesterol	38.5%
DSPC	10%
PEG-2000-DMG	1.5%

柠檬酸缓冲液 (#2) 成分	mM
柠檬酸	66
柠檬酸钠	34

【保存条件】

4°C 密封保存

【制备 LNP 建议实验方案】

1) 复方磷脂 M:

本试剂盒提供的复方磷脂 M 可直接使用。也可以根据需求用乙醇稀释至 12 mM 或 8 mM 进行实验。柠檬酸钠缓冲液 (100mM) 可稀释 1 倍 (终浓度=50mM) 进行使用。

2) 计算核酸用量:

核糖核酸的平均分子量为 339.5，形成 RNA 时脱去一分子水，分子量按 330.5 计算。

脱氧核糖核酸的平均分子量为 327.0，形成 DNA 时脱去一分子水，分子量按 318.0 计算。

计算氮原子数时，仅计算可电离阳离子磷脂。每摩尔复方脂质中含有 0.5 mol 氮原子。

每 mmol 脂质可包裹 RNA 的计算公式为： $\frac{0.5}{[N/P \text{ 比}]} \times 330.5$ ；DNA 为： $\frac{0.5}{[N/P \text{ 比}]} \times 318.0$

N/P 比	每 mmol 脂质可包裹 RNA	每 mmol 脂质可包裹 DNA
N/P=6	27.54 mg	26.50 mg
N/P=8	20.66 mg	19.88 mg
N/P=10	16.53 mg	15.90 mg

RNA 浓度计算公式: $(\frac{0.5}{[N/P \text{ 比}]} \times 330.5 \times \text{磷脂浓度}) / \text{流速比} = \text{RNA 浓度 (ng/}\mu\text{L)}$;

DNA 浓度计算公式: $(\frac{0.5}{[N/P \text{ 比}]} \times 318 \times \text{磷脂浓度}) / \text{流速比} = \text{DNA 浓度 (ng/}\mu\text{L)}$;

以柠檬酸缓冲液/复方磷脂流速比 (FRR) = 3、N/P = 6、磷脂浓度 = 16 mM 为例, 进行核酸使用量的计算:

柠檬酸钠缓冲液中 RNA 浓度: $(27.54 \times 16) / 3 = 146.88 \text{ ng/}\mu\text{L}$;

柠檬酸钠缓冲液中 DNA 浓度: $(26.50 \times 16) / 3 = 141.33 \text{ ng/}\mu\text{L}$ 。

3) 脂质纳米颗粒制备:

以 mRNA 制备 LNP 为例: 将 mRNA 溶解到 50 mM (试剂盒为 100mM) pH4.0 的柠檬酸钠缓冲液中, 使终浓度为 146.88 ng/μL。

利用微流控设备 (推荐使用 FluidicLab LNP 智能合成仪 S1), 将含有核酸的柠檬酸钠缓冲液 (50mM) 与复方磷脂在微流控芯片 (推荐使用 FluidicLab B1 鱼骨芯片) 中依照设定流速比和总流速进行混合 (常用流速比 FRR=3, 总流速 12 ml/min)。得到产物可吸取 200 μl 稀释于 800 μl 柠檬酸缓冲液中进行粒径及 PDI 的检测。

由于产物中含有乙醇, LNP 产物会自发融合。不可进行长时间的放置。

4) 超滤和透析

LNP 产物可以使用透析或超滤进行溶液的置换和浓缩。

透析: 将产物置于 20 kD 透析袋中, 以 50~100 倍体积 10 mM pH=7.4 的 PBS 或 20 mM pH=7.4 的 Tris-HCl 进行溶液置换。2 小时后换液, 并透析过夜。终产物需保存于含有 10% 蔗糖的 PBS 或 8% 蔗糖的 Tris-HCl 缓冲液中。

超滤: 将产物添加 4 倍体积柠檬酸缓冲液进行稀释, 并以 30 kD 超滤管进行超滤。3000 g 离心超滤至原体积的 1/4 (约 15 min)。之后添加液体, 换用 10 mM, pH=7.4 的 PBS 或 20 mM, pH=7.4 的 Tris-HCl 进行超滤。重复上述步骤三次, 将乙醇含量降低至 0.5% 以下。终产物需保存于含有 8% 蔗糖的相应缓冲液中。

产物可 4℃ 保存 3 周, 若 -20℃ 保存, 则终产物缓冲液中必须添加蔗糖。终产物严禁冻存在负 80℃ 保存。

【注意事项】

(1) 磷脂使用前要平衡至室温, 并充分混匀。储存环境保持干燥, 水分的存在会引起脂质的自组装, 对最终成品产生影响。

(2) 脂质纳米颗粒的制备过程最好在无菌、无酶环境下进行, 否则核酸被分解, 会影响最终成品的核酸使用率和包封率。

(3) 仅供科研使用

【生产单位】

公司名称 上海澎赞生物科技有限公司
地 址 上海市纪念路 8 号财大科技园 1 号楼 315
邮政编码 200082
电话号码 021-65103566
公司网站 www.fluidiclab.com

