



基于微流控方式制备纳米颗粒实验指南合集
(含LNP/Liposome/PLGA)
附检测方法、优化方案

(版本号: V1.0)

目录

一、基于微流控方式制备核酸脂质纳米颗粒（mRNA-LNP 合成为例） 实验操作指南 含 LNP 合成质量检测、转染细胞实验方案

1. 实验方案：微流控混合方式制备包裹 mRNA 的脂质纳米颗粒（mRNA-LNP 的制备） - 2 -
2. 实验方案：使用 Qubit 测定 LNP 包封率及利用率 - 14 -
3. 实验方案：使用酶标仪测定 LNP 包封率 - 16 -
4. 实验方案：mRNA-LNP 转染 293T 细胞 - 19 -
5. 附录 - 20 -

二、基于微流控的混合方式制备盐酸多柔比星脂质体（Doxorubicin-Liposome）

1. 实验方案：微流控混合方式制备盐酸多柔比星脂质体（Doxorubicin-Liposome） - 31 -
2. 实验方案：使用紫外分光光度计测定脂质体（Liposome）的包封率 - 36 -
3. 附录 - 37 -

三、基于微流控的混合方式制备 PLGA 纳米颗粒

1. 实验方案：微流控混合方式制备 PLGA 纳米颗粒 - 44 -
2. 附录 - 52 -

**一、基于微流控方式制备核酸脂质纳米颗粒
(mRNA-LNP 合成为例) 实验操作指南
含 LNP 合成质量检测、转染细胞实验方案**

实验方案：微流控混合方式制备包裹 mRNA 的脂质纳米颗粒 (mRNA-LNP 的制备)

实验目的：

参照 Moderna、BioNtech 和 Alnylam 的新冠疫苗配方，以 SM102、ALC-0315、MC3 为主要阳离子脂质制备包载 mRNA 的脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNPs)。

实验原理：

ALC-0315、MC3、和 SM102 是三种可用于人体的脂质。在酸性条件下，质子化形成阳离子脂质，能够通过静电作用和带负电的 mRNA 结合。脂质与溶有 mRNA 的水性溶液混合后析出，自组装形成载有 mRNA 的脂质纳米颗粒。本实验中采用微流控混合法，让脂质溶液与 mRNA 溶液在微混合器中充分、迅速、高度可重复地形成粒径均一可控的 LNP。在制备过程中，脂质溶解于乙醇，核酸溶解于酸性缓冲液中，故制备得到的 LNP 初产物含有高浓度乙醇。因此后续还需要透析或者超滤去除残余的乙醇并将溶液体系置换至中性缓冲液中，以备后续生物学实验及长期保存。

实验材料：

		ALC-0315 、DLin-MC3 、SM-102
试剂	复方磷脂成分 (溶于无水乙醇)	DSPC
		DMG-PEG2000/ALC-0159
		CHOLESTEROL
	缓冲液成分 (溶于超纯水)	柠檬酸(C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O)
		柠檬酸钠(C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O)
	溶剂	无水乙醇
		超纯水

	置换所需缓冲液	1 x PBS 缓冲液(pH 7.4)或 20 mM Tris 缓冲液(pH 7.4)保存液
耗材	合成需要	BD/安德（新华）/KDL 带鲁尔口的注射器若干 ^[1] Falcon 15 mL离心管(352096)
	若透析	Thermo Scientific™ Slide-A-Lyzer 透析盒(20K MWCO)[66003]
	若超滤	Millipore 15mL/100 kd 超滤离心管(外径50mL尺寸)[UFC903096]
	微混合芯片	FluidicLabLNP-B1
设备	微流控LNP合成	FluidicLab智能纳米颗粒合成仪（型号：NP-S2）
	LNP检测	动态光散射仪（本文中使用的为 Malvern ZS90）
	LNP超滤	冷冻离心机
	核酸包封检测	Qubit 4.0或酶标仪等检测仪器 ^[2]

[1]. 经测试，该三款注射器推杆较硬，推送液体较为准确。1mL AD/KDL注射器无需鲁尔口；

[2]. 此处不推荐NanoDrop检测核酸浓度，其对降解核酸以及低浓度核酸检测时会有较大波动

实验步骤：

1. 配制复方脂质-乙醇溶液：

LNP的成分与分子量见下表：

名称	ALC-0315	Dlin-MC3 -DMA	SM102	PEG2000-DMG	ALC-0159	DSPC	CHOLESTEROL
分子量	766.3	642.1	710.2	2509.2	2464.2	790.1	386.7
摩尔百分比	配方1	46.3%	-	-	1.6%	9.4%	42.7%
	配方2	-	50%	-	1.5%	10%	38.5%
	配方3	-	-	50%	1.5%	10%	38.5%
1mL为例，1mM浓度 投料量(ug)	354.80	321.05	355.09	37.64	36.43	74.27或 79.02	165.12或 148.86

所有成分总浓度配制成 12 mM（约 7.5 mg/mL）。如果需要摸索脂质浓度对 LNP 最终粒径的影响条件，可以配制以下浓度：8 mM（约 5 mg/mL）、12 mM（约 7.5 mg/mL）和 16 mM（约 10 mg/mL）等进行测试。**需注意，低于 4mM 会难以形成均一的 LNP，而过高浓度的脂质反而会导致 LNP 粒径**

的增大。不同脂质浓度对 LNP 粒径的影响见 附录-附件 1。我们推荐使用 12mM 浓度的复方脂质作为实验的起始条件。

备注：配制好的磷脂溶液可于 4°C 密封保存半年。再次使用前请平衡至室温，直至溶液澄清。阳离子磷脂保存条件比较苛刻，常温下接触空气后会发生氧化变质，受潮则易析出。直接结果为合成 LNP 时粒径出现异常增大（如粒径增大一倍以上），请确保妥善密封保存。

您也可以选择购买 FluidicLab 的 LNP（脂质纳米颗粒）包封试剂盒。出厂前我们进行了严格的 LNP 合成检测，以确保 LNP 合成的质量和稳定。

2. 配制柠檬酸缓冲液

使用超纯水分别配制 100 mM 的一水合柠檬酸(分子量:210.14，称取 1.05 g)和二水合柠檬酸钠(分子量:294.10，称取 1.47 g)溶液各 50 mL。取 33.0 mL 柠檬酸溶液和 17.0 mL 柠檬酸钠溶液混合，用 NaOH 调至 pH=4。随后用超纯水定容至 100 mL，加入终浓度 0.1% 的 DEPC 静置 30 分钟。高压灭菌去除 DEPC，即得 50 mM 柠檬酸缓冲液。柠檬酸缓冲液与乙醇配制的磷脂，需要分别用 0.22 μm 的 MCE 滤膜（柠檬酸缓冲液）与 PTFE 滤膜（乙醇配制的磷脂）分别过滤，确保其终产物不含微小的固态颗粒（包封试剂盒内含 100mM 柠檬酸缓冲液，稀释后可直接使用）。

3. 计算 RNA 浓度，配制 mRNA-柠檬酸缓冲液：

氮磷比 (N/P) 是 mRNA-LNP 包封中常用的计算核苷酸用量与磷脂用量的参数。每个碱基含有一个磷酸根，1 mol 的 RNA 或 DNA 即含有 1mol 的磷酸根 (P)。磷脂中仅以可电离脂质比例计算氮原子数，每摩尔复方脂质中含有 0.5 mol 氮原子 (N)。

核糖核苷酸的平均分子量为 339.5, 形成 RNA 脱水聚合后 NEB 推荐计算均值为 320.5 g/mol。脱氧核糖核苷酸的平均分子量为 327.0, 形成双链 DNA 脱水聚合后, NEB 推荐计算均值为 308.0 g/mol。以可电离脂质比例计算氮原子数, 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: $\frac{0.5}{[N/P \text{ 比}]} \times 320.5$; DNA 为: $\frac{0.5}{[N/P \text{ 比}]} \times 308.0$ 。

以 N/P 为 6 计算, 每毫摩尔总脂质可负载的 RNA 质量: $\frac{0.5}{6} \times 320.5 = 26.71 \text{ mg}$; 以 N/P 为 6 计算, 每毫摩尔总脂质可负载的 DNA 质量: $\frac{0.5}{6} \times 308.0 = 25.67 \text{ mg}$ 。

以柠檬酸缓冲液/复方磷脂流速比 (FRR) = 3、N/P = 6、磷脂浓度 = 12 mM 为例, 进行核酸使用量的计算:

柠檬酸钠缓冲液中 RNA 浓度: $(26.71 \times 12) / 3 = 106.84 \text{ ng}/\mu\text{L}$;

柠檬酸钠缓冲液中 DNA 浓度: $(25.67 \times 12) / 3 = 102.68 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

常用复方磷脂浓度与缓冲液中核酸浓度对应表

脂质浓度(mM)	8	12	16	8	12	16
N/P	6			8		
FRR	3			3		
ssRNA 浓度(ng/μL)	71.23	106.84	142.45	53.41	80.12	106.83
dsDNA 浓度(ng/μL)	68.45	102.68	136.91	51.33	77	102.67

4. 微流控混合制备 LNP（智能纳米颗粒合成仪 NP-S2 的操作说明）：

4.1. 装配芯片。

将微流控芯片（B1-含鲁尔口）的鲁尔口朝上，装入适配器中（图 1. A~C）。

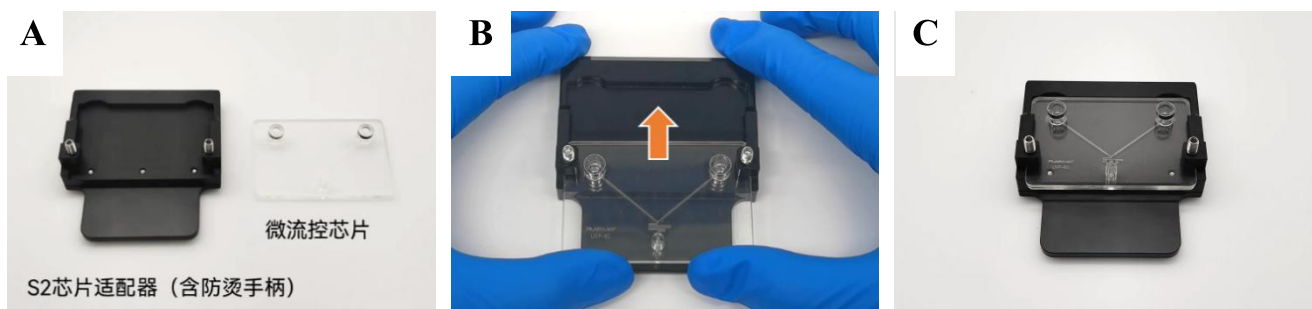


图 1. A. 芯片适配器和微流控芯片； B. 微流控芯片鲁尔口朝上装入适配器中； C. 装配完成。

4.2. 装配反应仓

将 B1 芯片鲁尔口朝内朝下，适配器把手朝外，装入微流控反应仓（图 2. A~B）

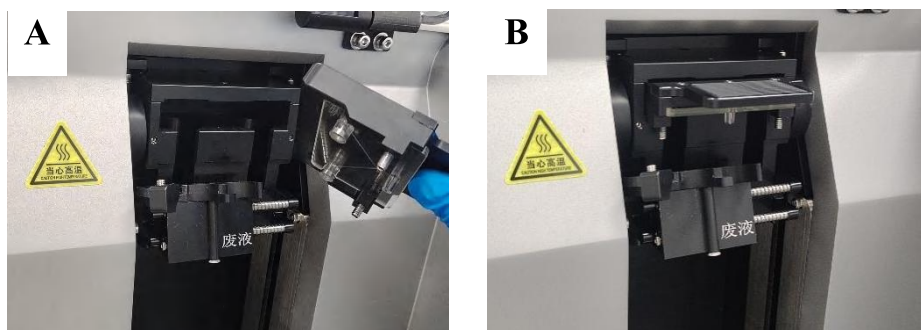


图 2. A~B: B1 芯片与适配器装入反应仓的操作。

4.3. 预冲洗芯片

实验前的预冲洗步骤是十分关键且必要的, 请务必将芯片中预先填充乙醇和缓冲液, 以帮助 LNP 高质量地合成。

4.3.1. 注射器套筒的装配（此处以 5mL 注射器套筒为例）。

握住芯片适配器把手，向上转动反应仓（图 3.A）；转动后可方便注射器适配器（套筒）的装入（图 3.B）。随后装入符合需求的注射器套筒（使用 20 mL 注射器无需额外套筒）（图 3.C）。

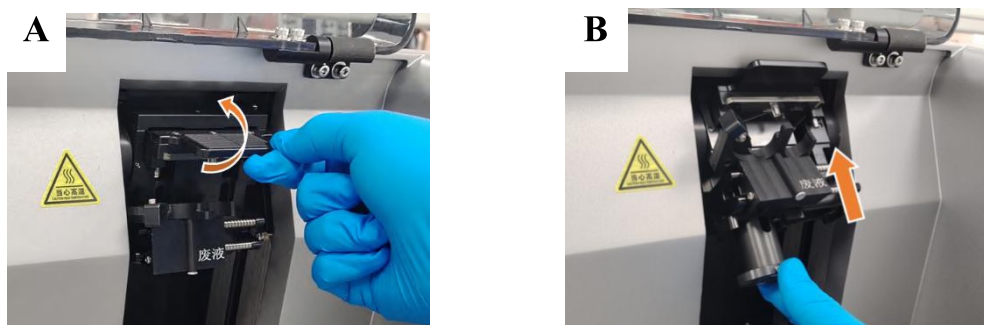


图 3. A. 反应仓握持及转动方向示意图； B. 装入符合需求的注射器套筒（使用 20 ml 注射器无需额外套筒）；



C. 装配完成示意图。

4.3.2. 注射器及收集管的装配（此处以 5mL 注射器为例）。

用两支注射器吸取乙醇与缓冲液，并排空气泡（图片未展示）。**注意注射器吸取液体必需略大于实际实验用量。**以拇指与食指握住注射器，挂耳对准自己（图 4.A），向上插入反应仓套筒。向上插入稍稍遇到阻力后，在向上用力的同时旋转注射器（图 4.B）。注意此处旋转并非是为了螺纹旋紧，而是释放对接中的应力，使得注射器与芯片连接更加牢固。装配完注射器后，将反应仓向下转动归位（图 4.C），此时注射器与水平面垂直。最后安装两个 15 mL 离心管作为产物、废液收集管（图 4.D）。安装部分操作完毕。

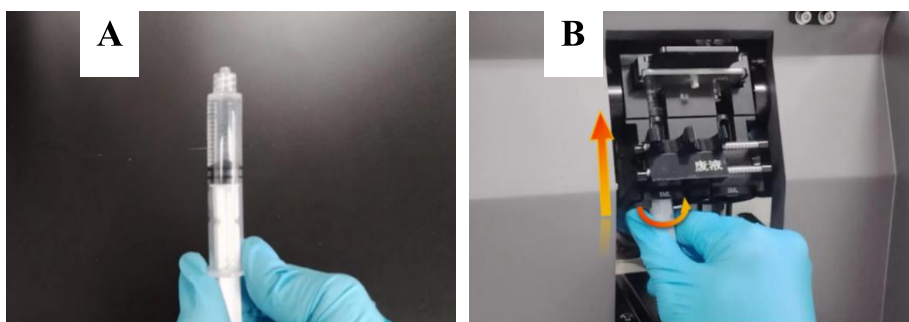


图 4.A. 注射器装配时有利于推入的握持方式； B. 注射器装配时的用力方向示意图；

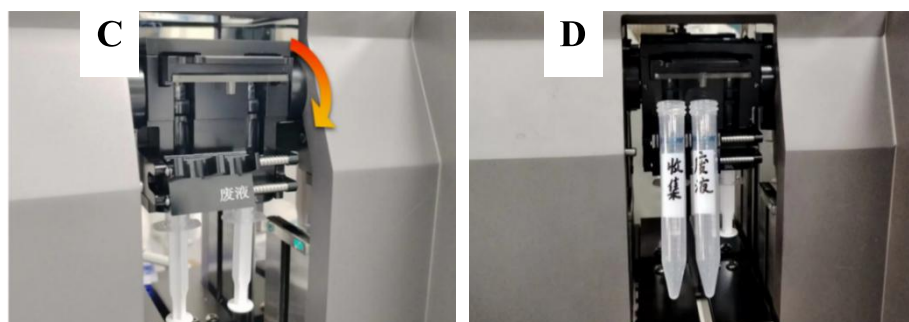


图 4. C. 归位后反应仓与注射器形态示意图； D. 安装完成的收集管与废液管。

4.3.3. 软件的设置

首先连接设备电源。注意设备背后电源线处有一总开关。打开总电源开关后，打开前方控制面板电源。随后进行注射器参数及运行程序的设置。点击屏幕右上角注射器设置。依次选择脂相和水相注射器参数（图 5.A）。正确的注射器参数才能保证准确的液体推送。**请务必每一次实验前检查注射器参数是否与本次实验所用注射器一致。**随后返回主页面。

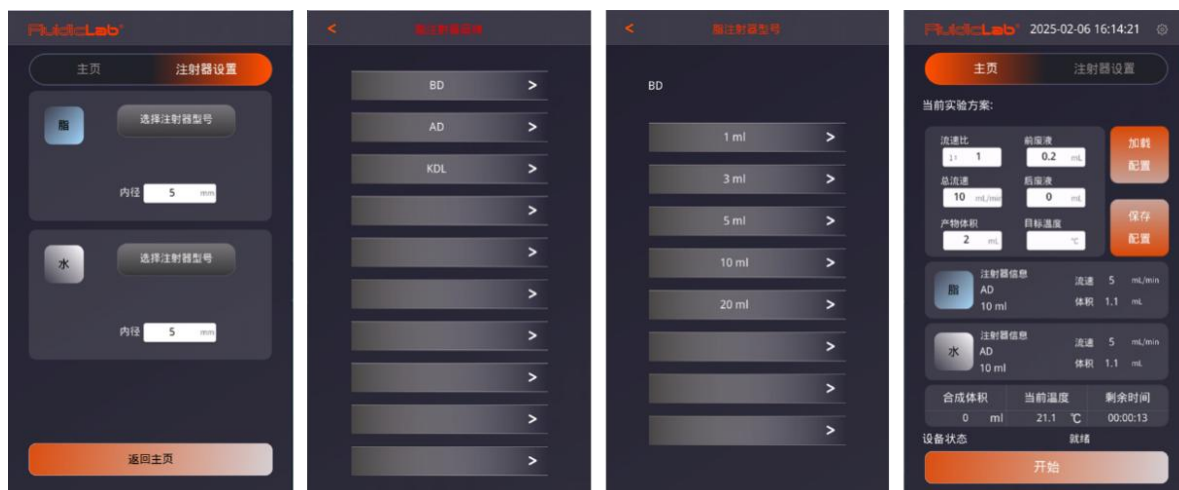


图 5. 注射器参数的设置。

在主界面（图 5 最右）依次设置流速比，总流速，产物总体积，前后废液等参数。预冲洗推荐参数：流速比 1: 1；总流速 16 mL/min；产物总体积 3 mL。预冲洗可不进行产物收集，产物体积设为 0 mL 即可。前废液设置为 3mL 设置完成点击界面最下端“开始”图标，即可开始预冲洗。

4.3.4. 微流控混合制备 LNP

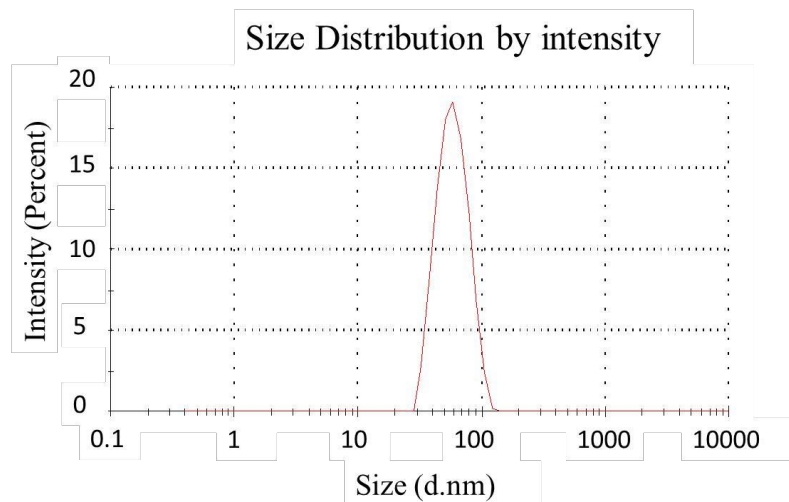
- 1) 装配或更换适合的注射器套筒；
- 2) 使用注射器吸取配制好的复方磷脂及 mRNA-柠檬酸缓冲液，**排空气泡并与芯片连接。推荐最低吸取 0.5mL；且吸取液体体积比实验计算用量略大 0.1~0.2mL。**如以 1: 3 的流速比计划合成 1mL 终产物，0.2mL 前废液（即总产物 1.2 mL）。则至少吸取 0.5 mL（>0.3 mL，至少 0.5mL）的复方磷脂和 1 mL（>0.9 mL）的 mRNA-柠檬酸缓冲液。
- 3) 装配注射器，**并于软件中修改或确认注射器品牌及参数。**
- 4) 设置合成参数。我们推荐初始合成参数为：流速比 1: 3；总流速 16 mL/min，前废液 0.2 mL，后废液 0 mL。对于 B1 芯片：一定区间内流速越大，粒径越小，PDI 也会越稳定。具体流速-粒径/PDI

对应关系，参数详见附录-附件 2 实验数据。

5) 点击“开始”图标进行实验，NP-S2 智能合成仪即可全自动切换前（后）废液并收集产物。

5. 粒径和 PDI 的检测

mRNA-LNP 产物可以使用动态光散射仪测定 LNP 粒径和均一度。正常结果如下图所示：



值得注意的是，由于 LNP 初产物中含 25%乙醇，高浓度乙醇会导致直接检测初产物粒径有 80% 以上的偏差。因此需要及时地使用超纯水将初产物稀释 10 倍进行检测。我们的实验数据显示，将乙醇的浓度稀释至 5% 以下，所测量的粒径才相对较为准确（误差 < 10%）。具体的稀释数据参考 附录-附件 3 《乙醇浓度对 LNP 粒径及 PDI 检测的影响》。

备注：LNP 初产物中高浓度乙醇会造成 LNP 融合，故推荐合成后立即用缓冲液稀释。若进行透析则无需稀释，尽快（10min 内）将产物置于透析袋和透析液中进行透析。

若遇终产物粒径/PDI 异常，合成后的立即检测数据有助于排查原因。实验论文中对外展示的粒径、PDI 一般是经过后处理的终产物数据。

6. 产物的处理和保存

可以根据实际情况选择超滤或者透析来去除产物中的乙醇并置换缓冲液。如果希望获得 LNP 粒

径更小的终产物，则推荐进行透析。具体对比见 附录-附件 4。

6.1. 透析

1. 产物在制备后用注射器直接将产物移入透析卡(推荐使用 Thermo 的 Slide-A-Lyzer™ 透析盒, 20 K MWCO) 或 20 KD 预处理过的透析袋。
2. 将装有 LNP 初产物的透析卡或透析袋置于至少 50 倍体积 1 x PBS (pH=7.4) , 或 50 倍体积 20 mM Tris-HCl (pH=7.4) 于 4°C透析 2h。
3. 将透析液更换为 50 倍体积, 含有 10% 蔗糖 的 PBS (pH=7.4) , 或 50 倍体积, 含有 8% 蔗糖的 20 mM Tris-HCl (pH=7.4) 于 4°C透析过夜。
4. 透析后 LNP 终产物可于 4°C或-20°C进行保存。

6.2. 超滤

1. 样品收集后 , 加入 3 倍体积的柠檬酸缓冲液稀释。
备注 : 不建议直接使用 PBS 或者 Tris 缓冲液稀释 , 过快改变 LNP 外环境 pH 会造成不可控的粒径/PDI 的增大。
2. 使用 Milipore 100 kD 超滤管, 3000 g 离心 10 min, 超滤至原体积的 1/4。 (**使用过小孔径的超滤管会使得超滤困难, 超滤时间延长。不建议使用 10kD 或更小的超滤管。)**
3. 补加 1 x PBS (或 20 mM Tris-HCl) 至原体积 , 再次超滤 10 min, 至原体积 1/4。
4. 重复步骤 3 两次 , 将乙醇含量降低至 0.5%以下。
5. 最后一次使用含有蔗糖保护液的缓冲液超滤浓缩, 使得 PBS 缓冲液的终产物中含有 10%的蔗糖 (Tris-HCl 缓冲液终产物含有 8%蔗糖) 。
6. 将超滤后的液体收集, 于 4°C 或 -20°C冻存。

Tips :**LNP 保存缓冲液与粒径的关联:**

虽然根据 Moderna 公开数据显示，SM-102 适合使用含有 8%蔗糖 的 20 mM Tris buffer (pH=7.4) 进行保存，但是我们测试发现 DLin-MC3-DMA, SM102 两种配方使用含有 10% 蔗糖的 PBS (pH=7.4) 透析后粒径更小，且差异显著。ALC-0315 配方生成的 LNP 保存于两种缓冲液中，粒径/PDI 接近。故，对粒径有要求的实验者建议使用含有蔗糖的 PBS 进行透析和保存。

LNP 保存时效与保存环境的关联:

LNP-RNA 产物于含有 10 % 蔗糖的 PBS 中，-20°C 条件下保存一个月，与新制备 LNP-RNA 产物比较，稳定性和体内效力两者接近[1]。我们的实验结果则显示，4°C保存一个月，LNP 产物粒径/PDI 基本稳定，且仍具有转染细胞的能力。故，请 4°C或-20°C保存。切勿进行-80°C冻存^[1]。

LNP 转染效率与保存缓冲液的关联:

有文献报道显示 DLin-MC3-DMA 于 TBS (Tris-buffered saline) 缓冲液条件下转染效率会高于 PBS 缓冲液^[2]。所以若对后续转染细胞或小鼠有需求的实验者，可以参考该文献对缓冲液体系进行优化。

7. 终产物的电位检测

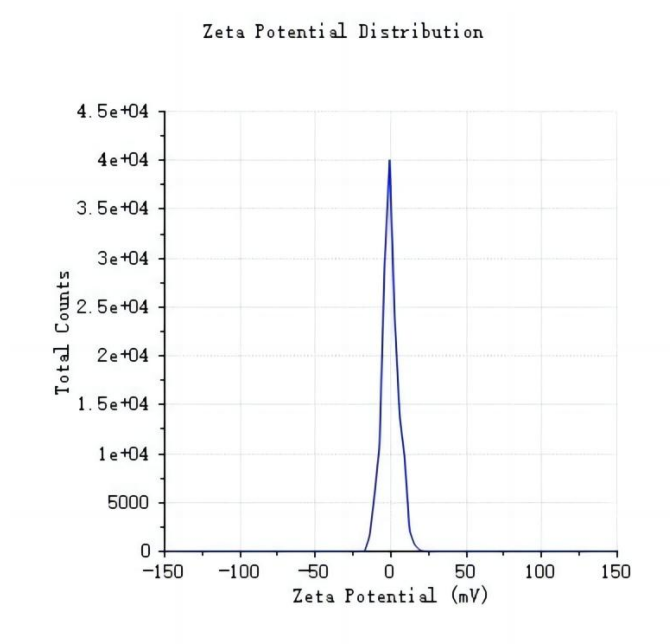
得到终产物后，除了检测粒径、PDI 等常规参数外，也可对产物进行 Zeta Potential 的检测。

1. 100 μ L 终产物加 900 μ L 水或 PBS 定容至 1mL，混匀后加入马尔文 DTS1070 电位比色皿进行检测。

使用 PBS 测量时，由于液体中的电导率过高，会导致测量结果无峰图显示。马尔文粒径仪并不适合高盐条件下的检测。但根据马尔文工程师的反馈，该现象并不会影响电位测量的准确性。若要

获得相应的电位分布图, 则建议使用 ddH₂O 进行稀释。若仍需回收利用, 则建议使用 PBS 进行稀释。

我们的测试结果显示, 使用 PBS 对终产物进行不同倍数的稀释后, 产物 Zeta Potential 无显著变化(附件 5)。



2. 若需要重复利用内部液体, 则使用 1mL 注射器将内部液体吸出。加入液体检测时, 需确保加入的液体没过电极片。详细电位测量细节, 可参考 Malvern ZS90 说明书。常规 LNP 配方的电位检测峰图如上图所示:

[1]. Kim B, Hosn RR, Remba T, Yun D, Li N, Abraham W, Melo MB, Cortes M, Li B, Zhang Y, Dong Y, Irvine DJ. Optimization of storage conditions for lipid nanoparticle-formulated self-replicating RNA vaccines. *J Control Release*. 2023 Jan;353:241-253.

[2]. Henderson MI, Eygeris Y, Jozic A, Herrera M, Sahay G. Leveraging Biological Buffers for Efficient Messenger RNA Delivery via Lipid Nanoparticles. *Mol Pharm*. 2022 Nov 7;19(11):4275-4285.

实验方案：使用 Qubit 测定 LNP 包封率及利用率

实验目的：

对制备的 LNP 包封 mRNA 的效果进行测定

实验试剂：

试剂名称	货号	品牌
Qubit™ RNA HS Assay Kit	Q32852	Invitrogen
Triton-X-100 AR 级	T824275-500mL	麦克林
DEPC 水或 TE buffer	/	/

实验耗材：

名称	货号	品牌
Axygen 0.5mL 离心管	MCT-500-C	Axygen
枪头若干	/	/

实验仪器：

Qubit 4.0 Invitrogen

实验步骤：

检测步骤可参考 Qubit™ RNA HS Assay Kit 说明书：[Document Connect \(thermofisher.cn\)](https://www.thermofisher.cn/document-connect)

操作步骤简述如下：

1) 配制 RNA 检测工作液:吸取 [(样品数)+(2 标曲)+(1)] μL 的 Qubit™ RNA HS reagent,加入 $200 \times [(样品数)+(2 标曲)+(1)] \mu\text{L}$ 的 Qubit™ RNA HS buffer, 配成 1:200 比例配制工作液。

【如 6 个待测样本,吸取(6+2+1)=9 μL 的 Qubit™ RNA HS reagent,加入 $200 \times (6+2+1) \mu\text{L} = 1800 \mu\text{L}$ 的 Qubit™ RNA HS buffer 中配成工作液。】

2) 制作常规标曲, 并于 Qubit 4.0 上进行标曲的校准

3) 检测 LNP 合成终产物中, 游离 RNA 含量。

【若浓度过低无法检测, 则吸取 190 μL 工作液, 加入 10 μL 待测样本, 充分混匀后检测。在 Qubit 4.0 中选择 1 μL 选项, 并随后将数值 $\div 10$, 进行 10 倍换算。】

4) 使用 TE buffer 或 DEPC 水配制 4% Triton X-100, 与 LNP 终产物 1:1 混合 (5 μL +5 μL 即可)。

使用该终浓度为 2% 的 Triton X-100 破乳 5 分钟。

5) 在常规标曲中添加 1 μL 的 2% Triton X-100, 并于 Qubit 4.0 上进行含有 Triton X-100 新标曲的校准^[3]。

6) 测量 LNP 破乳后的 RNA 浓度。

【注意该 RNA 溶液在破乳时稀释了 1 倍。真实浓度需要 $\times 2$ 。】

7) 进行包封率的计算, 公式为:

$$\text{载药量} = \text{破乳后读值} - \text{破乳前读值}$$

$$\text{包封率}(\%) = [\text{载药量}/\text{破乳后读值}] \times 100\%$$

8) 同时可进行 RNA 利用率的计算, 公式为:

$$\text{RNA 利用率}(\%) = [\text{载药量}/\text{RNA 投入量}] \times 100\%$$

[3]. 经检测, Triton X-100 的存在会影响 RNA 检测的准确度, 故推荐制作新标曲。

实验方案：使用酶标仪测定 LNP 封装率

实验目的：

对制备的 LNP 封装 mRNA 的效果进行测定

实验原理：

Quant-iT™ RiboGreen® RNA 试剂是一种超灵敏的荧光核酸染色剂，可检测溶液中 1-200 ng 的核酸，这种核酸染料无法透过 LNP，因此只有游离的未被 LNP 封装的核酸可以被结合。Triton X-100 作为一种表面活性剂常被用作破乳剂，使用 1% 的 Triton X-100 处理获得的 LNP-mRNA 可以使封装的核酸释放，得到总核酸量。通过计算破乳前后核酸量的差异得到封装量，再除以总核酸量即可得到封装率，即：

封装率 (%) = (破乳后定量-破乳前定量) /破乳后定量

实验材料：

Quant-iT™ RiboGreen™ RNA 检测试剂盒	(Thermo Fisher, R11490)
Triton™ X-100	(SIGMA-ALDRICH, T8787-100mL)
DEPC 水	
CellCarrier-96 Ultra Microplates	(PerkinElmer, 6055308)

实验步骤：

试剂准备等检测步骤细节可参考 Quant-iT™ RiboGreen® RNA 试剂盒说明书。

- 1) 将 20 × TE 用 DEPC 水稀释至 1X；用稀释好的 1 × TE 稀释试剂盒中的标准品，稀释成 2 μg/mL 及 100 ng/mL 两种终浓度；

2) 用 $1 \times$ TE 稀释试剂盒中的 QuantiT™ RiboGreen® Reagen, 稀释成 200 倍及 2000 倍两种终浓度; 注意要同时制作含有/不含有 Triton X-100 的两套标曲;

按照下表在 CellCarrier-96 Ultra Microplates 中加入以下试剂, 做复孔:

High range

Volume(μ L) of TE	Volume(μ L) of 2 μ g/mL RNA Stock	Volume(μ L) of 200-fold Diluted Quanti-iT™ RiboGreen' Reagent	Final RNA Concentration in Quanti-iT™ RiboGreen' Assay
0	1,000	1,000	1 μ g/mL
500	500	1,000	500 ng/mL
900	100	1,000	100 ng/mL
980	20	1,000	20 ng/mL
1,000	0	1,000	blank

Low range

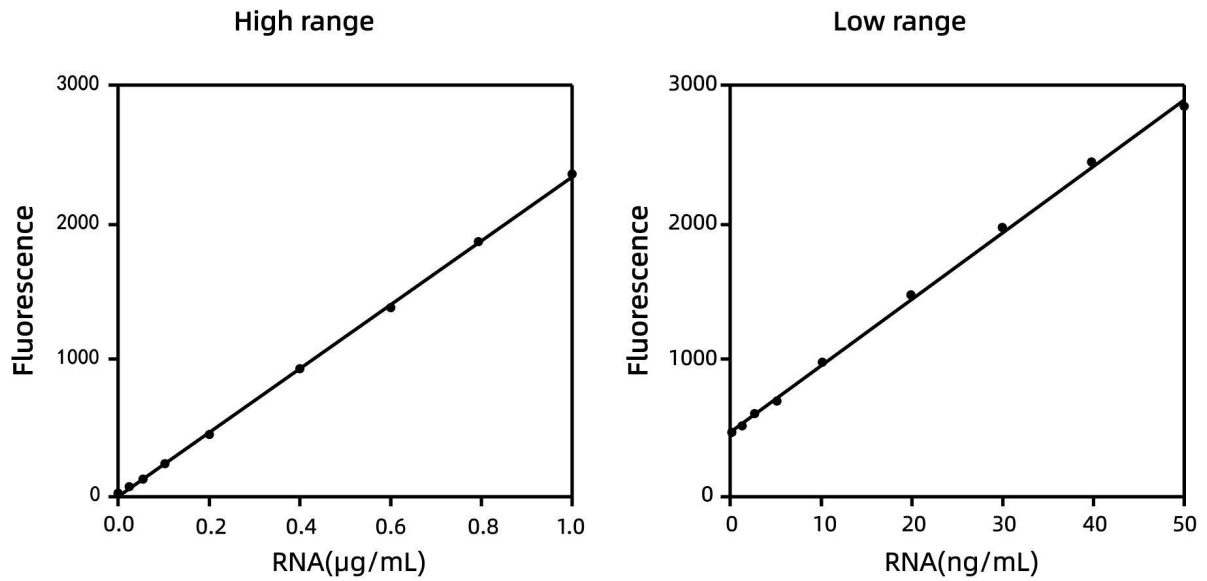
Volume(μ L) of TE	Volume(μ L) of 100 ng/mL RNA Stock	Volume(μ L) of 2,000-fold Diluted Quanti-iT™ RiboGreen' Reagent	Final RNA Concentration in Quanti-iT™ RiboGreen' Assay
0	1,000	1,000	50 ng/mL
500	500	1,000	25 ng/mL
900	100	1,000	5 ng/mL
980	20	1,000	1 ng/mL
1,000	0	1,000	blank

3) LNP 破乳。将 Triton X-100 用 $1 \times$ TE 稀释到 2%, 取 100 μ L 加入 CellCarrier-96 Ultra Microplates, 加入 1 μ L 制备好的 LNP, 处理 5 分钟, 加入 100 μ L 200-fold diluted quant-iT RiboGreen Reagent。

4) LNP 游离核酸测定。在 CellCarrier-96 Ultra Microplates 中加入 100 μ L $1 \times$ TE, 取 1 μ L 制备好的 LNP 加进去, 混匀, 加入 100 μ L 2000-fold diluted quant-iT RiboGreen Reagent。

5) 读板使用 SPARK 读取荧光强度, 激发光设置为 480 nm, 发射光为 520 nm。

6) 标曲制备



7) 样品定量

载药量 = 破乳后读值-破乳前读值

包封率 (%) = 载药量/破乳后读值

8) 同时可进行 RNA 利用率的计算, 公式为:

RNA 利用率 (%) = [载药量/RNA 投入量] × 100%

实验方案：mRNA-LNP 转染 293T 细胞

实验目的：

以 293T 细胞为例，使用包封了 EGFP-mRNA 的 LNP 对细胞进行转染。

实验步骤：

1. HEK-293T 细胞消化

选取 P3 – P15 之间的 HEK-293T 细胞^[4]。弃上清后 PBS 清洗。1 mL 胰酶 37°C 消化 1min。使用 1 mL 含 10 % FBS 的 DMEM 终止消化。轻柔吹打细胞，收集细胞悬液。

2. 细胞铺板

室温 125 g，离心 5~10 min。弃上清，并以 3mL，noPS，10 % FBS 的 DMEM 重悬细胞。对细胞进行计数。取 5×10^4 个细胞/24 孔板单孔铺板。每个孔中添加 1 mL noPS，含 10 % FBS 的 DMEM 培养基。

3. 细胞转染

可用 lipo 作为阳性对照进行转染实验。对于 LNP 转染，直接加入包封完成的 EGFP-mRNA-LNP 即可。每孔添加 500ng。若使用其他规格培养皿或培养板，保证包封在 LNP 内的 EGFP-mRNA-转染量达到终浓度 500ng/mL 即可。培养 24h 后即可观察到荧光。

若 mRNA-LNP 浓度较高，可在转染前使用 opti-MEM 对 LNP 进行稀释或定容。

4. 检测

在转染 48 小时后，收集细胞，流式检测 GFP 信号阳性率。

细胞转染结果见附录-附件 6

[4]. 大量的实践结果表明，293T 细胞被支原体感染后，虽不影响 Lipo-mRNA 的转染，却会极大降低 mRNA-LNP 的转染效率。这会导致阳性对照正常，转染实验组无表达。请在转染前，务必进行细胞支原体检测，确保细胞的状态。

附录

附件清单：

附件 1：复方磷脂浓度与粒径/PDI 的关系图；

附件 2：LNP 合成总流速与 LNP 粒径/PDI 的关系图；

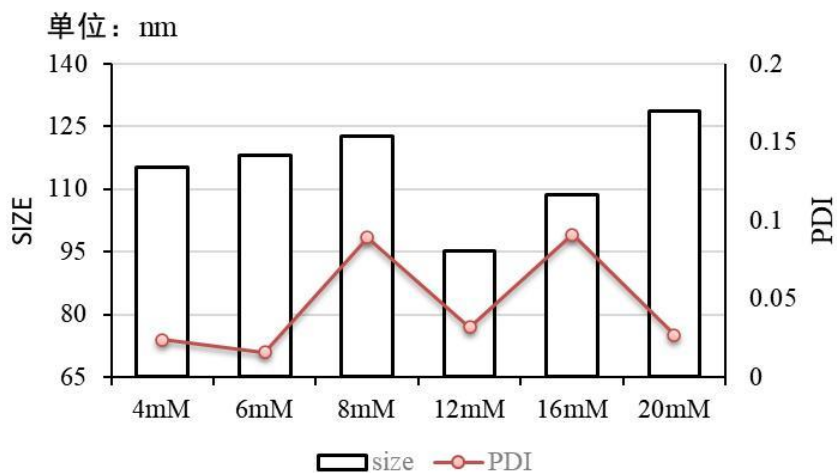
附件 3：乙醇浓度对 LNP 粒径及 PDI 检测的影响；

附件 4：LNP 合成超滤与不同条件透析对比

附件 5：LNP 终产物的 Zeta 电位检测

附件 6：mRNA-LNP 转染 HEK-293T

附件 1：复方磷脂浓度与粒径/PDI 的关系图



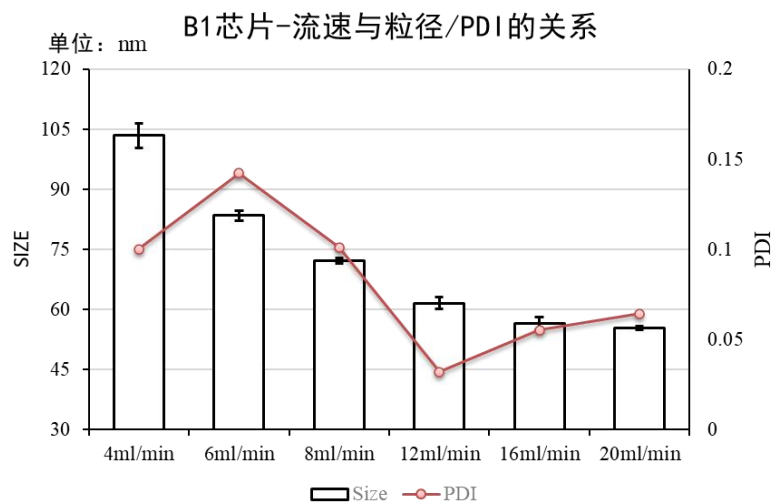
实验条件： 仪器： FluidicLab-S1 ； 芯片： FluidicLab-B1

MC3 复方脂质配方： 总流速： 12 mL/min； 流速比（脂相： 水相） = 1 : 3； 前废液 0.2 mL； LNP 空包

无 mRNA； 初产物未经过柠檬酸缓冲液稀释。

可见 12 mM 合成粒径最小。

附件 2：LNP 合成总流速与 LNP 粒径/PDI 的关系图



实验条件：仪器：FluidicLab-S1；芯片：FluidicLab-B1

MC3 配方：12 mM 浓度；流速比（脂相：水相）= 1 : 3；前废液 0.2 mL；LNP 空包无 mRNA；

初产物经柠檬酸缓冲液稀释 5 倍后检测：可见速度越高合成 LNP 粒径越小。

附件 3：乙醇浓度对 LNP 粒径及 PDI 检测的影响

LNP 越稀释粒径越小？

LNP 全称 Lipid Nanoparticle（纳米脂质颗粒）。常用 LNP 合成仪，利用微流控的方式在微流控芯片中进行高度可控的合成。LNP 合成后，有一些老师发现使用马尔文粒度仪测量 LNP 粒径时，对 LNP 产物做了稀释的粒径小于 LNP 产物直接进行检测。这是怎么回事呢？

众所周知，马尔文粒度检测仪对于粒子粒径大小的检测基于粒子的布朗运动速率。所以液体的折射率/粘度等参数都会对检测结果有所影响。这也是在进行粒度检测之时需要选择粒子所在溶液及液相参数的原因。

那不禁想问，LNP 合成后所残存的乙醇是否对 LNP 粒径和 PDI 有影响？产物直接做检测是否得到的是真实的粒径？为了回答这些问题，我们进行了一系列验证实验。

25%乙醇会显著增加粒径的检测值

一般 LNP 合成时，有机相（溶解了脂质的乙醇）：水相（溶解了 mRNA 的柠檬酸钠缓冲液）的流速比为 1：3。这就使得产物会有 25%的乙醇。为了模拟这个乙醇浓度，我们在标准品 70nm 的分散交联聚苯乙烯标准微球（即 70nm PS 微球）中加入了 25%乙醇进行检测。与原始溶液中的标准微球相比，添加终浓度 25%乙醇后，检测到的粒径值接近 130nm，几乎是原始粒径的一倍（图 1.A）；而相比之下，添加终浓度为 25%的柠檬酸钠缓冲液中微球粒径和 PDI 与原始检测结果并无差异（图 1.A）。

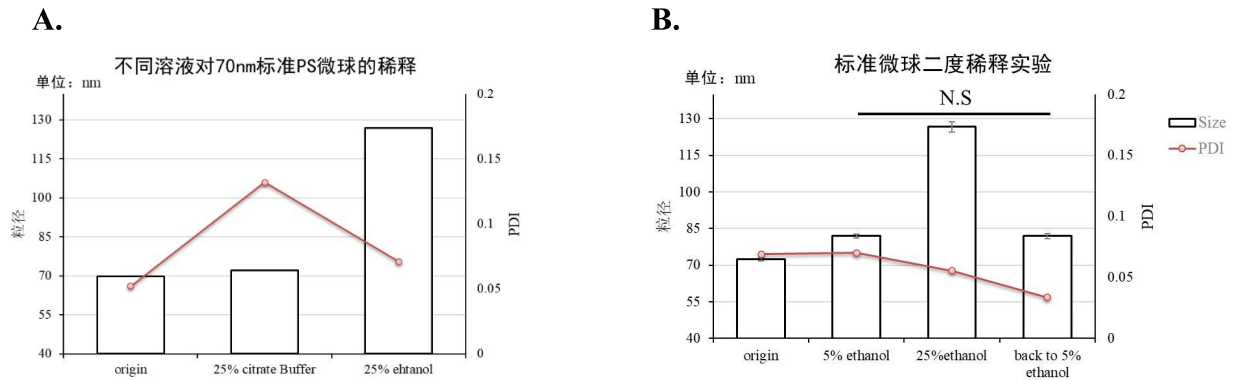


图 1: 标准微球的乙醇稀释实验

A: 终浓度为 25%的柠檬酸缓冲液和 25%的乙醇对 70nm 标准微球的稀释测量结果;

B: 标准微球的两度稀释实验。Error bar 为样本标准差;

N.S: 无显著差异; 检验方式: Student's t-test。

乙醇改变粒径检测值而不改变其实际大小

熟悉材料学的朋友可能会提出异议, PS 是会被乙醇降解的。这个结果是否是由于乙醇将 PS 微球溶解从而导致检测粒径增大呢? 为了回答这个问题,我们将上一步实验得到的包含 PS 微球的 25% 的乙醇溶液再次进行了稀释, 将乙醇浓度降低至 5%。结果发现, 检测粒径重新变小, 且与直接加入 5%的乙醇相比, 粒径数值没有显著差异(图 1.B)。粒径可能被溶解从而增大, 但并不会自发缩小。该结果可以认为, 粒径数值上的改变完全是因为乙醇浓度造成的影响。

推荐 LNP 合成后进行 10 倍稀释(检测时, 乙醇终浓度 \leq 5%)

意识到乙醇的存在会对粒径检测产生剧烈影响, 那究竟在 LNP 合成后, 稀释多少倍进行检测比较合适呢? 我们在标准微球中加入了 1%~25%的乙醇进行了反复测试, 观察乙醇对粒径测量的影响。

结果发现，即使 2% 的乙醇即可使得粒径测量值有着显著的增加（图 2）。并且随着乙醇浓度的逐渐增加，标准微球的测量数值逐渐增加。但是根据图 1.B 的结果我们可以知道，这仅仅是检测数值的变化，并非粒子真实的粒径改变。大家可以根据实际需要，参考我们的结果，进行 LNP 合成溶液的稀释和粒径检测。

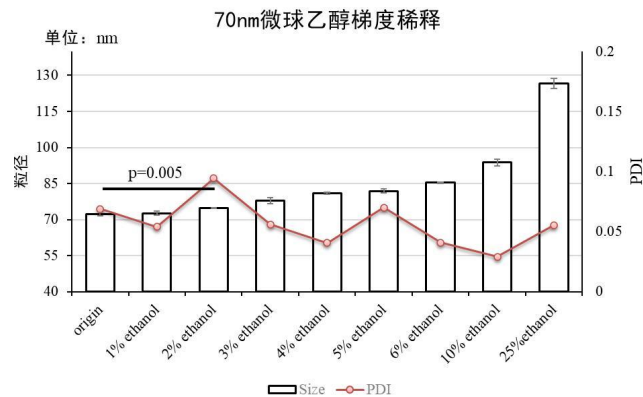


图 2：70nm PS 微球的梯度稀释实验。Error bar 为样本标准差；

N.S：无显著差异；检验方式：Student's t-test。

虽然乙醇浓度越低越接近真实的粒径值，但是我们仍推荐将乙醇浓度降低至 5% 附近进行检测。不做进一步稀释的原因是，过高的稀释倍数会导致溶液环境的剧烈变化。尤其是使用 PBS 稀释，会剧烈改变溶液的 pH 值。这将直接导致粒子电位的剧烈变化，从而使得 LNP 变得不稳定，PDI 异常增大。过大的稀释倍数也会同时使得 LNP 粒子浓度的下降，这将会大大增加马尔文粒度检测仪的检测时长，降低精准度。10 倍左右的稀释既可以保证与真实粒径的差异在 15% 以内，且 PDI 不会有剧烈波动（图 3）。

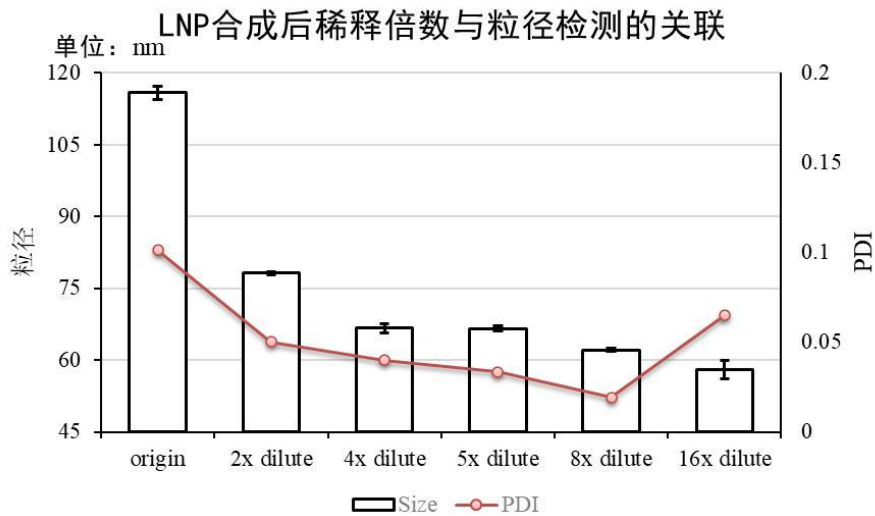


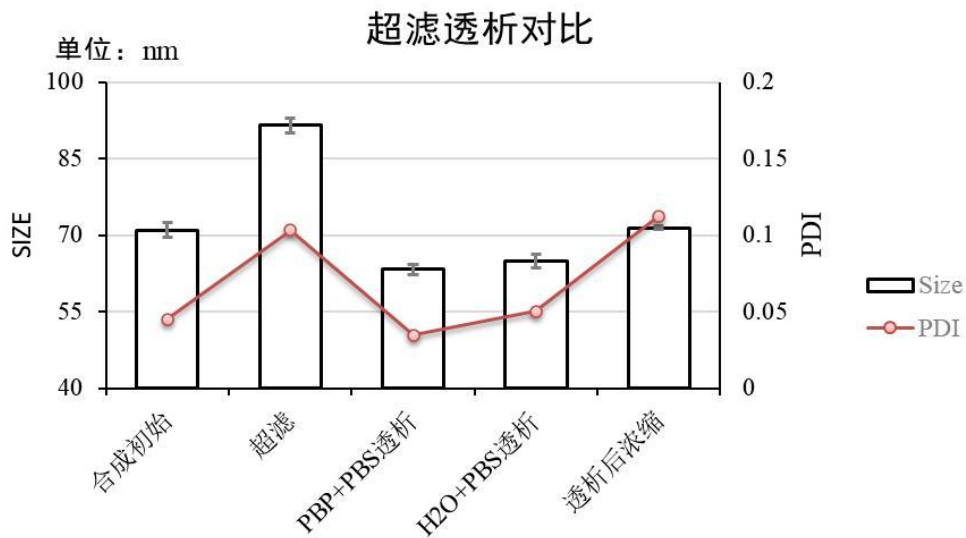
图 3: LNP 稀释倍数与粒径/PDI 的关系。

LNP 合成条件:

脂相: Alnylam 配方 (Dlin-MC3-DMA/DSPC/cholesterol/PEG-2000-DMG=50/10/38.5/1.5, mol/mol), 12mM 脂质总浓度;

水相: 柠檬酸缓冲液 (50mM 柠檬酸+50mM 柠檬酸钠, pH=4.0), 无 mRNA; 脂:水 FRR (流速比) =1:3; 总流速=12mL/min。使用仪器: FluidicLab (上海澎赞生物) LNP 智能合成仪-S1。芯片: FluidicLab (上海澎赞生物) B1 (鱼骨) 芯片。

附件 4：LNP 合成超滤与不同条件透析对比



实验条件：仪器：FluidicLab-S1 ；芯片：FluidicLab-B1

MC3 配方：12 mM 浓度；流速比（脂相：水相）= 1 : 3；前废液 0.2 mL； LNP 空包无 mRNA；

合成初始——初产物经柠檬酸缓冲液稀释 5 倍后检测；

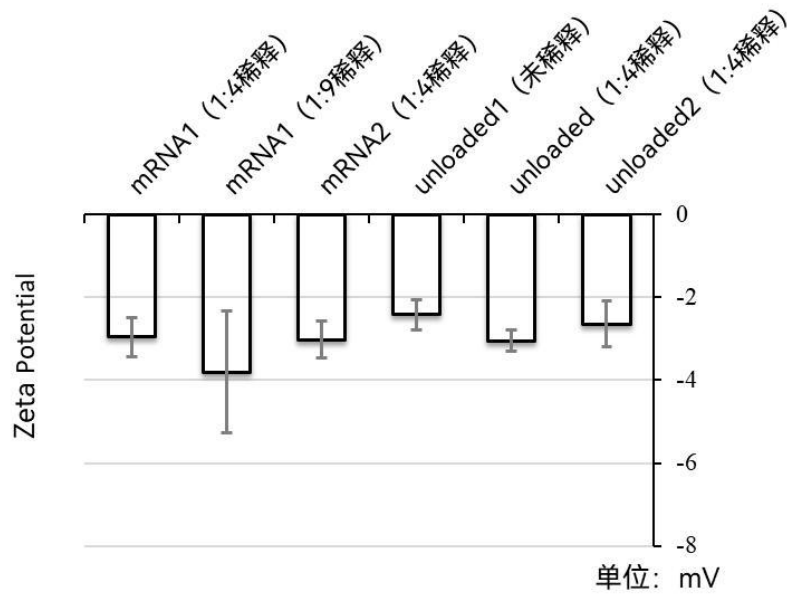
超滤使用 Millipore 15mL/30 kd 超滤离心管(外径 50mL 尺寸)[UFC903096]。

透析使用 Thermo Scientific™ Slide-A-Lyzer 透析盒 (20K MWCO)[66003]。

超滤后浓缩则使用[66003]透析盒后再使用[UFC903096]进行浓缩。

实验步骤参照第一节：《实验方案：微流控混合方式制备包裹 mRNA 的脂质纳米颗粒（mRNA-LNP 的制备）》。

附件 5: LNP 不同稀释倍数对 Zeta 电位的影响



实验条件: 仪器: FluidicLab-S2 ; 芯片: FluidicLab-B1

MC3 配方: 12 mM 浓度; 流速比 (脂相: 水相) = 1 : 3; 前废液 0.3 ml;

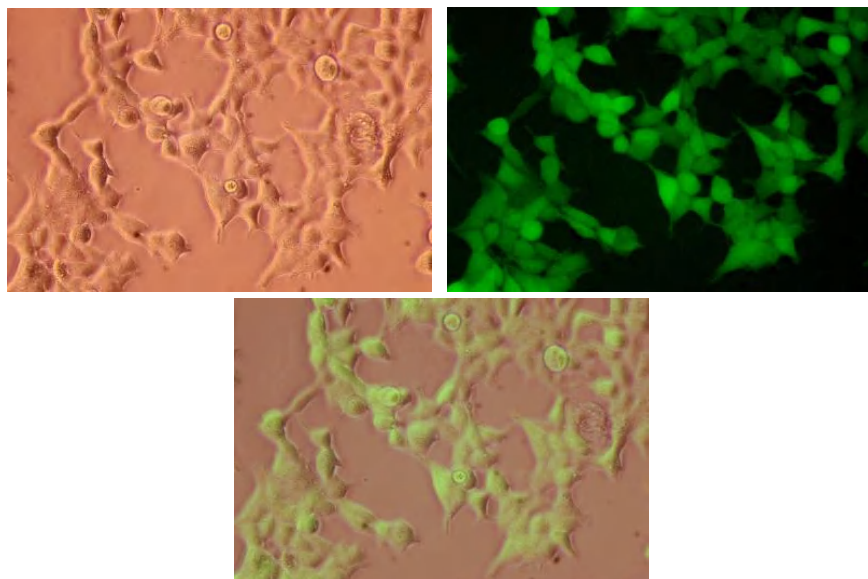
柠檬酸缓冲液中 mRNA 浓度 106.84 ng/ μ L 或不含 mRNA (unloaded)

产物使用 PBS 稀释定容至 1mL 后检测

zeta 电位检测参数设置: 材料吸光度 0.001; 材料折射率 (RI) 1.45; 分散剂折射率 (RI) 1.33 ;

粘度 0.8872 cP。

附件 6: mRNA-LNP 转染 HEK-293T



实验条件: 见: 第 5 节: 《实验方案: mRNA-LNP 转染 293T 细胞》。

二、基于微流控的混合方式制备

盐酸多柔比星脂质体

(Doxorubicin-Liposome)

实验方案：微流控混合方式制备盐酸多柔比星脂质体 (Doxorubicin-Liposome)

脂质体 (Liposome) 是最先被广泛研究的纳米颗粒之一，是一种磷脂双分子层囊泡。由于其结构类似于生物膜的主要结构磷脂双分子层，故脂质体也被称为“人工生物膜”。脂质体的主要成分一般由磷脂与胆固醇构成，都是生物体内的内源性物质，几乎没有免疫原性。具有低毒性/高生物相容性等特点，被广泛用于药物的递送。

多柔比星 (Doxorubicin)，又称阿霉素，是一种广谱抗癌药物，可以抑制 DNA 与 RNA 的合成，适用于急性白血病、恶性淋巴瘤等多种癌症。但多柔比星作为一种蒽环类药物对心脏毒性极大，使用脂质体包裹多柔比星可以在降低心脏毒性的同时，增加多柔比星的递送效率。在本文中，将介绍使用微流控混合的方式合成脂质体包裹多柔比星的实验方法。

实验目的：

制备包裹盐酸多柔比星 (DOX) 的脂质体并对其质量进行检测

实验材料：

		HSPC
试剂	脂质成分 (溶于无水乙醇)	CHOLESTEROL
		mPEG-DSPE
	缓冲液成分 (溶于超纯水)	硫酸铵 ((NH ₄) ₂ SO ₄)
溶剂		无水乙醇
		超纯水

	置换所需缓冲液	0.9 % NaCl缓冲液
耗材	合成需要	BD/新华/KDL 带鲁尔口的注射器若干
		Falcon 15 mL离心管 (352096)
	若透析	Thermo Scientific™ Slide-A-Lyzer 透析盒 (20 K MWCO) [66003]
	微混合芯片	FluidicLabB1
设备	微流控脂质体合成	FluidicLab智能LNP合成仪 (型号: NP-S2)
	脂质体检测	动态光散射仪 (本文中使用的Malvern ZS90)
	脂质体超滤	冷冻离心机
	DOX包封检测	紫外分光光度计

实验步骤:

1. 配置脂质溶液---脂质体的脂质溶液成分、分子量、配置情况见下表

名称	HSPC	CHOLESTEROL	mPEG-DSPE
分子量 (g/mol)	783.8	386.7	2794.07
摩尔百分比	57%	38%	5%
每 mM 投料量 (μg/mL)	446.77	146.95	139.70
200mM 母液 (mg/10ml)	893.5	294.0	279.5

为方便称量,可先行配置总浓度 200 mM 的脂质溶液母液,可使用 60°C 的水浴加热帮助溶解。根据后续实验的需求,再对母液进行稀释。**室温下 200mM 的母液会逐渐析出,请溶解后尽快稀释配置工作液,或发现析出后再次加热助溶。**

2. 配置硫酸铵缓冲液

称取 1.9812 g 硫酸铵（分子量：132.14），使用超纯水定容至 50 mL，得到 300 mM 的硫酸铵缓冲液 50 mL。硫酸铵缓冲液与无水乙醇配置的脂质溶液需要分别使用 0.22 μm 的 MCE 滤膜与 0.22 μm 的 PTFE 滤膜过滤，确保终产物中不含微小固态颗粒或杂质。

3. 微流控合成

智能纳米颗粒合成仪操作界面如下

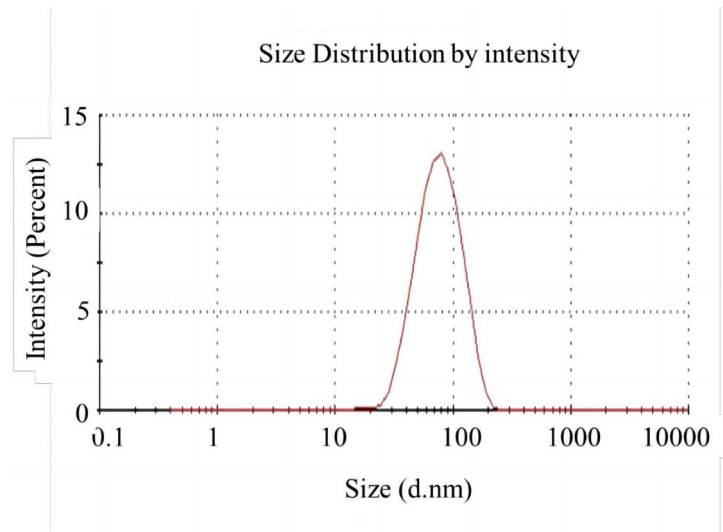


对于仪器的使用方法，请参照前一章 LNP 的仪器操作部分，或我司上传的操作指导视频 (https://www.bilibili.com/video/BV1Kg4y127tc?share_source=copy_web)，经测试，我们发现不同总脂质浓度、总流速、流速比等条件都会对脂质体的合成粒径、PDI 产生影响。

具体来说，该配方下，随着总脂质浓度升高，合成的脂质体粒径先下降后上升。在 80mM 浓度及以上合成的脂质体中，PDI 显著升高。其影响的具体参数见【附录-附件 1】。对于微流控参数条件进行测试，我们也发现其受到流速与流速比的影响。配方和实验参数经优化，结果为：使用 15 mM 浓度的脂质溶液（附录-附件 1），总流速为 16 mL/min（附录-附件 2）；流速比为 1: 4（附录-附件 3），可获得该配方下，粒径最小且均匀的脂质体。

4. 粒径和 PDI 的检测

合成的脂质体可以使用动态光散射仪测定粒径与均一度。正常结果如下图所示：



由于脂质体初产物中含 20% 的乙醇，高浓度乙醇会使检测初产物的粒径有 80% 以上的偏差。因此需要及时将初产物稀释进行检测。

经测试，我们推荐的稀释方式是使用硫酸铵缓冲液将乙醇浓度稀释至 2.5%（8 倍稀释）。稀释浓度的确定过程参考附录-附件 4。也可参考我司 LNP 合成方案中，附录 3 的稀释实验结论，其原理一致。

备注：Liposome 初产物中高浓度乙醇会造成脂质体融合，需尽快（10 min 内）将产物置于透析袋和透析液中透析。

5. DOX 的包封

合成的脂质体可以使用动态光散射仪测定粒径与均一度。正常结果如下图所示：

5.1 配置 DOX 溶液

称取 4.5g NaCl, 使用超纯水定容至 500 mL, 配成质量浓度为 0.9 %的 NaCl。使用该缓冲液将 DOX 配置为 10 mg/mL 母液。

5.2 脂质体初产物的透析

1.合成后的脂质体初产物用注射器直接移入透析卡（推荐使用 Thermo 的 Slide-A-Lyzer™ 透析盒, 20 K MWCO）或 20 kDa 预处理过的透析袋。

2.将装有脂质体初产物的透析卡或透析袋置于至少 50 倍体积的 0.9% NaCl 缓冲液中, 室温透析至少 6h。中途进行一次换液。

3.透析后的脂质体产物可以 4 °C保存。

5.3 DOX 的包封

1.选择适量 DOX, 加入透析完成的脂质体产物, 并混合均匀。将溶液置于 60 °C水浴中共孵育 30 min。

备注【DOX 使用量】：

推荐的 Drug: Lipid 比例为 1:5-10 (mol:mol) , 已知 DOX 分子量为 543.525 g/mol。以 20 mM 浓度的脂质溶液合成 1 mL 脂质体为例,

选择 1:5 的药脂比, 药物的量为 $1 \text{ mL} \times 1/5$ (1:4 的流速比) $\times 20 \text{ mM} \times 1/5$ (1:5 的药脂比) $\times 543.525 \text{ g/mol} = 0.435 \text{ mg}$, 即加入 10 mg/mL DOX 溶液 435 μL 。因此【推荐的 DOX 的量为 435 μL - 217 μL 】

2.孵育完毕, 将产物用注射器移入透析卡或透析袋中, 置于至少 50 倍体积的 0.9% NaCl 缓冲液中, 室温透析至少 6h, 中途换液 2 次。

3.透析后的 DOX-Liposome 可以在 4 °C保存

4.随后, 可对该脂质体进行包封率的测量

实验方案：使用紫外分光光度计测定脂质体（Liposome）的包封率

实验目的：

对制备的脂质体包封 DOX 的效果进行测定。

实验试剂：

分析纯（AR 级）或更高纯度异丙醇；

75 mM 盐酸

实验仪器：

紫外分光光度计

实验步骤：

1. 配置测试溶液

取 45 mL 异丙醇与 5 mL 浓度为 75 mM 的盐酸混合均匀备用标准曲线的测定

使用 0.9% NaCl 分别将 DOX 稀释至 10 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、150 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 。

取 100 μL 不同浓度的 DOX 溶液与 900 μL 异丙醇-盐酸溶液混合，在波长 480 nm 下测定吸光度，将吸光度与 DOX 浓度绘制成标准曲线备用，我们测定的 DOX-A480 标准曲线见附录-附件 5。

2. 产物超滤

记录制备完成的 DOX-Liposome 的体积 V_0 。使用 30 kDa 超滤管进行超滤并收集超滤后，超滤管中的液体（体积记为 V_2 ）与超滤下的液体（体积记为 V_1 ）。

该步骤有 2 个作用。一为对脂质体进行浓缩；二为分离不含脂质体的外部缓冲液，方便后续确认未包封 DOX 的量。

3. 包封率的测定

分别取 100 μL 上述液体与 900 μL 异丙醇-盐酸溶液混合，在波长 480 nm 下测定吸光度，并代入标准曲线中，超滤下的液体的吸光度记为 A_1 ，超滤后超滤管内获得的液体的吸光度记为 A_2 ，通过标曲将其分别换算为浓度 B_1 与 B_2 。

DOX 的载药量（Drug loading capacity, DLC）为：
$$\text{DLC} = V_2 \times B_2 - V_1 \times B_1$$

DOX 的包封率（Encapsulate efficacy, EE）为：
$$\text{EE}\% = \frac{V_2 \times B_2 - V_1 \times B_1}{B_2} \times 100\%$$

附录

附件清单：

附件 1：脂质溶液浓度与粒径/PDI 的关系图

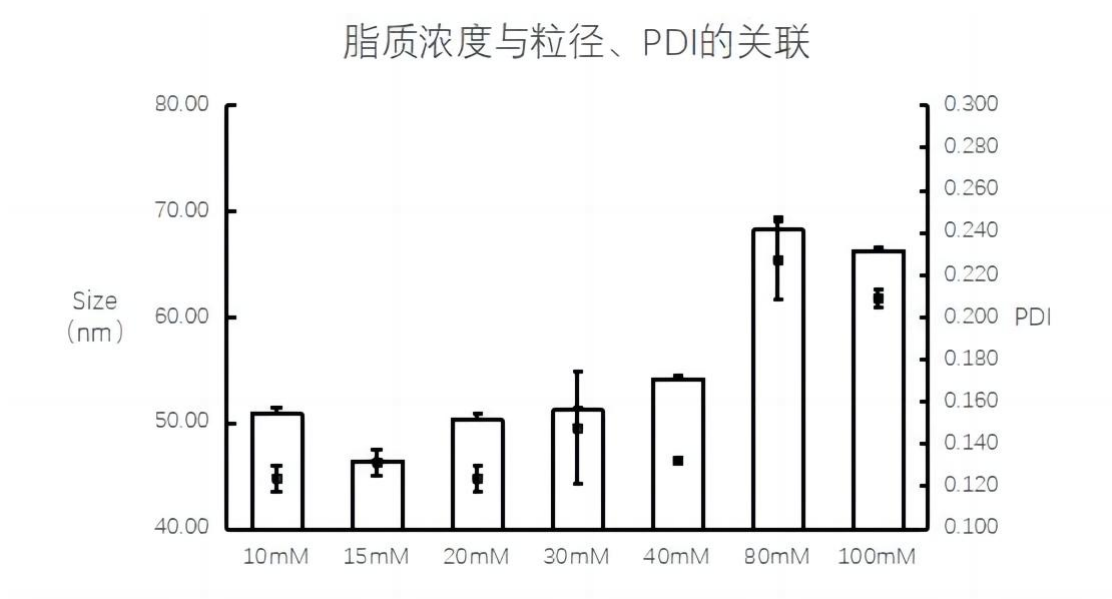
附件 2：Liposome 合成总流速与粒径/PDI 的关系图

附件 3：Liposome 合成流速比与粒径/PDI 的关系图

附件 4：乙醇浓度与稀释溶液对 Liposome 粒径/PDI 的影响

附件 5：DOX-A480 标准曲线

附件 1：脂质体（Liposome）合成中，脂质浓度与粒径/PDI 的关系图



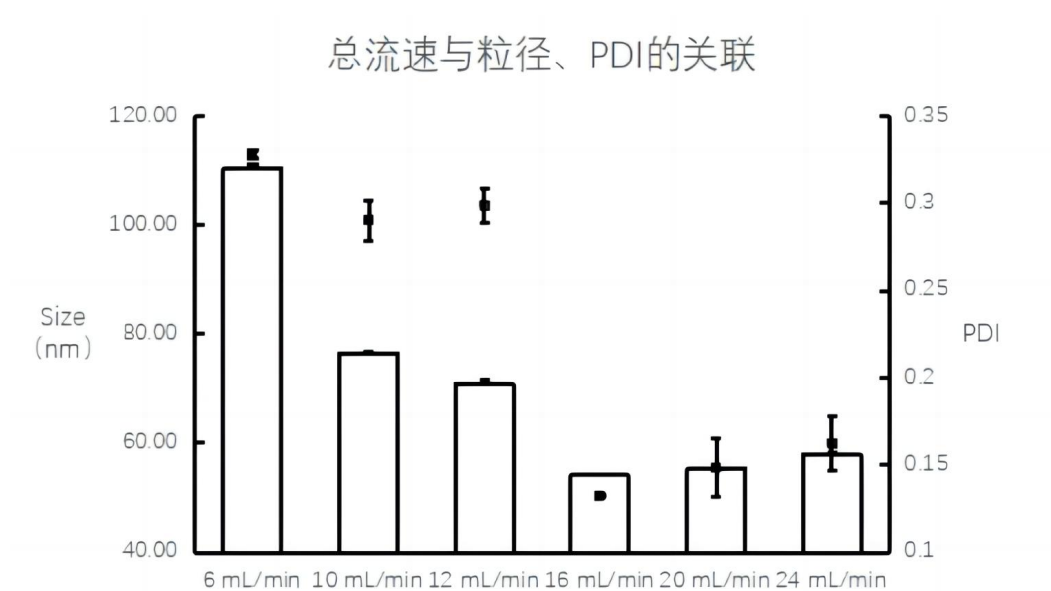
实验条件：仪器：FluidicLab-NP-S2；芯片：FluidicLab-COC-LNP-B1

总流速：16 mL/min；流速比（脂相：水相=1：4）；前废液：0.3 mL；Liposome 空包无 DOX；

产物经硫酸铵缓冲液稀释至乙醇浓度为 2.5%后进行 DLS 检测。

可见该配方下，15 mM 脂质溶液合成的脂质体粒径最小，且均一度佳。

附件 2: 脂质体 (Liposome) 合成中, 合成总流速与粒径/PDI 的关系图



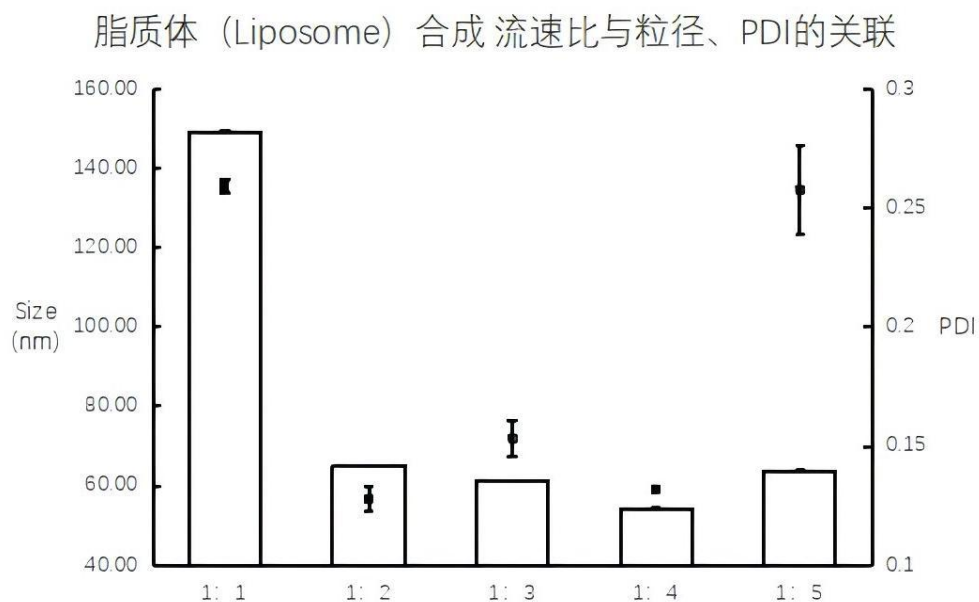
实验条件: 仪器: FluidicLab-NP-S2; 芯片: FluidicLab-B1

试剂浓度: 40 mM 脂质溶液;

流速比: 1: 3 (脂相: 水相); 前废液: 0.3 mL; Liposome 空包无 DOX; 产物经硫酸铵稀释至乙

醇浓度为 2.5%。可见该配方下, 15 mM 脂质溶液合成的脂质体粒径最小, 且均一度佳。

附件 3：脂质体 (Liposome) 合成中，合成流速比与粒径/PDI 的关系图



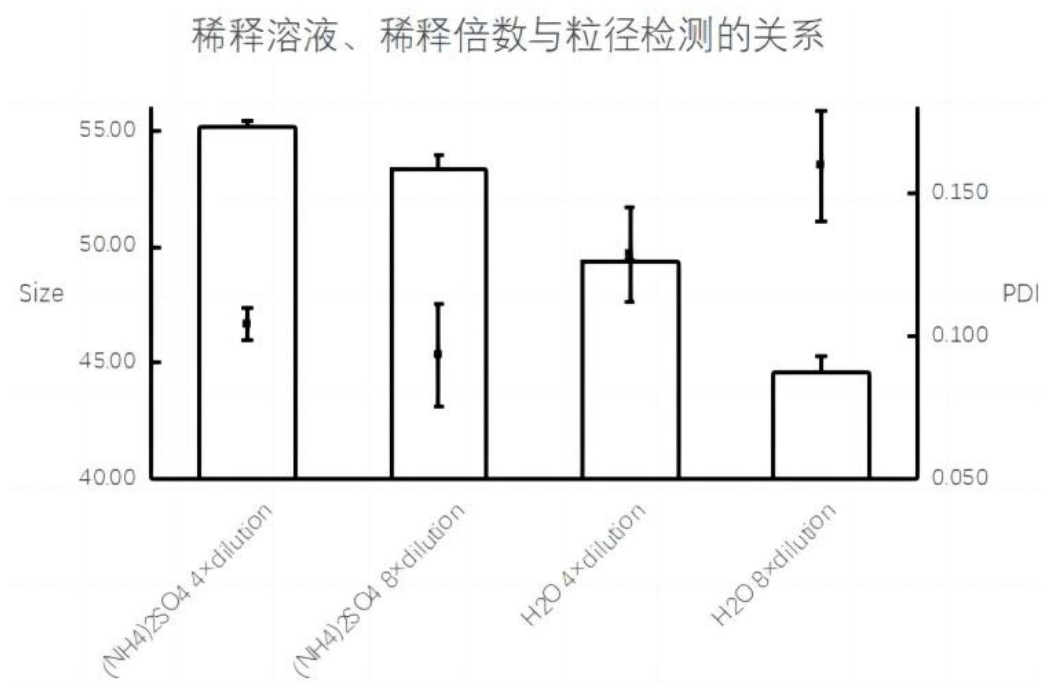
实验条件：仪器：FluidicLab-NP-S2；芯片：FluidicLab-B1

试剂浓度：40 mM 脂质溶液；

总流速：16 mL/min；前废液：0.3 mL；Liposome 空包无 DOX；各产物经硫酸铵稀释，确保乙醇浓度统一为 2.5%。

可见该配方下，1:4 的流速比合成的脂质体粒径最小。

附件 4：乙醇浓度与稀释溶液对脂质体（Liposome）粒径/PDI 的影响



实验条件：仪器：FluidicLab-NP-S2；芯片：FluidicLab-B1

试剂浓度：20 mM 脂质溶液；

总流速：16 mL/min；流速比 1：4（脂相：水相）；前废液：0.3 mL；Liposome 空包无 DOX；

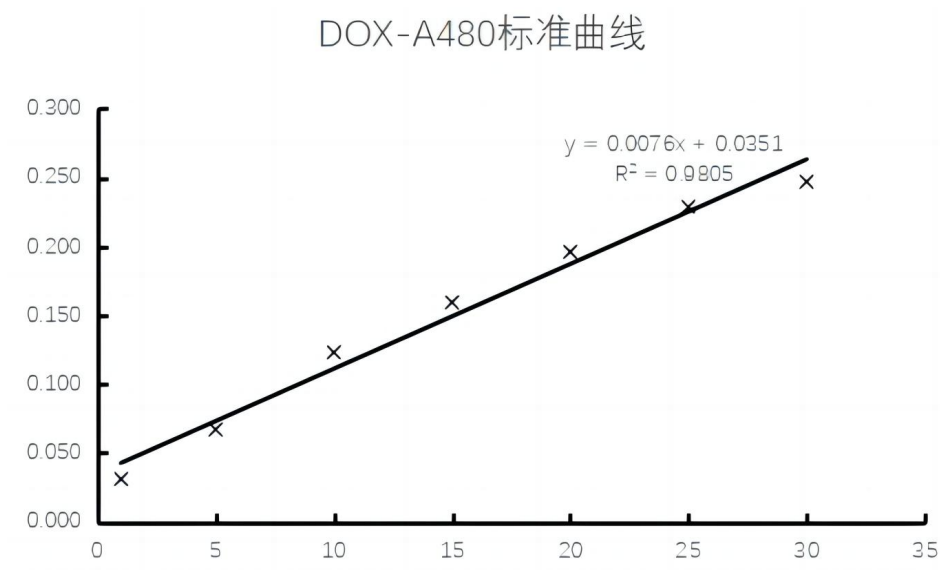
产物经不同溶液与稀释倍数稀释。

可见虽然水稀释测得的粒径更小，但 PDI 却较高，且在 1000 nm 以上的位置产生了小峰（见下图）。

这有可能是离子浓度发生了较剧烈改变导致的。因此为了获得更稳定的结果，我们推荐使用 **300**

mM 硫酸铵缓冲液将乙醇稀释至 2.5% 及以下。

附件 5: DOX-A480 标准曲线



可见 DOX 在 1 µg/mL-30 µg/mL 下的吸光度有较好的线性范围。

三. 基于微流控的混合方式制备 PLGA 纳米颗粒

实验方案：微流控混合方式制备 PLGA 纳米颗粒

聚乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA）因其独特的生物相容性、低免疫原性以及生物降解性，已被美国食品与药品管理局（FDA）批准用于药物辅料而进入药典。PLGA 在人体内经过降解，生成乳酸与羟基乙酸，两者均是人体代谢的副产物，不具有毒性。

PLGA 纳米颗粒的用途十分广泛。目前已有报道运用 PLGA 纳米颗粒包封一些治疗癌症的药物，如：阿霉素（DOX）、紫杉醇（PTX）、白藜芦醇等。与游离的药物相比，PLGA 纳米颗粒包封的药物对肿瘤的治疗效果有所提升。此外，PLGA 纳米颗粒还可以用于包裹蛋白质、多肽与 DNA 等生物大分子，以制备化妆品、骨修复材料等多类产品。同时，由于 PLGA 的机械强度大，其对包裹的内容物具有很好的保护作用。合适的制备工艺可以增加内容物的溶解性，提高其生物利用度，也可作为药剂缓释的载体。因此 PLGA 纳米颗粒具有广泛的开发前景。

实验目的及方法：

使用微流控方式，制备 PLGA 纳米颗粒。

实验原理：

使用微流控进行 PLGA 纳米颗粒的合成，原理上分为两种。第一类称为“自上而下”的合成（Top-down, 图 1）。该类合成使用难溶于水的溶剂（如二氯甲烷，即 DCM）溶解 PLGA。当[PLGA-二氯甲烷]与[PVA-水]溶液接触时，两者混合发生乳化，形成较大的 PLGA 颗粒。初始产物的乳化液

通过微混合器芯片的连续混合，分解成细乳化液。同时，有机溶剂扩散到周围的水相中（室温下二氯甲烷在水中的溶解度为 2%），颗粒固化，直径进一步减小。

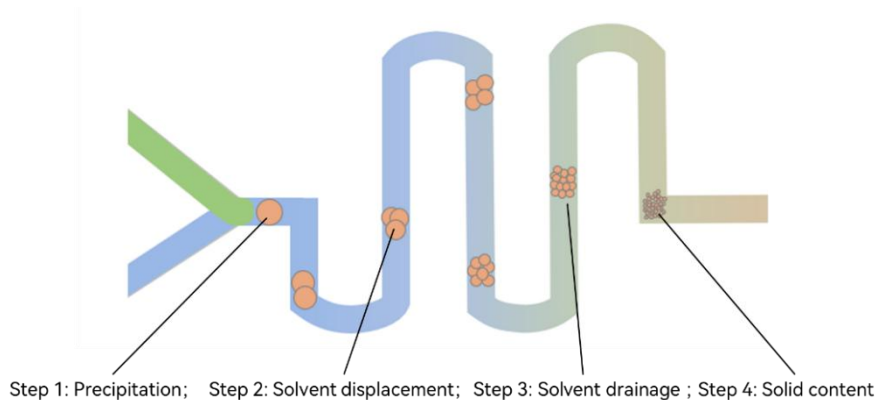


图 1. “Top-down” PLGA 纳米颗粒合成原理示意图

另一种称为“自下而上”的合成（Bottom-up，图 2）。该类合成使用易溶于水的溶剂（如丙酮）溶解 PLGA。在[PLGA-丙酮]与[PVA-水]溶液混合之时，PLGA 自发、随机地析出形成微核。随着层流混合的加剧和丙酮浓度的持续下降，微核表面会持续析出 PLGA，并逐步变大。该过程称为 PLGA 纳米颗粒的“生长”（Particle growth）。该过程会持续于整个微流控混合的过程中。而高效、均匀的混合可以确保该过程的持续性、稳定性和均一性，产生高单分散性的 PLGA 纳米颗粒。在该过程中以及合成完毕后，PLGA 纳米颗粒会逐步硬化并形成最终产物。

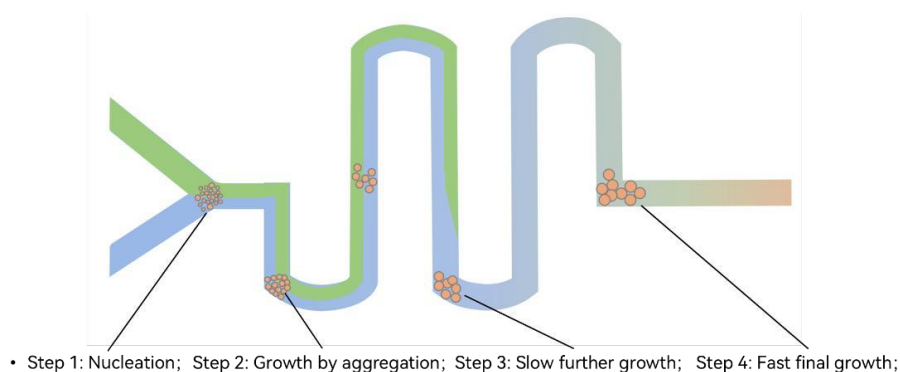


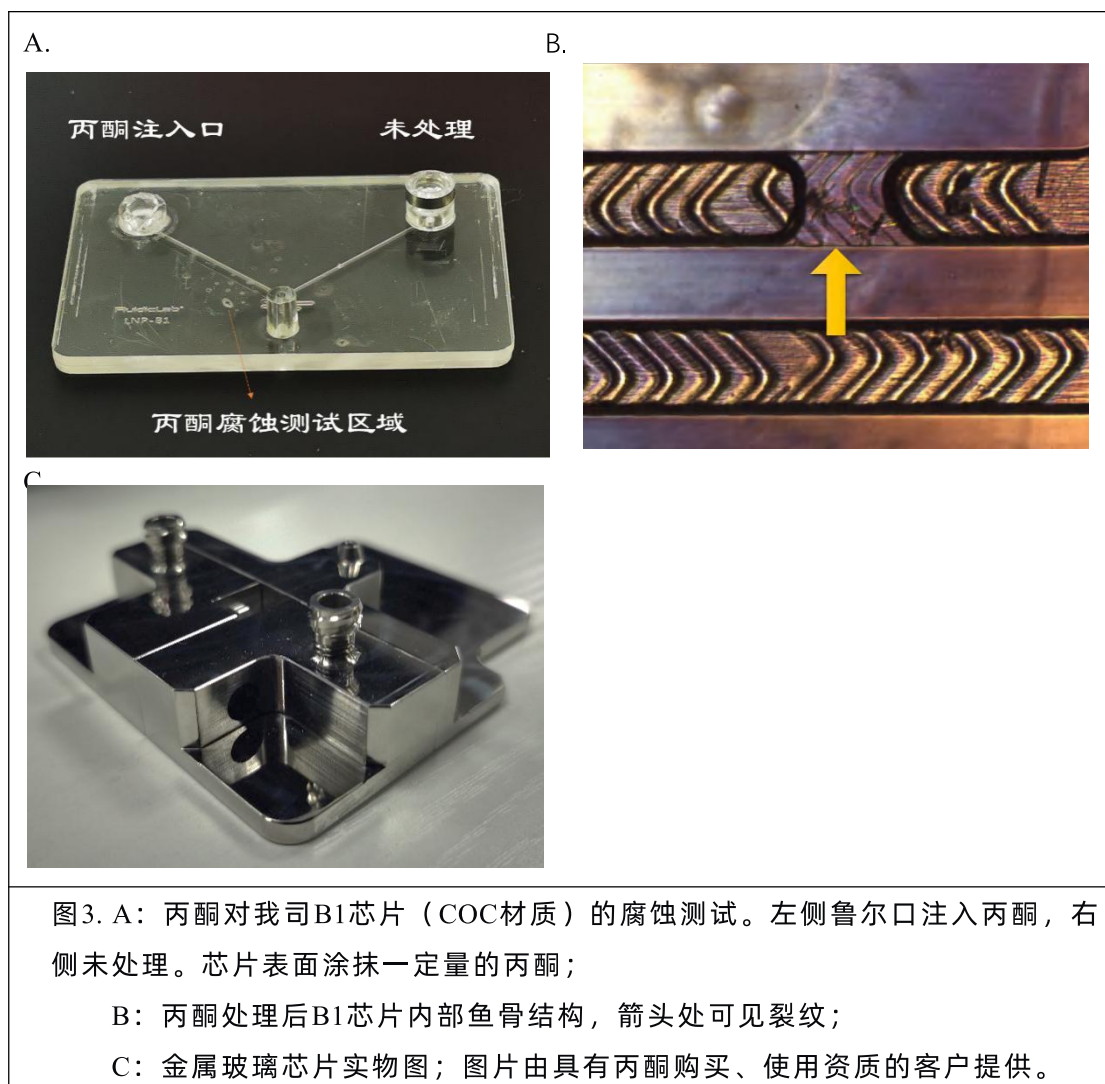
图 2. “Bottom-up” PLGA 纳米颗粒合成原理示意图

实验材料:

试剂	脂质成分（溶于丙酮）	PLGA（LA:GA=50:50, 20 kDa）
	缓冲液成分（溶于超纯水）	聚乙烯醇（PVA, 30000-70000）
		丙酮
		超纯水
耗材	合成需要	BD/新华/KDL 带鲁尔口的注射器若干 Falcon 15 mL离心管（352096） 20 mL棕色玻璃瓶若干
	若透析	生工透析膜，生物技术等级，CE膜，100 KD，扁平宽度24 mm，容积1.8 mL/cm（F131417-0001）
	若超滤浓缩	15 mL/100kD Milipore超滤管（外径50 mL）
	微混合芯片	FluidicLab金属-玻璃芯片：MTGL-FL-001
	微流控PLGA合成	FluidicLab智能纳米颗粒合成仪（NP-S2）
设备	PLGA检测	动态光散射仪（本文中使用的Malvern ZS90）
	PLGA超滤	冷冻离心机
	PLGA冷冻干燥	冷冻干燥机

微流控法制备 PLGA 纳米颗粒的难点

溶解 PLGA 一般需要强有机溶剂进行，包括二氯甲烷、丙酮等。而这些强有机溶剂经测试，短时接触即会对常用芯片材质 COC（或各类聚合物）造成不可逆损伤（图 3.A）。内部混合结构会逐步被破坏，导致混合效果变差。若使用玻璃芯片，则存在价格高、需要专用注射器接头进行转接等问题。上海澎赞生物提供智能纳米颗粒合成仪（NP-S2），配合独创专利“金属-玻璃”芯片助力 PLGA 纳米颗粒的合成（图 3.B）。



实验步骤:

1. 配置 PLGA 溶液

配置浓度为 100 mg/mL 的 PLGA 母液。

称取 PLGA 1 g, 加入 10 mL 丙酮。若溶解困难, 可使用超声辅助溶解。使用 0.22 μm 的 PTFE 滤膜过滤, 确保终产物中不含微小的固态颗粒。根据合成的 PLGA 粒径需要, 可将 PLGA 稀释至不同的浓度。

使用微流控合成 PLGA 纳米颗粒时，PLGA 纳米颗粒粒径与 PLGA 初始浓度相关联。当 PLGA 溶于丙酮溶液时，10 mg/mL PLGA 可以获得该配方下粒径最小、最均一的 PLGA 纳米颗粒；其浓度对其合成后的粒径影响可分别参考附录-附件 1。

2. 配置 PVA 溶液

配置浓度为 2% (w/v) 的 PVA 溶液。

称取 0.2 g PVA 粉末，加入 6 mL 超纯水震荡，放入 85°C 水浴锅中搅拌、加热直至溶解。溶解后使用超纯水定容至 10 mL。使用 0.22 μm 滤膜过滤，确保终产物中不含微小的固态颗粒。若需大量合成，则等比例放大配置量。

3. 微流控合成（见智能纳米颗粒合成仪 NP-S2 操作说明）

当使用丙酮作为 PLGA 溶剂时，微流控合成中的实验参数推荐值如下：

总流速 8~20 mL/min、流速比 1:1~1:3、可获得粒径小且均匀的 PLGA。实验者也可以根据实验需求调节流速比、总流速等参数来获得更大粒径的 PLGA 纳米颗粒。本方案是 PLGA 空包的实验流程，根据文献报道及实验测试，一般包裹了药物后 PLGA 纳米颗粒的粒径会变大。变大程度与药物的种类、浓度相关。关于微流控参数对空包 PLGA 合成的影响见附录-附件 2~3。

4. 粒径和 PDI 的检测

由于合成的 PLGA 纳米颗粒中含有丙酮与 PVA，过高的浓度会影响动态光散射仪（DLS）测量的准确性。我们根据测试（附录-附件 4）推荐使用超纯水进行 10 倍稀释（产物：水 = 1:9），从而获得较为准确、可信而稳定的数据。DLS 会测定粒径大小与多分散性指数（PDI），前者代表了纳米颗粒的大小，后者则反应了颗粒的均一程度。正常结果如图 4 所示：

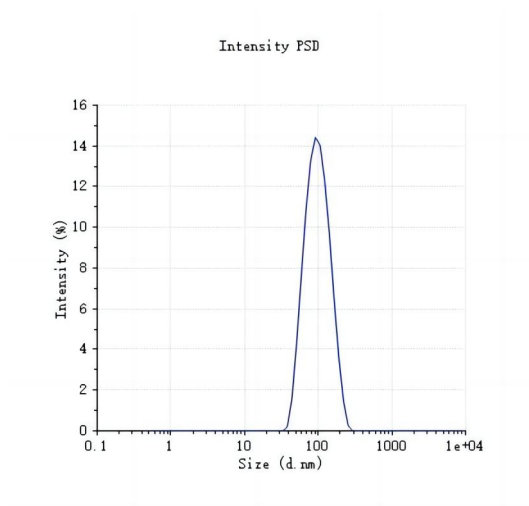


图 4. PLGA 纳米颗粒 动态光散射 检测结果

5. PLGA 后处理

A. 透析

不同厂家的透析膜有不同的预清洗/预处理流程，**请严格参考各厂家透析膜使用说明**。本文以生工 CE 透析膜（F131417-0001）为例进行说明。

预处理时，在室温下，剪取所需长度的膜，将膜浸泡在蒸馏水中 15~30 分钟除去防腐剂，然后用去离子水彻底冲洗膜。该款膜为防腐剂湿型包装，建议佩戴口罩、手套等防护用品操作。不推荐煮沸处理，以免损坏膜管或膜孔径。

注意：膜一旦处理为潮湿状态，不可让膜变回干燥状态，以免造成孔隙结构损坏。

由于我们使用的 PVA 分子量在 30 K-70 K 之间，故不建议使用 100 kD 以下孔径的透析袋或膜，过小孔径的膜会导致 PVA 被截留在袋内。

用透析膜夹，密封夹住透析膜一端；将合成后的 PLGA 纳米颗粒初产物液体直接移入透析袋，尽可能排空气泡。随后用透析膜夹封住另一端。为确保密封，可将冗余部分透析袋翻折后再夹紧。

将该装有 PLGA 纳米颗粒初产物的透析袋置于至少 100 倍体积的超纯水中，室温透析至少 6h，或透析过夜。在透析 2h 后，中途进行 1~2 次换液。

B. 超滤

若不进行透析，初产物 PLGA 也可使用超纯水补足到 15 mL，加入 100kD 超滤管中。于 4 °C，4000 g；离心 45 分钟。如此反复进行三次超滤。

对于 PLGA 纳米颗粒，超滤的方式得到的产物会更稳定，此步骤有别于 LNP 合成。但该结果需要更多的证据支持。

超滤或透析后，每 1mg PLGA 产物加入 1mg 海藻糖/蔗糖进行保存，短期可保存于 4°C，长期保存则需进行冷冻干燥。

PLGA 形成的纳米颗粒电镜图片如下：

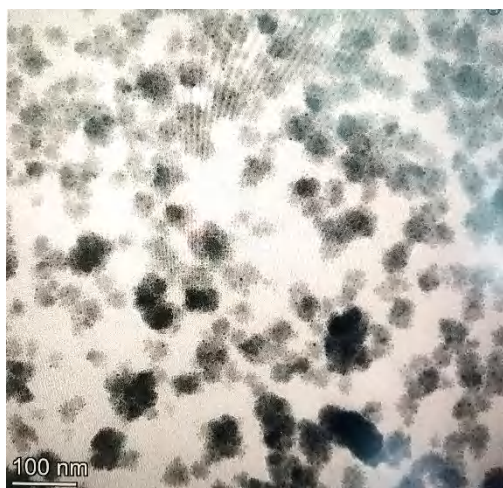


图 5：PLGA 包裹某小分子药物透射电镜图；

（鸣谢：南部战区总院 王之发老师供图）

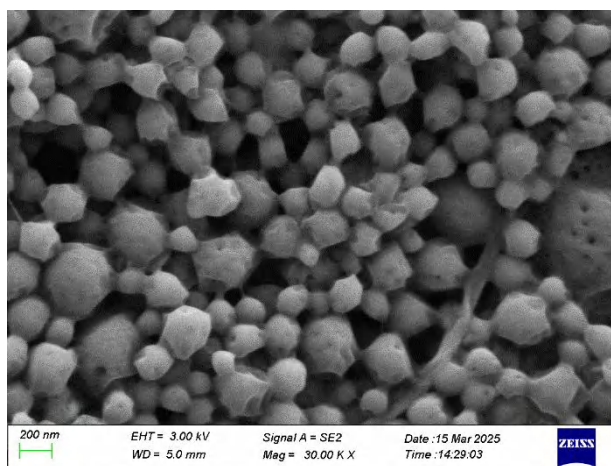


图 6：空载 PLGA 纳米颗粒扫描电镜

（鸣谢：长春应化所 丁建勋组 李昔纹老师供图）

6. PLGA 的冷冻干燥

冷冻干燥后，PLGA 可以重新溶解于水相。根据我们的实验结果可知，无保护剂情况下重新溶解的 PLGA 纳米颗粒粒径与 PDI 都与原始颗粒相比，显著增大；而加入蔗糖或海藻糖作为保护剂后，能够有效稳定 PLGA 纳米颗粒。冷冻干燥步骤如下：

- A. 首先将样本置于培养皿中，增大表面积，-80°C 冰箱进行预冷冻；
- B. 设置样本进行 -50°C，常压下的冷冻干燥；持续 3 小时
- C. 设置样本进行 -50°C，抽真空后进行冷冻干燥；持续 15 小时。

说明：本文所有实验或测试结果均来源于有丙酮购买和使用资质的实验室合作得出。

附录

附件清单：

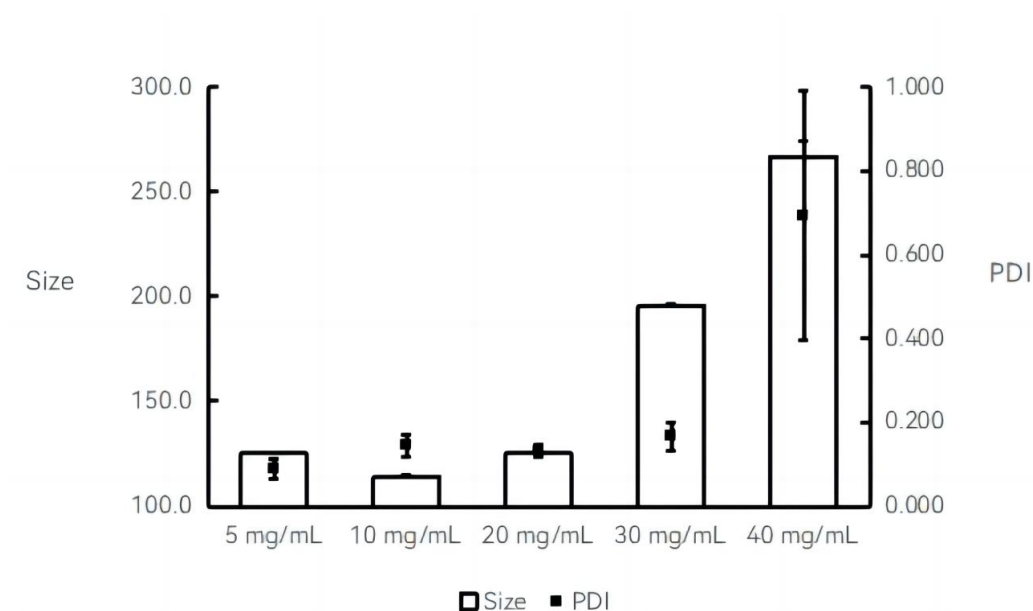
附件 1：不同浓度的 PLGA-丙酮与合成的 PLGA 纳米颗粒粒径\PDI 的关系

附件 2：PLGA 纳米颗粒合成的总流速与粒径\PDI 的关系（PLGA-丙酮）

附件 3：PLGA 纳米颗粒合成的流速比与粒径\PDI 的关系（PLGA-丙酮）

附件 4：不同稀释方法与 PLGA 纳米颗粒粒径\PDI 的关系

附件 1: 不同浓度的 PLGA-丙酮与合成的 PLGA 纳米颗粒粒径\PDI 的关系



实验条件：仪器：FluidicLab-NP-S2；芯片：FluidicLab-MTGL-FL-001

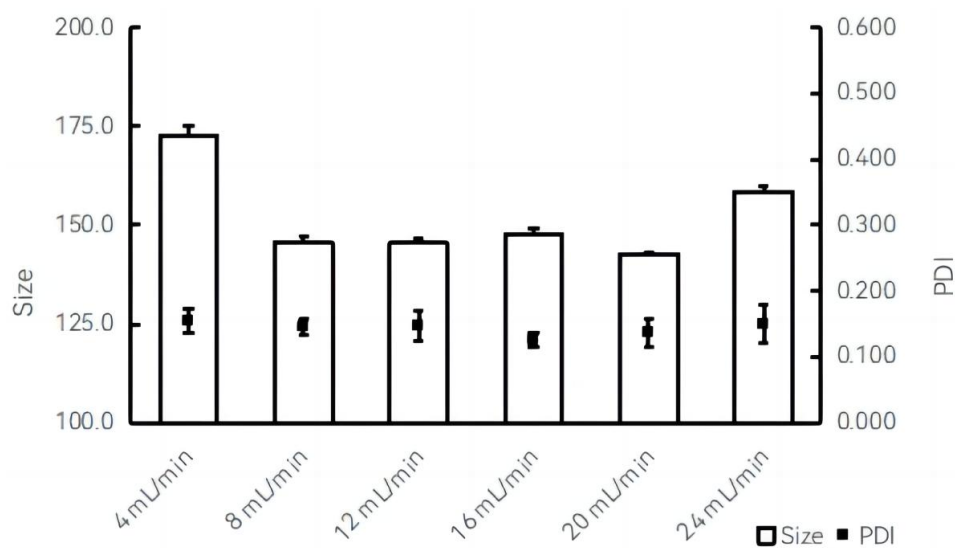
不同浓度的 PLGA-丙酮溶液；

总流速：12 mL/min；流速比（脂相:水相=1:1）；前废液：0.5 mL；超纯水稀释至 10 倍检测。

【结论】

该实验条件下，10 mg/mL 的 PLGA-丙酮溶液可得粒径最小的 PLGA 纳米颗粒。

附件 2：PLGA 纳米颗粒合成的总流速与粒径\PDI 的关系 (PLGA-丙酮)



实验条件：仪器：FluidicLab-NP-S2；芯片：FluidicLab-MTGL-FL-001

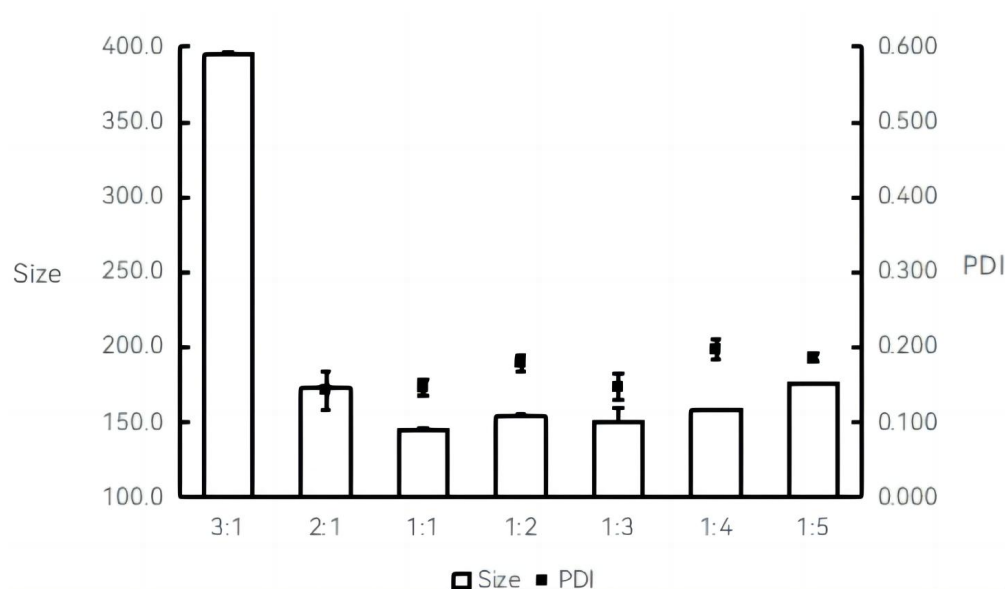
试剂浓度：20 mg/mL PLGA-丙酮溶液；流速比（脂相:水相=1:1）；

不同总流速与粒径的关联；前废液：0.5 mL；使用超纯水稀释至 10 倍后检测。

【结论】

该实验条件及 PLGA 配方下，使用 8mL/min 的总流速即可获得较小粒径的 PLGA 纳米颗粒，且增加流速粒径变化不显著。20mL/min 流速得到的 PLGA 纳米颗粒粒径最小。

附件 3：PLGA 纳米颗粒合成的流速比与粒径\PDI 的关系 (PLGA-丙酮)



实验条件：仪器：FluidicLab-NP-S2；芯片：FluidicLab-MTGL-FL-001

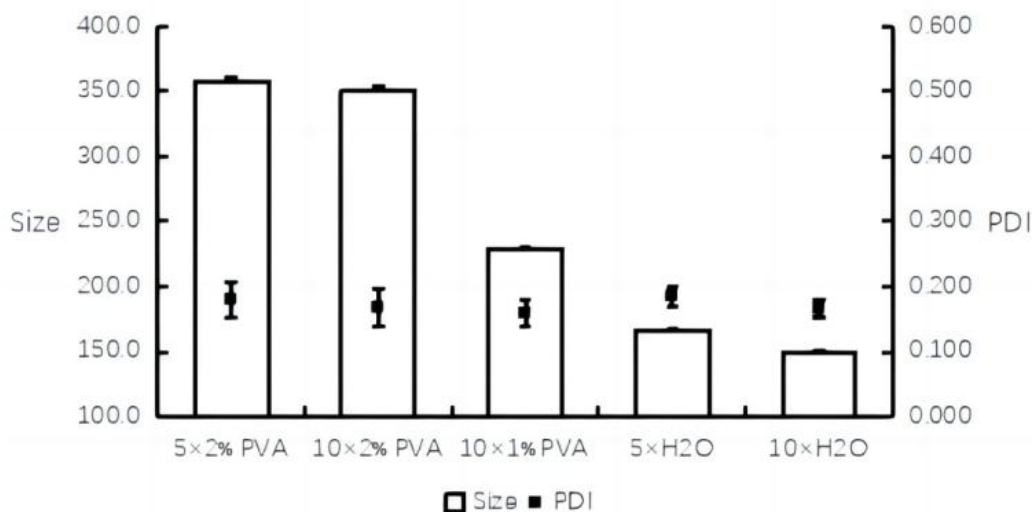
试剂浓度：20 mg/mL PLGA-丙酮溶液；

总流速：8 mL/min；不同流速比；前废液：0.5 mL；产物使用超纯水稀释至 10 倍后检测。

【结论】

该实验条件下，PLGA-丙酮与 PVA 水溶液使用 1:1 的流速比合成 PLGA 纳米颗粒粒径最小。

附件 4：不同稀释方法与 PLGA 纳米颗粒粒径\PDI 的关系



实验条件：仪器：FluidicLab-NP-S2；芯片：FluidicLab-MTGL-FL-001

试剂浓度：20 mg/mL PLGA-丙酮溶液；

总流速：8 mL/min；流速比 1:1（脂相:水相）；前废液：0.5 mL；产物使用超纯水或 2%PVA 溶液稀释。

【结论】

使用超纯水对合成的 PLGA 纳米颗粒初产物稀释 10 倍测得的粒径最小最均一。

由于 PVA 在水中会影响水对光的吸收及折射率，且水稀释纳米颗粒一般不会改变粒径，故认为水稀释后最能反应 PLGA 原始粒径，并推荐使用该稀释比检测。

FluidicLab[®]

— 上海澎赞生物科技有限公司 —



上海市杨浦区纪念路8号财大科技园1号楼315



021-65103566



sale@fluidiclab.com



www.fluidiclab.com

★ 该手册仅限于科研使用