

微量紫外 - 可见分光光度法测定阳离子脂质体中MicroRNA的含量

贺井刚, 吴孟岚, 文鑫鑫, 谭霖, 杨从武

黔东南苗族侗族自治州食品药品检验检测中心, 贵州 凯里

收稿日期: 2025年4月15日; 录用日期: 2025年4月28日; 发布日期: 2025年5月23日

摘要

目的: 建立以硬脂胺制备载MicroRNA阳离子脂质体中RNA含量测定的方法。方法: 采用Q5000微量紫外 - 可见分光光度计, 检测波长为260 nm, 进行标准曲线绘制, 精密度, 重复性, 稳定性及回收率等考察, 建立可靠的、灵敏的RNA含量测定方法。结果: 得到MicroRNA的线性回归方程: $Y = 1.0378X - 4.0546$, ($R^2 = 0.9984$), 在3.32~1091.22 ng/ μ L范围内具有良好的线性关系, 精密度RSD值为0.41%, 重复性RSD值为3.62%, 稳定性RSD值为0.63%, 加样回收率平均值为99.80%, RSD值为1.81%。阳离子脂质体中MicroRNA含量为 200.73 ± 10.31 ng/ μ L。结论: 本实验方法简便准确、重复性好、灵敏度高、含量测定方法稳定可行, 适用于阳离子脂质体中MicroRNA的含量测定。

关键词

阳离子脂质体, MicroRNA, 微量紫外 - 可见分光光度计, 含量测定, 标准曲线

Determination of MicroRNA in Cationic Liposomes by Micro UV Spectrophotometry

Jinggang He, Menglan Wu, Xinxin Wen, Lin Tan, Congwu Yang

Qiandongnan Miao and Dong Autonomous Prefecture Food and Drug Inspection and Testing Center, Kaili Guizhou

Received: Apr. 15th, 2025; accepted: Apr. 28th, 2025; published: May 23rd, 2025

Abstract

Objective: To establish a method for the determination of RNA in MicroRNA cationic liposomes prepared with Stearic amine. **Methods:** A Q5000 UV-visible spectrophotometer was used with the detec-

文章引用: 贺井刚, 吴孟岚, 文鑫鑫, 谭霖, 杨从武. 微量紫外-可见分光光度法测定阳离子脂质体中 MicroRNA 的含量[J]. 药物化学, 2025, 13(2): 168-175. DOI: 10.12677/hjmce.2025.132018

tion wavelength of 260 nm, and the standard curve drawing, precision, repeatability, stability and recovery were investigated to establish a reliable and sensitive method for the determination of RNA content. Results: The linear regression equation for MicroRNA was obtained: $Y = 1.0378X - 4.0546$, ($R^2 = 0.9984$), with good linearity in the range of 3.32~1091.22 ng/ μ L, precision RSD value of 0.41%, repeatability RSD value of 3.62%, stability RSD value of 0.63%, mean spiked recovery of 99.80%, and the RSD value was 1.81%. The content of MicroRNA in cationic liposomes was 200.73 ± 10.31 ng/ μ L. Conclusion: The established present experimental method was simple, accurate, reproducible, sensitive, stable and could be used for the determination of MicroRNA in cationic liposomes.

Keywords

Cationic Liposome, MicroRNA, Micro UV-Vis Spectrophotometer, Content Determination, Standard Curve

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

MicroRNA(miRNA)是一类内生的、长度约为 20~24 个核苷酸的小 RNA, 是短的非编码 RNA 调控元件, 其在细胞内具有多种重要的调节作用[1]。以 RNA 为技术原理在医疗领域进行治疗病症事业已然有了一定的初步发展, 到目前为止, 已有 Patisiran, Givlaari, Oxelumo, Leqvio 和 Amvuttra 等五种 RNA 药物递送系统获得美国食品和药物管理局批准并上市[2]。脂质体介导的基因传递是最早的用于把外源性遗传物质引入宿主细胞的策略之一[3][4]。在 20 世纪 80 年代, 有研究证明使用脂质体可以向宿主细胞传递外源性的球蛋白信使 RNA (Globin mRNA)、DNA 和染色体[5]。脂质体是一种以脂质为基础的囊泡系统, 最常使用的阳离子脂质体是两亲性分子, 其共有结构由一个带正电荷的头基和一个或两个由烃链或甾类结构组成的疏水尾部区域组成[6][7], 且具备较好的安全性和生物降解性。

结合国内外研究, 现有的 RNA 含量测定方法有如下几种: 普通紫外-可见分光光度法[8][9]、凝胶电泳法、荧光分光光度法、高效液相色谱法[10][11]。普通紫外-可见分光光度法在药物分析[12]、标准物质研制[13]等领域都发挥着重要的作用。普通紫外-可见分光光度计利用核酸分子在 260 nm 处具有最大吸收峰, 可进行定量分析[14]。但是普通紫外-可见分光光度法用于核酸标准物质特性量值确定时, 只适用于浓度高, 纯度大的 RNA 样品[8]。

凝胶电泳法进行 RNA 电泳是常用的分子生物学实验技术, 可分为非变性电泳和变性电泳[15]。目前, 最常用的变性电泳为甲醛琼脂糖凝胶电泳[16]。琼脂糖凝胶机械强度较差, 容易破碎, 保存不方便, 配置的时间需要临近使用的时间, RNA 浓度过低时条带不明显; 最终测得的结果定量精确性差[17]。荧光分光光度法在近年来在 RAN 含量测定领域被应用。但是, 用于 RNA 定量研究的荧光染料其自身有较高的本底荧光, 对于<50 bp 基因片段灵敏度较低, 也并不适合 21 bp 的 siRNA 含量测定等研究[18][19]。同时, 在荧光的光强并不高时, 呈线性情况并不是很理想; 受某些离子的干扰影响, 荧光会湮灭, 实验速度必须要快[20][21]。因此, 开发同时具备操作简便、灵敏度高、样品量小的核酸类药物含量测定方法具有较大的必要性。

Quawell Q5000 是一款微容量的紫外可见分光光度计。在全光谱(200~850 nm)范围内可以测量核酸、微阵列探针、纯化后的蛋白质和荧光染色蛋白; 监测悬浮的细胞、细菌和酵母培养物的密度; 同时也可

以进行一般的实验室紫外-可见光吸光度测量。Q5000 不需要使用比色皿, 上样量仅需 0.5~2 μL , 并在大约 8 秒内测量出样品浓度, 具有高度的准确性和可重复性。

本课题采用前期实验研究制备的负载 MicroRNA 的硬脂胺阳离子脂质体(Stearic amine cationic liposome/MicroRNA, SCL/MicroRNA), 使用 Q5000 微量紫外-可见分光光度计对 RNA 含量测定方法的建立, 拟对 RNA 含量测定方法进行补充, 为 RNA 药物递送系统的发展提供实验参考。

2. 材料与方法

2.1. 仪器

Q5000 微量紫外可见分光光度计(上海在途生物科技有限公司); KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); IKA RV3 旋转蒸发仪(艾卡仪器设备有限公司); UPW 型实验室专用纯水仪(成都天萃宁科技有限公司); Avanti 脂质体挤出器(美国 Avanti Polar Lipids 公司)。

2.2. 试剂与试剂

MicroRNA(上海吉玛制药技术有限公司, 批号: 20240522, 20240726, 20240810); 甲醇(国药集团化学试剂有限公司, 分析纯, 批号: 20241127); DEPC 去酶水(北京 solarbio 公司, 批号: 20241007); MicroRNA 阳离子脂质体自制(批号: 20240220, 20240221, 20240224); 大豆磷脂(PC, 上海太伟药业有限公司, 批号 202408012, 纯度 90%); 胆固醇(CHO, 上海源叶生物, 批号 57885, 纯度 95%); 硬脂胺(上海源叶生物, 批号 F2001126, 纯度 97%)。

2.3. 方法

2.3.1. 载 MicroRNA 硬脂胺阳离子脂质体(SCL/MicroRNA)的制备

精密称取 120 mg PC、40 mg CHO、5 mg 硬脂胺溶于 5 mL 无水乙醇, 50℃超声溶解, 于 50℃水浴旋蒸除去有机溶剂, 加入 12 mL DEPC 去酶水于 50℃水浴超声水合 30 min, 于挤出器过孔径为 200 nm 的聚碳酸酯膜 7 次, 得阳离子脂质体 SCL。选择 N:P 为 10:1 作为其最佳复合氮磷比将 SCL 和 MicroRNA 在室温下孵育 30 min, 得 SCL/MicroRNA。

2.3.2. 测定方法

1. 测定波长的选择

RNA 在 260 nm 吸收最强, 参照(中国药典 2020 版通则 0401), 在 260 nm 处吸收峰的比吸光系数 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 值(207)为计算含量依据。

2. 对照品溶液的制备

取购买的 MicroRNA, 按照说明书配置成溶液, 加入 DEPC 去酶水 31 μL 使其溶解并摇匀, 即得浓度为 1064.00 ng/ μL 的 MicroRNA 储备液。

3. 供试品溶液及空白对照溶液的制备

分别精密量取实验室前期制备的 SCL/MicroRNA 和 10% Triton X-100 (v/v) 10.0 μL , 40 KHz 超声 5 min 破乳, 混匀, 即得 SCL/MicroRNA 供试品溶液; 精密量取实验室自制 SCL, 同法操作, 即得空白对照溶液。

4. 样品测定

打开仪器, 设置测量对象为 RNA, 波长设置为 260 nm, 移液枪精密吸取 2.0 μL 空白溶液调零, 擦拭纸搽干空白溶液, 移液枪精密吸取 2.0 μL 供试品溶液测量即得 RNA 的浓度。

2.4. 方法学考察

2.4.1. 线性关系

精密量取对照品的储备液, 用 DEPC 去酶水分别配置成 4.16、16.63、66.50、133.00、266.00、532.00、1064.00 ng/ μ L 的样品。用微量紫外-可见分光光度计在 260 nm 波长处测定浓度, 以理论浓度为横坐标, 实际浓度为纵坐标, 绘制标准曲线。

2.4.2. 精密度考察

取 MicroRNA 对照品溶液 20 μ L, 将溶液摇匀, 平行制备 6 份, 连续 6 次测定 RNA 浓度, 记录测定结果并计算 RSD。

2.4.3. 重复性试验

取制备好的 SCL/MicroRNA 样品 6 份, 按照“2.3.2.3”法制备供试品溶液, 按“2.3.3.4”测定浓度, 记录测定结果并计算 RSD。

2.4.4. 溶液稳定性试验

1. 对照品冻融稳定性

取“2.3.2.2”的对照品溶液, 于-20℃反复冻融 1、2、3、4、5、6 次后测定 RNA 浓度, 记录测定结果并计算 RSD。

2. 供试品储存稳定性

取“2.3.2.3”供试品溶液, 分别室温下储存 0、0.25 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、12 h、24 h、48 h 后按“2.3.3.4”测定浓度, 记录测定结果并计算 RSD。

2.4.5. 加样回收试验

分别精密量取 6 份 MicroRNA 含量为 219.36 ng 的 SCL/MicroRNA 样品 2 μ L, 置 1.5 mL EP 管中, 并精密量取 MicroRNA 对照品溶液 2 μ L(每 2 μ L 中 miR-126 含量为 532.00 ng)加样, 按“2.3.2.3”供试品溶液的制备方法制备加样回收样品溶液, 按“2.3.3.4”测定浓度, 计算回收率。

2.4.6. 含量测定

分别取 3 批 MicroRNA 阳离子脂质体制剂样品, 按“2.3.2.3”项下供试品溶液的制备方法制备, 按“2.3.3.4”测定浓度, 并计算阳离子脂质体中 MicroRNA 含量。

3. 结果

3.1. MicroRNA 线性考察结果

用微量紫外-可见分光光度计在 260 nm 波长处测定浓度, 以理论浓度为横坐标, 实际浓度为纵坐标, 绘制标准曲线。拟合得 MicroRNA 的线性回归方程为($n=7$) $Y=1.0378X-4.0546$, ($R^2=0.9984$), 在 3.32~1091.22 ng/ μ L 范围内线性关系良好, 标准曲线见图 1。

3.2. 精密度考察

MicroRNA 对照品溶液连续检测 6 次, 计算得精密度 RSD 为 0.41%, 表明仪器精密度良好。考察结果见表 1。

3.3. 重复性试验

重复性试验测得 RSD 值为 3.62%, 结果表明重复性良好。考察结果见表 2。

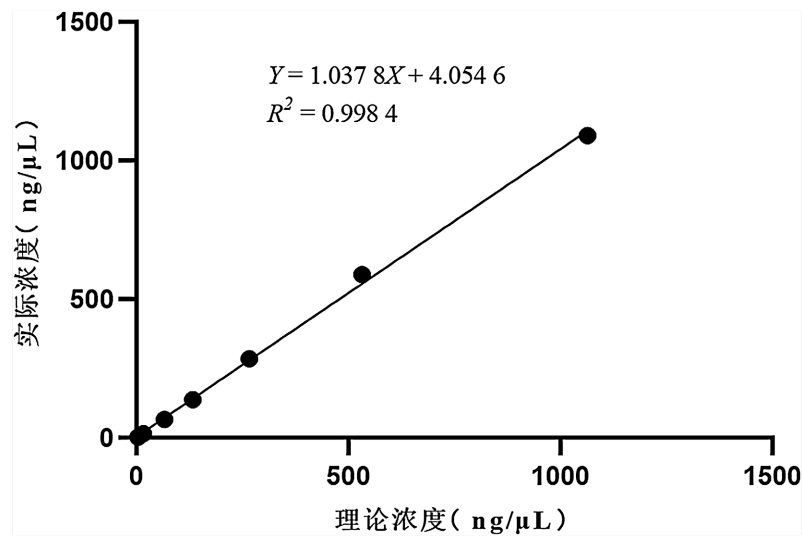


Figure 1. MicroRNA linear experimental results
图 1. MicroRNA 线性实验结果

Table 1. Precision test results
表 1. 精密度试验结果

编号	浓度(ng/μL)	平均浓度(ng/μL)	RSD
1	281.13	282.75	0.41%
2	283.34		
3	282.33		
4	282.60		
5	284.61		
6	282.50		

Table 2. Repeatability test results
表 2. 重复性试验结果

编号	浓度(ng/μL)	平均浓度(ng/μL)	RSD
1	176.39	188.30	3.62%
2	185.08		
3	195.78		
4	190.16		
5	189.75		
6	192.65		

3.4. 稳定性试验

稳定性考察对照品溶液测量得到 RSD 为 0.63%，供试品溶液 RSD 为 2.75%；表明对照品在-20℃条件下保存，反复冻融 6 次基本稳定，供试品溶液在室温条件下，至少 48 h 内基本稳定。对照品稳定性见表 3，供试品稳定性结果见表 4。

Table 3. Stability test results of reference substance
表 3. 对照品稳定性试验结果

冻融次数(次)	浓度(ng/μL)	平均浓度(ng/μL)	RSD
1	282.60	282.48	0.63%
2	282.18		
3	282.93		
4	284.15		
5	283.82		
6	279.19		

Table 4. Test results of stability of test sample
表 4. 供试品稳定性试验结果

储存时间(h)	浓度(ng/μL)	平均浓度(ng/μL)	RSD
0	199.27	206.17	2.75%
0.25	198.91		
0.5	201.59		
1	202.36		
2	205.26		
4	207.67		
6	208.87		
12	209.14		
24	213.47		
48	215.19		

3.5. 加样回收率试验

按公式：回收率 = (加标试样测定值 - 试样测定值)/加标量 × 100%，平均回收率为 99.80%，RSD 值为 1.81 %，该含量测定方法加样回收率平均值为 99.80%。结果见表 5。

Table 5. Experimental results of sample recovery rate
表 5. 加样回收率实验结果

序号	取样量/μL	样中量/ng	加入量/ng	测得量/ng	回收率/%	平均值	RSD%
1	2.00	219.36	564.66	763.08	96.29	782.90	1.81%
2	2.00	219.36	564.66	798.76	102.61		
3	2.00	219.36	564.66	796.00	102.12		
4	2.00	219.36	564.66	793.86	101.74		
5	2.00	219.36	564.66	760.28	95.80		
6	2.00	219.36	564.66	785.38	100.24		

3.6. 含量测定

三批阳离子脂质体中 MicroRNA 平均含量分别为 211.43 ng/μL，190.85 ng/μL，199.92 ng/μL。RSD 值

分别为 2.6%, 0.82%, 0.73%, 表明该阳离子脂质体中的 MicroRNA 含量较稳定。结果见表 6。

Table 6. Experimental results of content determination (n = 3)

表 6. 含量测定实验结果(n = 3)

样品	批号	含量(ng/μL)	RSD
1	20240220	211.43	2.6%
2	20240221	190.85	0.82%
3	20240224	199.92	0.73%

4. 讨论

目前, RNA 含量测定方法主要有普通紫外-可见分光光度法、凝胶电泳法、荧光分光光度法等; 但均存在精密密度不高, 灵敏度较差, 操作过程繁琐, 用量大等一种或多种同时存在的缺点。本课题使用微量紫外-分光光度计测量 MicroRNA 的含量, 设定好检测对象和最大吸收波长后可直接测量得到 RNA 的浓度; 操作简便、检测范围较广。

在实验过程中, 由于 MicroRNA 是核酸的一种, 而核酸又存在易被酶解或聚集等缺点, 因此在测量时需使用无酶枪头, 以防止 MicroRNA 被酶解, 每次测量前需吹打样品数次保证测量结果的准确性。SCL 阳离子脂质体由 PC、CHO 和硬脂胺按一定比例制备, 辅料在 260 nm 处会出现一定吸收, 从而干扰最终测得 MicroRNA 的浓度, 因此在测定 MicroRNA 供试品浓度时务必使用空白 SCL 溶液调零。同样, 在对供试品进行稳定性实验时, 温度和时间都会对其结果造成影响, 在 4℃ 条件下存放测得结果不稳定, RSD 值较大, 可能是由于阳离子脂质体在 4℃ 条件下可能发生相变, 导致脂质双分子层排列紊乱(如从液晶相转变为凝胶相)。这种相变会破坏脂质体与 microRNA 的静电复合结构, 使包封的核酸释放。研究显示, DOTAP/DOPE 脂质体在低于相变温度(T_m)时粒径会增大 20%~40%。在室温下只能保证存放 48 h 内 RSD 值在规定范围内, 若室温放置时间增加, 则 RSD 值会随着时间的增加而增大。因此, 考虑将脂质体制备成冻干粉针剂, 可能是实验室自制的 MicroRNA 阳离子脂质体稳定性改进的一个理想方法。

通过方法学研究验证, 本文建立的以 MicroRNA 为模型测定 RNA 含量的微量紫外-分光光度法线性、精密密度、加标回收率等均良好, 可以对 RNA 含量测定方法进行补充, 为 RNA 药物递送系统发展提供实验参考。随着核酸药物(如 mRNA 疫苗、siRNA、ASO 等)的快速发展, 准确、高效、稳定的含量测定技术成为质量控制的关键环节; 未来核酸药物含量测定技术的发展将围绕高灵敏度、自动化、智能化、无损化方向发展, 并结合微流控、CRISPR 检测、AI 分析等前沿技术。

参考文献

- [1] Jiménez-Morales, J.M., Hernández-Cuenca, Y.E., Reyes-Abrahantes, A., Ruiz-García, H., Barajas-Olmos, F., García-Ortiz, H., *et al.* (2022) MicroRNA Delivery Systems in Glioma Therapy and Perspectives: A Systematic Review. *Journal of Controlled Release*, **349**, 712-730. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.07.027>
- [2] Paul, A., Muralidharan, A., Biswas, A., Kamath, B.V., Joseph, A. and Alex, A.T. (2022) siRNA Therapeutics and Its Challenges: Recent Advances in Effective Delivery for Cancer Therapy. *OpenNano*, **7**, Article ID: 100063. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100063>
- [3] Cai, W., Liu, J., Zheng, L., Xu, Z., Chen, J., Zhong, J., *et al.* (2021) Study on the Anti-Infection Ability of Vancomycin Cationic Liposome Combined with Polylactide Fracture Internal Fixator. *International Journal of Biological Macromolecules*, **167**, 834-844. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.039>
- [4] Yang, S., Tang, Q., Chen, L., Chang, J., Jiang, T., Zhao, J., *et al.* (2020) Cationic Lipid-Based Intracellular Delivery of Bacterial Effectors for Rewiring Malignant Cell Signaling. *Angewandte Chemie International Edition*, **59**, 18087-18094. <https://doi.org/10.1002/anie.202009572>

- [5] Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K. and Farokhzad, O.C. (2008) Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, **5**, 505-515. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- [6] Yadav, K., Singh, D., Singh, M.R. and Pradhan, M. (2020) Multifaceted Targeting of Cationic Liposomes via Co-Delivery of Anti-IL-17 siRNA and Corticosteroid for Topical Treatment of Psoriasis. *Medical Hypotheses*, **145**, Article ID: 110322. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110322>
- [7] Fotoran, W.L., Kleiber, N., Glitz, C. and Wunderlich, G. (2020) A DNA Vaccine Encoding *Plasmodium falciparum* PfRH5 in Cationic Liposomes for Dermal Tattooing Immunization. *Vaccines*, **8**, Article 619. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040619>
- [8] 徐明明, 郑璐侠, 王自强, 等. 注射用核糖核酸的含量测定方法比较[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(11): 1436-1441.
- [9] Jia, X., Liu, Y., Wagner, A.M., Chen, M., Zhao, Y., Smith, K.J., *et al.* (2021) Enabling Online Determination of the Size-Dependent RNA Content of Lipid Nanoparticle-Based RNA Formulations. *Journal of Chromatography B*, **1186**, Article ID: 123015. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123015>
- [10] 张再平, 吴小曼, 石蓓佳, 等. 反相离子对色谱法测定注射用核糖核酸酶解产物中的 5'-核苷酸[J]. 中南药学, 2013, 11(3): 194-198.
- [11] Hua, J. and Huang, K.L. (2010) Optimization by Orthogonal Array Design of Ion-Pair HPLC Separation of the Enzymatic Hydrolysis Products of Yeast RNA. *Chinese Chemical Letters*, **21**, 1453-1456. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2010.07.002>
- [12] 郑冬妮. 紫外-可见分光光度计测定食品中亚硝酸盐含量的不确定度评定[J]. 食品界, 2017(3): 88-89.
- [13] Yao, D.B., Chi, D.F., Yu, J., *et al.* (2009) An Improved Method for Extraction of Nucleic acid from Coleopteran Insects. *Journal of Northeast Forestry University*, **37**, 86-88. (In Chinese)
- [14] 陈怡, 张辉, 邓超. 醋酸氢化可的松纯度标准物质的定值及不确定度分析[J]. 化学试剂, 2018, 40(3): 261-268.
- [15] Mergny, J. (2005) Thermal Difference Spectra: A Specific Signature for Nucleic Acid Structures. *Nucleic Acids Research*, **33**, e138. <https://doi.org/10.1093/nar/gni134>
- [16] Bryant, S. and Manning, D.L. (1998) Formaldehyde Gel Electrophoresis of Total RNA. In: Rapley, R. and Manning, D.L., Eds., *RNA Isolation and Characterization Protocols*, Humana Press, 69-72. <https://doi.org/10.1385/0-89603-494-1:69>
- [17] Farrell, R.E. (2017) Electrophoresis of RNA. In: Farrell Jr., R.E., Ed., *RNA Methodologies*, Elsevier, 383-426. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804678-4.00013-0>
- [18] Sharma, S., Mazumdar, S., Italiya, K.S., Date, T., Mahato, R.I., Mittal, A., *et al.* (2018) Cholesterol and Morpholine Grafted Cationic Amphiphilic Copolymers for Mirna-34a Delivery. *Molecular Pharmaceutics*, **15**, 2391-2402. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00228>
- [19] 孟月, 王丹, 王雪蕾, 郭晓茹, 夏桂民. 建立共载米铂与核酸 miR-34a 阳离子脂质体中 miR-34a 的含量测定方法[J]. 中国医药生物技术, 2020, 15(3): 235-239.
- [20] Liu, X., Xu, G.M., Guo, J.F., *et al.* (2008) A Method for Quantification of Double Strand DNA Using SYBR Green I Dye. *China Biotechnology*, **28**, 55-60.
- [21] 沈雁, 涂家生, 庞卉, 朱家璧. 凝胶电泳法及荧光光度法测定 siRNA 阳离子脂质体的含量和包封率[J]. 药学报, 2009, 44(4): 430-435.