

文章编号: 1674-7054(2013)02-0138-08

聚赖氨酸接枝淀粉共聚物的制备及其作为基因载体的研究

赵天勤 杜 杰 金春阳 操 风 潘彦鹏 曹献英

(海南大学 材料与化工学院 海南 海口 570228)

摘 要: 以还原胺化反应制得 PLL-S 共聚物, 并通过红外光谱以及核磁共振对其进行了结构表征, 采用凝胶渗透色谱法检测了 PLL-S 的相对分子质量, 激光粒度分析仪检测了其电位, 琼脂糖凝胶电泳法研究了其结合 DNA 的能力及抗 DNase I 的能力, MTT 法分析了 PLL 修饰前后的细胞毒性, 并研究了其在 293T 细胞中转染质粒 DNA 的能力。结果表明: 制备的 PLL-S 共聚物接枝率为 2.8%, 数均相对分子质量为 60 629, 电位为 23.7 mV, 达到细胞毒性评价等级 0 级和 1 级, 材料是合格的, 可结合 DNA 且能保护 DNA 免受 DNase I 的破坏, 在 293T 细胞中的转染效率达到了 $(48 \pm 3.2)\%$ 。经对 PLL-S 的性能分析可以判断: 该共聚物可作为基因载体在生物医学方面予以应用。

关键词: PLL; 可溶性淀粉; 基因载体

中图分类号: TQ 316.33

文献标志码: A

自首次发现聚赖氨酸 [Poly(L-lysine), PLL] 与 DNA 可形成聚合电解质复合物以来, PLL 即作为基因载体得到了广泛的应用^[1-2]。PLL 是具有氨基酸重复单元的多肽, 生物可降解, 同时也是最早应用于基因转染研究的阳离子聚合物之一; PLL 侧链上的 ϵ -伯胺可在生理环境下质子化后带正电, 这些阳离子共聚物通过静电作用与 DNA 负电荷的磷酸基团发生电性吸附形成复合物^[3-4], 该复合物不仅毒性较高, 而且易引起复合物自身的聚集和沉淀, 影响 DNA 的稳定性; 同时, 该阳离子聚合物能与血浆蛋白结合, 在循环系统中易被清除出体外^[4]。故有研究者提出: 以 PLL 为骨架将多糖接枝到其分子上作为侧链, 形成梳状共聚物^[5]。由于梳状共聚物上的多糖侧链可减小共聚物与 DNA 形成的复合物粒子之间的聚集及沉淀, 进而增加复合物的稳定性, 并增加复合物中 DNA 分子的二级结构和三级结构, 同时减少 PLL 骨架与血浆蛋白之间的相互作用^[6-8], 因此, 笔者选择具有良好生物相容性的水溶性淀粉作为多糖供体, 通过还原胺化反应制备多聚-L-赖氨酸-淀粉(PLL-S)共聚物, 结果证明: PLL-S 具有结合 DNA 的能力, 可以作为基因载体材料, 应用于生物医学方面。

1 材料与方法

1.1 实验材料及仪器 多聚-L-赖氨酸溴化氢(PLL·HBr)(BR); 可溶性淀粉(S, 药用级); 氰基硼氢化钠(AR); 二甲基亚砜; 质粒 DNA(实验室自备); GV; 琼脂糖(Biowest); DNase I(Fermentas); 质粒中型提取试剂盒(Omega); MTT(Sigma); DMEM 培养基(GIBCO); 胎牛血清(GIBCO); 胰酶; PBS; 二甲基亚砜(DMSO); $6 \times$ DNA loading buffer(Fermentas); 蛋白胨(OXOID); 酵母浸提物(OXOID); 氯化钠(NaCl)(广州化学试剂厂, 分析纯); 琼脂粉(Biosharp); 透析袋(MW = 8 000-12 000)。

集热式磁力加热搅拌器(金坛市医疗仪器厂); 电子天平(北京塞多利斯仪器有限公司); 荧光酶标仪

收稿日期: 2013-03-01

作者简介: 赵天勤(1986-), 女, 甘肃白银人, 海南大学材料与化工学院 2010 级硕士研究生。

通信作者: 曹献英(1962-), 女, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: Cxying_02@163.com

(BioTek synergy HT); 倒置荧光显微镜(Olympus); 三洋 MCO175 型 CO_2 培养箱; 凝胶成像系统(Alpha 2200); 冷冻干燥器(北京四环科学仪器厂有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 PLL-S 共聚物的制备 取 PLL·HBr 200 mg, 可溶性淀粉 60 mg, 氰基硼氢化钠 30 mg, 混合置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 20 mL 二甲基亚砜为溶剂, 在 40 °C 下反应 48 h, 以水为介质, 透析 6 d, 冷冻干燥得到白色絮状共聚物^[5]。合成的共聚物结构如图 1 所示。

1.2.2 PLL-S 共聚物的红外(FTIR)测试 将经过干燥的样品和 KBr ($m_{\text{样品}}:m_{\text{KBr}}=1:100$) 混合均匀, 并研磨至粒度小于 0.2 μm , 置于磨具中于 8 MPa 下压成透明薄片, 于 370 ~ 7 500 cm^{-1} 波数、4 cm^{-1} 分辨率的光谱条件下检测。

1.2.3 PLL-S 共聚物的核磁共振(NMR)检测 将 3

种样品淀粉、PLL 和 PLL-S 分别溶解在 D_2O 中, 用瑞士布鲁克(Bruker)公司的 AV 400 核磁共振仪, 在 400 MHz 探头温度 298 K 条件下做核磁共振 ^1H 谱检测。

1.2.4 PLL-S 共聚物的相对分子质量及电位测定 色谱条件: 凝胶渗透色谱柱: UltrahydrogelTM500, UltrahydrogelTM120, Waters 1515, 示差检测器 2414; 流动相: 水; 流速: 0.6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 45 °C; 检测池: 40 °C; 柱子填料: 羟基化的聚甲基丙烯酸甲酯。

样品溶液的制备: 取 PLL-S 于 10 mL 烧杯中, 加入双蒸水溶解, 使其质量浓度达到 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 用 0.2 μm 的针头过滤器过滤备用。

进样: 在检测前一天, 开启凝胶渗透色谱仪, 调试机器, 更换检测所需的流动相, 设置检测的温度和时间, 分别测试标准样品, 葡聚糖 1 460, 葡聚糖 9 900, 葡聚糖 12 400(以上分别代表其相对分子质量), 使其达到最佳的检测条件。色谱仪稳定后对上述样品进行检测分析。

1.2.5 PLL-S 共聚物的电位测定 检测条件: 电位检测角度: 90°和 13°; 光源: 4 mW He-Ne 633 nm; 样品质量分数范围: 0.001% ~ 40%; 粒度测量范围: 0.3 ~ 5 000 nm。

样品制备及检测: 分别制备质量浓度为 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PLL 和 PLL-S 共聚物, 而后取 1 ~ 1.5 mL 样品于比色皿中, 置于激光粒度仪检测槽内, 设置电位检测条件, 检测电位, 导出数据进行分析。

1.2.6 细胞毒性试验 细胞毒性是限制基因载体应用的重要因素之一, 通过 MTT 实验, 检测材料的细胞毒性。将 293T 细胞 5×10^3 个 \cdot 孔 $^{-1}$ 接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后吸出培养液, 加入 100 μL 用 DMEM 培养基稀释的 PLL-S 溶液。空白组为无细胞的培养液, 阴性对照组为不作处理的细胞, 每组 4 个复孔, 分别培养 2 d 后, 加入 $\rho=5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液 20 μL , 37 °C 培养 4 h, 然后吸去含 MTT 的培养液, 加入 DMSO 150 μL , 振荡 10 min 混匀后, 用酶标仪检测 OD_{490} 值。细胞存活率的计算公式如下:

$$\text{细胞存活率} = (OD_{\text{样品}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{阴性}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%。$$

1.2.7 PLL-S/DNA 复合物的制备 称取 PLL-S 共聚物, 将其溶解在双蒸水中, 配成质量浓度分别为 4, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PLL-S 溶液, 并分别取 5 μL 的 PLL-S 溶液置于 5 μL 的 EP 管中, 再分别取 7 μL $\rho=70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质粒 DNA, 孵育 30 min, 制成质量比分别为 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 1:1, 0.5:1, 0.1:1 的 PLL-S/DNA 复合物。

1.2.8 PLL-S/DNA 复合物琼脂糖凝胶电泳阻滞实验 PLL-S 结合 DNA 能力实验: 1) 胶板制备: 取出电泳槽中的有机玻璃板和梳子冲洗干净, 晾干。装好胶板, 插入梳子。取 0.2 g 琼脂糖置于三角瓶中, 加入 1 \times TAE 20 mL, 置于微波炉中加热 1 min, 制成 $w=1\%$ 的琼脂糖凝胶液, 待温度降至 60 °C 后加入 1.5 μL 基因染料 GV 混匀, 将其倒入电泳槽内, 30 min 后琼脂糖完全凝固后拔出梳子。然后将制好的胶放入电泳槽中, 加入 1 \times TAE, 使其液面在电泳槽黑色线之上。2) 加样: 在已制备的各比例 PLL-S/DNA 复合物中加

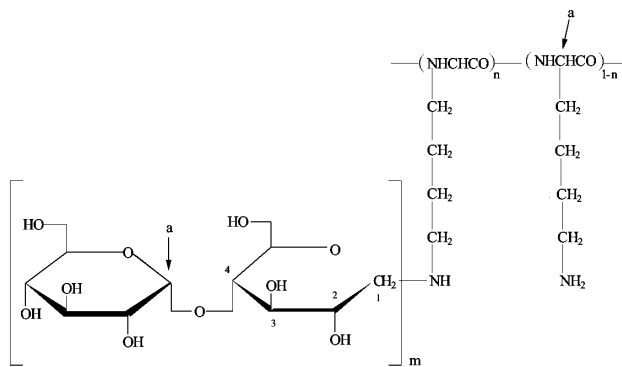


图 1 PLL-S 共聚物结构式

Fig. 1 The structure of PLL-S copolymer

入 $6 \times \text{DNA Loading } 3 \mu\text{L}$, 用移液枪将其加入到琼脂糖凝胶的各小槽中, 记好加样顺序。3) 电泳: 加样后的凝胶板立即通电进行电泳实验, 电压为 90 V , 时间为 120 min 。

PLL-S 抗 DNase I 降解实验: 按质量比 $0:1$, $0.1:1$, $1:1$, $5:1$, $10:1$, $20:1$, $40:1$ 分别配制 PLL/DNA 复合物溶液, 总体积为 $50 \mu\text{L}$, 每份含质粒 DNA $1 \mu\text{g}$, 用涡旋振荡器使其完全混匀, 室温敷育 30 min 。将核酸酶溶液 $10 \mu\text{L}$ ($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 加入到 PLL-S/DNA 复合物中, 并在 37°C 反应液中温育 90 min 。加入反应停止液 $10 \mu\text{L}$ ($\text{pH}=8.0$, 400 mmol NaCl 和 100 mmol EDTA 混合液) 并摇匀, 室温放置 5 min 。将 $w=10\%$ 的 SDS 溶液 $12 \mu\text{L}$ 加入到上述溶液中(以不加 $w=10\%$ 的 SDS 溶液为对照) 并在 65°C 孵育过夜, 从复合物中解离 DNA。取上述混合液 $17 \mu\text{L}$, 于 $w=1\%$ 的琼脂糖凝胶中进行电泳, 以未消化的质粒 DNA 为对照, 电压 90 V , 电泳时间为 120 min , 紫外灯下观察电泳结果。

1.2.9 体外转染试验 转染前 1 d 将处于对数生长期的 293T 细胞接种于 96 孔培养板上, 接种量为 5×10^3 个 $\cdot \text{孔}^{-1}$, 置于 37°C $\varphi=5\%$ 的 CO_2 培养箱中培养 24 h , 当细胞汇合度约 60% 时转染。将 $0.2 \mu\text{g}$ 质粒加入到 $100 \mu\text{L}$ 无血清 DMEM 培养液中, 再按设定质量比加入经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤的 $\rho=20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PLL-S 溶液, 混合均匀, 室温静置 30 min 。以脂质体转染质粒 DNA 为对照。吸弃 96 孔板中含血清的培养液, 加入上述转染溶液, 培养 4 h 将转染溶液吸出, 加入含有 $w=10\%$ 的胎牛血清 DMEM 培养液 $100 \mu\text{L}$ 培养 48 h , 倒置荧光显微镜拍照观察, 流式细胞仪检测转染效率。

2 结果与分析

2.1 PLL-S 共聚物的红外分析 PLL-S 共聚物的红外表征结果如图 2 所示, 3120 cm^{-1} 处是淀粉分子上羟基 O—H 之间氢键的伸缩振动特征吸收峰。 2927 cm^{-1} 处为淀粉 C5 上亚甲基的 C—H 伸缩振动特征峰, 1640 cm^{-1} 处是淀粉分子结构骨架上 C—O 伸缩振动吸收峰, β -糖苷键上 C—H 的面外弯曲振动出现在 851 cm^{-1} 处, 708 cm^{-1} 处是淀粉分子结构中 O—H 的面外弯曲振动, $1080 \sim 1023 \text{ cm}^{-1}$ 处是淀粉分子中特有的糖苷键 C—O—C 的吸收峰(淀粉的 FTIR)。与淀粉和 PLL 的红外谱图相比较, 由于淀粉分子上的 O—H 与 PLL 上的 N—H 之间发生缔合, 因此, 在 PLL-S 红外谱图中, 3419 cm^{-1} 处的吸收峰变宽。在 PLL-S 的 IR 谱中, 2931 cm^{-1} 处出现淀粉分子上的 C—H 伸缩振动, 在 $1080 \sim 1023 \text{ cm}^{-1}$ 处仍出现糖苷键 C—O—C 的吸收峰, 而在 PLL 中, 并无此吸收峰, 在 856 cm^{-1} 处是淀粉上 C—H 的面外弯曲振动, 此外, 在 PLL-S 化学结构上, 1644 cm^{-1} 处出现了羰基 $\text{C}=\text{O}$ 的特征吸收峰, 而淀粉并无此特征峰, 1554 cm^{-1} 处是 C—N 伸缩振动吸收峰, 结果表明淀粉接枝到了 PLL 上, 形成了 PLL-S 共聚物。

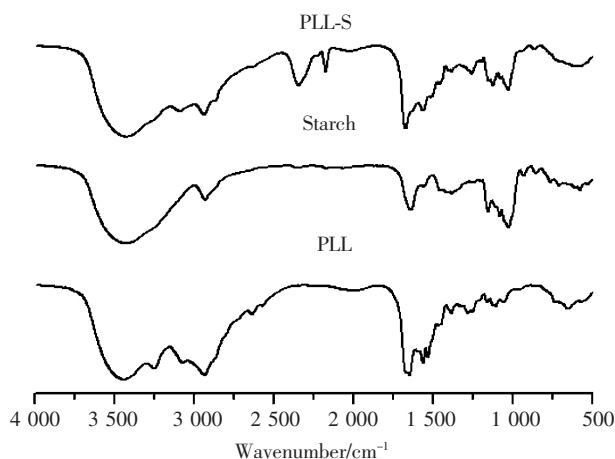


图2 淀粉、PLL-S、PLL 的红外光谱图

Fig.2 The infrared spectra of starch, PLL-S and PLL

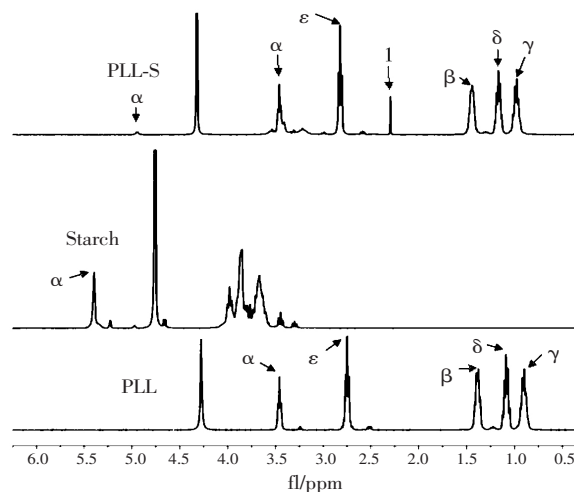


图3 淀粉、PLL-S、PLL 核磁共振¹H 谱图

Fig.3 The NMR ¹H spectra of starch, PLL-S and PLL

2.2 PLL-S 共聚物的核磁共振¹H 解析 PLL、PLL-S、淀粉的核磁共振¹H 谱如图 3 所示, PLL: 1.38 ppm , 1.09 ppm , 0.89 ppm 处分别是 PLL 上 β - δ - γ -上的亚甲基质子峰(PLL 结构见图 1), 2.75 ppm 处是 ϵ -

亚甲基质子峰 3.47 ppm 处是 α -次甲基质子峰^[8-9]; 淀粉: 5.44 ppm 处是淀粉 α -次甲基质子峰 3.64 ~ 4.03 ppm 处是淀粉糖骨架上的质子峰; PLL-S: 在 PLL-S 核磁¹H 谱中 1.39 ppm 1.10 ppm 0.92 ppm 仍出现 β - δ - γ -上的亚甲基质子峰, 由于接枝了可溶性淀粉, 淀粉上羟基的氧电负性较强, 因此 β - δ - γ -上的亚甲基质子化学位移向低场移动, 与 PLL 上有所差异。由于接枝率较低, PLL-S 共聚物中淀粉含量少, 且 PLL 上含有带正电荷的 $-\text{NH}_2-$, 因此化学位移向高场移动, 在 2.78 ~ 3.40 ppm 处可看到低矮的淀粉糖骨架质子峰。在 2.23 ppm 处是新形成的化学键 $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 上亚甲基的质子峰。综上分析, 进一步证明成功制备了 PLL-S 共聚物, 且其接枝率为 2.8%。

2.3 PLL-S 共聚物的相对分子质量及电位分析 测量制备的 PLL-S 共聚物的相对分子质量及电位结果分布图如图 4 和图 5 所示: 通过检测, 在未修饰前 PLL 的数均相对分子质量为 29 563, 重均相对分子质量为 46 088, 电位是 29.5 mV, 接枝淀粉后, 制备的 PLL-S 共聚物数均相对分子质量为 60 629, 重均相对分子质量为 108 481, 电位为 23.7 mV, 电位较接枝前降低, 原因是接枝的淀粉屏蔽了 PLL 上的正电荷。

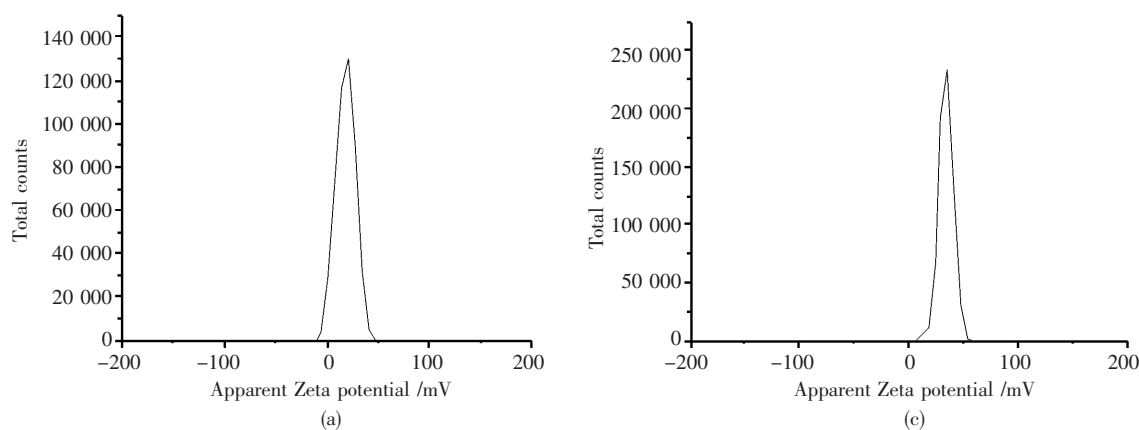


图 4 PLL 被淀粉修饰前 (a) 与修饰后 (c) 的电位图

Fig. 4 The apparent Zeta potential diagram of before (a) and after (c) the PLL modified

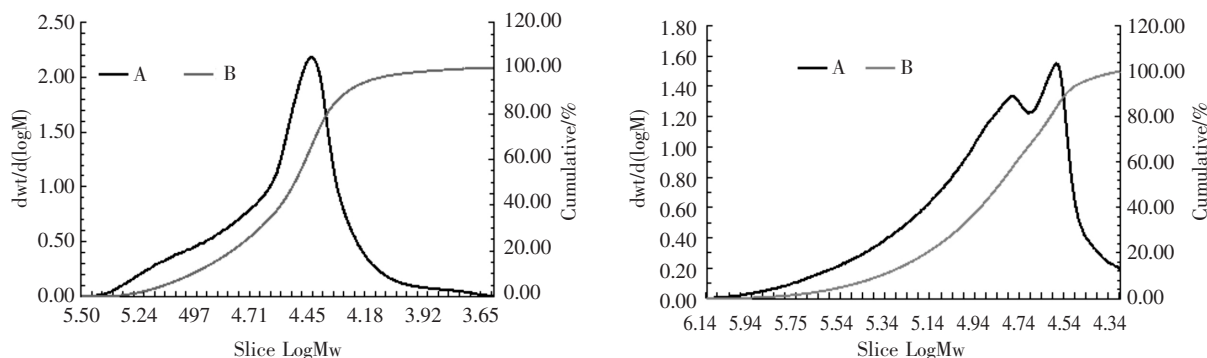


图 5 PLL 被淀粉修饰后的相对分子质量及其分布图

A 为累积百分含量曲线; B 为不同相对分子质量的点对应的百分含量曲线

Fig. 5 The relative molecular mass and its distribution of copolymer

A: Cumulative percentage of curve; B: Point of different molecular weights corresponding to the percentage of curve

2.4 PLL-S 共聚物结合核酸能力 目前, 研究阳离子聚合物/DNA 复合物是否形成, 应用最多的是琼脂糖凝胶电泳法, 具有操作简单、灵敏等优点。它的原理是复合物能压缩 DNA 将其阻滞在凝胶上的样品槽内, 而未完全压缩的 DNA 仍能随着电场的作用, 由负极向正极在凝胶上移动, 在紫外光下看到明亮的典型质粒条带^[10-11]。PLL 表面带有正电荷, 可以与带负电荷的质粒 DNA 通过静电作用结合。结合后形成的复合物相对分子质量大, 不能通过琼脂糖凝胶中的孔道, 因此会滞留在点样孔中。

凝胶电泳结果见图 6, 孔道 8 为裸质粒 DNA 在琼脂糖凝胶上出现典型的质粒 DNA 条带, 与孔道 8 比

较, 孔道 7 亦出现了类似孔道 8 的亮条带, 但孔道 7 的样品槽内未有亮条纹, 说明 DNA 未被 PLL-S 共聚物结合; 当 PLL-S 与 DNA 的质量比为 0.1 : 1 时, 孔道 6 出现了亮条带, 但比裸质粒 DNA 条带滞后模糊, 且在孔道 6 的样品槽内中出现有亮条纹, 说明 PLL-S 共聚物与 DNA 部分结合, 即部分被压缩, 故无法全部阻滞 DNA 的移动, 从而出现亮的条带, 被压缩的部分 DNA 滞留在凝胶孔出现亮条纹; 当 PLL-S 共聚物和 DNA 的质量比为 40 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 1 : 1 时, 在琼脂糖凝胶上未看到亮的条带, 只在点样孔出现亮条纹, 如孔道 1 ~ 5。琼脂糖凝胶电泳分离的原理是基于 DNA 电荷大小以及相对分子质量大小, 故此时 DNA 所带的负电荷已被完全中和, DNA 被滞留在点样孔中, 其不受电场的影响而迁移, 故形成了 PLL-S/DNA 复合物。

2.5 PLL-S 复合物抗核酸酶观察 DNA 保护试验的原理是 DNase I 能降解质粒 DNA, 在凝胶上看不到亮条带。点样孔 9 是裸质粒 DNA, 在未加入 DNase I 时, 在凝胶上可看到特有 DNA 条带, 孔道 11 加入 DNase I 后, 在凝胶上未看到亮条带(见图 7), 说明裸质粒 DNA 被加入的 DNase I 降解, 在凝胶上看不到亮条带; 点样孔 1 ~ 4 的 PLL-S 与 DNA 的质量比分别为 40 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 加入 DNA 洗脱液 $w = 10\%$ 的 SDS, 且加 DNase I, 该点样孔在凝胶上看不到亮条带, 洗脱出来的质粒 DNA 条纹明亮完整, 表明 PLL-S 复合物能保护 DNA, 不被 DNase I 降解; 点样孔 5 ~ 8 (PLL-S 与 DNA 的质量比分别为 40 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1) 不加 $w = 10\%$ 的 SDS, 加入 DNase I 后, 点样孔加样槽内出现亮条带, 说明滞留在点样孔中的质粒 DNA 未被 DNase I 降解。孔道 10, 未与 PLL-S 结合的 DNA 在凝胶上出现亮条带, 加入 DNase I 后, 亮条带消失(孔道 12), 说明 DNase I 能完全降解不受保护的 DNA。结果表明, PLL-S 能保护 DNA 免受 DNase I 降解, 且 PLL-S 与 DNA 的比例越大, 其保护 DNA 的能力越强。

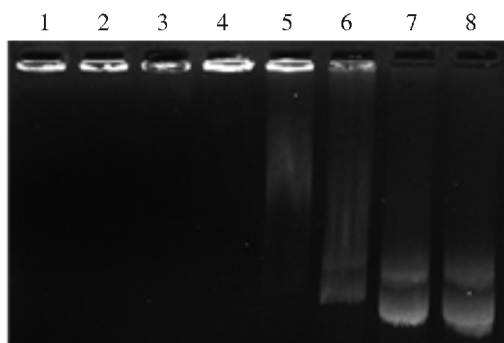


图 6 琼脂糖凝胶电泳阻滞实验

孔道 1 ~ 8 分别代表不同的 PLL-S 与 DNA 质量比依次是: 40 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 1 : 1, 0.5 : 1, 0.1 : 1, 0 : 1

Fig. 6 The agarose gel electrophoresis retardation assay. The tunnels 1 to 8 represent the mass ratio of the PLL-S with DNA that was sequentially: 40 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 1 : 1, 0.5 : 1, 0.1 : 1, 0 : 1

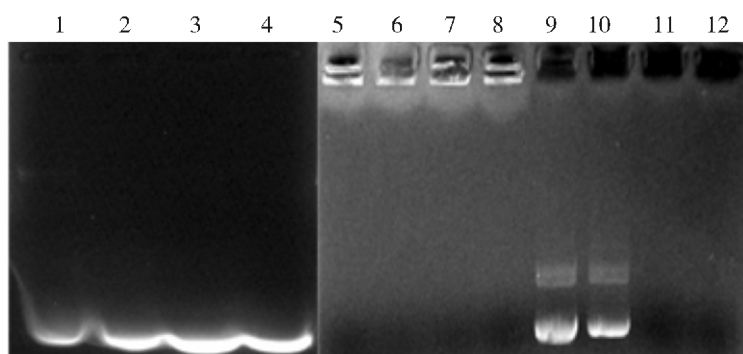


图 7 琼脂糖凝胶电泳分析不同 PLL-S/DNA 下抗核酸酶降解作用

孔道 1 ~ 4 和 5 ~ 8 表示 PLL-S 与 DNA 的质量比分别为 40 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1; 孔道 9 和 11 表示 PLL-S 与 DNA 的质量比为 0 : 1; 孔道 10 和 12 表示 PLL-S 与 DNA 质量比为 0.1 : 1

Fig. 7 The PLL-S copolymer anti-DNase I degradation

The tunnels 1 to 4 and 5 to 8 represent the mass ratio of the PLL-S with DNA that was sequentially: 40 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1; The tunnels 9 and 11 represent the mass ratio of the PLL-S with DNA that was also 0 : 1; The tunnels 10 and 12 represent the mass ratio of the PLL-S with DNA that was also 0.1 : 1

2.6 体外细胞毒性分析 PLL 质量浓度分别为 4, 2, 1, 0.1, 0.01 $g \cdot L^{-1}$, 于第 2, 4, 6 天检测 PLL 和 PLL-S 的细胞毒性, 结果发现: 第 2 天, 随着浓度的升高细胞存活率下降, 其中 $\rho = 4 g \cdot L^{-1}$ 时存活率仅 68.68%,

而 $\rho = 0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率达 85.89%。第 4 天 $\rho = 4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞存活率为 37.03%, 第 6 天, 细胞存活率下降至 23.07%。第 4 天 $\rho = 0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞存活率是 79.96%, 第 6 天下降至 38.19%。

PLL-S 质量浓度分别为 4 2 1 0.1 0.01 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 第 2 天 随着浓度的升高细胞存活率下降 $\rho = 4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时存活率是 79.20% $\rho = 0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时存活率是 90.11%。第 4 天, PLL-S 质量浓度为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率为 76% 其他 4 个浓度下细胞存活率都超过了 80%。随着 PLL-S 浓度的增加, 细胞存活率逐渐下降, 并维持在约 80% 水平。与相同浓度的 PLL 相比, PLL-S 复合物浓度下的细胞存活率大于 PLL。据文献 [12] 报道, 经过修饰的 PLL 细胞毒性小于 PLL, 本研究结果证明: PLL-S 在 5 个不同浓度下的细胞存活率均在 80% 以上, 达到了细胞毒性评级等级 0 级和 1 级标准, 所制备的材料符合生物医学材料对细胞毒性的要求, 制备的材料是合格的。

与第 4 天相比, 第 2 天高浓度的 PLL 细胞存活率低, 原因可能为 PLL 水溶液呈碱性, 高浓度的 PLL 改变了细胞生长环境的 pH, 抑制了生长。而第 4 天细胞存活率均高于 75%, 可能是因为细胞代谢的 CO_2 平衡了 PLL 引起的 pH 变化, 细胞恢复了生长。而 PLL-S 第 2 天的细胞存活率与 PLL 相反, 可能是 PLL-S 具有很好的缓冲能力, 故细胞毒性较 PLL 低(图 8)。

2.7 PLL-S 介导的基因转染 共聚物

PLL-S 在 293T 细胞中绿色荧光蛋白表达情况如图 9 所示。当 PLL-S 与 DNA 的质量比分别为 64 : 1 32 : 1 16 : 1 8 : 1 (图 9A ~ D) 时, 可以见到绿色荧光亮点, 通过

流式细胞仪检测其转染效率, 分别是 $(45 \pm 4.4) \%$ $(48 \pm 3.2) \%$ $(12 \pm 3.1) \%$ $(4 \pm 0.1) \%$, 说明 PLL-S 能够携带质粒 DNA 进入细胞并转录表达。PLL 及脂质体在 293T 细胞中的转染效率分别是 $(78 \pm 5.1) \%$ 和 $(91 \pm 2.3) \%$ 。通过对比, PLL-S 的转染效率低于脂质体和 PLL(图 9E 和图 9F)。

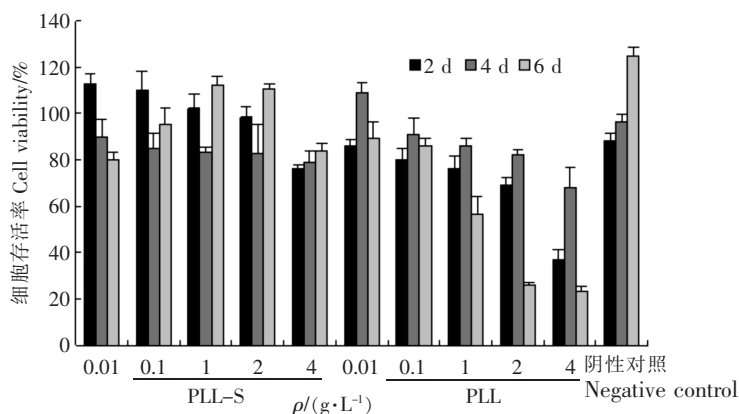


图 8 不同质量浓度 PLL-S 及 PLL 下 293T 细胞的存活率

Fig. 8 The 293T cell viability in different concentrations of PLL and PLL-S

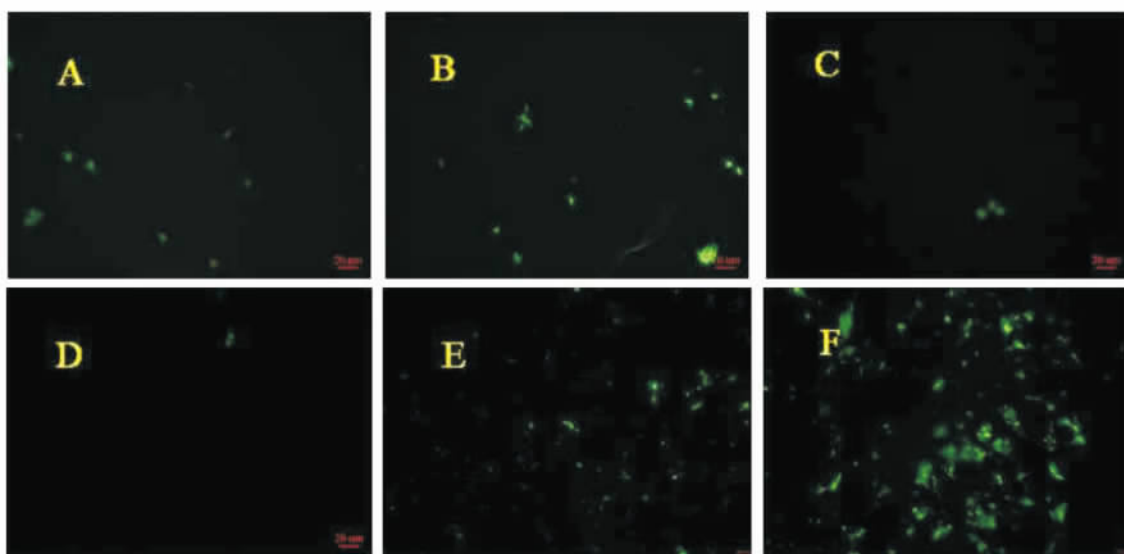


图 9 体外转染 293T 细胞

A ~ D 中 PLL-S 与 DNA 的质量比分别为 64 : 1 32 : 1 16 : 1 8 : 1; E、F 分别为 PLL 和脂质体

Fig. 9 The transfected 293T cells *in vitro*

The mass ratio of the PLL-S with DNA were respectively 64 : 1 32 : 1 16 : 1 8 : 1;

E and F represent respectively PLL and liposomes

随着 PLL-S 与 DNA 质量比的升高,其转染效率随之升高,原因是其质量比增大,PLL-S/DNA 复合物的表面电荷增大,有利于中和细胞表面的负电荷,使其穿过细胞膜进入细胞而表达。PLL-S 的转染效率低于 PLL 及脂质体,原因是 PLL 的相对分子质量较 PLL-S 的小,而脂质体是一种人工细胞膜,其脂溶性高于 PLL-S 及 PLL 的,因此更容易进入细胞。

3 讨 论

本研究通过还原胺化反应制得多聚-L-赖氨酸-淀粉(PLL-S)共聚物,并对所制备的 PLL-S 共聚物进行表征,检测了其接枝淀粉后的相对分子质量及电位,并对其细胞毒性进行了检测,以及它结合 DNA 及抗 DNase I 降解的能力,并对其在 293T 细胞中转染质粒 DNA 进行了研究,结果表明,制备的 PLL-S 共聚物数均相对分子质量为 60 629,重均相对分子质量为 108 481,电位为 23.7 mV,淀粉成功地接枝到了 PLL 上,且细胞毒性符合生物医学材料对细胞毒性的要求,材料是合格的,能够很好地压缩 DNA,保护 DNA 不受 DNase I 的降解,且在 293T 细胞中的转染效率低于脂质体和 PLL。通过对制备的 PLL-S 进行表征,以及对其性能的研究,可以判断,PLL-S 可作为基因载体材料在生物医学方面予以应用。

参考文献:

- [1] LAEMMLI U K. Characterization of DNA condensation induced by poly(ethylene oxide) and polylysine[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72: 4288-4292.
- [2] ANDERSON W F. Human gene therapy[J]. Science, 1992, 256: 808-813.
- [3] 胡海梅,潘仕荣,张璇. 基因载体 MPEG-PLL 共聚物与 DNA 形成复合物体外研究[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(3): 299-304.
- [4] 冯磊,年士艳,山德生,等. 不同性别代谢综合征患病情况分析[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(5): 664-665.
- [5] MARUYAMA A, KATO H, ISHIHARA T, et al. Comb-Type polycations effectively stabilize DNA triplex[J]. Bioconjugate Chem, 1997, 8: 3-6.
- [6] MARUYAMA A, WATANABE H, FERDOUS A, et al. Characterization of interpolyelectrolyte complexes between double stranded DNA and polylysine comb-type copolymers having hydrophilic side chains[J]. Bioconjugate Chem, 2009, 9: 292-299.
- [7] ROTH JA, CRISTIANO R. Gene therapy for cancer: What have we done and where are we going? [J]. Natl Cancer Inst, 1997, 89: 21-39.
- [8] PARK J U, ISHIHARA T, KANO A, et al. Preparation of dendritic graft copolymer consisting of Poly(L-lysine) and arabinogalactan as a hepatocyte specific DNA carrier[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 1999, 29(4): 353-370.
- [9] ASAYAMA S, NOGAWA M, TAKEI Y, et al. Synthesis of novel polyampholyte Comb-Type copolymers consisting of a Poly(L-lysine) backbone and hyaluronic acid side chains for a DNA carrier[J]. Bioconjugate Chem, 1998, 9: 476-481.
- [10] NAH J W, YU L, HAN S O, et al. Artery wall binding peptide-poly(ethyleneglycol-grafted-poly(L-lysine))-based gene delivery to artery wall cells[J]. Control Release, 2002, 78: 273-284.
- [11] WOLFERT M A, SCHACHT E H, TONCHEVA V, et al. Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block copolymers[J]. Human Gene Therapy, 1996, 7: 2123-2133.
- [12] LIU G, MOLAS M, GROSSMANN G A, et al. Biological properties of Poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polyelectrolyte[J]. J. Biol. Chem., 2001, 276: 34379-34387.

Research on the Preparation and Property of PLL-grafted Starch Copolymer as Gene Carriers

ZHAO Tianqin , DU Jie , JIN Chunyang , CAO Feng , PAN Yanpeng , CAO Xianying

(College of Material and Engineer , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: Poly-L-lysine-Starch (PLL-S) copolymer was prepared by reductive amination reaction. The PLL-S copolymer were characterized by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy and the molecular weights of the PLL-S were examined by gel chromatography , with a laser particle size analyzer to detect its potential. We examined the ability of the PLL to DNA-binding and degradation of the ability of anti-DNase I using agarose gel electrophoresis. The cytotoxicity of PLL decorated with starch modified was analyzed through MTT method in 293T cells. We assayed the PLL-S transfecting plasmid DNA of capability. The results showed that the prepared PLL-S graft ratio was 2.8% , a number average molecular weight was 60 629 , potentials was 23.7 mV. PLL-S copolymer was capable of binding to DNA , and protected DNA from the destruction of the DNase I . The cytotoxicity of the copolymer was low enough to achieve evaluation level of one or more standard. transfection efficiency of the PLL-S copolymer was as high as (48 ± 3.2) % . We judged that PLL-S copolymer prepared can be used as gene carriers in biomedical application by studying its performance.

Key words: PLL; soluble starch; gene carrier

(上接第 137 页)

Construction of Vector Expressing *Xa21* during Whole Growth Stage

CAO Yuxin , HUA Long , ZHAO Tianlong , LI Mingrong , XIA Zhihui

(College of Agriculture , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: In this study , the results of realtime PCR of rice sucrose synthase gene 1 (*RSuS1*) showed that *RSuS1* was highly expressed in sheath and leaf during whole growth stage. The promoter of *RSuS1* was amplified from genomic DNA template of an indica rice variety “Minghui 63” , then the DNA fragment of *Xa21* including open reading frame and terminator was amplified from vector pDB*Xa21* carrying completely genomic *Xa21* fragment. In order to breed transgenic rice with resistance to bacterial leaf blight during whole growth stage and without risk of comestible safety , we constructed an expression vector that *Xa21* was driven by RSP.

Key words: *Xa21*; promoter of rice sucrose synthase gene 1; bacterial leaf blight; rice; whole growth stage