

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 CO₂ 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 D₂O 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 mL·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 g·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 g·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·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, 4, 6 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 OD₄₉₀ 值。细胞存活率的计算公式如下:

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

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 g·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, 敷育 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 × 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 × 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

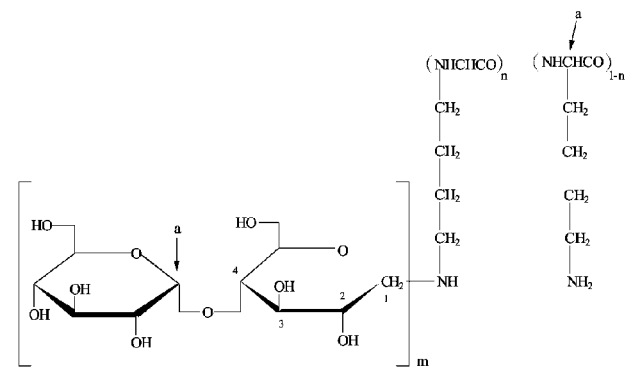


图 1 PLL-S 共聚物结构式

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 $0:1, 0.1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 40:1$ 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 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应液中温育 90 min 。加入反应停止液 $10 \mu\text{L}$ ($\text{pH} = 8.0, 400 \text{ mmol NaCl}$ 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 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 $5 \times 10^3 \text{ 个} \cdot \text{孔}^{-1}$, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\varphi = 5\%$ 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 C=O 的特征吸收峰, 而淀粉并无此特征峰, 1154 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。

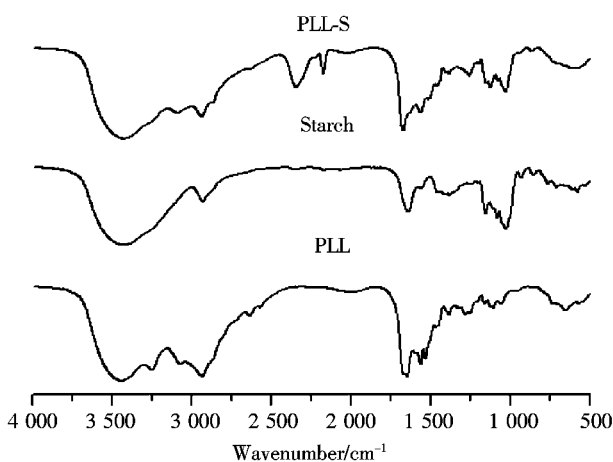


图2 淀粉、PLL-S、PLL 的红外光谱图

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

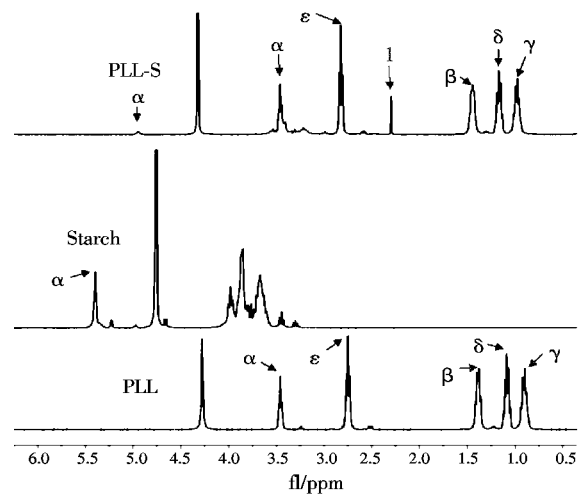


图3 淀粉、PLL-S、PLL 核磁共振¹H 谱图

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—NH₂—,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—CH₂—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。

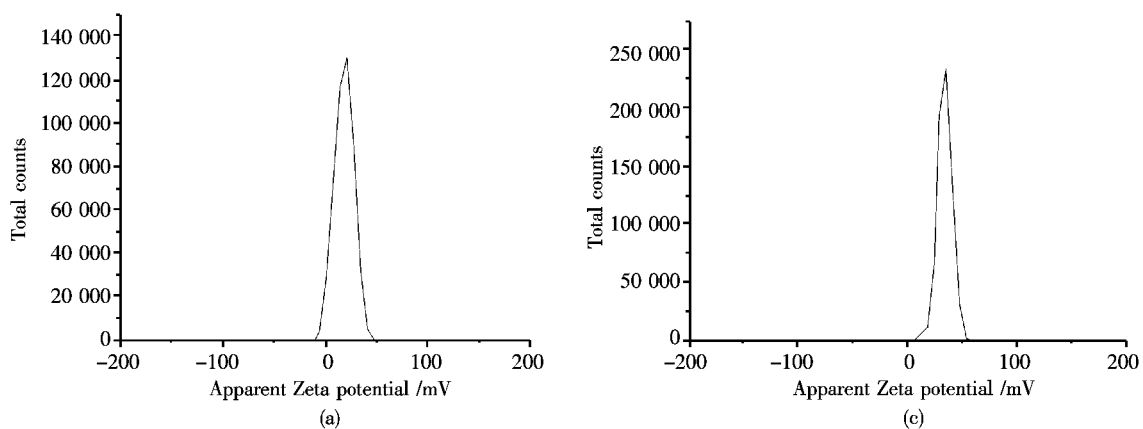


图 4 PLL 被淀粉修饰前(a)与修饰后(c)的电位图

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

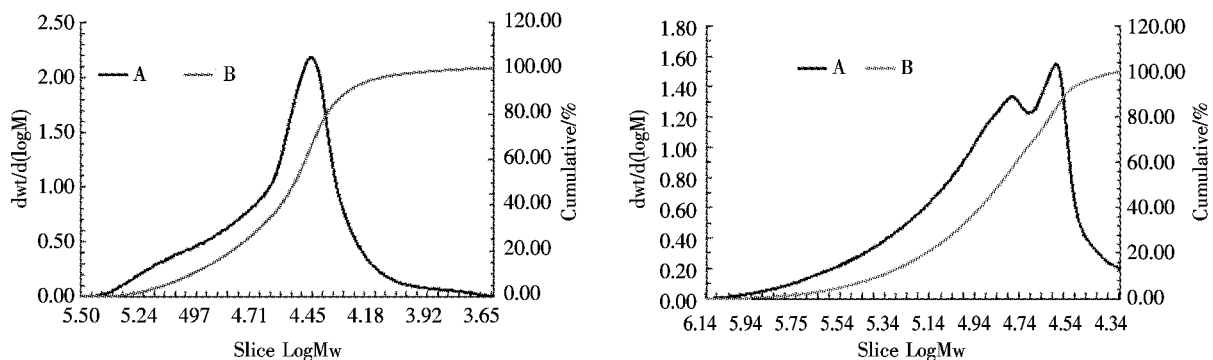


图 5 PLL 被淀粉修饰后的相对分子质量及其分布图

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,且加入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。

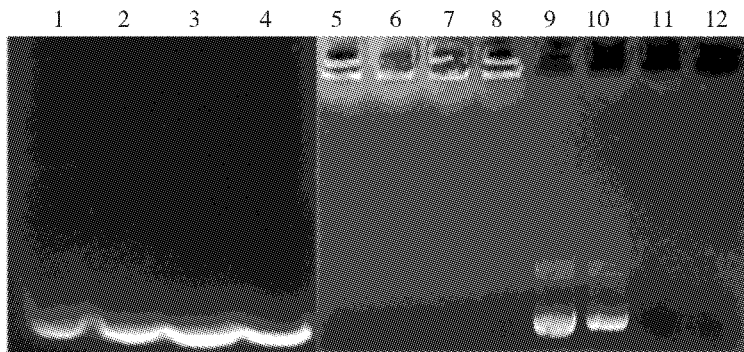


图7 琼脂糖凝胶电泳分析不同PLL-S/DNA下抗核酸酶降解作用

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%,

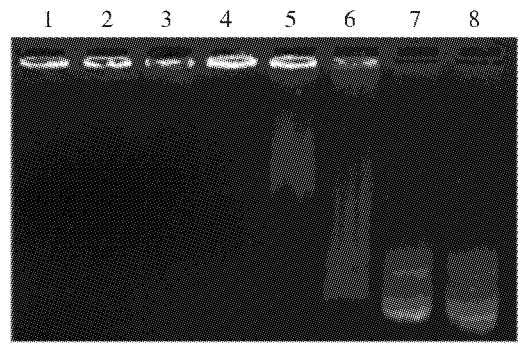


图6 琼脂糖凝胶电泳阻滞实验

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

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)。

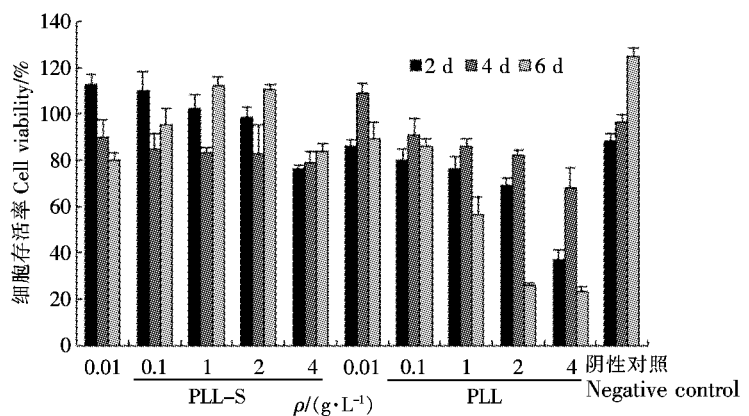


图 8 不同质量浓度 PLL-S 及 PLL 下 293T 细胞的存活率

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

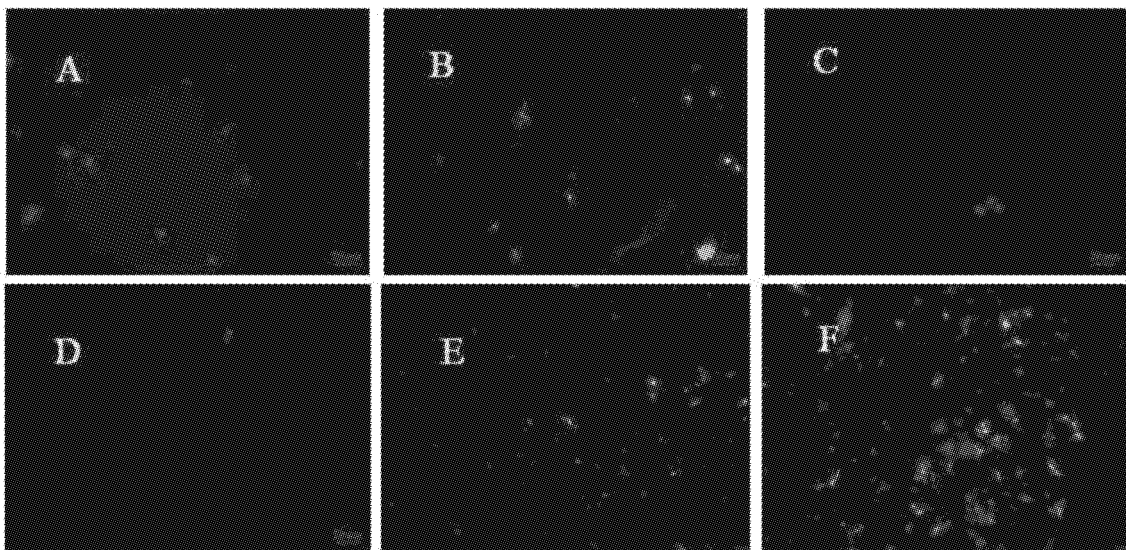


图 9 体外转染 293T 细胞

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 $(48 \pm 3.2)\%$. 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