

核酸/高分子复合体系的制备与性能

孙亚伟, 刘冬生*

(国家纳米科学中心, 清华大学化学系)

摘要: 综述了近年来核酸/高分子复合体系在设计、合成、性能研究以及应用等方面的最新研究进展, 主要阐述了不同种类以及不同结构核酸/高分子体系的制备方法以及其在核酸检测、生物医药以及纳米等领域的应用, 并对其未来的研究方向作了展望。

关键词: 核酸; 复合体系; DNA 检测; 组装

1 简介

脱氧核糖核酸(DNA)在现代科学中的角色已经不再局限于分子生物学的领域, 其作为一类具有结构和形貌可精确调控的生物大分子, 在化学以及材料领域得到了广泛关注。多个课题组将DNA与有机和无机材料结合, 制备得到了不同结构的复合体系, 并将其广泛应用于生物检测、医药以及纳米器件等方面, 取得了令人瞩目的成果^[1]。近年来, 将DNA与人工合成的高分子结合所得到的核酸-高分子复合体系逐渐成为材料领域的研究热点, 人们设计并合成了多种结构的复合体系并系统研究了相关性能。

2 核酸/高分子复合体系的制备

将DNA与高分子结合来制备复合体系, 首先要解决的是如何将DNA与高分子进行连接, 常用的连接方法有如下几种: 接枝法(Grafting Strategy)、固相合成法(Solid-Phase Strategy)以及单体共聚法。接枝法即将3'端或5'端修饰有官能团的DNA与高分子在溶液中反应来制备目标分子:

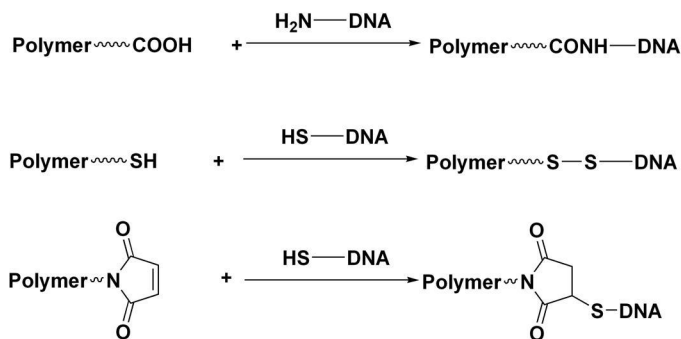


图1 接枝法的合成原理

Figure 1 The principle of Grafting Strategy

图1中列出了接枝法常用的反应。由于氨基和巯基修饰的DNA已经商业化, 因此在高分子上修饰便于和DNA上的修饰基团反应的官能团, 是接枝法的关键。

和其它修饰相比, 氨基修饰DNA的成本相对较低, 应用更加广泛, 其与带有羧基或者相应活性酯基团的高分子在缩合试剂的存在下可高效地形成稳定的酰胺键^[2, 3]。巯基修饰的DNA成本较高, 但其与

基金项目: 国家自然科学基金项目(2007CB935902);

作者简介: 孙亚伟(1982—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事DNA在超分子化学中的研究;

*通讯联系人, E-mail: sunyw@nanoctr.cn.

高分子上的巯基^[4]或马来酰亚胺^[5]反应的反应效率也要高出许多,因此也被广泛大量应用。利用接枝法合成 DNA-高分子复合体系的操作简单,对试验设备的要求也较低,得到了广泛应用。但是该方法的效率受制于高分子的水溶性,低水溶性的高分子由于溶解性差,与 DNA 水溶液的反应效率大大降低。

为了解决低水溶性高分子与 DNA 结合的问题,人们提出利用固相合成法(Solid-Phase Synthesis)来制备核酸-高分子复合体系。该方法的原理是将末端含羟基的高分子和氯代亚磷酰胺反应得到末端修饰有亚磷酰胺基团的高分子,再将其与负载在固相载体上 DNA 的 5' 羟基缩合,即可实现 DNA 与高分子的共价连接。将复合分子从载体上切除后经凝胶电泳或高效液相色谱纯化后即可以较高收率得到目标分子。

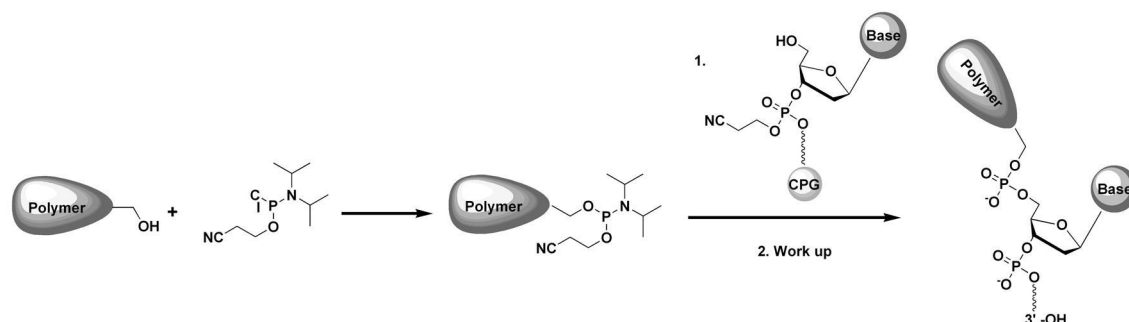


图 2 固相合成法的原理

Figure 2 The principle of Solid-phase synthesis strategy

与传统的嫁接法相比,固相合成法在效率及合成规模上都有着明显的优势,而且所有反应都是在有机相中进行,避免了溶解性和生物相容性等问题。2004 年, Mirkin 课题组利用固相合成制备了 DNA-聚苯乙烯复合体系,通过改变 DNA 序列中碱基的数目以及聚苯乙烯的分子量,他们得到了不同直径的胶束^[6]。

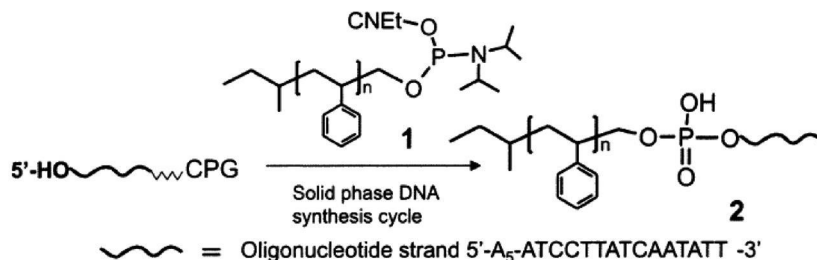


图 3 通过亚磷酰亚胺方法 DNA-PS 复合分子^[6]

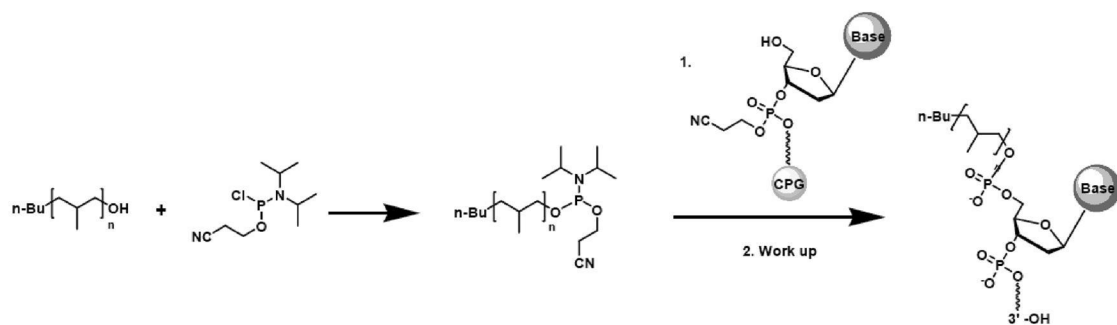
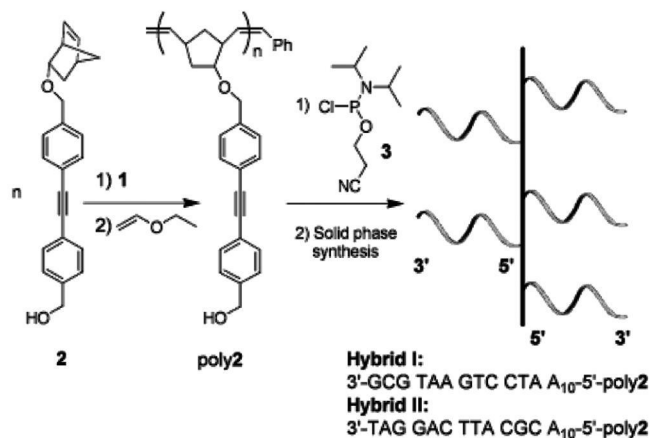
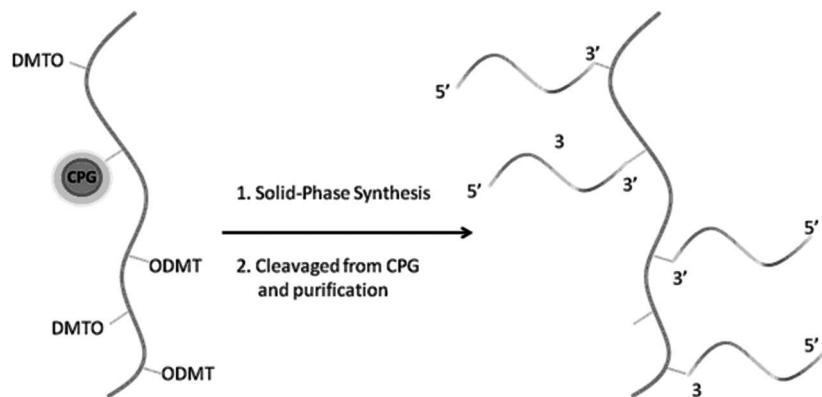
Figure 3 Synthesis of DNA-PS/ Hybrid using phosphoramidite chemistry^[6]

Herrmann 课题组也在该领域做了大量的研究工作,他们将聚环氧丙烷(PPO)通过固相合成连接到 DNA 上得到两亲复合分子,并且以该两亲分子组装成的胶束为基础展开了一系列的工作^[7],如图 4 所示。

除了上述的共聚型复合分子外,DNA 还可以接在高分子的侧链上形成嵌段共聚高分子。由于该类复合分子中 DNA 的接枝密度较前面所述的共聚物高得多,因此在生物检测领域有着更广阔的前景。2001 年, Mirkin 课题组设计了一类嵌段共聚物,在其中含有羟基的单元上修饰亚磷酰胺基团后进行固相合成,成功得到了梳状 DNA-高分子复合物^[8],如图 5 所示。

2005 年, Chaix 课题组将高分子负载在 CPG 载体上进行 DNA 的固相合成,反应结束后可得到负载有多条 DNA 序列的高分子,为制备高 DNA 负载量的复合体系提供了一种新的思路^[9],如图 6 所示。

2007 年, Mi 课题组提出了另一种研究思路,他们将修饰有丙烯酰胺的 DNA 与丙烯酰胺共聚也得到了梳状复合分子^[10]。通过向该复合分子的溶液中加入可与 DNA 结合的蛋白后,可实现溶液-凝胶态的转化,如图 7 所示。

图4 通过亚磷酰亚胺方法 DNA-PPO 复合分子^[7]Figure 4 Synthesis of DNA-PPO/ Hybrid using phosphoramidite chemistry^[7]图5 利用固相合成制备 DNA 嵌段共聚物^[8]Figure 5 Synthesis of DNA-block copolymer hybrid by solid-phase synthesis^[8]图6 以嵌段共聚物为基础合成 DNA 嵌段共聚物^[9]Figure 6 DNA-polymer hybrids synthesized from block copolymer^[9]

3 应用

3.1 高灵敏度 DNA 检测

DNA 检测在基因测序以及法医等领域占有重要地位^[11]。该项技术的关键部分在于发展一类能够高效识别单链/双链 DNA, 并将其转化成如电化学或荧光等可检测信号的检测探针。

1995 年, Haralambidis 课题组将修饰有荧光分子苝的多肽通过固相合成连接在 DNA 的 3' 端, 得到

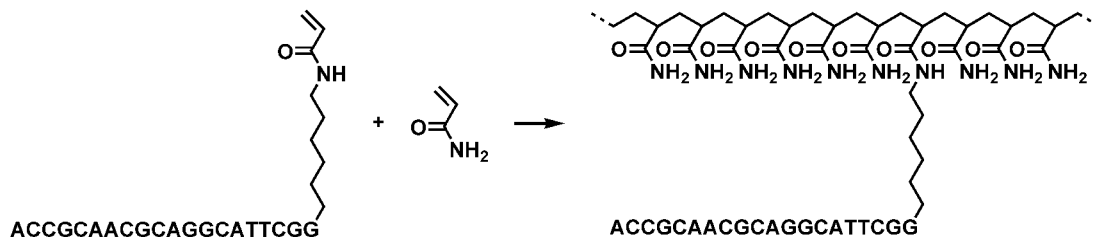
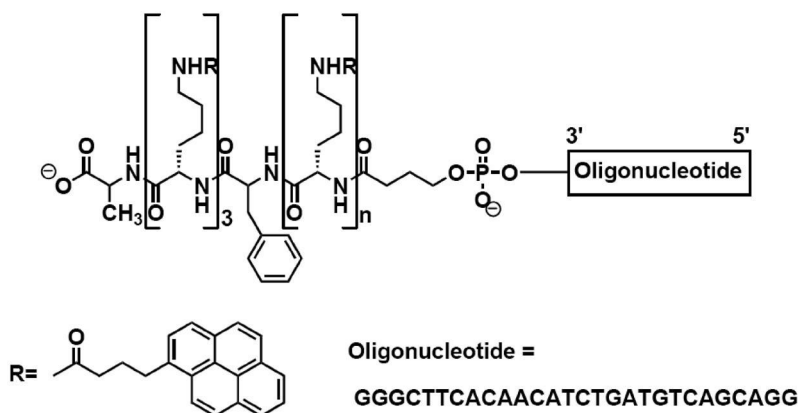
图7 DNA-聚丙烯酰胺体系的制备^[10]Figure 7 Preparation of DNA-polyacrylamide hybrid^[10]

图 8 DNA-多肽探针的结构^[12]

Figure 8 Structure of DNA-polypeptide probe^[12]

了 DNA-多肽复合分子,并将其用于检测 DNA 双链形成,表现出了极高的效率^[12],如图 8 所示。

2004 年, Tan 课题组基于 hairpin 结构设计了一类可以高效检测 DNA 的荧光探针(如图 9 所示),他们通过半固相合成将聚苯乙炔(PPS)和相应的淬灭基团分别连接到的 hairpin 结构的 5' 端和 3' 端,当待检测序列与 hairpin 结合成双链后,聚苯乙烯基团远离淬灭基团,发出特定波长的荧光。但是该设计并未取得理想的检测限^[13]。



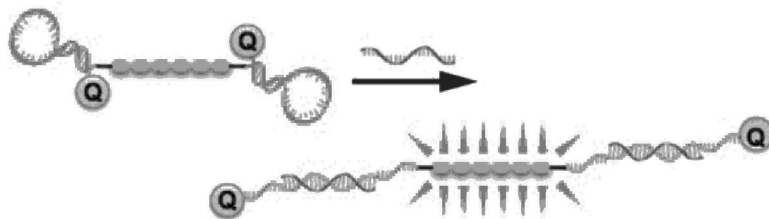
图9 DNA-单聚苯乙炔荧光探针的工作原理^[13]

Figure 9 Principle of DNA-PPS hybrid ^[13]

2007 年, Kim 课题组对该体系作了进一步的拓展, 他们将 hairpin 结构连接在水溶性聚苯乙炔的两端, 该方法使得聚苯乙炔的荧光效率提高了两个数量级, 达到了 4×10^{-6} mol/L, 达到了可以检测单核苷酸多态性(SNP)的精度^[14], 如图 10 所示。

由于简便的检测手段和较好的检测精度, 电化学检测得到了人们越来越多的关注。2004 年 Grinstaff 课题组将 DNA-PEG-DNA 嵌段分子作为探针, 连接到金电极上来检测目标 DNA, 如图 11 所示。当目标序列与探针中的检测序列结合后, 后者的构型发生改变, 使得连接在其末端的二茂铁探针靠近金电极, 产生电化学信号的变化, 实现对目标序列的检测^[5]。该方法的检测限在 2×10^{-10} mol/L 左右, 是一类相当灵敏的生物传感器。

Mirkin 课题组在他们课题组已报道的嵌段共聚物的基础上发展了另一类 DNA 电化学探针^[16], 如图 12 所示。他们在高分子的侧链上同时引入 DNA 检测序列和二茂铁基团, 并将所得到的复合分子应用在

图 10 DNA-双聚苯乙炔荧光探针的工作原理^[14]Figure 10 Principle of DNA-PPS-DNA hybrid^[14]

DNA 检测, 实现了 100pM 的检测限, 极大提高了 DNA 检测的灵敏度。而且由于探针中可以修饰较多的二茂铁基团, 该探针还可用于检测 DNA 中的碱基错配。

3.2 在生物医药领域的应用

利用反义核酸 (Antisense ODN) 来治疗疾病是近年来生物以及医药领域的重要研究课题之一^[17], 但是反义核酸药物的低传输效率及易被酶解等性质极大限制了其广泛应用。

为了解决这个问题, Park^[18] 和 Kataoka 等^[19] 课题组将反义核酸与生物相容性较好的高分子 (如聚乳酸-羟基乳酸, 聚环氧丙烷等) 连接得到两亲的复合分子, 该类复合分子在水溶液中形成的胶束与阳离子型聚电解质 (如聚乙烯亚胺等) 混合后形成的聚电解质胶束, 表现出非常好的稳定性, 细胞穿透性以及较强的靶点效应, 如图 13 所示。

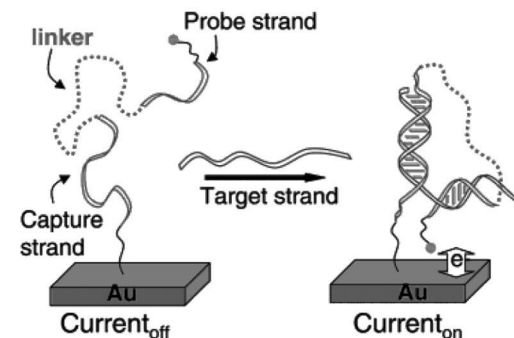
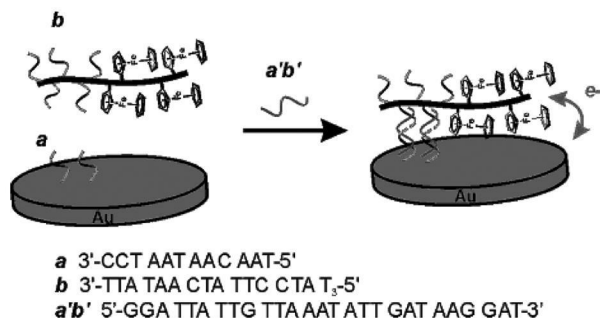
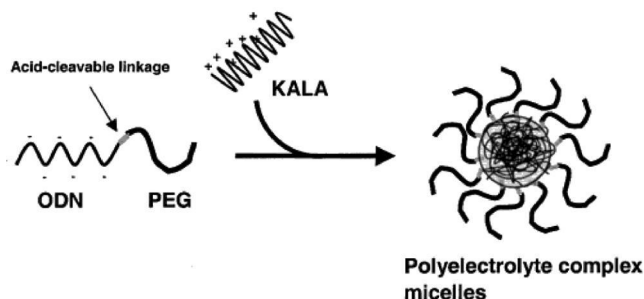
图 11 DNA-PEG-DNA 探针的电化学检测原理^[15]Figure 11 DNA detection based on DNA-PEG-DNA probe^[15]图 12 DNA-二茂铁-高分子探针的电化学检测^[16]Figure 12 DNA detection based on DNA-polymer probe^[16]图 13 DNA-PEG 复合分子形成的聚电解质胶束^[19]

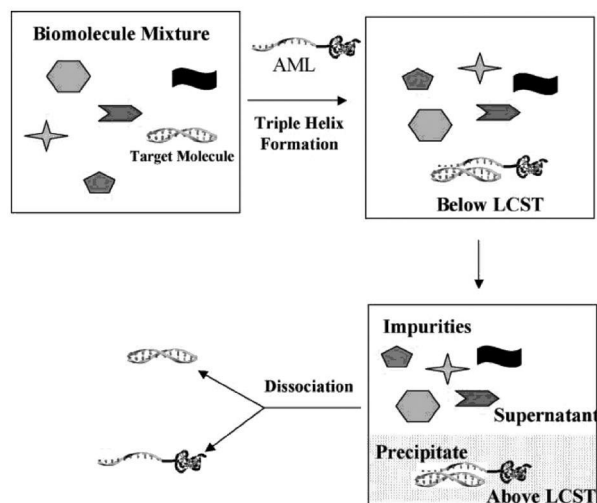
Figure 13 Polyelectrolyte complex micelles

formed by DNA-PEG hybrids^[19]

Kataoka^[20] 课题组在进一步的研究中发现, 只有当复合分子中的连接基团为可以酸解的官能团时, 该体系中的反义核酸才可以表现出良好的活性。

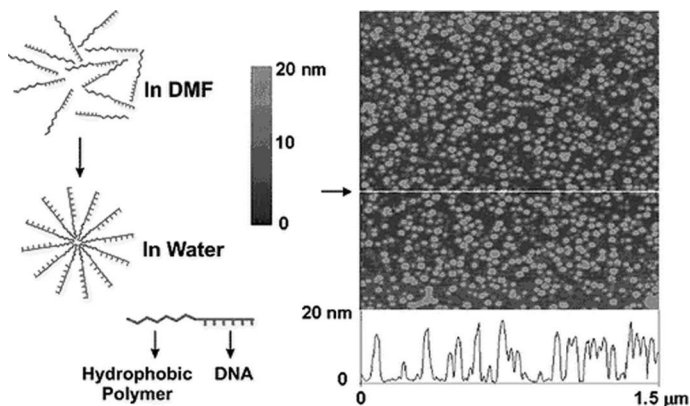
质粒 DNA 在临床医学上有着重要的应用, 但是由于分离纯化的效率较低, 一直呈现供不应求的状态。Freitag 课题组利用 *N*-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAM) 水溶性随温度变化的性质, 设计了一类温度响应型的复合体系来分离质粒 DNA^[21], 如图 14 所示。他们首先将可以和质粒 DNA 形成三链结构的单链 DNA 连接到聚异丙烯酰胺上, 制得温敏型复合体系。将该复合分子与含有质粒 DNA 的体系混合后降温至聚异丙烯酰胺的最低临界溶解温度 (Low Critical Solution Temperature) 之下, 通过离心得到复合分子与质粒 DNA 的复合物, 再将该复合物解离即可以 71%~90% 的收率得到纯度较好的质粒 DNA。

Maede 课题组则利用该体系来分离可与 DNA 结合蛋白, 也取得了令人满意的结果^[22]。

图 14 利用 DNA-PNIPAM 分离质粒 DNA 的原理^[21]Figure 14 Purification of plasmid DNA by DNA-PNIPAM hybrid^[21]

3.3 在纳米科学中的应用

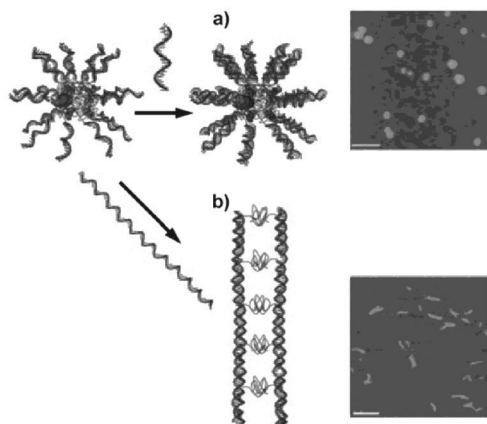
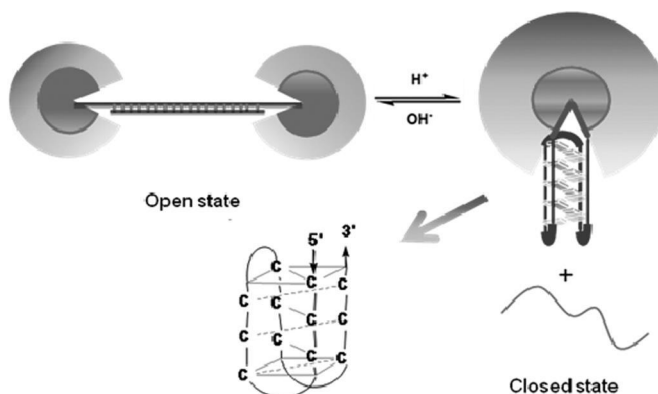
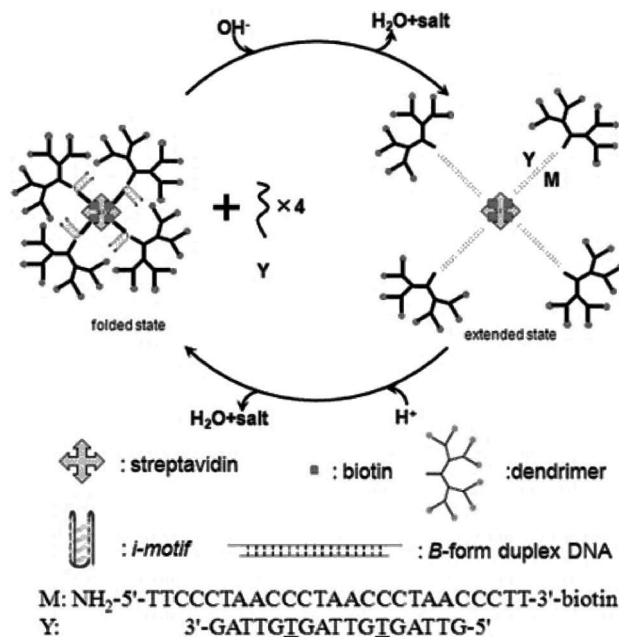
将亲水的 DNA 与疏水的有机分子结合所得到的两亲分子不仅被应用于基因传输/治疗等领域,在纳米科学领域中也受到了极大的重视。Mirkin 课题组报道了 DNA-聚苯乙烯复合分子在水溶液中的组装,通过改变 DNA 序列的长度以及聚苯乙烯的分子量,可以得到直径 8~30nm 不等的胶束。

图 15 DNA-PS 复合分子在水溶液中形成的胶束 (AFM)^[16]Figure 15 The spherical micelles constructed by DNA-PS hybrids under AFM^[16]

Herrmann 课题组合成的聚环氧丙烷-DNA 两亲复合体系在水溶液中可以组装成 20nm 左右的胶束,在此基础上他们通过调节加入互补序列的长度,可以得到不同形貌的聚集体^[23],如图 16 所示。例如,加入等长的互补序列时,得到的是尺寸相当的胶束,而加入较长的模板序列时,则可观察到棒状聚集体的大量存在。

有别于传统意义上的高分子,树状分子(Dendrimer)是一类结构独特的大分子,它独特的拓扑学结构和物理化学性质使得其在材料以及纳米科学领域得到了广泛的应用,但是将树状分子与 DNA 结合的例子确少见报道。Liu 课题组将水溶性树状分子通过共价键连接到 i-motif DNA 的两端,得到了 DNA-树状分子复合分子。并通过改变环境的 pH 值来调节 DNA 的构型,控制树状分子间的融合,首次得到了可以对环境相应的 DNA-树状分子复合体^[24],如图 17 所示。

随后, Liu 和 Xu 课题组又将连接有树状分子的 i-motif DNA 连接到链霉亲和素上,通过调节 i-motif DNA 的构型变化来调控整个体系的形貌,首次得到了蛋白质-DNA-树状分子三元复合体系,实现了 DNA 与天然以及人工合成高分子的有效结合^[25],如图 18 所示。

图 16 DNA-PPO 复合分子在水中的不同组装形式(SFM)^[23]Figure 16 Different form of aggregates constructed by DNA-PPO hybrids under SFM^[23]图 17 pH 响应的 DNA-树状分子复合体系^[24]Figure 17 pH responsive DNA-Dendrimer hybrid^[24]图 18 pH 响应的蛋白质-DNA-树状分子复合体系^[25]Figure 18 pH responsive Protein-DNA-Dendrimer hybrids^[25]

4 总结与展望

如何精确控制材料的结构、分子量以及官能团数量是化学家和材料学家多年来致力解决的问题。上世纪末, 化学家以及材料学家将多种生物大分子与人工合成的高分子结合来制备复合材料, 为解决上述问题开辟了新的思路。其中核酸以其独特的结构和物理化学性质被人们广泛关注, 多个课题组关注开展了相关工作并且取得了令人瞩目的成果。但是在该领域的探索才刚刚开始, 核酸-高分子复合体系的应用还有待于人们的进一步发掘。

参考文献:

- [1] Feldkamp U, Niemeyer C M. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 1856~1876.
- [2] Jeong J H, Kim S H, Kim S W, Park T G. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16: 1034~1037.
- [3] Takei Y G, Aoki T, Sanui K, Ogata N, Okano T, Sakurai Y. *Bioconjugate Chem*, 1993, 4: 42~46.
- [4] Takei Y G, Aoki T, Sanui K, Ogata N, Sakurai Y, Okano T, Matsukata M, Kikuchi A. *Bioconjugate Chem*, 1994, 5: 577~582.
- [5] Oishi M, Hayama T, Akiyama Y, Takae S, Harada A, Yarnasaki Y, Nagatsugi F, Sasaki S, Nagasaki Y, Kataoka K. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 2449~2454.
- [6] Li Z, Zhang Y, Fullhart P, Mirkin C A. *Nano Lett*, 2004, 4: 1055~1058.
- [7] Alemdaroglu F E, Ding K, Berger R, Hermann A. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 4206~4210.
- [8] Watson K J, Park S J, Im J H, Nguyen S T, Mirkin C A. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 5592~5593.
- [9] de Lambert B, Chaix C, Charreyre M T, Laurent A, Aigoui A, Rubens A P, Pichot C. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16: 265~274.
- [10] Wei B, Cheng I, Luo K M, Mi Y Q. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 47: 337~339.
- [11] Heeger P S, Heeger A J. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1999, 96: 12219 ~ 12221.
- [12] Tong G, Lawlor J M, Tregear G W, Haralambidis J. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 12151~12158.
- [13] Yang C Y J, Pinto M, Schanze K, Tan W H. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 2572~2576.
- [14] Lee K, Povlich L K, Kim J. *Adv Funct Mater*, 2007, 17: 2580~2587.
- [15] Immoos C E, Lee S J, Grinstaff M W. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 10814~10815.
- [16] Gibbs J M, Park S J, Anderson D R, Watson K J, Mirkin C A, Nguyen S T. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 1170~1178.
- [17] Stein C A, Cheng Y C. *Science*, 1993, 261: 1004~1012.
- [18] Fong R B, Ding Z L, Long C J, Hoffman A S, Stayton P S, et al. *Bioconjugate Chem*, 1999, 10: 720~725.
- [19] Oishi M, Nagatsugi F, Sasaki S, Nagasaki Y, Kataoka K. *Chem Bio Chem*, 2005, 6: 718~725.
- [20] Oishi M S, Nagasaki S Y, Kataoka K. *Biomacromolecules*, 2003, 4: 1426~1432.
- [21] Costioli M D., Fisch I, Freitag R, et al. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 81: 535~545.
- [22] Soh N, Umeno D, Tang Z L, Murata M, Maeda M. *Anal Sci*, 2002, 18: 1295.
- [23] Ding K, Alemdaroglu F E, Borsch M, Berger R, Herrmann A. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 1172~1176.
- [24] Sun Y W, Liu H J, Xu L J, Wang L Y, Fan Q H, Liu D S. *Langmuir*, 2010, 26: 12496~12499.
- [25] Chen P, Sun Y W, Liu H J, Xu L J, Fan Q H, Liu D S. *Soft Matter*, 2010, 6: 2143~2145.

Preparation and Characterization of Nucleic Acid/Polymer Hybrids

SUN Ya-wei, LIU Dong-sheng *

(*Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China*)

Abstract: Nucleic acid/polymer hybrids are reviewed including their design, synthesis, characterization and application in recent years. Special efforts have been taken in the introduction of nucleic acid/polymer hybrids' synthesis and application in DNA detection, biomedicine and nanoscience, these literature work indicated the good potential application of nucleic acid/polymer hybrids in nanoscience and material chemistry.

Key words: Nucleic acid; Hybrid; DNA Detection; Assembly