论著

文章编号:1000-5404(2007)14-1378-03

氨基甘露聚糖对质粒DNA构象的影响因素及机制研究

郭 渊,刘永康,李宏涛,杜 莹,陈国民 (重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

提 要:目的 研究氨基甘露聚糖(aminoglucomannan, AGM)对质粒DNA构象影响的机制和影响因素。**方法** 根据琼脂糖电泳条带的改变来检测阳离子化的聚糖与DNA质粒聚合后的情况并与多种糖类进行比较,改变聚糖浓度、pH、离子强度(NaCl浓度)、温度条件及质粒DNA种类,分析其对该聚合过程的影响。**结果** AGM和质粒DNA聚合后,电泳条带发生明显的向大分子量方向的移动变化,与AGM浓度呈剂量依赖趋势,且该作用与酶切作用不完全相同,氨基半乳糖和中药木芙蓉提取物有相似作用。pH、离子强度(NaCl浓度)、温度可影响其聚合作用。**结论** 该AGM在适当的条件下有与DNA聚合并对质粒DNA构象产生影响的作用,该作用可能与其分子结构中的氨基有关。

关键词: 氨基甘露聚糖;质粒DNA;聚合

中图法分类号: Q503;Q539;Q523 **文献标识码:** A

Condensation mechanism of aminoglucomannan with plasmid DNA

GUO Yuan, LIU Yong-kang, LI Hong-tao, DU Ying, CHEN Guo-min (Institute of Virus Hepatitis, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To study the condensation mechanism of aminoglucomannan (AGM) with plasmid DNA and some influencing factors in this process. **Methods** The polysaccharide-DNA complex was analyzed with agarose gel electrophoresis by observing the changes of DNA bands under various influencing conditions including different pH, ionic strength (NaCl concentration), temperature and plasmid DNA sorts. **Results** The new bands appeared in the slow migration positions after reaction between AGM and plasmid DNA, and the changes of DNA bands content were dependent on AGM concentrations. The condensation degree could be effected by pH, temperature, and ionic strength. **Conclusion** Our study suggests that the AGM can be condensed with plasmid DNA in proper conditions.

Key words: aminoglucomannan; plasmid DNA; condensation

阳离子多聚物作为人工合成的DNA载体一般应具有与DNA聚合以及亲细胞的特征,与带阴性电荷的DNA之间通过非共价键形成复合物,由细胞内吞摄入[1]。李宏涛等[2]应用氨基甘露聚糖(aminoglucomannan, AGM)作为载体,进行DNA聚合、细胞转染,得到了令人关注的结果。根据此研究结果,我们找到一种无毒性、以多糖为基质的化学物质,通过与DNA聚合使之超螺旋结构解旋松弛或构象发生改变,达到抗病毒的目地。葡甘聚糖具有水溶、增稠、稳定、胶凝、黏结等多种理化特性。在食品、制药、化工等领域广泛应用。将其纯化后进行氨基化修饰,使之成为带有阳性电荷的多糖。具有和阳离子脂质体、氨基多聚物、多聚赖氨酸等高分子聚合物等非病毒载体相同的物理化学性质[1],并具有多糖的特征。本研究将阳离子甘露聚糖和质粒DNA进行聚合实验,改变聚合的条件包括:加热、NaCl浓度和pH,观察质粒DNA电泳条带的变化,并与多种糖类及酶切作用进行比较,研究AGM与质粒DNA聚合并对质粒DNA构象产生影响的作用因素及作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 氨基甘露聚糖 0.4%阳离子葡甘聚糖,由本所实验室自行制备并纯化。

1.1.2 质粒 pEGFP-C1(100 μg/ml)由BD公司购入。

基金项目: 国家科技部新药研究基金(96-901-05-240)
Supported by the New Drug Research Funds by Ministry of Science and Technology of China (96-901-05-240)

作者简介: 郭 渊(1969-),女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事病毒学、免疫学和多糖类方面的研究。电话:(023)63693000-3343, E-mail: gouyzh@tom.com

通讯作者: 陈国民,电话:(023)63693225

收稿日期: 2007-01-19;**修回日期:** 2007-04-26

pAg85a,由我实验室保存。pLG1,由我实验室保存。

1.1.3　仪器　　PAC300 电泳仪, Bio-Rad Gel Doc 2000 凝胶成像仪。

1.2　方法

1.2.1　AGM 和质粒的聚合实验　　取 100 μl AGM 按 1∶2、1∶4、1∶8、1∶16、1∶32、1∶64 梯度稀释;标记 8 只 Ep 管,每管加入质粒 pEGFP-C1 0.1 μg;再分别加入 10 μl 的双蒸水、原液、稀释后的 AGM。振荡混匀。55 ℃水浴加热 10 min[3],3 000 r/min 离心 5 min,4 ℃放置 15 min。后进行电泳。电泳条件:1% 琼脂糖,溴化乙锭显色,TAE Buffer,上样量 5 μl/孔,1.5 μl 核酸上样 Buffer。90 V 电压,30 min 后观察结果并照相。

1.2.2　AGM 和不同质粒的聚合及与酶切作用的比较　　分别取质粒 pEGFP-C1、pAg85a、pLG1 各 0.4 μg,加入 *Xho* Ⅱ酶 1 μl,反应体系 21 μl,反应条件 37 ℃、1 h;标记 9 只 Ep 管,以 3 管为 1 组,前 2 管分别加入质粒 pEGFP-C1、pAg85a、pLG1 各 0.1 μg,后 1 管分别加入酶切后质粒各 0.1 μg,再以 3 管为 1 组分别加入 10 μl 的双蒸水、AGM 原液、双蒸水。混合、加热以及电泳等处理过程同上。

1.2.3　AGM 和其他糖类与质粒聚合作用的比较　　标记 8 只 Ep 管,每管加入质粒 pEGFP-C1 0.1 μg;再分别加入 10 μl 的双蒸水、半乳糖、氨基半乳糖、葡甘聚糖、AGM、乳糖、果糖、葡萄糖。混合、加热以及电泳等处理过程同上。

1.2.4　离子强度(NaCl 浓度)对 AGM 和质粒聚合影响的实验　　配制 NaCl 浓度分别为:0、3.0、6.0、12.0、24.0、48.0、96.0 mmol/L 的氨基甘露聚糖溶液。标记 8 只 Ep 管,加入质粒 pEGFP-C1 0.1 μg/管。依次加入双蒸水和已配制不同 NaCl 浓度的氨基甘露聚糖。混合、加热以及电泳等处理过程同上。

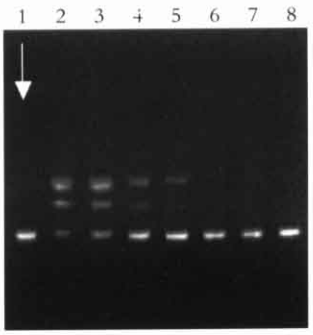
1.2.5　pH 对 AGM 和质粒聚合影响的实验　　试纸法测 AGM 的 pH 为 7.5,双蒸水 pH 为 6.0;取 9 只 Ep 管,各加入 100 μl AGM,加入 0.1 mol/L 盐酸调 pH 分别 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0。加入 0.1 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 8.0、9.0、10.0、11.0。取 11 只 Ep 管,每管加入质粒 0.1 μg,分别加入 10 μl 不同 pH 的 AGM 和双蒸水。混合、加热以及电泳过程同上。

1.2.6　温度对 AGM 和质粒聚合影响的电泳实验　　制备不同批次的氨基甘露聚糖 A 组和 B 组。各取 200 μl 加入 4 只 Ep 管,分别编号为 A1、A2、B1、B2。A1、B1 经过 80 ℃ 1 h 水浴;A2、B2 经过 80 ℃ 2 h 水浴。再标记度 Ep 管,每管加入 0.1 μg 质粒。按照编号顺序,分别加入双蒸水、各组上清 10 μl。其余处理过程及电泳条件同上。

2　结果

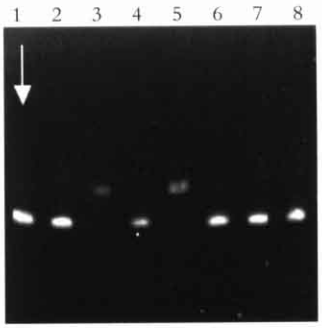
2.1　AGM 和质粒 DNA 的聚合

各 AGM 组均出现质粒 DNA 电泳条带滞后于质粒对照组现象,该作用随 AGM 浓度下降而减弱,呈浓度依赖趋势。图 1 显示 AGM 与质粒 DNA 聚合后电泳条带滞后分离;其他批次合成的 AGM 与质粒 DNA 聚合后电泳条带滞后呈 1 条带。表明 AGM 能够和质粒聚合形成复合物,低浓度即可聚合,浓度越高则聚合效果越好,形成的复合物可滞留上样孔。非阳离子化的葡甘聚糖没有出现类似的作用,见图 2。



1:质粒对照; 2: AGM 原液; 3: 1∶2稀释 AGM; 4: 1∶4稀释 AGM; 5: 1∶8稀释 AGM; 6: 1∶16 稀释 AGM; 7: 1∶32 稀释 AGM; 8: 1∶64 稀释 AGM

图 1　AGM 对质粒影响剂量依赖的电泳图

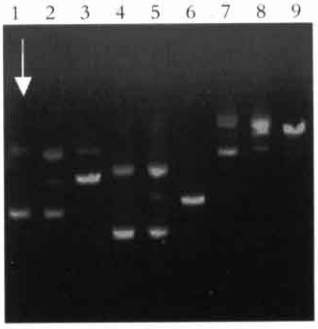


1:质粒空白对照; 2:半乳糖; 3:氨基半乳糖; 4:甘露聚糖; 5:氨基甘露聚糖; 6:乳糖; 7:果糖; 8:葡萄糖

图 2　多种糖类对质粒的影响分析电泳图

2.2　AGM 和不同质粒的聚合及与酶切作用的比较

图 3 中 2、5、8 道显示 AGM 分别可使 3 种质粒 DNA 电泳条带滞后分离为深浅两条带,其中浅淡的条带位置与 3、6、9 道所示 *Xho* Ⅰ酶切后的 3 种质粒 DNA 电泳条带位置相同,深色的条带位置与 *Xho* Ⅰ酶切后的 3 种质粒 DNA 电泳条带位置完全不同。



1: pEGFP 对照; 2: AGM + pEGFP-C_1; 3:酶切 pEGFP-C_1; 4: pAg85a 对照; 5:AGM + pAg85a; 6:酶切 pAG85a; 7: pLG 对照; 8: AGM + pLG1; 9:酶切 pAg85a

图 3　AGM 呈现轻微 DNA 酶作用

2.3　AGM 和其他糖类与质粒聚合作用的比较

图 2 示 3 道氨基半乳糖和 5 道 AGM 组较质粒对照组均出现质粒 DNA 电泳条带滞后分离现象,其他无氨基糖类组无此作

用。由此可推测 AGM 和氨基半乳糖对质粒 DNA 的作用机制与其分子结构中的氨基有关。

2.4 离子强度(NaCl 浓度)对 AGM 和质粒聚合的影响

实验显示无 NaCl AGM 溶液使质粒 DNA 电泳条带滞后分离作用最强,随溶液离子强度(NaCl)增加,质粒 DNA 电泳条带滞后分离现象逐渐减弱直至消失。说明离子强度可以在一定范围内影响氨基甘露聚糖和质粒 DNA 的聚合。

2.5 pH 对 AGM 和质粒聚合的影响

实验显示当溶液 pH 值为 5.0、6.0、7.5 时,AGM 使质粒 DNA 电泳条带滞后的作用较强,随 AGM 溶液 pH 值升高和降低,电泳条带滞后作用逐渐减弱,pH 值降至3.0 以下电泳条带消失。说明溶液 pH 值可以在一定范围内影响 AGM 和质粒 DNA 的聚合。

2.6 温度对 AGM 和质粒聚合的影响

实验中未经加热处理的 AGM 均出现质粒 DNA 电泳条带滞后分离,而经过 1 次加热的 AGM 仅有较弱的泳动较慢的条带,经过 2 次加热的 AGM 基本上没有新的条带出现,和质粒对照的条带相同。说明较高的温度使 AGM 减弱,甚至丧失了与 DNA 聚合的能力。

3 讨论

3.1 AGM 能够和多种报告质粒 DNA 形成共聚物

无论是脂类、氨基酸、氨基聚合物和烷基硅粒[1]等,其 DNA 聚合功能是基于正/负电荷的静电引力等非共价键产生的[1,4]。国外文献报道了大量的此类结果,不少载体已经商品化。国内马大龙等使用壳聚糖作为载体,进行 DNA 聚合、细胞转染以及动物实验,得到了可喜的结果。李宏涛等[2]也成功地应用氨基甘露聚糖作为载体,进行 DNA 聚合、细胞转染。在实验中,氨基甘露聚糖和质粒的聚合程度明显和浓度正相关,如图 1 所示,参照单纯质粒的条带位置,出现泳动滞后的新的条带,甚至滞留加样孔,分析其可能和质粒聚合形成新的颗粒较大的聚合物,可能是氨基甘露聚糖使超螺旋的 DNA 质粒解旋松弛或构象发生改变。非阳离子化的葡甘聚糖则没有这样的作用。结果证明人工合成的氨基甘露聚糖具有 DNA 聚合功能。

3.2 溶液中的离子强度可干扰 AGM 和质粒的聚合

Liu 等[5]报道高浓度的促进多聚赖氨酸和 DNA 形成球形聚合物。本研究也选择 NaCl 作为观察离子强度对 AGM 和质粒 DNA 聚合影响的因素。实验显示随着 NaCl 浓度升高,则 AGM 与质粒 DNA 聚合的能力下降。因为溶液中的 Cl^- 在聚糖的阳离子基团周围形成离子氛[6],其中 Na^+ 可影响质粒 DNA 的表面阴性电荷和 DNA 的保留长度[1],形成静电屏障,从而降低了 AGM 分子和 DNA 的静电引力的作用,抑制二者的聚合。这和 Liu 等[5]的结果不同,可能是 AGM 和多聚赖氨酸的理化性质不同有关。

3.3 AGM 和质粒聚合的最佳溶液 pH 值是 5.0~7.5

本实验结果显示随溶液 pH 值升高或降低,AGM 和质粒结合作用逐渐减弱或消失。表明 AGM 和质粒在中性和弱酸性的溶液中可较好地形成聚合物。提示二者的聚合与阳离子基团的电离程度有关,氨基甘露聚糖原液的 pH 值是 7.5,和人体的生理状态接近,为将来应用于人体奠定了基础。

3.4 80 ℃加热对 AGM 的 DNA 聚合功能有破坏作用

本实验结果中可以看到,随着 AGM 加热次数的增加,其和质粒 DNA 的聚合能力减弱,最后消失。分子间作用力通常比共价键弱,超分子结构的热力学稳定性不如分子[4];单纯 DNA 分子本身有退火能力,80 ℃加热可能使 DNA 解链,一旦退火(电泳时)则恢复其双链结构。所以,推测较高的温度可能破坏 AGM 表面的氨基,使 AGM 正电荷减少,使之与 DNA 聚合能力降低,甚至消失。

3.5 AGM 和 DNA 质粒聚合形成复合物可能是其使超螺旋的 DNA 质粒解旋松弛或构象发生改变

如图 2 所示,AGM 能够和多种 DNA 质粒聚合形成复合物使质粒 DNA 电泳条带滞后,这种作用与酶切作用完全不同,推测可能是 AGM 使超螺旋的 DNA 质粒解旋松弛或构象发生改变。AGM 的这一性质为开发新的有效抗病毒物质提供理论依据。同时,AGM 对 DNA 质粒有一定酶切作用但不是主要作用。

3.6 AGM 和 DNA 质粒聚合作用机制与其分子结构中的氨基有关

如图 3 所示,通过与其他含氨基和不含氨基的糖类进行比较,含氨基的糖类包括氨基甘露聚糖和氨基半乳糖等均出现和 DNA 质粒聚合的相似现象,不含氨基的糖类则无此作用。表明氨基甘露聚糖和 DNA 质粒聚合作用机制可能与其分子结构中的氨基有关。

根据初步的实验结果,证明合成的氨基甘露聚糖具有与 DNA 聚合并改变其生物化学行为的作用。为进一步研究以多糖为基质的新的抗病毒药物开创一条探索途径。

参考文献:

[1] Vijayanathan V, Thomas T, Thomas T G. DNA Nanoparticles and Development of DNA Delivery Vehicles for Gene Therapy [J]. Biochemistry, 2002, 41(48): 14085-14094.

[2] 李宏涛, 兰英华, 郭 晖, 等. 氨基葡甘聚糖的质粒 DNA 转染载体作用的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(3): 73-77.

[3] 张海玲, 朱敦皖, 杨 健, 等. 壳聚糖修饰对细胞摄入和细胞毒性的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2006, 28(4): 486-491.

[4] Lehn J M. 超分子化学:概念和展望[M]. 沈兴海, 等译. 北京:北京大学出版社, 2002: 5-7.

[5] Liu G, Molas M, Grossmann G A, *et al*. Biological properties of poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(37): 34379-34387.

[6] 魏祖期. 基础化学[M]. 第6版. 北京:人民卫生出版社, 2004: 24-26.

(编辑 王 红)