

彭子艾, 李丹丹, 夏澳运, 等. 磁性纳米颗粒负载质粒 DNA 的研究 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(1): 78-82.  
PENG Ziai, LI Dandan, XIA Aoyun, et al. Study on magnetic nanoparticle loading plasmid DNA[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(1): 78-82.

# 磁性纳米颗粒负载质粒 DNA 的研究

彭子艾, 李丹丹, 夏澳运, 王加峰, 黄翠红, 王 慧, 郭 涛, 陈志强  
(华南农业大学 农学院/国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

**摘要:**【目的】研究磁性纳米颗粒 (MNP) 负载质粒 DNA 形成的纳米载体-基因复合物的生物物理学特性、负载形态与负载机理, 为基于磁性纳米载体定向编辑技术的应用奠定基础。【方法】以 MNP 作为基因载体, 与质粒 DNA pRGEB32 制备纳米载体-基因复合物 MNP-pRGEB32, 分析 MNP 负载、保护 pRGEB32 的能力, 并对其粒度分布、Zeta 电位、结合形态进行研究。【结果】MNP 通过静电作用压缩、吸附、聚集 pRGEB32, 形成纳米载体-基因复合物。MNP 能有效负载并保护 pRGEB32。【结论】MNP 可作为一种理想的基因转移载体。

**关键词:** 磁性纳米颗粒; 纳米载体-基因复合物; 负载形态; 负载机理  
**中图分类号:** S511; S502      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-411X(2020)01-0078-05

## Study on magnetic nanoparticle loading plasmid DNA

PENG Ziai, LI Dandan, XIA Aoyun, WANG Jiafeng, HUANG Cuihong, WANG Hui, GUO Tao, CHEN Zhiqiang  
(College of Agriculture, South China Agricultural University/National Engineering  
Research Center of Plant Space Breeding, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** 【Objective】To study biophysical property, loading morphology and loading mechanism of nanocarrier-gene complex prepared by magnetic nanoparticle (MNP) loading plasmid DNA, and lay a foundation for application of oriented editing technology based on magnetic nano carrier. 【Method】MNP was used as gene carrier to prepare nanocarrier-gene complex MNP-pRGEB32 with plasmid DNA pRGEB32. The abilities of MNP loading and protecting pRGEB32 were analyzed. The particle size distribution, Zeta potential and loading morphology of MNP-pRGEB32 were investigated. 【Result】MNP compressed, adsorbed and aggregated pRGEB32 through electrostatic interaction to form nanocarrier-gene complex. MNP could effectively load and protect pRGEB32. 【Conclusion】MNP can be used as an ideal gene transfer carrier.

**Key words:** magnetic nanoparticle; nanocarrier-gene complex; loading morphology; loading mechanism

随着纳米生物技术的迅速发展, 纳米材料可作为基因载体, 通过包裹、静电吸附及化学键作用等方式负载外源基因<sup>[1-3]</sup>, 通过细胞吞噬作用将其传送到细胞内, 使基因成功表达<sup>[4]</sup>。与其他纳米载体相比, 磁性纳米载体具有超顺磁性优势<sup>[5]</sup>, 在磁场作用下可快速负载、运输目的基因<sup>[6]</sup>。有研究表明外源基因成功整合到基因组中需要通过 3 个细胞屏障: 细胞膜、溶酶体和细胞核<sup>[7]</sup>, 影响整合效率的关键因素是避开溶酶体的消化作用<sup>[8-9]</sup>, 纳米载体的表面电荷<sup>[10]</sup>、粒径大小<sup>[11]</sup>和修饰功能基团<sup>[12]</sup>等是影响整合

收稿日期: 2019-05-10      网络首发时间: 2019-12-19 14:19:34  
网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20191217.1722.022.html>  
作者简介: 彭子艾 (1995—), 女, 硕士研究生, E-mail: [453276098@qq.com](mailto:453276098@qq.com); 通信作者: 郭 涛 (1978—), 男, 教授, 博士, E-mail: [guoquot@scau.edu.cn](mailto:guoquot@scau.edu.cn); 陈志强 (1956—), 男, 教授, E-mail: [chenlin@scau.edu.cn](mailto:chenlin@scau.edu.cn)  
基金项目: 广东省重点领域研发计划 (2018020206002); 国家重点研发计划 (2016YFD0102102); 国家水稻产业技术体系建设专项 (CARS-01-17)

效率的重要因素。有学者提出纳米载体基因复合物可通过“质子海绵效应”免受溶酶体的消化作用<sup>[13-14]</sup>。

纳米载体基因传输技术为动植物遗传育种提供了新思路, Wang 等<sup>[15]</sup>将磁性纳米载体与精子介导的基因转染相结合, 获得了转基因小鼠。Zhao 等<sup>[16]</sup>利用磁性纳米颗粒 (Magnetic nanoparticle, MNP) 作为基因载体, 负载 pGBIF4ABCΔα 质粒, 在磁场作用下磁转染棉花花粉, 成功筛选到转融合抗虫基因的棉花。随着 CRISPR 基因编辑和修饰技术的使用, 磁性纳米颗粒会是将生物分子传送到植物体内进行基因编辑和修饰的最佳平台<sup>[17]</sup>。

本研究选用 MNP 作为基因载体, 负载质粒 pRGEB32, 构建了不同质量比的纳米载体-基因复合物 MNP-pRGEB32。通过琼脂糖凝胶电泳阻滞试验评价和分析了 MNP 对 pRGEB32 的结合和保护能力。通过纳米粒度分析仪、Zeta 电位分析仪、透射电子显微镜和原子力显微镜对 MNP 和 MNP-pRGEB32 复合物的粒径、表面电位、形貌、分布等进行了检测和观察, 研究了 MNP-pRGEB32 复合物的生物物理特性、基因负载形态与负载机理, 以期 MNP 负载 CRISPR/Cas9 表达载体的应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

MNP poly MAG1000 购自德国 Chemicell 公司; DNase I 购自 TaKaRa 公司; 无内毒素质粒大提试剂盒购自 TIANGEN 生物技术有限公司; 含 CRISPR/Cas9 表达载体 pRGEB32<sup>[18]</sup> 的大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5α 由国家植物航天育种工程技术研究中心保存; 核酸染料 GelRed 购自美国 Biotium 公司。

### 1.2 质粒 DNA 的提取与纯化

取 pRGEB32(15 888 bp) 大肠埃希菌菌液加入到含 50 ng/μL 卡那霉素的 LB 液体培养基 (每升培养基含酵母提取物 5 g、胰蛋白胨 10 g、NaCl 10 g) 中, 于 37 °C、220 r/min 培养 16 h, 按照 TIANGEN 无内毒素质粒大提试剂盒说明书提取质粒。利用微量紫外分光光度计测定质粒 DNA 的浓度和纯度, 选取  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} \approx 1.8$  的质粒 DNA 于 -20 °C 贮存备用。

### 1.3 磁性纳米颗粒-DNA 复合物的制备

pRGEB32 质量固定为 4 μg, 将 poly MAG1000 和 pRGEB32 按照质量比为 1:1、1:4、1:8、1:16、1:24、1:40、1:50 混合, 于 37 °C 条件下培育 30 min,

连接制备 MNP-DNA 复合物。

### 1.4 琼脂糖凝胶阻滞试验

将 MNP-pRGEB32 复合物点样在 8 g/L 的琼脂糖凝胶 (含 7 μL 荧光染料 GelRed) 上, 在 TAE 缓冲液中于 130 V 电泳 30 min, 然后在凝胶成像仪上观察, 分析 MNP 对 pRGEB32 的负载能力; 同时, 将 MNP-pRGEB32 复合物在 37 °C 分别用 DNase I 酶切 4 h, 用 *Hind* III 和 *Bsa* I 双酶切 16 h, 然后电泳跑胶, 分析对 MNP 对 pRGEB32 的保护能力。

### 1.5 粒度分布及 Zeta 电位分析

将 MNP 和 pRGEB32 按照质量比为 1:1、1:4、1:8 制备的 MNP-pRGEB32 复合物分别用超纯水稀释至 0.001 μg/μL, 采用纳米粒度分析仪及 Zeta 电位分析仪分析粒度分布及 Zeta 电位。

### 1.6 透射电子显微镜观测

吸取 MNP 和 MNP-pRGEB32 质量比为 1:1 的 MNP-pRGEB32 复合物, 用超纯水分别稀释至 0.001 μg/μL, 各取 10 μL 均匀滴加到干净的碳膜覆盖的铜网上, 用滤纸吸干多余的液体, 静置晾干 30 min, 用 20 g/L 的磷钨酸负染 1 min, 置于干净的培养皿中自然干燥, 然后在透射电子显微镜下观测形态并拍照。

### 1.7 原子力显微镜观测

吸取 MNP 和 pRGEB32 质量比为 1:1 的 MNP-pRGEB32 复合物, 用超纯水稀释至 0.01 μg/μL, 取 10 μL 均匀滴加到新剥离的云母片表面, 置于干净的培养皿中自然干燥, 然后在原子力显微镜下扫描成像, 用 NanoScope Analysis 1.5 在 Height Sensor 模式下分析图像。

## 2 结果与分析

### 2.1 磁性纳米颗粒对质粒 DNA 负载和保护能力分析

2.1.1 磁性纳米颗粒对质粒 DNA 的负载能力分析 MNP 和 pRGEB32 质量比为 1:1、1:4、1:8、1:16 时, MNP 与 pRGEB32 完全结合, 泳道中无游离的 pRGEB32; 质量比为 1:24、1:40、1:50 时, 逐渐减少的 MNP 难以负载逐步增多的 pRGEB32, 形成的 MNP-pRGEB32 复合物较少, 过量的 pRGEB32 在泳道中呈现明显条带 (图 1)。结果表明 MNP 能有效装载相当于自身质量 16 倍的 pRGEB32。

2.1.2 磁性纳米载体对 pRGEB32 的保护能力分析 MNP-pRGEB32 复合物用核酸酶 DNase I 处理 4 h 后, 质量比为 1:1、1:4、1:8、1:16 的复合物样品仍停留在点样孔, 纯质粒及质量比为 1:24、1:40、1:50 的复合物样品中过量的 DNA 被完全消

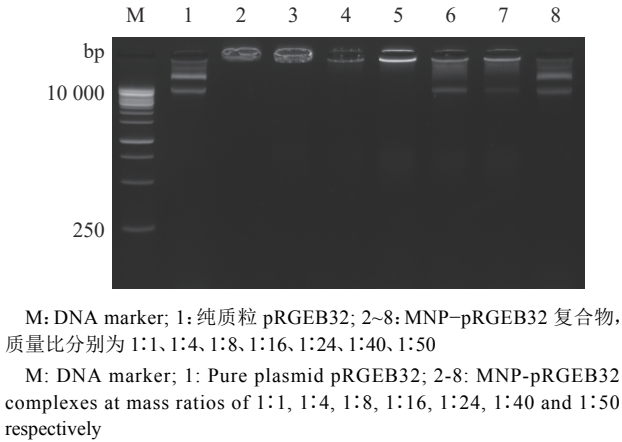


图 1 MNP-pRGEB32 复合物电泳分析

Fig. 1 Electrophoreses analyses of MNP-pRGEB32 complexes

化, 完全结合的 MNP-pRGEB32 复合物停留在点样孔 (图 2)。MNP-pRGEB32 复合物用 *Hind* III 和 *Bsa* I 双酶切 16 h 后, 纯质粒及质量比为 1:24、1:40、1:50 的复合物样品中过量的 DNA 随电场迁移, 被限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bsa* I 切开形成 2 条线性质粒条带, MNP-pRGEB32 复合物质量比为 1:1、1:4、1:8、1:16 的泳道没有 DNA 痕迹, 说明 MNP-pRGEB32 复合物没有被酶切割 (图 3)。结果证明 MNP 能保护其负载的 pRGEB32 免受酶促降解。

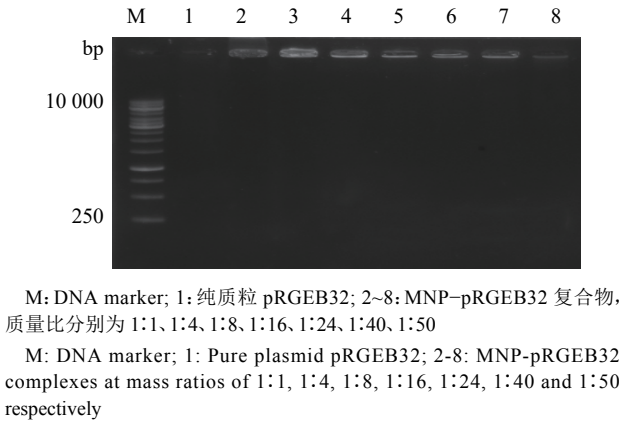


图 2 MNP-pRGEB32 复合物用 DNase I 酶切处理的电泳分析

Fig. 2 Electrophoresis analyses of MNP-pRGEB32 complexes digested with DNase I

2.2 粒度分布及 Zeta 电位分析

纳米粒度及 Zeta 电位分析仪结果显示, MNP 的平均疏水粒径为 127.5 nm, Zeta 电位为 12.1 mV, 在结合带负电的 pRGEB32 后, MNP-pRGEB32 复合物的粒径增大, Zeta 电位降低 (图 4)。随着结合的 pRGEB32 的量逐渐增加, MNP-pRGEB32 复合物的粒径也逐渐增加, Zeta 电位逐渐降低。结果

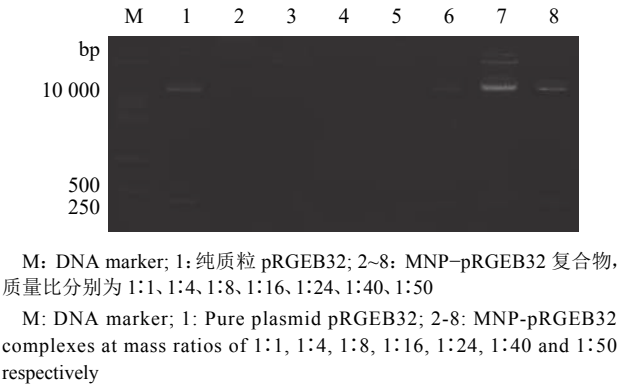


图 3 MNP-pRGEB32 复合物用 *Hind* III 和 *Bsa* I 双酶切处理的电泳分析

Fig. 3 Electrophoresis analyses of MNP-pRGEB32 complexes digested with *Hind* III and *Bsa* I

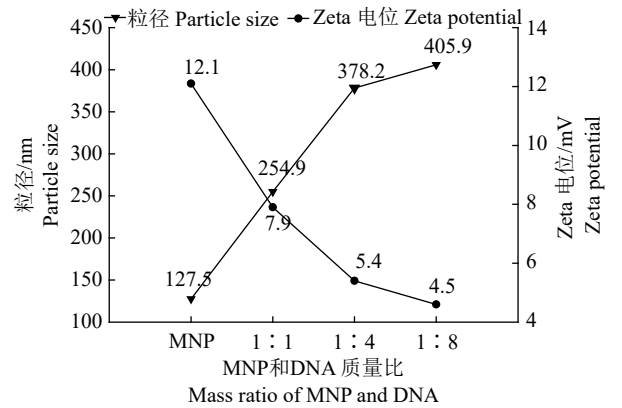


图 4 MNP 和 MNP-pRGEB32 复合物的粒径及 Zeta 电位分析

Fig. 4 Size distribution and Zeta potential of MNP and MNP-pRGEB32 complex

说明 MNP 能通过静电作用负载 pRGEB32, 并能有效地结合和负载 pRGEB32 形成纳米载体基因复合物。

2.3 透射电子显微镜观测

透射电镜下 MNP 为规则球形, 分散性较好, 粒径约 10~150 nm (图 5a)。中心深色部分为磁性氧化铁核心, 外层附有阳离子 PEI 膜包裹 (图 5b)。MNP 与 pRGEB32 结合后大量的 pRGEB32 被压缩、吸附、聚集在纳米颗粒表面 (图 5c 和 5d)。试验表明 MNP 可携带大量的 pRGEB32, 从而作为外源基因转移的载体。

2.4 原子力显微镜观测

原子力显微镜观察到 MNP 周围吸附了杆状的 pRGEB32, 以载体颗粒为中心, 越靠近中心浓度越高, 呈放射状向外扩展 (图 6), 与透射电镜观测的形态相符合。这种高浓度的聚集有利于载体颗粒携带大量的 pRGEB32, 从而通过细胞的吞噬作用将外源基因传送至细胞内部。

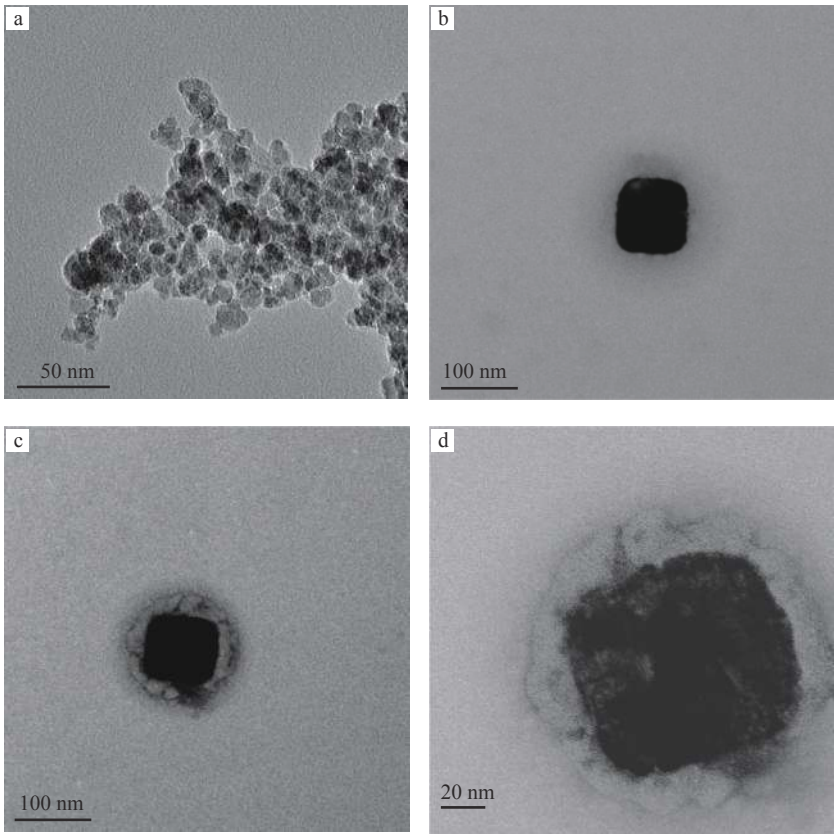


图 5 MNP 和 MNP-pRGEB32 复合物的透射电镜图像

Fig. 5 Transmission electron microscope images of MNP and MNP-pRGEB32 complex

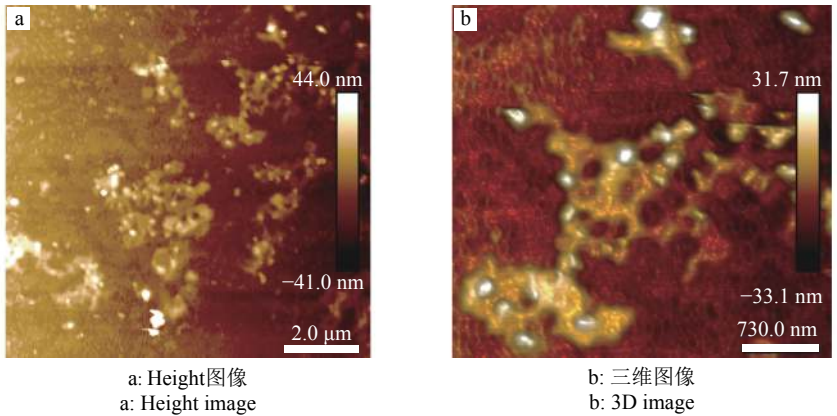


图 6 MNP-pRGEB32 复合物的原子力显微镜图像

Fig. 6 Atomic force microscope images of MNP and MNP-pRGEB32 complex

### 3 讨论与结论

纳米技术已经与许多学科交叉研究, 具有巨大的潜在价值, 已经广泛应用于生物及医学领域<sup>[19-21]</sup>。理想的基因载体应该能有效地负载外源核酸, 具有较高的生物相容性, 在细胞质内可以有效保护外源核酸免受酶促降解, 使其最终能实现高效表达<sup>[22-23]</sup>。琼脂糖凝胶电泳阻滞试验显示了 MNP 高效负载 pRGEB32 的能力, 并能够有效保护 pRGEB32 免受

核酸酶降解作用。有研究推测可能是 DNA 和纳米载体结合后导致 DNA 构象发生变化, 阻止  $Mg^{2+}$ 、核酸酶与 DNA 接触, 从而保护 DNA 免受酶的消化作用<sup>[24-25]</sup>。通过粒度分布和 Zeta 电位测试显示 MNP 结合 pRGEB32 后, 粒径增大, 电位降低, 说明二者通过静电相互作用形成了 MNP-pRGEB32 复合物。透射电镜和原子力显微镜的观测证实 pRGEB32 被吸附压缩后聚集在 MNP 表面<sup>[26]</sup>, 这种压缩和高浓度的聚集, 使载体能够有效地负载和保护 pRGEB32。

通过上述结果可知, MNP 在负载、聚集和保护 pRGE32 方面表现优越, 是一种理想的基因载体。

有研究通过磁性纳米载体负载外源基因, 将外源基因整合到生殖细胞中, 外源基因能在后代稳定遗传<sup>[16]</sup>。同时有研究证明可以利用 CRISPR/Cas9 编辑性细胞基因组, 如 Chapman 等<sup>[27]</sup>利用 CRISPR/Cas9 直接编辑大鼠的精原细胞, 产生纯合非镶嵌突变后代。若能将纳米材料和 CRISPR 基因编辑技术有效结合, 直接对动植物生殖细胞定向编辑, 将克服传统方式中部分物种基因转化困难、育种周期长等瓶颈问题。本试验证实磁性纳米载体能有效结合 CRISPR 编辑系统, 为探索基于磁性纳米载体定向编辑技术的研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 韩旭, 丁冠宇, 董青, 等. 基于脂质体的纳米基因载体的研究进展 [J]. *应用化学*, 2018, 35(7): 735-744.
- [2] 卢艳敏. 磁性纳米颗粒作为载体在基因转染中的研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(5): 736-740.
- [3] 古晓晓, 杜宝吉, 李云辉, 等. 基于纳米材料的基因载体 [J]. *化学进展*, 2015, 27(8): 1093-1101.
- [4] KHALAJ-KONDORI M, SADEGHIZADEH M, BEHMANESH M, et al. Chemical coupling as a potent strategy for preparation of targeted bacteriophage-derived gene nanocarriers into eukaryotic cells[J]. *J Gene Med*, 2011, 13(11): 622-631.
- [5] 郭大伟, 朱玲英, 顾宁. 磁性纳米颗粒作为基因递送载体的研究进展 [J]. *中国材料进展*, 2013, 32(10): 605-610.
- [6] MacDONALD C, FRIEDMAN G, ALAMIA J, et al. Time-varied magnetic field enhances transport of magnetic nanoparticles in viscous gel[J]. *Nanomedicine*, 2010, 5(1): 65-76.
- [7] 孙茂蕾, 徐晓薇, 顾中一, 等. 纳米载体逃逸溶酶体机制及其调控的研究进展 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2017, 43(4): 845-848.
- [8] NAMGUNG R, SINGHA K, YU M K, et al. Hybrid superparamagnetic iron oxide nanoparticle-branched polyethylenimine magnetoplexes for gene transfection of vascular endothelial cells[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(14): 4204-4213.
- [9] NEL A E, MADLER L, VELEGOL D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface[J]. *Nat Mater*, 2009, 8(7): 543-557.
- [10] AKINC A, QUERBES W, DE S, et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(7): 1357-1364.
- [11] WEISSLEDER R, KELLY K, SUN E Y, et al. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(11): 1418-1423.
- [12] PETROS R A, DeSIMONE J M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(8): 615-627.
- [13] MINDELL J A. Lysosomal acidification mechanisms[J]. *Annu Rev Physiol*, 2012, 74: 69-86.
- [14] GUO S, HUANG L. Nanoparticles escaping res and endosome: Challenges for siRNA delivery for cancer therapy[J]. *J Nanomater*, 2011. doi: 10.1155/2011/742895.
- [15] WANG Y, ZHAO X, DU W, et al. Production of transgenic mice through sperm-mediated gene transfer using magnetic nano-carriers[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2017, 13(12): 1673-1681.
- [16] ZHAO X, Meng Z, WANG Y, et al. Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers[J]. *Nat Plants*, 2017, 3(12): 956-964.
- [17] CUNNINGHAM F J, GOH N S, DEMIRER G S, et al. Nanoparticle-mediated delivery towards advancing plant genetic engineering[J]. *Trends Biotechnol*, 2018, 36(9): 882-897.
- [18] XIE K, MINKENBERG B, YANG Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(11): 3570-3575.
- [19] KWAK S Y, LEW T T S, SWEENEY C J, et al. Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers[J]. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14(5): 447-455.
- [20] 白华荣, 范换换, 张晓兵, 等. 核酸适体-纳米材料复合物用于癌症的诊断与靶向治疗研究进展 [J]. *物理化学学报*, 2018, 34(4): 348-360.
- [21] 冯婷婷, 郭建花. 纳米材料在生物医学中的应用 [J]. *当代化工研究*, 2018(2): 159-162.
- [22] 宋瑜, 李颖, 崔海信, 等. 两种阳离子纳米基因载体及植物基因介导效果的研究 [J]. *生物技术通报*, 2009(6): 75-80.
- [23] 李瑶, 崔海信, 刘琪, 等. 磁性纳米颗粒作为基因载体的研究发展概况 [J]. *功能材料*, 2010, 41(S1): 14-19.
- [24] RHAESE S, Von BRIESEN H, RUBSAMEN-WAIGMANN H, et al. Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery[J]. *J Control Release*, 2003, 92(1/2): 199-208.
- [25] HE X X, WANG K M, TAN W H, et al. Bioconjugated nanoparticles for DNA protection from cleavage[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(24): 7168-7169.
- [26] VIJAYANATHAN V, THOMAS T, ANTONY T, et al. Formation of DNA nanoparticles in the presence of novel polyamine analogues: A laser light scattering and atomic force microscopic study[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(1): 127-134.
- [27] CHAPMAN K M, MEDRANO G A, JAICHANDER P, et al. Targeted germline modifications in rats using CRISPR/Cas9 and spermatogonial stem cells[J]. *Cell Rep*, 2015, 10(11): 1828-1835.