

X 射线小角散射研究温度对 DNA/磷脂复合物结构的影响*

胡书新 李大鹏 麦振洪 李明¹⁾

(中国科学院物理研究所 北京 100080)

摘要 报道由短链 DNA 和磷脂分子在水溶液中形成的复合物的小角散射研究结果. 水溶液中, DNA 分子和阳性磷脂分子自发组装成有序的复合多层膜结构: 脂双层相互平行, DNA 夹在脂双层之间, 在垂直于 DNA 方向呈现一维有序结构. 逐渐升高体系的温度, 磷脂双分子膜柔软增加, DNA 向双分子层内塌陷, 使多层膜层间距逐渐减小. 而由于 DNA 分子是一种刚性分子, DNA 之间的距离在所测温度范围内没有变化.

关键词 小角 X 射线散射 温度 多层膜 DNA/磷脂复合物

1 引言

基因疗法是过去十几年分子生物学中一个令人兴奋的研究领域. 它被用于体内细胞跟踪, 靶向体内细胞治疗, 培养疫苗预防疾病等三大方面, 被认为是未来医学领域最有潜力的治疗手段. 如何成功地将遗传物质如 DNA 完整地导入生物体内, 则成为这一领域研究的重点和热门课题^[1, 2]. DNA 和带有正电荷的脂质体可以在水溶液中自发形成稳定有序的夹层结构, 利用这种类细胞膜的结构可以成功的将 DNA 向生物体内运输. 其中作为定向药物载体的脂质体, 是靶向给药系统的一种新剂型, 不仅是形成双分子层的基础物质, 且其本身也具有极为重要的生理功能. 脂质体材料一般是阳离子型磷脂和一种中性磷脂的混合物, 两亲性磷脂在水溶液中由于疏水作用而自动聚集, 形成稳定的双分子层结构. 带有大量磷酸根基团的 DNA 分子则会在与脂质体溶液混合的过程中, 自动组装在双分子层结构的亲水层间形成稳定的夹心型结构. 当脂质体中含有一定量的头部带有正电荷的阳离子型磷脂, 则会通过静电相互作用, 在很大程度上增加这种结构的稳定性, 提高脂质体对 DNA 的封装性, 从而达到改进治疗效果的作用.

在分子和自组装水平上研究这种组装配合物的结构和性质, 对提高 DNA 向生物体内输运效率的研究会有本质上的帮助. 目前对这种配合物结构和性质的研究主要利用 X 射线散射, 中子散射技术, 热分析技术, 显微成像技术等. 溶液同步辐射 X 射线散射技术可以准确地对这种夹心双层配合物的基本结构进行表征, 最近已经引起了人们的广泛关注^[3, 4]. 已有的文献报道多见于磷脂和长链 DNA 分子之间的组装^[5, 6]. 中性的磷脂 DOPC (二油酰磷脂酰胆碱) 与带正电的磷脂 DOTAP (N-[1-(2,3-二油酰) 丙基]-N, N, N-三甲基氯化铵) 具有相同长度的疏水链. 他们在水溶液中在疏水链的作用下组装成脂双层膜结构(如图 1(a)所示). 图中小球代表磷脂的亲水头, 曲线代表磷脂的两条疏水尾链, 灰色的小球代表 DOTAP, 白色的小球代表 DOPC. 当加入 DNA 水溶液后, DNA 会成功地组装在脂双层结构的亲水头部(如图 1(b)所示), 形成取向有序的夹心型多层膜结构. 在垂直于界面方向由磷脂和 DNA 组成有序结构的周期大小用 $d_{D/L}$ 来表示. 研究表明, DNA 在亲水平面中也可以作有规则的排列^[3, 7], 其周期的大小可以用 d_{DNA} 来表示. 我们利用溶液小角 X 射线散射技术, 将一定浓度的短链 DNA (25bp) 水溶液或寡核苷酸片段 (25 个碱基) 水溶液和由 DOPC 与

* 国家自然科学基金(10325419)和北京同步辐射实验室资助

1) E-mail: mingli@aphy.iphys.ac.cn

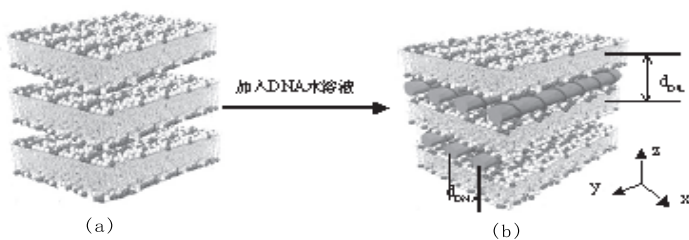


图1 磷脂和DNA配合物的形成示意图

DOTAP组成的混合脂质体悬浮液小心混合,对自发组装成的有序层状化合物的结构随温度的变化进行了研究,可以为这一领域的其它研究工作出示有力的证据.

2 实验方法和样品制备

实验在北京同步辐射实验装置(BSRF)的4B9A束线小角散射(SAXS)实验站完成.入射X射线的波长是 1.54\AA ,样品处的光斑尺寸大小是 $1 \times 3\text{mm}^2$.采用成像板技术记录X射线散射光的强度.成像板探测器型号MAR345,样品到成像板的距离为1539.0mm.由电离室记录入射光的强度.样品散射强度是从总的测量强度中扣除背底散射,并进行吸收校正.实验时采用自行设计的带有控温装置的纯铜密闭式恒温器,中心为不锈钢样品池(如图2所示).样品池厚度1mm,直径12mm,窗口用Mylar膜封闭,溶液用注射器送入.样品池的温度通过循环冷却泵可以在 -8°C 到 100°C 之间调节,控制精度为 0.1°C .

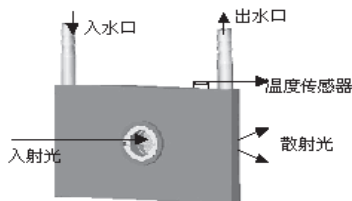


图2 样品池示意图

X射线从窗口进入,经过样品散射后从另一个窗口射出,样品池的温度由经过腔内的循环水调节控制.

实验所用DNA由北京赛百盛基因技术有限公司提供合成,两条序列互补的寡核糖核酸(OND)片段(片段a: $5' \text{ CCG TAT TGG TAA CTA TAA ACT GAA C } -3'$; 片段b: $5' \text{ GTT CAG TTT ATA GTT ACC AAT ACG G } -3'$),在实验前退火成双链的DNA.所用磷脂为Avanti公司的DOPC(二油酰磷脂酰胆碱)和DOTAP(阳离子脂类N-[1-(2,3-二油酰)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵).溶液配置过程中所用的有机溶剂甲醇和氯仿由北京化学试剂公司生产,色谱

纯.Millipore超纯水,电阻率为 $1.8 \times 10^5 \Omega \cdot \text{m}$.称取质量比 $m_{\text{DOTAP}}:m_{\text{DOPC}}$ 为4:5的DOTAP和DOPC粉末于1.5ml的离心管中,用 CHCl_3 和 CH_3OH ($v:v=1:1$)的混合溶剂溶解,配制浓度为 20mg/ml 的溶液.在氮气流中除去 CHCl_3 和 CH_3OH ,置于真空中24h,使溶剂挥发干净,在离心管中形成均匀的磷脂混合物粉末.加入一定量的超纯水溶解该混合物,超声振荡配制成浓度为 20mg/ml 澄清的脂质体悬浮液.按DNA骨架上所带磷酸根的数目与DOTAP所带正电荷数目相等的比例,小心地在脂质体悬浮液中滴加单链的OND或退火后的双链DNA水溶液,轻轻振荡,使其混合均匀.实验前,在室温下放置2天,使体系达到平衡状态.

3 结果与讨论

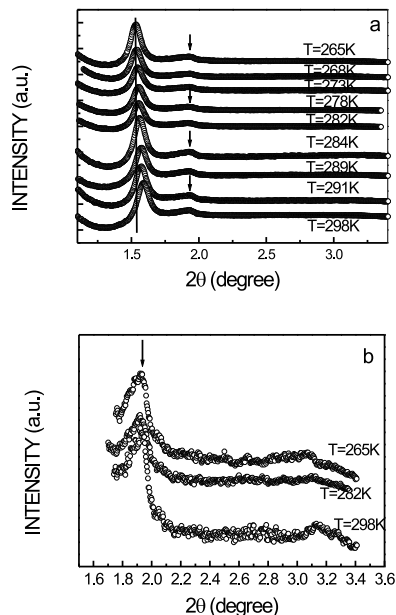


图3 不同温度下DNA/Lipid配合物样品的小角散射结果(a)

沿脂双层法线方向DNA/Lipid的第二级衍射峰强度较弱,为了清楚起见,在(b)中将(a)中 2θ 从1.7—3.4度部分放大(只选取了3个温度作为说明).箭头所指的是DNA在磷脂双层膜亲水层内的周期性排列结果.

实验主要得到了样品在 9 个不同温度下的小角散射结果, 如图 4 所示. 图中清晰的布拉格峰提示形成的 DNA/Lipid 复合物具有较好的层状结构. 从布拉格峰的位置可以计算出不同温度下多层膜周期的大小. 在磷脂和 DNA 形成的体系中, z 方向上双层膜周期的大小随温度的升高而略有减小, 变化结果如图 5 所示. 图 4 中箭头所指的较弱布拉格峰被指认为 DNA 分子在亲水层间一维有序排列产生的衍射峰, 根据其峰位计算得到周期的大小为 45.7\AA , 结果与相关的报道一致^[3-5]. 由实验结果可以看出, 双链 DNA 分子在双层膜亲水层间排列周期的大小不随温度的变化而变化.

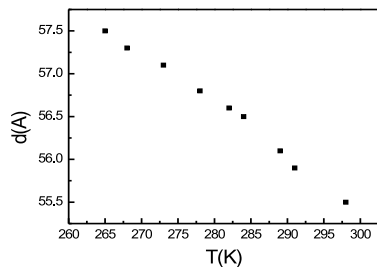


图 4 DNA/磷脂复合结构层间距 $d_{D/L}$ 随温度变化的曲线

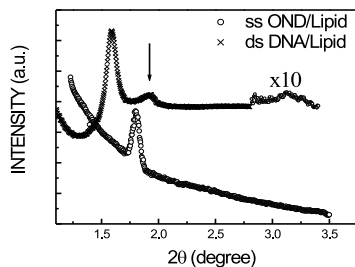


图 5 室温下单链 OND/Lipid 与双链 DNA/Lipid 复合物溶液的小角散射结果比较

双链 DNA/Lipid 复合物多层膜, 沿脂双层法线方向 DNA/Lipid 的第二级衍射峰强度较弱, 为了清楚起见, 将其 2θ 从 $2.8-3.4$ 度部分放大 10 倍说明. 箭头所指是双链 DNA/Lipid 体系中, DNA 在磷脂双层膜亲水层内的周期性排列结果.

实验同时比较了室温下单链 OND 分子和双链 DNA 分子与磷脂混合溶液的小角散射结果, 如图 5 所示. 结果表明, 因为单链 OND 分子的柔软结构, 其与 Lipid 复合物多层膜的周期大小 49.1\AA , 小于 DNA/Lipid 所形成层状结构的周期 55.5\AA . 且在磷脂分子形成的双层膜亲水层间的排列没有有序性. 在 Weisman S. 等人的实验中, 使用的是 18 个碱基的寡核苷酸片段, 利用透射电子显微镜对 OND/Lipid 体系结构的研究得到了同样的结论^[8].

在变温过程中, 双链 DNA/Lipid 复合多层膜结构在 z 方向和 xy 方向上的不同变化可以做以下解释. 在纯的混合脂质体体系中, 由质量比 $m_{\text{DOTAP}}:m_{\text{DOPC}}$ 为 4:5 的 DOPC 和 DOTAP 组成的混合脂质体双层膜, 在水溶液中周期的大小为 90\AA ^[9]. 在这种双层膜体系中, 水与磷脂头部基团之间的相互作用, 以及分子间的范德华力决定了双层膜结构周期的大小. 由于 DOTAP 分子的亲水头部是水溶性极好的季胺盐, 从而使水与季胺盐之间的作用力成为决定周期结构大小的主要因素. 由于 DOTAP 在混合磷脂中占有较大的比例, 使该体系中双层膜结构的周期很大. 在加入 DNA 分子后, DNA 分子和磷脂分子之间的静电作用成为影响周期结构大小的主要作用力, 导致了膜的周期大大减小为 55.5\AA (室温条件下). 在温度升高的过程中, 磷脂分子变得柔软, 磷脂膜界面的热起伏变大, 磷脂分子与 DNA 分子之间的相互作用变得更为容易, 引起磷脂分子向 DNA 分子周围塌陷, 表现为夹心双层膜结构的周期随着温度的升高略有降低. DNA 分子通常被看作刚性的棒状分子, 而在实验温度范围内, 能量的改变还不足以引起亲水层内 DNA 一维周期排列的变化, 因此其周期的大小保持在 45.7\AA .

作者感谢小角散射站吴忠华和陈兴在实验过程中给予的帮助, 感谢洪新国提供控温设备.

参考文献 (References)

- Chesony S, Huang L. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2000, **29**: 27
- Safinya Cyrus R, Curr. Opin. Struct. Biol., 2001, **11**: 440
- Rädler Joachim O, Koltover Ilya, Salditt Tim et al. Science, 1997, **275**: 810
- Koltover Ilya, Sahu Sanjukta, Davis Nicolynn. Angew. Chem. Int. Ed., 2004, **43**: 4034
- Salditt Tim, Koltover Ilya, Rädler Joachim O. Phys. Rev., 1998, **E58**: 889
- Natali F, Castellano C, Pozzi D et al. Biophys. J., 2005, **88**(2): 1081
- Caracciolo G, Caminiti R, Pozzi D et al. Chem. Phys. Lett., 2002, **351**: 222
- Weisman S, Hirsch-Lerner D, Barenholz Y et al. Biophys. J., 2004, **87**: 609
- Koltover I, Salditt T, Safinya C R. Biophys. J., 1999, **77**: 915

Small Angle X-Ray Scattering Study of the Influence of Temperature on the Structure of DNA/Lipid Complexes^{*}

HU Shu-Xin LI Da-Peng MAI Zhen-Hong LI Ming¹⁾

(Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract We report on the synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS) study of self-assembled complex formed by mixing short-chain DNAs with cationic phospholipids in water. The DNA/lipid complex is a sandwiched structure, consisting of alternate layers of DNAs and lipid bilayers with a periodicity of $d_{D/L}$. The DNAs at the interfaces are one-dimensionally ordered with a periodicity of d_{DNA} . When the temperature of the system is increased, the lipid bilayers become soft so that the DNAs are trapped more deeply inside the lipid bilayers. This explains why the measured $d_{D/L}$ decreases insignificantly with the increase of temperature. On the other hand, the value of d_{DNA} keeps constant because of the stiffness of the DNAs.

Key words small angle X-ray scattering, temperature, multilayers, DNA/lipid complexes

^{*}Supported by National Natural Science Foundation of China (10325419) and Beijing Synchrotron Radiation Laboratory

1) E-mail: mingli@aphy.iphy.ac.cn