

# 纳米磁性粒子在 DNA 分离与纯化中的应用进展

孙敏莉 张皓\*

(上海第二医科大学附属仁济医院血管外科, 上海 200001)

**摘要** 纳米磁性粒子是一种新型的亲和纯析固相载体, 其粒径小, 具有超顺磁性, 表面积大, 表面可赋予多种反应基团如链霉亲和素、抗体等, 或 DNA 片段, 在磁场作用下可分离目的 DNA, 已逐步应用于分子生物学领域中, 有着极为广泛的应用前景。

**关键词** 纳米磁性粒子, DNA 分离与纯化, DNA 三螺旋结构

中图分类号 Q78 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2001)06-0601-03

DNA 的分离与纯化在分子生物学实际工作中起着重要的角色。传统的 DNA 分离方法, 不仅需接触有毒试剂, 而且步骤繁杂, 费时、费力, 难以自动化操作。一种新型的高分子材料——纳米磁性粒子被用于分子生物学领域。纳米磁性粒子的研究始于 70 年代, 迄今广泛用于有机固相合成和生物分子固定化的载体。纳米磁性粒子粒径很小, 比表面积大, 偶联容量高, 其悬浮稳定性较好, 便于各种反应高效而方便地进行。又因其具有顺磁性, 在外磁场作用下, 固液相的分离十分简单, 可省去离心, 过滤等繁杂的操作, 并可在外磁场作用下定位。纳米磁性粒子可通过共聚, 表面改性, 赋予其表面多种反应性功能基, 可连接各种基团或 DNA 片段以达到分离的目的, 下面介绍其在 DNA 纯化与分离中的一些具体应用。

## 1 生物素与亲和素系统

在纳米磁性粒子表面共价结合链霉亲和素 (Streptavidin), 再合成连有生物素的核苷酸探针, 利用生物素与亲和素间特异高亲和力而达到快速、有效的生物磁性分离靶分子。

### 1.1 三螺旋结构亲和和捕捉法

1957 年, Felsenfeld 等人就发现, 当双链核酸的一条链都为嘌呤核苷酸, 另一条链都为嘧啶核苷酸时, 就会发生转化形成核酸三链结构。这个结构由一条嘌呤链和两条嘧啶链构成。80 年代后期, 研究者发现双螺旋 DNA 上的全嘌呤/全嘧啶序列可与第三条链形成序列专一性的稳定复合物。这些复合物并不是由于单链 DNA 简单置换双螺旋结构中的一条而形成的 D-loop 结构, 而表现出三螺旋 DNA 特征。

三螺旋 DNA 中三股链上的碱基都参与氢键的形成, 它的基本结构单元是碱基三联体 (Triad), 有多种配对形式。最

具有特征的结构是聚嘌呤-聚嘧啶的双螺旋链与一条聚嘧啶单链形成的三螺旋, 第三条聚嘧啶链位于双螺旋 DNA 链的大沟上, 通过 Hoogsteen 氢键, 与嘌呤链平行结合。第三条链上的胸腺嘧啶 (T) 识别双链上的腺嘌呤-胸腺嘧啶 (A·T), 形成 T·A·T 三联子, 3 位上的氮原子质子化的胞嘧啶 (C) 识别鸟嘌呤-胞嘧啶碱基对 (G·C), 形成 C<sup>+</sup>·G·C 三联子 (图 1)。这种结构在分子动力学和热力学上较为稳定, 与 pH 值、离子浓度、温度等有关, 尤其适合于目的 DNA 的分离。<sup>[1]</sup>

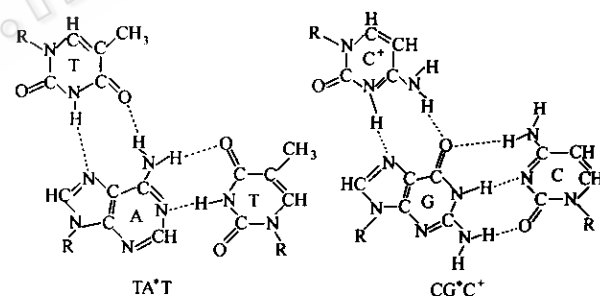


图 1 碱基三联体的组成

Fig. 1 Construction of triad

Schluep 等介绍应用三螺旋结构作为中介, 从细菌的溶解液中纯化质粒 DNA, 将连有链霉亲和素的纳米磁性粒子与合成的连有生物素的寡核苷酸探针反应, 再与制备好的细菌溶解液孵育, 使质粒 DNA 与寡核苷酸探针充分形成三螺旋结构, 在强磁场作用下进行洗涤, 弃上清液, 然后将质粒 DNA 从三螺旋结构上洗脱下来, 在磁场下将上清液移至清洁管中, 而纳米磁性粒子在外加磁场作用下吸附在管壁上, 与传统的有机分离和阳离子交换层析方法比较, 这种方法没有 RNA 的污染, 没有细菌染色体组 DNA, 没有残留的蛋白质<sup>[2]</sup>。

收稿日期: 2001-05-25, 修回日期: 2001-08-27。

基金项目: 上海市科委重点基金项目资助 (99JC14016)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-21-63260930-2118; Fax: 86-21-63730455; E-mail: smj21@263.net

单链 M13 DNA 是酶性双脱氧测序反应的理想模板,传统的方法是应用酚/乙醇有机抽提后再进行 PEG 沉淀,因而面临 RNA 的污染,需要 RNA 酶进行处理。Johnson 等利用三螺旋亲和捕捉方法纯化单链 M-13 DNA,他们在 M13-100 载体 *Bgl* III 限制性位点处克隆入一个 20 碱基的聚嘌呤序列,形成新的 M13-101 载体,再合成一条 50 碱基的寡核苷酸作为捕捉探针,其 5' 端连有生物素,并含有与 M13-101 载体中聚嘌呤序列互补的 20 碱基聚嘧啶结构,捕捉探针与包有链霉亲和素的纳米磁性粒子反应形成三螺旋微球,加入到 M13-101 溶解液中,进行孵育,在外加磁场作用下洗涤,最后将 M13-101 从纳米磁性粒子上洗脱下来,上清液移入清洁试管中,可作为测序反应的模板<sup>[3]</sup>。

## 1.2 合成标记生物素的 DNA 探针进行大肠杆菌维罗毒素的检测

产维罗毒素大肠杆菌(VTEC)是出血性肠炎的重要致病菌,可以引起血样腹泻、血尿、出血性结肠炎等症状。VTEC 的致病机理尚未完全清楚,但现有的研究表明与 VTEC 的产物——维罗毒素(VTs)有关。VTs 依据其抗原性可分为 VT1 和 VT2。Chen 等应用磁性捕捉杂交 PCR(MCH-PCR)检测产维罗毒素大肠杆菌。他们首先合成与维罗毒素 1(VT1),维罗毒素 2(VT2)基因特异的标记有生物素的 DNA 探针,用于捕捉 VTEC 目的 DNA。制备细菌的细胞裂解溶液,离心后将上清液移入离心管中,加入探针混合物进行杂交,在杂交混合物中加入连有链霉亲和素的纳米磁性粒子,孵育一段时间后,在磁场作用下进行收集和洗涤,最后产物进行 PCR 扩

增,扩增后的产物用 Southern 和 Slot 杂交检测,VT1 探针只与 VT1 产物杂交,VT2 探针只与 VT2 产物杂交,Slot 杂交中显示探针针对 VTEC 有高度特异性,在对照实验组未发现假阳性结果。传统的 PCR 方法受样品中的杂质影响较大,为了除去 PCR 的抑制物,采用了多种方法,如乙醚分离、柱层析,或是另外加入小牛血清、蛋白酶抑制剂和 Tween20,但没有一个方法是最理想的,而 MCH-PCR 依据磁性分离的特性可有效除去样品中的 PCR 的抑制,提高了检测的精确性<sup>[4]</sup>。

## 1.3 从人-鼠杂交细胞中提取并富集特异性 cDNA

了解人类基因疾病的分子机制,需要从目的染色体区域分离出基因。近年来,研究者试用了多种方法从选定的染色体区域鉴别编码序列,如外显子陷井捕捉法、利用 CPG 岛和杂交选择法。从人-鼠杂交细胞的单染色体中分离出非均一核 RNA(hnRNA),逆转录成非均一核 cDNA(hncDNA),构建 cDNA 文库,有研究者曾用这种方法从几个远端染色体区域中鉴别转录序列,这种方法的成功与否在于用一种有效的技术鉴定人特异性 hncDNA 序列。而 hncDNA 的大部分是啮齿类动物来源的。Oren 等介绍用纳米磁性粒子选择性富集人染色体特异的 hncDNA,这种方法较原来的鉴别人特异性 hncDNA 方法要迅速、有效。合成 hncDNA 聚 dT 引物后,将 hncDNA 与标记有生物素的 Alu 序列(PD39)杂交,PD39 有很高的人源性,杂交后的 hncDNA-PD39 复合物用偶联有链霉亲和素的纳米磁性粒子进行捕捉,在磁场下移去未结合的 DNA,再洗涤结合的复合物(图 2),结果用荧光原位杂交方法(FISH)进行检测,证明 PD39 与筛选过的 hncDNA 杂交信号很

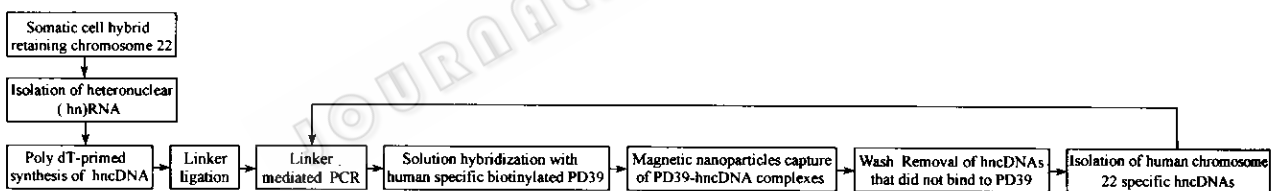


图 2 纳米磁性粒子富集人染色体 22 特异性序列

Fig. 2 Schematic of enrichment of human chromosome 22 specific sequence by magnetic nanoparticles

强,而未筛选的 hncDNA 杂交信号则很弱<sup>[5]</sup>。

## 1.4 测定端粒酶活性

端粒酶是由蛋白质和 RNA 组成的核糖核蛋白, RNA 序列决定所加的端粒序列的性质,而蛋白质起 DNA 聚合酶的作用,它是利用自己的 RNA 组分为 DNA 聚合的模板,端粒酶的作用可以保证真核细胞染色体线性 DNA 的复制得以完全。目前测定端粒酶活性的方法有两种:①传统的引物延伸法;②基于 PCR 方法的端粒重复扩增协议法(Telomeric Repeat Amplification Protocol, TRAP)。在传统的方法中,人端粒酶的低特异性限制了有意义的定量结果,此外,高分子量 DNA 和  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$  增加了背景噪声。而 TRAP 虽然提高了检测的灵敏度和速度,但经过了 PCR 扩增后,端粒酶的进行性和非进行性产物显得没有区别,使研究端粒酶的作用机制变得困难。TRAP 法的另一个问题是很难用这种方法去发现端粒酶的抑制物,因为任何能影响 Taq DNA 聚合酶的复合物都会影响最终结果。Sun 等设计的实验方法无需 PCR,他们合成 5'

端连有生物素的(TTAGGC)<sub>3</sub>,作为端粒酶反应的引物,可使反应固定在包有链霉亲和素的纳米磁性粒子上,反应产物在磁场作用下进行分离,洗涤复合物,除去  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$  的背景和非特异性的高分子 DNA,复合物重悬后,最后洗脱,上清液移入清洁试管中,用乙醇沉淀,端粒酶反应产物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳,再转移至滤膜上干燥,用放射自显影技术进行分析,此种方法,降低了背景噪声,可以提高端粒酶测定的敏感性、评估端粒酶的抑制因子、了解端粒酶反应的生化方面的机制<sup>[6]</sup>。

## 2 非特异性分离 DNA

K. Rudi 等应用纳米磁性粒子从各种组织中分离用于 PCR 的 DNA,他们先用去垢剂溶解细胞,释放出 DNA,将释放出的 DNA 吸附在单分散状态的纳米磁性粒子上,吸附后的 DNA 通过几步洗涤后得到纯化,因为 DNA 没有渗入纳米磁性粒子内,而纳米磁性粒子又不会影响 PCR 扩增,纳米磁性

粒子/DNA 复合物便可直接用于 PCR<sup>[7]</sup>。Deggerdal 运用同样的方法,用纳米磁性粒子从血液、骨髓和培养细胞中分离 DNA,用于 PCR。现今广泛应用的溴化十六烷基三甲胺 (CTAB)法分离 DNA,不适宜于肝素化血液。而纳米磁性粒子无此禁忌<sup>[8]</sup>。

### 3 其他分离方法

#### 3.1 琼脂糖微球分离质粒 DNA

Levison 报道用一种新型的纳米磁性粒子-Magarose,即包有超顺磁性成分的琼脂糖微球,从细菌的细胞溶解液中分离出质粒 DNA。他们先制备细胞溶解液,用预冷的乙酸钾进行沉淀,冰浴后离心,将上清液移至不含 DNase 和 RNase 的微离心管中,加入 DEAE-Magarose,在磁场中进行分离,移去上清液,洗涤后弃上清液,再解附,磁场作用下将其移至清洁试管。Magarose 微球对磁场反应迅速, $A_{260}/A_{280}$  显示高纯度<sup>[9]</sup>。

#### 3.2 免疫亲和系统

在纳米磁性粒子上包裹有抗鼠 IgG,用单克隆抗 DNA 结合在顺纳米磁性粒子上进行分离 DNA,载有 DNA/抗 DNA 复合物的纳米磁性粒子可无需洗脱便可直接用于 DNA 扩增,排除了样本中的任何 PCR 抑制物对扩增的影响,提高了 PCR 反应的精确性<sup>[10]</sup>。

### 4 展 望

纳米磁性粒子作为一种新型的高分子功能材料有着极具潜力的应用前景,目前国内的应用局限于药物的靶向治疗和细胞分选,而在分子生物学领域的应用报道很少,而国外虽已有商品化的纳米磁性粒子,但价格昂贵,开发中国自己的纳米磁性粒子成为一项迫切的任务。现在国内对此项的研究与开发正方兴未艾,我们相信在不久的将来我们会有自己的高品质的纳米磁性粒子应用于生物医学的各个领域。

### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] ZHANG Y J(张玉静). Molecular Genetics(分子遗传学):The structure of Triplex DNA. 1<sup>st</sup>, Shang Hai:Science Publishing House Press,2000,pp.64 ~ 67
- [ 2 ] Thomas Schlupe, Charles L Cooney. Purification of Plasmids by Triplex Affinity Interaction. *Nucleic Acids Research*, 1998,26(19):4524 ~ 4530
- [ 3 ] Arthur F, Johnson, Renfeng Wang, Huamin Ji *et al*. Purification of Single-Stranded M13 DNA by Cooperative Triplex-Helix-Mediated Affinity Capture. *Analytical Biochemistry*, 1996,234:83 ~ 85
- [ 4 ] Jinru Chen, Roger Johnson, Mansel Griffiths. Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* by Magnetic Capture-Hybridization PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998 Jan:147 ~ 152
- [ 5 ] Kirk Overmyer, Hans-Werner Müller, Winfried Cimbel *et al*. Enrichment of Chromosome Specific hndDNAs by Magnetic Bead Coupled *Alu* Sequences. *Molecular Biology Reports*,1996,22:53 ~ 57
- [ 6 ] Daekyu Sun, Laurence H. Hurley, Daniel D Von Hoff. Telomerase Assay Using Biotinylated-Primer Extension and Magnetic Separation of the Products. *Biotechniques*, 1998,25:1046 ~ 1051
- [ 7 ] Rudi K, Kroken M, Dahlberg O J, *et al*. Rapid, Universal Method to Isolate PCR-Ready DNA Using Magnetic Beads. *Bio Technique*, 1997,22:506 ~ 511
- [ 8 ] Arne Deggerdal, Frank Larsen. Rapid Isolation of PCR-Ready DNA from Blood, Bone Marrow and Cultured Cells, Based on Paramagnetic Beads. *Bio Techniques*, 1997,22:554 ~ 557
- [ 9 ] Peter R Levison Stephen E Badger, Jon Dennis *et al*. Recent Developments of Magnetic Beads for Use in Nucleic Acid Purification. *Journal of Chromatography A*, 1998,816:107 ~ 111
- [ 10 ] Adrian R Gelsthorpe, Keith Gelsthorpe, Robert J Sokol. Extration of DNA Using Monoclonal Anti-DNA and Magnetic Beads. *Biotechniques*, 1997,22:1081 ~ 1082

## The Development of Nanoparticles on DNA Isolation and Purification

SUN Min-Li ZHANG Hao\*

(Department of Vascular Surgery of Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China)

**Abstract** Magnetic nanoparticle is a new solid-support of affinity chromatography. The particle size is small and it has superparamagnetism. It has large surface area and it can be endowed many reaction groups such as streptavidin, antibody or DNA fragments. The target DNA can be separated in magnetic field. The magnetic nanoparticle is applied in the biomolecular field gradually and it has a very broad prospect of appliance.

**Key words** magnetic nanoparticle, DNA isolation and purification, DNA triplex structure

Received: May 25, 2001

This work was supported by the Major Fundamental Project of Shanghai Committee of Science.

\* Corresponding author. Tel:86-21-63260930-2118; Fax:86-21-63730455; E-mail:sml21@263.net