

阴离子交换色谱在 DNA 纳米结构纯化中的应用

邢淑, 江大卫, 崔呈俊, 王丽华*, 黄庆

中国科学院界面物理与技术重点实验室, 上海同步辐射光源, 中国科学院上海应用物理研究所物理生物学实验室与生物成像中心, 上海 201800

*通讯作者, E-mail: wanglihua@sinap.ac.cn

收稿日期: 2015-03-22; 接受日期: 2015-05-09; 网络版发表日期: 2015-07-03

doi: 10.1360/N032015-00042

摘要 随着 DNA 纳米技术的发展, 研究快速、简便、有效的纯化方法, 提高 DNA 纳米结构的产率、纯度和规模等成为人们关注的热点. 本文使用阴离子交换色谱 (AEC) 技术纯化了 5 种不同棱长 (13、17、20、26 和 30 bp) 的 DNA 四面体及一种棱长 (20 bp) 的 DNA 三角双锥结构, 将这些 DNA 纳米结构从初始合成纯度 30%~65% 提高到 95% 以上. 利用纯化后的带有互补手臂链的两个四面体杂交构建哑铃状 DNA 纳米结构, 其产率从 11% 提高到 90%. AEC 纯化解了 DNA 纳米结构应用中存在的纯度、产率等瓶颈问题, 为其在生物学和医学领域中的应用奠定了基础.

关键词阴离子交换色谱
分离纯化
DNA 纳米结构
哑铃状结构

1 引言

DNA 纳米结构由于精确可控的几何外形而在众多领域有着潜在应用^[1]. 与无机纳米材料相比, DNA 纳米结构的合成遵循 Watson-Crick 碱基互补配对原则, “自下而上”制备, 具有很多独特的性质: 尺寸和形状精确可控、化学反应活性、空间可寻址性等. 迄今为止, 研究者们已经成功制备了大小形状可调节、机械性能各异、表面修饰多样的二维和三维 DNA 纳米结构^[2-5], 并实现了 DNA 纳米结构与其他材料的共组装^[6-11]. DNA 四面体^[12]是最常见的一种 DNA 纳米结构, 结构简单 (4~6 条 ssDNA 组成)、易大量制备、尺寸大小可通过棱长调节, 而且具有多个可修饰位点, 在生物传感器领域中得到应用并表现出了很好的效果^[13]. 此外, DNA 四面体还可以用作载体把蛋白质^[6,7]或其他分子运送到细胞或者活体内部^[14,15]. 近年来, DNA 四面体穿过细胞膜的方式及其在胞内运输的途径等研究也有了突破性的进展^[16]. 然而, 由于 DNA 错误折叠等现象存在, 获得高纯度、高产率的 DNA 纳米结构依然是一个挑战, 成为 DNA 纳米技

术应用的瓶颈问题. 因此, 发展简单、高效的纯化方法也成为人们关注的热点.

目前, DNA 纳米结构纯化最常用的方法是凝胶电泳, 包括聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和琼脂糖凝胶电泳. 尽管电泳方法分辨率很高, 但是存在一些问题, 如回收率偏低、规模小、费时繁琐且存在 DNA 嵌入染料或者凝胶残余等的污染. 最近 Shih 课题组^[17]首次报道了使用甘油速率区带离心法纯化一系列较大的三维 DNA 折纸纳米结构的方法. 这种方法主要是利用单体与其各种副产物如聚集体以及原料如订书钉链 (staple 链) 的沉降系数的不同而进行分离, 其分辨率较低, 对于沉降性质差别较小的结构分离能力较差, 且对于较小的 DNA 纳米结构也无能为力. 因此建立一个高分辨率、快速简便、可大规模纯化的方法对于 DNA 纳米结构的应用非常重要. 本文提出将传统的高效液相色谱 (HPLC) 用于 DNA 纳米结构的分离纯化的方法.

HPLC 是一种经典的分离技术, 分辨率高、可以高通量回收、可自动化, 广泛应用于分析化学领域和生化领域. 最近 HPLC 在纳米材料领域也有较多应用,

已用来纯化量子点^[18]和金纳米粒子^[19]等. 阴离子交换色谱(AEC)非常适合于 DNA 的分离纯化, 可用来分离各种 DNA 结构, 包括短的单链 DNA 和双链 DNA, 长的 PCR 产物和质粒 DNA 等. 它的分离原理是在阴离子交换树脂(固定相)上含有两种基团: 固定不动的阳离子基团和可交换的阴离子基团, 待测阴离子可与阳离子基团结合, 但这种结合是可逆的, 可被流动相中的阴离子交换, 当流动相阴离子浓度增加到足够强度时, 待测阴离子便会被完全交换下来, 从而达到分离纯化的目的. DNA 是一类多阴离子的聚合物, DNA 结构越大, 阴离子越多, 与固定相亲和性越高, 这种结构差异导致的性质差异可以被 HPLC 有效区分.

本文拟用 AEC 方法分离 5 种 DNA 四面体, 棱长分别为 13 (实验室自主设计)、17^[12]、20^[20]、26^[10]和 30 bp^[15], 依次命名为 TH13、TH17、TH20、TH26 和 TH30; 此外, 还制备了 20 bp 棱长的三角双锥^[21], 命名为 TB20, 考察 AEC 对 DNA 纳米结构的分离效果.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

三羟甲基氨基甲烷(Tris base)购自 Aladdin[®] (中国), 纯度>99.9%; NaClO₄·H₂O 购自 Sigma-Aldrich 公司(美国), 纯化等级为 HPLC 级, 纯度>99.0%; GelRed DNA 染料购自 Biotium 公司(美国); 其他试剂均从国药集团化学试剂公司(中国)购买. 整个实验所用的水为 Milli Q 水, 18 MΩ cm. MWCO 30 kDa 滤管购自 Millipore 公司(美国); 阴离子交换色谱柱购自 Thermo Scientific 公司(美国), 型号为 DNAPac[™] PA-100 BioLCTM Analytical 4×250 mm; DNA 寡核苷酸购自 Invitrogen 公司(美国), PAGE 纯化, DNA 序列见表 S1 (网络版补充材料).

紫外-可见分光光度计(Hitachi U-3010, 日本); PCR 仪(applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycler, 美国); HPLC 系统: Waters 1525 泵(美国)、Waters 2998 光电二极管阵列检测器(美国); 核酸蛋白质微量定量仪(IMPLEN NanoPhotometer P330, 德国); 化学发光成像系统(Syngene G:Box Chemi-XL, 英国).

2.2 实验方法

2.2.1 DNA 四面体及三角双锥的自组装

DNA 四面体通过一步退火来合成, 将各组分单链(4~6 条), 在 TM 缓冲液(0.01 mol/L Tris-HCl, 0.005 mol/L MgCl₂, pH 8.0)中等摩尔混匀, 通常 DNA 四面体各链终浓度为 1×10^{-6} mol/L, 而 DNA 三角双锥为 1.7×10^{-7} mol/L, 然后在 PCR 仪预设程序中退火, 预设程序一般为 95℃加热 10 min, 迅速冷却至 4℃, 在 4℃停留 20 min 后取出样品, 即完成组装.

2.2.2 阴离子交换色谱(AEC)纯化 DNA 四面体及三角双锥

HPLC 所用流动相 A 为 0.025 mol/L Tris-HCl, 0.375 mol/L NaClO₄, pH 8.0; 流动相 B 为 0.025 mol/L Tris-HCl, pH 8.0. 各个结构所用的洗脱方法见表 S2, DNA 四面体中 TH20 采用 AEC-1 程序, 其他采用 AEC-2 程序进行分离, DNA 三角双锥使用 AEC-3 程序进行分离, 260 nm 波长检测并对产物进行收集.

2.2.3 纯化前后 DNA 四面体及三角双锥的表征

收集到的产物浓度较低, 且流动相中含有高盐, 为了方便下游应用, 我们使用 MWCO 30 kDa 的超滤管进行超滤, 对其进行浓缩并将 DNA 四面体置换到 TM 缓冲液中. 为了尽可能减小超滤对样品的损伤, 超滤中使用的离心力不要超过 2000 g. AEC 纯化前后的 DNA 四面体使用 8% PAGE 进行表征, 电泳在冰浴条件下进行, 电压 80 V, 电泳时间 2~3 h, 电泳结束后使用 GelRed 染色 15~30 min, 用化学发光成像系统对其成像.

2.2.4 哑铃状 DNA 纳米结构的制备与表征

设计两个互补的 TH20: A₂₀-TH20 和 T₂₀-TH20, 分别经 AEC 纯化, 方法用 AEC-2 程序. 定量后以 1:1 等摩尔混匀, 37℃孵育 2 h 杂交, 对比实验中使用未纯化的 A₂₀-TH20 与 T₂₀-TH20 以相同条件杂交. 杂交后的结构使用含 1×GelRed DNA 染料的 1%琼脂糖凝胶电泳进行表征, 电泳条件为冰浴, 80 V, 3 h, 电泳完毕后进行成像.

3 结果与讨论

3.1 AEC 纯化方法的建立及产物的表征-TH20

以 TH20 为例, 确定 AEC 分离纯化的条件, 并

对得到的多个产物进行成分鉴定. 一步退火合成的 TH20, 电泳表征如图 1(B)中泳道 1 所示, 多条条带的存在证明其中除了有目标产物外, 还有多个副产物存在. 使用 Image J 软件计算电泳条带灰度值可以得出 TH20 的产率在 42% (条带 1 最前端). 另外还有超过一半的错误折叠结构, 大部分错误折叠的结构由于分子量太大而被堵在凝胶的上样孔, 无法被电泳出来, 这里我们命名为高聚物; 也有少部分结构能从上样孔泳出但距离较短, 分子量仍然比 TH20 大, 命名为低聚物.

本实验中我们选用的阴离子交换色谱柱, 其填充物是溶剂兼容性良好的直径 13 μm 无孔基底, 在其表面覆盖有一薄层季铵(阳离子)修饰的直径 100 nm 的树脂, 使其含有丰富的阴离子交换位点. AEC 纯化 DNA 四面体主要是依据混合物中不同组分跟带正电的固定相之间发生离子交换的能力差异来实现分离. DNA 分子量越大, 所携带的阴离子越多, DNA 四面体的合成产物中所携带的阴离子数目依次为 TH20 < 低聚物 < 高聚物, 则它们与带正电的固定相之间的结合强弱依次为 TH20 < 低聚物 < 高聚物. 首先在色谱柱中通以低离子强度流动相以促使样品组分结合到固定相上, 慢慢增加流动相的离子强度, 混合物组分中与固定相结合较弱的单体组分会先被流动相中的阴离子交换下来, 而结合较强的错配结构需要更高的盐浓度才可被置换下来, 所以在 AEC 分离 DNA 四面体的过程中依次被洗脱出来的是 TH20、低聚物、高聚物. 图 1(A)为使用 AEC-1 梯度方法纯化 TH20 的

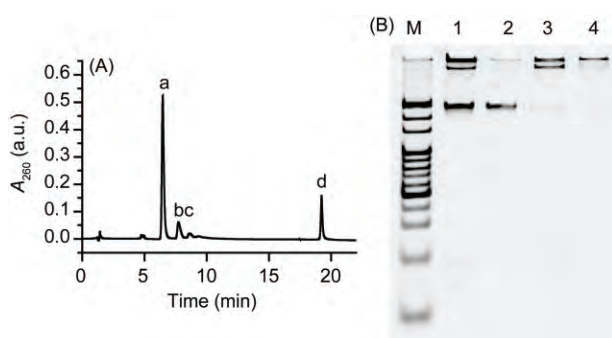


图 1 AEC 分离 TH20 的色谱图及各组分的 PAGE 表征. (A) AEC-1 方法分离 TH20 的色谱图; (B) PAGE 分析鉴定各色谱峰, 其中, M: 20 bp DNA Ladder; 条带 1: 未纯化的 TH20; 条带 2: TH20 单体, 对应于(A)中的色谱峰 a; 条带 3: 低聚物及部分高聚物, 对应于(A)中的色谱峰 b 和 c; 条带 4: 高聚物, 对应于(A)中的色谱峰 d

色谱图, 当 NaClO_4 的浓度从 0.1125 mol/L 增加到 0.1875 mol/L 时, 会依次洗脱出 a、b、c 三个主要的色谱峰, 然后继续增加盐浓度至 0.2625 mol/L, 在这种情况下结合到柱填料上的样品组分迅速被洗脱下来, 为峰 d. 将这些峰组分收集后进行电泳表征, 从图 1(B)可以看出, 峰 a 为正确组装的 TH20, 峰 b 和 c 的混合物包含低聚物, 而峰 d 对应高聚物.

3.2 利用 AEC 纯化其他 DNA 纳米结构

其他 DNA 纳米结构如 TH13、TH17、TH26、TH30 和 TB20, 其 PAGE 结果表明, 尽管它们的产率各不相同, 但仍存在较大的聚集结构(图 2(B), 条带 1 为纯化之前的产物). 采用 AEC-2 程序对以上多个 DNA 四面体进行分离, 色谱图如图 2(A)所示. DNA 三角双锥由于结构较大, 带有的阴离子偏多, 在纯化时需要在更高的离子强度下才能出峰, 采用 AEC-3 程序进行分离. 使用 PAGE 表征将各个 DNA 纳米结构纯化前后的效果进行对比, 如图 2(B)中条带 2 所示, AEC 纯化后的各结构的纯度大大提高, 大部分副产物被有效去除. 目标产物的产率从纯化前的 30%~65%到纯化后的 90%~98%, 证明 AEC 在 DNA 四面体等纳米结构的纯化方面具有非常高的效率和普适性.

3.3 哑铃状 DNA 纳米结构的制备与表征

我们利用 AEC 纯化后的 DNA 四面体构建了哑铃状的 DNA 纳米结构, 并对其产率和纯度进行了考

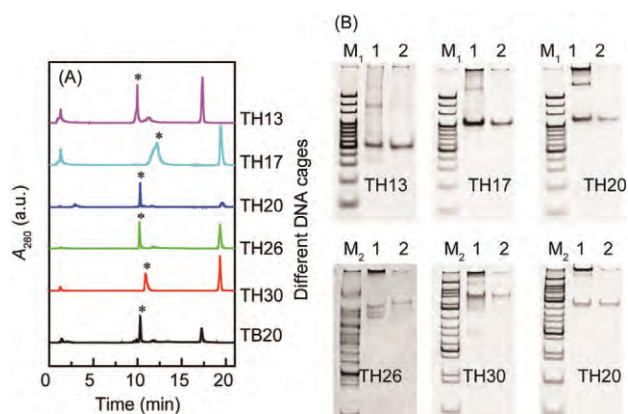


图 2 AEC 分离多种 DNA 纳米结构. (A) AEC-2 程序分离多种 DNA 四面体以及 AEC-3 程序分离 TB20 的色谱图; (B) AEC 纯化前后各结构的 PAGE 图, 其中, M₁: 20 bp DNA Ladder; M₂: 50 bp DNA Ladder; 条带 1: 未纯化的 DNA 纳米结构; 条带 2: AEC 纯化后的结构

察. 首先设计合成了两种带手臂链的 TH20 四面体: 一种在四面体的顶点伸出 20 个 A, 命名为 A₂₀-TH20; 另一种是伸出 20 个 T, 以 T₂₀-TH20 命名. 各自退火后形成四面体, 如图 3(b)条带 1 和 2 所示. 由于分别引入手臂链 A₂₀ 和 T₂₀, 使得 DNA 四面体的产率进一步降低, 条带 1 和 2 中有大量的弥散性杂带出现. 直接用 A₂₀-TH20 和 T₂₀-TH20 来制备哑铃状结构, 得到的产物也有着非常弥散的条带, 产率在 11%左右. 分

别将 A₂₀-TH20 和 T₂₀-TH20 两种四面体用 AEC 进行分离纯化, 色谱图如图 3(a)所示. 我们将纯化后收集到的 A₂₀-TH20、T₂₀-TH20 两种四面体进行杂交来构建哑铃状 DNA 纳米结构. 图 3(b)中的琼脂糖凝胶电泳结果显示, 经过纯化后的四面体的纯度很高, 在 95%左右, 其杂交后的产物纯度也有大幅提升, 大于 90%. 该数据证实了在 DNA 纳米结构的制备问题上, 前期对四面体的纯化非常重要, 较纯的 DNA 四面体可以大大提高后期自组装结构的产率.

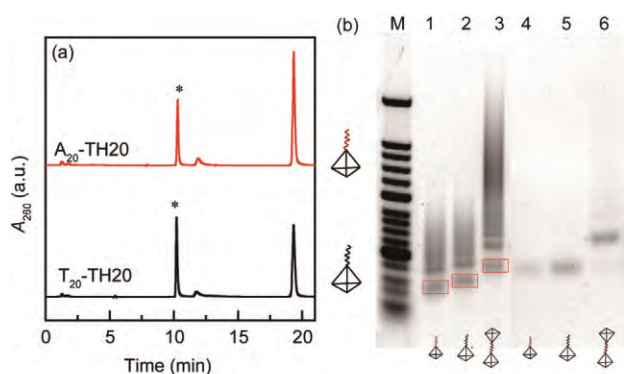


图 3 哑铃状 DNA 纳米结构的制备. (a) A₂₀-TH20 和 T₂₀-TH20 两种互补四面体的色谱图; (b) 琼脂糖凝胶电泳分析纯化前后的两种四面体的杂交效果, 其中, M: 50 bp DNA Ladder; 条带 1: 未纯化 A₂₀-TH20; 条带 2: 未纯化的 T₂₀-TH20; 条带 3: 使用未纯化的 A₂₀-TH20 和 T₂₀-TH20 构建的四面体哑铃状结构; 条带 4: AEC 纯化 A₂₀-TH20; 条带 5: AEC 纯化的 T₂₀-TH20; 条带 6: 使用 AEC 纯化后的 A₂₀-TH20 和 T₂₀-TH20 构建的四面体哑铃状结构

4 结论

我们将 AEC 方法用于 DNA 四面体及三角双锥的纯化, 将这些 DNA 纳米结构从初始合成纯度 30%~65% 提高到 95% 左右, 并且我们证明经过 AEC 纯化后的 DNA 四面体更有利于制备产率更高的 DNA 四面体哑铃状结构. 与电泳凝胶回收相比, 该方法对结构无破坏、操作简单、回收率高、短时间内即可纯化出大量样品. 该方法可以广泛用于 DNA 纳米结构的分离纯化, 分离过程中所使用的色谱柱、流动相等条件可以根据待分离材料的尺寸、维度等来选择. 由于离子交换所用的网孔状介质具有分子筛和离子交换双重功效, 对于尺寸较大的 DNA 三维折纸, 可以根据需要选择合适粒径的填料即可. 该方法解决了大规模、高纯度 DNA 四面体的制备难题, 对于 DNA 纳米结构未来作为载体或者免疫佐剂等生物学和医学领域广泛应用有着重要意义.

补充材料

本文的补充材料见网络版 chem.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(31371015, 21329501)和国家重点基础研究发展计划(2012CB932603)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Pinheiro AV, Han DR, Shih WM, Yan H. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6: 763–772
- 2 Lin CX, Liu Y, Rinker S, Yan H. DNA tile based self-assembly: building complex nanoarchitectures. *ChemPhysChem*, 2006, 7: 1641–1647
- 3 Sacca B, Niemeyer CM. DNA origami: the art of folding DNA. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 58–66

- 4 Wei B, Dai MJ, Yin P. Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles. *Nature*, 2012, 485: 623–626
- 5 Ke YG, Ong LL, Shih WM, Yin P. Three-dimensional structures self-assembled from DNA bricks. *Science*, 2012, 338: 1177–1183
- 6 Erben CM, Goodman RP, Turberfield AJ. Single-molecule protein encapsulation in a rigid DNA cage. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 118: 7574–7577
- 7 Crawford R, Erben CM, Periz J, Hall LM, Brown T, Turberfield AJ, Kapanidis AN. Non-covalent single transcription factor encapsulation inside a DNA cage. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 125: 2340–2344
- 8 Flory JD, Shinde S, Lin S, Liu Y, Yan H, Ghirlanda G, Fromme P. PNA-peptide assembly in a 3D DNA nanocage at room temperature. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 6985–6993
- 9 Stephanopoulos N, Liu MH, Tong GJ, Li Z, Liu Y, Yan H. Immobilization and one-dimensional arrangement of virus capsids with nanoscale precision using DNA origami. *Nano Lett*, 2010, 10: 2714–2720
- 10 Mastroianni AJ, Claridge SA, Alivisatos AP. Pyramidal and chiral groupings of gold nanocrystals assembled using DNA scaffolds. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 8455–8459
- 11 Pal S, Deng ZT, Ding BQ, Yan H, Liu Y. DNA-origami-directed self-assembly of discrete silver-nanoparticle architectures. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 2700–2704
- 12 Goodman RP, Berry RM, Turberfield AJ. The single-step synthesis of a DNA tetrahedron. *Chem Commun*, 2004, 12: 1372–1373
- 13 Pei H, Lu N, Wen, YL, Song SP, Liu Y, Yan H, Fan CH. A DNA nanostructure-based biomolecular probe carrier platform for electrochemical biosensing. *Adv Mater*, 2010, 22: 4754–4758
- 14 Li J, Pei H, Zhu B, Liang L, Wei M, He Y, Chen N, Li D, Huang Q, Fan CH. Self-assembled multivalent DNA nanostructures for noninvasive intracellular delivery of immunostimulatory CpG oligonucleotides. *ACS Nano*, 2011, 5: 8783–8789
- 15 Lee H, Lytton-Jean AKR, Chen Y, Love KT, Park AI, Karagiannis ED, Sehgal A, Querbes W, Zurenko CS, Jayaraman M, Peng CG, Charisse K, Borodovsky A, Manoharan M, Donahoe JS, Truelove J, Nahrendorf M, Langer R, Anderson DG. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted *in vivo* siRNA delivery. *Nature Nanotechnol*, 2012, 7: 389–393
- 16 Liang L, Li J, Li Q, Huang Q, Shi JY, Yan H, Fan CH. Single-particle tracking and modulation of cell entry pathways of a tetrahedral DNA nanostructure in live cell. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 7745–7750
- 17 Lin CX, Perrault SD, Kwak M, Graf F, Shih WM. Purification of DNA-origami nanostructures by rate-zonal centrifugation. *Nucl Acid Res*, 2013, 41: 122–136
- 18 Wang SP, Mamedova N, Kotov NA, Chen W, Studer J. Antigen/antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates. *Nano Lett*, 2002, 2: 817–822
- 19 Claridge SA, Liang HW, Basu SR, Fréchet JMJ, Alivisatos AP. Isolation of discrete nanoparticle-DNA conjugates for plasmonic applications. *Nano Lett*, 2008, 8: 1202–1206
- 20 Goodman RP, Schaap AT, Tardin CF, Erben CM, Berry RM, Schmidt CF, Turberfield AJ. Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication. *Science*, 2005, 310: 1661–1665
- 21 Erben CM, Goodman RP, Turberfield AJ. A self-assembled DNA bipyramid. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 6992–6993

Purification of DNA nanostructures by anion exchange chromatography

Shu Xing, Dawei Jiang, Chengjun Cui, Lihua Wang*, Qing Huang

CAS Key Laboratory of Interfacial Physics and Technology, Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Division of Physical Biology & Bioimaging Center, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

*Corresponding author (email: wanglihua@sinap.ac.cn)

Abstract: A purification step after synthesis has become a standard procedure for many DNA nanostructures studies. We firstly applied anion exchange chromatography (AEC) to DNA nanocages purification. A 20 bp-edge DNA bipyramid and five DNA tetrahedra with different edge lengths including 13, 17, 20, 26 and 30 bp were purified effectively by AEC, which improved the purity of these nanostructures from 30%–65% up to 95%. And the yield of a dumbbell-like nanostructure which was constructed using AEC-purified DNA tetrahedra was more than 90%, but 11% for the unpurified group. Given the versatility of this method, AEC is promising for other DNA nanocages and other DNA nanostructures purification.

Keywords: anion exchange chromatography, separation and purification, DNA nanostructure, dumbbell-like DNA structure