DNA 与非离子表面活性剂复配体系水溶液聚集行为

王丽焕, 张琪, 郝京诚*

山东大学胶体与界面化学教育部重点实验室, 济南 250100

* 联系人, E-mail: jhao@sdu.edu.cn

2016-09-01 收稿, 2016-10-03 修回, 2016-10-10 接受, 2016-11-15 网络版发表

国家自然科学基金(21420102006, 21273134)和山东省博士后创新项目(201402022)资助

摘要 自组装构建DNA的纳米复合物以提高其基因治疗效果, 是目前化学、生物和医药学交叉领域的一个研究热点. 本文研究了非离子表面活性剂十二烷基聚四氧乙烯醚($C_{12}EO_4$)与DNA之间弱相互作用构筑的复配体系溶液聚集体, 探讨了复配溶液聚集体的组装结构、相结构转变与性能. 通过温度改变控制DNA与 $C_{12}EO_4$ 相互作用过程, 确定了复配体系溶液聚集体结构的可控转变, 建立了一种可控的组装方法. 研究结果对DNA与表面活性剂复配溶液聚集体的性质与结构的组装规律具有重要意义.

关键词 DNA, 非离子表面活性剂, 弱相互作用, 层状相, Cryo-TEM

表面活性剂在水溶液中可以自发聚集形成热力学稳定的胶束结构^[1,2]. 十二烷基聚四氧乙烯醚($C_{12}EO_4$)是一种典型的非离子表面活性剂, 在水溶液中可以通过氢键、静电和疏水作用等驱动力, 自聚集成胶束、碟状结构、囊泡、层状结构、液晶(六角状和立方状等)和反向胶束等自聚集结构^[3], 而且, $C_{12}EO_4$ 水溶液体系的聚集行为具有敏感的环境响应性, 如温度、磁场和添加剂等的响应性.

具有生物活性的聚电解质和表面活性剂之间的相互作用研究是表面活性剂物理化学的模型体系, 在物理化学学科中具有重要意义, 且在生物医药领域中也引起了极大的关注. 随着分子生物学和分子遗传学的发展, 基因疗法从分子水平上治愈疾病正在逐步成为现实. 基因治疗的关键问题是将体外重组的DNA片段通过载体运送到细胞内^[4]. DNA是具有双螺旋结构并且在水溶液中高度荷负电荷的生物聚电解质, 是生物体细胞核内的重要大分子, 承载着遗传信息的作用. 但裸露的DNA分子在溶液中由于以舒展的螺旋状结构存在, 尺寸大, 且带高荷负电, 不

容易穿过带负电的细胞膜进入到细胞内. 将DNA与带相反电荷的表面活性剂复合, 可以诱导DNA发生松散螺旋状到密堆积微小球状的复配组装体转变, 并伴随着电荷的减弱, 有利于细胞膜的吸收; 同时二者通过弱相互作用可以自发形成高级组装体作为基因载体, 向细胞运送DNA, 在运送的过程中可以避免DNA的解离^[5]. DNA体内的释放可以通过加入阴离子化合物, 导致压缩聚集体响应性改变来完成. 因此, 表面活性剂与DNA相互作用形成的复配物作为基因传输的非病毒基因载体, 成为药物投递研究的新增长点.

阳离子表面活性剂与DNA相互作用的研究最为广泛和深入, 如季铵盐阳离子、Gemini型阳离子表面活性剂与DNA之间表现出强烈的静电相互作用可导致聚沉^[6~8]. 二者的键合作用发生在临界胶束浓度(CMC)以下, 加入低于CMC量的阳离子表面活性剂, 即使可以使DNA的构象发生显著变化, 且随着阳离子表面活性剂疏水链长的增加, 所需阳离子表面活性剂的量会越少. 荧光显微镜^[9]和动态光散射^[10]实验

引用格式: 王丽焕, 张琪, 郝京诚. DNA 与非离子表面活性剂复配体系水溶液聚集行为. 科学通报, 2017, 62: 606–615

Wang L H, Zhang Q, Hao J C. The aggregation behavior of DNA/nonionic surfactant mixtures in water (in Chinese). Chin Sci Bull, 2017, 62: 606–615, doi: 10.1360/N972016-00840

表明,阳离子表面活性剂与DNA相互作用具有不连续性,导致DNA分子构象的变化不连续,避免了聚合物链段之间的相互影响.当二者的复合物呈现正电性时,转运过程效率最高,最容易穿过细胞膜.然而,研究发现合成的阳离子表面活性剂由于其细胞毒性限制了其进一步的临床应用.因此,天然阳离子磷脂与DNA的自组装复合物作为有效的基因载体,得到了极大的关注^[11].这种自组装载体通常表现为层状结构和六方相结构,DNA通过静电作用被包嵌在水核中^[12,13],但是它的主要缺点是价格高,且基因转染效率低.

基于以上原因,研究者转向环境友好、低毒性的非离子表面活性剂.非离子表面活性剂与DNA之间存在弱的氢键作用力^[14,15],使二者通过弱相互作用形成复合组装结构.本文以非离子表面活性剂C₁₂EO₄与DNA水溶液为模型体系,研究了体系的相行为,发现该体系具有丰富的相行为,可形成胶束、囊泡和层状液晶等多种复配聚集体,通过改变温度对复配聚集体结构进行调控,以其获得可控传输DNA的新途径.

1 实验

(i) 试剂. C₁₂EO₄($M_w=362.4$,纯度>99%,图S1(a))购自Acros Organics公司.鲑鱼睾丸双链脱氧核糖核酸(DNA,纯度 $\geq 99\%$,图S1(b))购自Acros Organics公司,分子量为100~250 bp,通过琼脂糖凝胶电泳确定.基于DNA碱基的摩尔消光系数在260 nm时为 $6600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$,浓度通过紫外可见吸收光谱确定;DNA储备液在260和280 nm处吸收峰的比例为~1.8,表明DNA中无蛋白质等污染物干扰.重水(D₂O, $\geq 99.9\%$)购自Aldrich公司;氯化钙(CaCl₂, $M_w=110.98$,纯度>99%)和碳酸钠(Na₂CO₃, $M_w=105.99$,纯度>99%)购自百灵威化学试剂公司.所有试剂均未经过进一步提纯,实验所用三次水由优普UPHW-III-90T-type超纯水仪装置制得,三次水的电阻率为 $18.25 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

(ii) 相行为研究. 配制200个不同浓度的溶液样品,结合偏光显微镜照片观察和流变测定结果,对体系的相行为进行确定.将C₁₂EO₄与DNA以不同的浓度和比例在水溶液中混合,振荡混合均匀,置于(25.0 $\pm$ 0.1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下平衡4周以上,期间不断振荡样品,并观察外观相平衡状态.

(iii) 表面张力测定. 表面张力采用德国KRÜSS公司K100型程序表面张力仪测定,实验温度为(25.0 $\pm$ 0.1) $^{\circ}\text{C}$.测试中采用动态的Wilhelmy Pt吊片法,不同比例下的溶液至少测量3次取平均值,误差为 $\pm 0.01 \text{ mN m}^{-1}$.通过测定超纯水的表面张力对表面张力仪进行校正及检测样品池的清洁.

(iv) 偏光显微镜观察. 偏光显微镜观察由德国ZEISS公司的AXIOSKOP 40/40 FL显微镜完成,将几滴溶液滴入一个1 mm厚度的带有水槽的玻璃片上,用载玻片盖住以免溶液挥发.

(v) 小角X射线散射(SAXS)测试. SAXS实验利用北京同步辐射中心的Beamline 1W2A为光源,温度298 K.入射X射线的波长为0.154 nm,成像设备分辨率为2048 $\times$ 2048的Mar CCD装置(165 nm).所获得的二维散射图形是由同心圆组成,强度(I)和散射矢量(q)的关系与测试角度无关.为了获取结构信息,通过圆平均积分方法将二维图形转变为一维曲线. q 的范围为0.02~3 nm^{-1} , $q=4\pi\sin\theta/\lambda$,其中 θ 为散射角, λ 为波长.样品和探测器之间的距离是1120 mm,每个样品累积时间为120 s.

(vi) 氘代核磁共振 (^2H NMR). NMR测定采用德国Bruker公司配备脉冲梯度场(Z 方向)的AVANCE 400 Ultra Shield波谱仪完成.不同比例的溶液样品均溶解于重水中,测试前(25.0 $\pm$ 0.1) $^{\circ}\text{C}$ 恒温保存平衡4周,期间不断振荡样品加快其相平衡. ^2H 测定采用5 mm BBO探头,共振频率为61.4 MHz.采样范围为+50~-50 ppm,且采样数据点为32 K,90 $^{\circ}$ 脉冲为60 ms,弛豫延迟为1 s,采样次数为128次.

(vii) 冷冻蚀刻透射电子显微镜观察(FF-TEM).黏弹 L_a 相溶液由FF-TEM来进行观察,制样过程如下:少量(~4 μL)黏弹样品滴加在铜质样品台上,将样品迅速插入到液氮冷却的液态乙烷中,使样品冷冻玻璃化.样品的刻蚀和复型通过冷冻蚀刻制样台(EM BAF 060, Leica)完成.将样品转移到制样台的样品腔中,腔体温度通过液氮气流控制在-150 $^{\circ}\text{C}$,真空度达 $3\times 10^{-7} \text{ Pa}$.样品温度与腔体温度平衡后,通过硬金属刀断裂样品,调节温度使样品表面冰层经过短暂蚀刻后,先将Pt/C以45 $^{\circ}$ 角喷射到样品表面对样品结构进行复型,再将C以90 $^{\circ}$ 角电喷溅到样品表面以承载和强化复型膜.将复型膜浸洗下来转移到裸铜网上,通过JEOL JEM-1400电子显微镜观察,电压120 kV,图像通过Gatan 831 CCD(2.7 K $\times$ 2.7 K)采集记录,

上述转移操作都在液氮环境中(-196°C)进行。

(viii) 低温透射电子显微镜观察(Cryo-TEM). 稀溶液 L_{α} 相溶液用cryo-TEM来进行观察. 样品制备是在环境可控的低温制样装置Cryoplunge TM3内(Cp3, Gatan)进行, 环境温度控制在 25°C , Cp3腔体内相对湿度大于90%. 制样过程如下: 用镊子夹住微栅输送到Cp3腔体中, 用移液枪移取 $1\ \mu\text{L}$ 样品溶液黏到微栅上, 通过Cp3两侧的滤纸拍打样品对微栅表面液滴进行减薄以获得极薄的一层液膜, 随后将样品快速插入到液氮冷却的液态乙烷中(-165°C). 冷冻后的样品通过Gatan 626样品杆转移到TEM样品腔中(JEOL, JEM-1400)进行观察, 操作电压为 $120\ \text{kV}$. TEM的冷阱中也加入液氮以维持低温, 整个转移操作都在液氮环境中(-196°C)进行, 样品图像通过Gatan 831 CCD($2.7\ \text{K}\times 2.7\ \text{K}$)采集记录。

(ix) 流变性测定. 流变性测定利用HAAKE RS6000流变仪完成, 低黏度溶液样品通过同轴圆筒-转子传感系统(Z41 Ti)测量, 转子和转筒的直径分别为 41.420 和 $43.400\ \text{mm}$; 高黏度溶液样品通过锥板传感系统(C35/ 1° Ti L07116)测量, Ti直径 $35\ \text{mm}$, 锥角 1° . 在稳态剪切测试中, 剪切速率以阶梯式变化, 逐步从 $0.01\ \text{s}^{-1}$ 增至 $100\ \text{s}^{-1}$. 通过振荡剪切实验测定体系的黏弹性, 首先固定振荡频率通过应力扫描确定体系的线性黏弹区, 之后在线性黏弹区内选择一个合适的应力进行频率扫描. 频率扫描的范围是 $0.01\sim 100\ \text{Hz}$. 屈服应力值是通过应力扫描曲线三线拐点处获得. 测定温度控制在 $(25.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$, 所有样品在测试之前都要稳定至少4周。

2 结果与讨论

2.1 DNA/ C_{12}EO_4 水溶液性质和混合胶束形成

C_{12}EO_4 和DNA/ C_{12}EO_4 混合体系($25.0\pm 0.1^{\circ}\text{C}$)下的临界胶束浓度(CMC)通过表面张力测定确定, 结

果如图S2所示. C_{12}EO_4 和DNA/ C_{12}EO_4 混合体系的表面张力均随着 C_{12}EO_4 浓度的增加而显著下降, 表明 C_{12}EO_4 和DNA/ C_{12}EO_4 混合物在溶液表面上的吸附. 当溶液表面吸附达到饱和时, 表面张力值达到最低, 继续增加 C_{12}EO_4 浓度, 表面张力保持不变, 表明溶液中开始形成胶束聚集体. 由曲线的拐点可以求得CMC值, $\text{CMC}_{\text{C}_{12}\text{EO}_4}=2.35\times 10^{-5}\ \text{mol L}^{-1}$. 除了CMC值, 还可计算得到临界胶束浓度下的表面张力值 γ_{CMC} , 表面饱和吸附量 Γ_{max} , 吸附效率 Π_{CMC} 以及表面上 C_{12}EO_4 的最小分子截面积 A_{min} ^[16], 如表1所示^[17].

由表1可以发现, 随着DNA含量的增加, C_{12}EO_4 和DNA混合体系在水中的CMC和 γ_{CMC} 值与单一 C_{12}EO_4 水溶液相比略微降低, 而 Γ_{max} 随DNA含量增加大幅降低, A_{min} 和 Π_{CMC} 相应增加, 这些参数的变化充分表明DNA与 C_{12}EO_4 之间存在弱的相互作用. 这种相互作用产生可能是由于在水中, C_{12}EO_4 氧乙烯基团的氧原子能够通过氢键与 H_3O^+ 结合, 导致非离子表面活性剂带有部分正电荷, 与DNA分子之间产生静电吸引力; 另一方面, C_{12}EO_4 氧乙烯基团的氧原子也有可能和DNA分子中的氨基通过氢键发生结合. 也由此可以预测氢键在DNA与 C_{12}EO_4 分子相互结合过程中扮演主要角色。

2.2 DNA/ C_{12}EO_4 混合体系相行为

为了进一步研究 C_{12}EO_4 与DNA在水溶液中的相互作用, 对 C_{12}EO_4 /DNA/ H_2O 体系的相行为进行了研究. 图1给出了 C_{12}EO_4 /DNA/ H_2O 体系在 $T=(25.0\pm 0.1)^{\circ}\text{C}$ 时的部分相图, 相图中给出了不同相区域的典型样品照片. 室温下, 在 C_{12}EO_4 / H_2O 二元体系的相图中, 层状相占据了大部分相区, 出现在非常宽的浓度区域内. 而 C_{12}EO_4 与DNA混合溶液体系有更丰富的相行为: 在DNA浓度低于 $0.2\ \text{mol L}^{-1}$ 时, 随着 C_{12}EO_4 浓度的增加, 混合胶束相(L_1/L_1')转变为胶束和囊泡两相共存($L_1/L_{\alpha\text{v}}$), 之后依次转变为囊泡相($L_{\alpha\text{v}}$)和平

表1 C_{12}EO_4 和DNA混合体系胶束形成参数($T=(25.0\pm 0.1)^{\circ}\text{C}$, $\alpha=n_{\text{C}_{12}\text{EO}_4}/n_{\text{DNA}}$)^[17]

Table 1 Formation parameters of C_{12}EO_4 and DNA mixed micelles in water at $T=(25.0\pm 0.1)^{\circ}\text{C}$ and $\alpha=n_{\text{C}_{12}\text{EO}_4}/n_{\text{DNA}}$ ^[17]

$\text{C}_{12}\text{EO}_4:\text{DNA}$	$\text{CMC}(\text{mol L}^{-1})$	$\gamma_{\text{CMC}}(\text{mN m}^{-1})$	$\Gamma_{\text{max}}(\text{mol m}^{-2})$	$\Pi_{\text{CMC}}(\text{mN m}^{-1})$	$A_{\text{min}}(\text{nm}^2)$
100:0	2.35×10^{-5}	27.84	7.88	44.96	0.211
100:0.15	2.24×10^{-5}	27.23	6.05	45.57	0.275
100:0.36	2.03×10^{-5}	27.03	3.67	45.77	0.453
100:2.1	1.95×10^{-5}	26.78	2.92	46.02	0.569

图1 (网络版彩色)C₁₂EO₄/DNA/H₂O混合体系的相图, 相图存在不同相区: L_{ol} , L_{av} 和 L_1/L_{av} , 以及两种不同胶束的混合相(L_1/L_1'). $T=(25.0\pm0.1)^\circ\text{C}$

Figure 1 (Color online) Phase behavior of C₁₂EO₄/DNA/H₂O system at $T=(25.0\pm0.1)^\circ\text{C}$. Different phase regions can be observed: L_{ol} , L_{av} , L_1/L_{av} , and two micelle phases of L_1/L_1'

面层状相(L_{ol})相; 在DNA浓度高于0.2 mol L⁻¹时, C₁₂EO₄浓度的增加导致胶束混合相(L_1/L_1')转变为平面层状相(L_{ol}).

2.3 微观结构研究

(i) ²H NMR测定. 利用²H NMR测定, 观察了混合体系的相转变行为, 考察了混合体系不同比例下的聚集体结构转变. ²H NMR实验的四极裂分方法可以用来研究氘代水溶液中层状结构的各向异性程度^[16], 这是由于²H NMR技术可以提供氘核(自旋量子数 $I=1$)和周围电场梯度之间运动平均的电四极耦合信息, 主要影响来自于D₂O分子在各向异性环境中的运动, 其对表面活性剂聚集体的界面曲率十分敏感. 对于各向异性的体系, 处于各向异性位置的D₂O分子经历一个非零的平均四极相互作用, 将会产生共振裂分峰. 而对于各向同性环境, 由于分子快速移动而相互作用平均值为零, 所以在²H NMR图谱中呈现出一个单峰. 对于表面活性剂有序组合体的²H NMR研究, 目前已经总结了一些经验规律: 在平面层状相(L_{ol})溶液中, 图谱中通常出现一组对称的裂分峰, 这是由于长程有序各向异性双层结构的存在; 在囊泡(L_{av})溶液中, 少量的D₂O分子键合在弯曲双层结构的界面上显示出局部的各向异性, 大部分的D₂O分子分布在囊泡各向同性水核中, 裂分值为这两种情况的平均值, 因而囊泡在²H NMR图谱中通常表现为一个较宽的单峰.

图2(a)给出了C₁₂EO₄浓度为10%(质量分数, 下同)时聚集体结构随DNA浓度改变的²H NMR结果, 可以发现裂分峰的变化趋势: 囊泡(L_{av})的单峰向平面层状结构(L_{ol})的双峰转变; 而图2(b)同样表明, 保持DNA浓度为0.5 mmol L⁻¹, 随着C₁₂EO₄浓度从5%增加至40%, 囊泡向平面层状结构转变. 在囊泡和平面层状结构共存的中间相区域, 单峰和裂分出来的一组对称峰共存. 上述²H NMR图谱的连续变化证明了相图区域内囊泡溶液随非离子表面活性剂浓度增加向平面层状相转变的变化趋势.

(ii) SAXS测定. 结合²H NMR数据, 通过SAXS测定进一步考察组分浓度对C₁₂EO₄/DNA/H₂O体系层状结构转变的影响. 固定 $C_{DNA}=0.4\text{ mmol L}^{-1}$, 改变C₁₂EO₄的浓度, 其²H NMR谱图和一维SAXS曲线如图3所示. 随着C₁₂EO₄的浓度从10%增加到40%, ²H NMR谱图呈现出囊泡(L_{av})的单峰向平面层状结构(L_{ol})的双峰的转变趋势(图3(a)), 而SAXS曲线表明上述溶液样品均可以呈现出2个散射峰(图3(b)), 且散射矢量 $q_1:q_2=1:2$, 证明层状结构的存在. 根据Bragg方程 $d=2\pi/q_1$ 计算层间距 d , 即一个双分子层与相邻水层的厚度. 可以发现, 随着C₁₂EO₄比例的增加, 层间距呈现逐渐减小的趋势(图3(b)内插图). 这是由于非离子表面活性剂含量越高, 双层膜堆积越紧密.

保持C₁₂EO₄浓度为30%, 改变DNA浓度, 体系相行为变化如图S3所示. 图S3(a)表明, 随着DNA的浓度从0增加到2.0 mmol L⁻¹, 单峰逐渐演变成双峰, 证明囊泡向平面层状结构的转变. SAXS同样显示出2个

图2 ²H NMR对C₁₂EO₄/DNA/H₂O体系相行为的表征. (a) C₁₂EO₄=10%, 增加DNA浓度样品的核磁谱图; (b) C_{DNA}=0.5 mmol L⁻¹, 增加C₁₂EO₄浓度样品的核磁谱图. $T=(25.0\pm0.1)^\circ\text{C}$

Figure 2 ²H NMR characterization of phase behavior of C₁₂EO₄/DNA/H₂O at $T=(25.0\pm0.1)^\circ\text{C}$. (a) ²H NMR spectra at C₁₂EO₄=10% (mass fraction) with an increase of DNA concentration; (b) ²H NMR spectra at C_{DNA}=0.5 mmol L⁻¹ with an increase of C₁₂EO₄ concentration

图3 (网络版彩色)(a) $C_{12}EO_4$ /DNA/ H_2O 体系层状相的 2H NMR谱图; (b) SAXS曲线和层间距随浓度变化的曲线(内插图). $C_{DNA}=0.4 \text{ mmol L}^{-1}$, $C_{12}EO_4$ 浓度从10%增加到40%. $T=(25.0\pm0.1)^\circ\text{C}$

Figure 3 (Color online) 2H NMR spectra (a), SAXS curves (b) and the relationship of lamellar spacing distance and $C_{12}EO_4$ concentration (interior illustration) for the lamellar phase of $C_{12}EO_4$ /DNA/ H_2O system. $C_{DNA}=0.4 \text{ mmol L}^{-1}$ with an increase of $C_{12}EO_4$ concentration from 10% to 40%. $T=(25.0\pm0.1)^\circ\text{C}$

散射峰(图S3(b)), 散射矢量 $q_1:q_2=1:2$, 表明层状相是上述对比溶液样品的主要组成^[13]. 同时发现, 在保持 $C_{12}EO_4$ 浓度不变时, 增加DNA浓度, 可以促使层间距同样呈现出先增大后减小的趋势. 这是由于非离子表面活性剂水溶液中形成双分子层, 其稳定性依赖于分子的亲疏水平衡, 也依赖于双分子层自身的热波动. 由于层结构易于发生肿胀, 导致层间距亦具有波动性^[2]. 当加入少量DNA分子, DNA分子通过氢键与非离子表面活性剂相互作用, 抑制了双分子层的热波动, 导致双分子层更加平整, 使层间距也出现增大的现象. 若继续加入DNA分子, 溶液总浓度增大, 由于大量分子的相互挤压, 双分子层紧密排列, 导致层间距逐渐减小. 所以, 随着DNA含量的增加, 复合体系的双分子层间距先增大后减小.

(iii) Cryo-TEM和FF-TEM研究. Cryo-TEM和FF-TEM技术是用于观察表面活性剂溶液自聚集结构直观有效的手段. 本文分别采用cryo-TEM和FF-TEM对黏度较低的层状相溶液和较高黏度的层状凝胶样品进行观察, 结果如图4所示. 当 $C_{12}EO_4$ 浓度为10%, DNA浓度为 0.5 mmol L^{-1} 时, 样品为低黏度的溶液, cryo-TEM表征结果(图4(a))表明其具有一定曲率但未闭合的多层结构, 这与图2(a)中的 2H NMR结果相吻合, 证实了DNA的加入可以导致弯曲层状结构的出现. 而且图4(a)中的弯曲多层结构正、负曲率共存, 表明当 $C_{12}EO_4$ 浓度较低时, 由DNA参与形成的层状结构具有较好的弹性. 当 $C_{12}EO_4$ 为30%, DNA

图4 (a) Cryo-TEM图, $C_{12}EO_4=10\%$, $C_{DNA}=0.5 \text{ mmol L}^{-1}$; (b) FF-TEM图, $C_{12}EO_4=30\%$, $C_{DNA}=0.5 \text{ mmol L}^{-1}$

Figure 4 (a) Cryo-TEM image at $C_{12}EO_4=10\%$ and $C_{DNA}=0.5 \text{ mmol L}^{-1}$; (b) FF-TEM image at $C_{12}EO_4=30\%$ and $C_{DNA}=0.5 \text{ mmol L}^{-1}$

浓度为 0.5 mmol L^{-1} 时, 样品黏度高, 是典型的层状凝胶, FF-TEM结果证实了紧密堆积平面层状结构(图4(b))的存在, 平均层间距为 $(11\pm1.8) \text{ nm}$, 与SAXS表征结果一致(图3(b)).

2.4 层状相的流变学性质

流变学(rheology)性质是研究表面活性剂水溶液的宏观性质的有效方法, 可以间接证明复杂流体中的微观结构. 研究了层状相样品($C_{12}EO_4=20\%$, $C_{DNA}=1.0 \text{ mmol L}^{-1}$)在 $(25.0\pm0.1)^\circ\text{C}$ 时的流变性质. 频率扫描(图5(a))结果给出了弹性模量(G')和黏性模量(G'')随剪切频率 f 的变化曲线; 稳态剪切结果(图5(b))给出了该样品黏度 η 和剪切应力 τ 随剪切速率 $\dot{\gamma}$ 变化的曲线. 频率扫描结果表明, 在扫描频率范围内, G' 基本保持在45 Pa左右, 比 $G''\approx 6$ Pa大接近1个数量级, 二者几乎平行不随频率改变而改变, 该区样品为典型的Bingham流体, 样品表现出黏弹性的特点^[15], 同时, 样品的复合黏度($|\eta^*|$)在整个频率范围内呈现线性降低的趋势, 斜率为-1, 进一步证明了该相区域的溶液样品为典型的层状相, 且具有良好的黏弹性.

进一步考察了不同组分浓度对层状相溶液黏度的影响. 图5(c)给出了 $C_{12}EO_4=20\%$, 增加DNA浓度($0\sim 2.0 \text{ mmol L}^{-1}$)的溶液样品中剪切黏度随剪切速率的变化曲线. 可以发现, 所有样品在剪切作用下黏度降低, 呈现出非牛顿流体行为. 随着DNA浓度的增加, 溶液黏度无明显变化. 另一方面, 保持DNA浓度(1.0 mmol L^{-1})不变、增加 $C_{12}EO_4$ 浓度($20\%\sim 50\%$), 考察层状相溶液黏度变化. 图5(d)表明所考察的溶液样品均表现出剪切稀释的结果. 而且随着 $C_{12}EO_4$ 浓度的增加, 由于层状聚集体更加紧密堆积, 导致样品溶液的黏度增大, 并表现出典型的凝胶特征.

图5 流变性能表征. 频率(a)和稳态剪切(b)扫描, $C_{12EO_4}=20\%$ 和 $C_{DNA}=1.0 \text{ mmol L}^{-1}$; (c), (d) 剪切黏度 η 随剪切速率 $\dot{\gamma}$ 的变化曲线, 其中(c) $C_{12EO_4}=20\%$, DNA浓度从0增加至 2 mmol L^{-1} ; (d) $C_{DNA}=1.0 \text{ mmol L}^{-1}$, C_{12EO_4} 浓度从20%增加到50%. $T=(25.0\pm 0.1)^\circ\text{C}$

Figure 5 Rheological characterization. Frequency (a) and steady shearing (b) of $C_{12EO_4}=20\%$ and $C_{DNA}=1.0 \text{ mmol L}^{-1}$. (c), (d) The curves of shearing viscosity (η) with the change of shearing rate ($\dot{\gamma}$). (c) $C_{12EO_4}=20\%$ with an increase of DNA concentration from 0 to 2 mmol L^{-1} , (d) $C_{DNA}=1.0 \text{ mmol L}^{-1}$ with an increase of C_{12EO_4} concentration from 20% to 50%. $T=(25.0\pm 0.1)^\circ\text{C}$

2.5 温度对层状聚集体结构转变的影响

长链烷基聚氧乙烯醚(C_nEO_m)是一种对温度较敏感的非离子表面活性剂. 确认了 $C_{12}EO_4$ 与DNA复配体系的相行为、微结构以及流变学性质后, 本文继续考察了温度对层状聚集体结构的影响. 图6为温度对样品流变学性质的影响变化曲线. 对于 $C_{12}EO_4/\text{H}_2\text{O}$ 溶液($C_{12EO_4}=20\%$), 随着温度从室温升高到 50°C , 溶液的弹性模量逐渐降低(图6(a)). 添加DNA至 0.4 mmol L^{-1} 后(图6(b)), 温度的升高同样导致混合溶液的弹性模量逐渐降低. 随后我们考察了溶液剪切黏度随温度的影响, 发现在不添加DNA时(图6(c)), $C_{12}EO_4/\text{H}_2\text{O}$ 溶液($C_{12EO_4}=20\%$)黏度随温度升高而降低; 添加DNA至 0.4 mmol L^{-1} 后, 含有不同浓度 $C_{12}EO_4$ 的溶液都表现出黏度随温度升高而降低的现象(图6(d)~(f)). 这是因为表面活性剂 $C_{12}EO_4$ 分子间以及 $C_{12}EO_4$ 与水分子之间的氢键作用随着温度升高减弱; 同时, 温度的升高导致分子的热运动加快, 因此样品的黏弹性呈现降低的趋势.

利用 ^2H NMR测定考察了 $C_{12}EO_4/\text{DNA}/\text{H}_2\text{O}$ 复合体系中层状聚集体结构随温度的变化, 结果如图7所示. 无DNA添加时, 随着温度从室温升高到 50°C , $C_{12EO_4}=20\%$ 的 $C_{12}EO_4/\text{H}_2\text{O}$ 体系 ^2H NMR波谱始终保持单峰/双峰共存, 然而单峰强度逐渐减弱, 双峰强度不断增加, 表明溶液中各向同性的囊泡相(L_{av})逐渐向各向异性的层状相(L_{al})发生转化(图7(a)). 添加DNA至 0.4 mmol L^{-1} 后, ^2H NMR波谱呈现单峰, 而随着温度升高 50°C , 单峰转变为对称的双峰(图7(b)). 保持DNA浓度为 0.4 mmol L^{-1} , 增加 $C_{12}EO_4$ 浓度至30%和40%, 发现 ^2H NMR波谱均呈现单峰减弱或消失, 双峰不断增强(图7(c)和(d)). 这些结果表明, 随着温度升高, $C_{12}EO_4/\text{DNA}/\text{H}_2\text{O}$ 复合体系由各向同性的囊泡相(L_{av})逐渐向各向异性的层状相(L_{al})发生转化. 根据临界堆积参数理论: $P=v/al$, $C_{12}EO_4$ 的临界堆积参数趋近于1. 而温度的升高破坏了表面活性剂 $C_{12}EO_4$ 头基周围的水化层, 使得 $C_{12}EO_4$ 头基所占横截面积 a 减小, 临界堆积参数 P 变大, 从而引起囊泡

图6 不同温度下层状相溶液样品的流变学频率扫描和稳态剪切结果. (a), (b) 弹性模量 G' 随剪切频率 f 变化曲线. (a) $C_{12EO_4}=20\%$, $C_{DNA}=0$; (b) $C_{12EO_4}=20\%$, $C_{DNA}=0.4 \text{ mmol L}^{-1}$. (c)~(f) 剪切黏度 η 随剪切速率 $\dot{\gamma}$ 的变化曲线. (c) $C_{12EO_4}=20\%$, $C_{DNA}=0$; (d) $C_{12EO_4}=20\%$, $C_{DNA}=0.4 \text{ mmol L}^{-1}$; (e) $C_{DNA}=0.4 \text{ mmol L}^{-1}$, $C_{12EO_4}=30\%$; (f) $C_{DNA}=0.4 \text{ mmol L}^{-1}$, $C_{12EO_4}=40\%$

Figure 6 Rheological characterization of lamellar phase samples at different temperatures. The changes of modula (G') with shearing frequency (f) at $C_{12EO_4}=20\%$, $C_{DNA}=0$ (a) and $C_{12EO_4}=20\%$, $C_{DNA}=0.4 \text{ mmol L}^{-1}$. (b)~(f) The curves of shearing viscosity (η) and shearing rate ($\dot{\gamma}$). (c) $C_{12EO_4}=20\%$, $C_{DNA}=0$; (d) $C_{12EO_4}=20\%$, $C_{DNA}=0.4 \text{ mmol L}^{-1}$; (e) $C_{DNA}=0.4 \text{ mmol L}^{-1}$, $C_{4EO_4}=30\%$; (f) $C_{DNA}=0.4 \text{ mmol L}^{-1}$, $C_{12EO_4}=40\%$

相向平面层状相的转变.

SAXS 实验给出了不同温度下 $C_{12EO_4}=20\%$, $C_{DNA}=0.4 \text{ mmol L}^{-1}$ 层状相样品溶液的结构相关信息, 如图S4(a)所示. 可以发现, 随着温度从 25°C 升高到 50°C , 所考察的溶液样品均出现了2个散射峰. 25°C 时, 样品的散射矢量依次为 $q_1=0.56 \text{ nm}^{-1}$, $q_2=1.14 \text{ nm}^{-1}$; 在 40°C 时, 样品的散射矢量依次为 $q_1=0.54 \text{ nm}^{-1}$, $q_2=1.01 \text{ nm}^{-1}$; 50°C 时, 样品的散射矢量依次为 $q_1=0.51 \text{ nm}^{-1}$, $q_2=0.97 \text{ nm}^{-1}$. 三个温度条件下峰位置

对应的散射矢量之比均为 $q_1:q_2=1:2$, 符合层状结构的典型散射图样. 根据 Bragg 方程 $d=2/q_1$, 可以求得 25°C , 40°C 和 50°C 下的层间距 d 值分别为 11.2 , 11.6 和 12.3 nm . 由此证明, 层间距 d 随着温度的升高而逐渐变大 (图S4(b)), 即温度的升高引起复合层状结构的肿胀.

3 结论

以 DNA 与 $C_{12EO_4}/\text{H}_2\text{O}$ 复配体系为对象, 研究了 DNA 与非离子表面活性剂 C_{12EO_4} 的弱相互作用.

图7 不同温度下 $C_{12}EO_4$ /DNA/ H_2O 体系层状相结构的 2H NMR谱图。
(a) $C_{12}EO_4=20\%$, $C_{DNA}=0$; (b) $C_{12}EO_4=20\%$, $C_{DNA}=0.4\text{ mmol L}^{-1}$; (c) $C_{DNA}=0.4\text{ mmol L}^{-1}$, $C_{12}EO_4=30\%$; (d) $C_{DNA}=0.4\text{ mmol L}^{-1}$, $C_{12}EO_4=40\%$
Figure 7 2H NMR spectra of the lamellar phase for $C_{12}EO_4$ /DNA/ H_2O system at different temperatures. (a) $C_{12}EO_4=20\%$, $C_{DNA}=0$; (b) $C_{12}EO_4=20\%$, $C_{DNA}=0.4\text{ mmol L}^{-1}$; (c) $C_{DNA}=0.4\text{ mmol L}^{-1}$, $C_{12}EO_4=30\%$; (d) $C_{DNA}=0.4\text{ mmol L}^{-1}$, $C_{12}EO_4=40\%$

DNA的加入可以降低 $C_{12}EO_4$ 的CMC, 提高其表面活性, 形成复合聚集体. 改变 $C_{12}EO_4$ 和DNA组分浓度比可以调控复合聚集结构的转变过程: 表面活性剂 $C_{12}EO_4$ 浓度增加, 会引起混合胶束相向囊泡相和平面层状相发生转变; 而DNA浓度的增加, 会引起囊泡相向层状相发生转变, 且随着DNA浓度的增加, 层状相的层间距先增大、后减小, 即DNA浓度增加使双层膜的堆积变得更紧密. 层状相样品为典型的Bingham流体, 具有良好的黏弹性. 随着表面活性剂 $C_{12}EO_4$ 浓度的增大, 溶液中的表面活性剂分子增多, $C_{12}EO_4$ 与周围分子的相互作用增强, 分子的热运动减慢, 故黏弹性随 $C_{12}EO_4$ 浓度的增大而增大. 温度对体系相行为的影响较为显著, 升高温度破坏了表面活性剂 $C_{12}EO_4$ 头基周围的水化层, 使 $C_{12}EO_4$ 头基所占横截面积 a 减小, 临界堆积参数 P 变大, 从而引起囊泡相向平面层状相的转变. 同时, 温度的升高导致分子的热运动加快并且破坏了部分氢键, 随着温度的升高, 样品的黏弹性逐渐降低. 总之, DNA/非离子表面活性剂聚集结构的转变, 可以通过改变组分比例和温度来实现.

参考文献

- Whitesides G M, Grzybowski B. Self-assembly at all scale. *Science*, 2002, 295: 2418–2421
- Lehn J M. Toward self-organization and complex matter. *Science*, 2002, 295: 2400–2403
- Dong R, Hao J. Complex fluids of poly(oxyethylene) monoalkyl ether nonionic surfactants. *Chem Rev*, 2010, 110: 4978–5022
- Zhu N, Liggitt D, Liu Y. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science*, 1993, 261: 209–211
- Lasic D D. *Liposomes in Gene Delivery*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997
- Migue M G, Pais A A C C, Dias R S, et al. DNA-cationic amphiphile interaction. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*, 2003, 228: 43–55
- Cao M, Deng M, Wang X, et al. Decomposition of cationic gemini surfactant-induced DNA condensates by β -cyclodextrin or anionic surfactant. *J Phys Chem B*, 2008, 112: 13648–13654
- Trewavas A. A new method for counting labeled nucleic acids by liquid scintillation. *Anal Biochem*, 1967, 21: 324–329
- Melnikov S M, Sergeyev V G, Yoshikawa K. Discrete coil-globule transition of large DNA induced by cationic surfactant. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 2401–2408
- Dias R S, Innerlohinger J, Glatter O, et al. Coil-globule transition of DNA molecules induced by cationic surfactants: A dynamic light scattering study. *J Phys Chem B*, 2005, 109: 10458–10463
- Felgner P L, Gadek T R, Holm M, et al. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 7413–7417
- Radler J O, Koltover I, Salditt T, et al. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes indistinct interhelical packing regimes. *Science*, 1997, 275: 810–814
- Koltover I, Salditt T, Radler J O, et al. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science*, 1998, 281: 78–81
- Machado A H E, Lundberg D, Ribeiro A J, et al. Interactions between DNA and nonionic ethylene oxide surfactants are predominantly repulsive. *Langmuir*, 2010, 26: 13102–13109

- 15 Amar-Yuli I, Adamcik J, Blau S, et al. Controlled embedment and release of DNA from lipidic reverse columnar hexagonal mesophases. *Soft Matter*, 2011, 7: 8162–8168
 - 16 Dong R, Zhong Z, Hao J. Self-assembly of onion-like vesicles induced by charge and rheological properties in anionic-nonionic surfactant solutions. *Soft Matter*, 2012, 8: 7812–7821
 - 17 Zhang Q. Study on the Self-aggregation and property of DNA/nonionic surfactant in water (in Chinese). Master Desertation. Jinan: Shangdong University, 2014 [张琪. DNA 与非离子表面活性剂水溶液中自聚集结构和性质的研究. 硕士学位论文. 济南: 山东大学, 2014]
-

补充材料

图 S1 $C_{12}EO_4$ 的分子结构式和理论模拟的 CPK 模式以及脱氧核糖核酸 DNA 的组成结构式和双螺旋结构

图 S2 $C_{12}EO_4$ 以及 DNA/ $C_{12}EO_4$ 水溶液表面张力随表面活性剂浓度的变化曲线

图 S3 $C_{12}EO_4$ /DNA/ H_2O 三元体系层状相的 2H NMR 谱图和 SAXS 曲线

图 S4 不同温度下的 SAXS 曲线和层间距随温度变化的曲线

本文以上补充材料见网络版 csb.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.

Summary for “DNA与非离子表面活性剂复配体系水溶液聚集行为”

The aggregation behavior of DNA/nonionic surfactant mixtures in water

WANG LiHuan, ZHANG Qi & HAO JingCheng^{*}

Key Laboratory of Colloid and Interface Chemistry of Ministry of Education, Shandong University, Jinan 250100, China

^{*} Corresponding author, E-mail: jhao@sdu.edu.cn

The co-assembly of DNA and cationic surfactants in solution will induce the formation of ordered nanocomplexes (such as lamellar and hexagonal structures) due to their strong electrostatic interactions, which has attracted broad attention for the promising applications in biotechnology, medicine, and gene delivery. However, the complexes of DNA and nonionic surfactants have been rarely reported. Here, we have investigated the phase behavior of DNA and tetraethylene glycol monododecyl ether (C₁₂EO₄) nonionic surfactant in water, and demonstrated that the weak electrostatic interaction and the hydrogen bonding between DNA and C₁₂EO₄ molecules as well as the hydrophobic forces led to the formation of various ordered aggregates. Typically, planar lamellas (L_{al}) and closed vesicles (L_{av}) were determined by ²H NMR, small-angle X-ray scattering (SAXS), cryogenic transmission electron microscopy (Cryo-TEM), freeze fracture transmission electron microscopy (FF-TEM), and rheological measurements. Notably, the phase transition between planar lamellas (L_{al}) and vesicles (L_{av}) can be precisely tuned through the concentration, the ratio of DNA and C₁₂EO₄, and the temperature. Our results provide an in-depth understanding of the self-assembly of DNA and nonionic surfactants, thus making way for the future development of nonviral carriers of DNA for gene therapy.

DNA, nonionic surfactant, weak interaction, lamellar phase, Cryo-TEM

doi: 10.1360/N972016-00840