

孙仲旭,张汉超,陈 龙,等. 类水滑石纳米载体负载 DNA 质粒构建及植物基因递送研究[J]. 江苏农业科学,2023,51(20):49-57.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.20.008

类水滑石纳米载体负载 DNA 质粒构建 及植物基因递送研究

孙仲旭,张汉超,陈 龙,曾章华

(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所,北京 100081)

摘要:为克服外源基因在植物遗传转化中进入细胞过程复杂,转染率低等问题,通过水热法合成了一种粒径较小、分散均一的类水滑石纳米材料基因载体(layered double hydroxide nanosheets,简称 LDHs)。通过傅里叶变换红外光谱仪、透射电子显微镜、马尔文纳米粒度电位仪等对该硝酸根插层的类水滑石纳米材料进行了表征,LDHs 呈现较规则的六边形层板结构、粒径为 20~80 nm,zeta 电位是 (39.8 ± 2.5) mV,并借助琼脂糖凝胶电泳试验发现该材料可有效地和外源基因结合,当质粒与 LDHs 质量比为 1:3 时可被完全负载,并保护核酸分子免受脱氧核糖核酸酶 DNase I 的消化水解作用。通过形成纳米粒子-核酸复合体的方式,借助叶面无孔注射,将含有绿色荧光蛋白质粒 DNA 渗入到生长 4 周的野生型本氏烟草叶片中,4 d 后可在激光共聚焦显微镜下清晰地观察到目的信号。表明,类水滑石有望通过不借助外力的简易方法将外源基因高效率地递送入植物体从而实现完整的基因释放及表达,展现出了此纳米材料在植物纳米基因载体方面的应用方面具备很大的潜力,对优化外源基因递送进入植物细胞进行遗传转化方面具有一定的指导意义。

关键词:类水滑石;基因载体;基因递送;植物基因工程;纳米材料

中图分类号:TB383;S184 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)20-0049-09

植物基因工程是 21 世纪有关植物遗传转化和

收稿日期:2022-12-08

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0200900)。

作者简介:孙仲旭(1997—),女,河北衡水人,硕士研究生,主要从事
纳米生物学研究。E-mail:sunfox9@163.com。

通信作者:曾章华,博士,研究员,主要从事纳米生物学研究。
E-mail:zengzhangua@caas.cn。

新品种培育的重要核心技术,是农业领域中的研究热点和重要手段。在传统的植物遗传育种中,需要通过多个植物世代进行多次杂交和筛选,以达到获得具有目的性状的植株品种。而植物基因工程通过与传统育种技术相结合,借助一定的手段将体外分离的目的基因转入植物细胞并表达,从而使目的植物获得理想的性状,例如抗病、抗虫、抗逆等,

- [19] Du W K, Hu F R, Yuan S X, et al. The identification of key candidate genes mediating yellow seedling lethality in a *Lilium regale* mutant [J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47 (4): 2487-2499.
- [20] Hu L L, Zhang H Q, Xie C, et al. A mutation in CsHD encoding a histidine and aspartic acid domain-containing protein leads to yellow young leaf-1 (yyl-1) in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Plant Science, 2020, 293:110407.
- [21] 简 磊,王仲康,曾冬冬,等. 水稻白化转绿突变体 albg 的鉴定和基因精细定位[J]. 核农学报,2017,31(12):2289-2297.
- [22] 朱雪云,陈利萍. 植物嵌合体的研究与应用[J]. 核农学报, 2010,24(6):1185-1191.
- [23] Zhu S P, Wang F S, Shen W X, et al. Genetic diversity of *Poncirus* and phylogenetic relationships with its relatives revealed by SSR and SNP/InDel markers[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015,

37(7):141.

- [24] Preiner D, Marković Z, Šikuten I, et al. *In vitro* synthesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) intraspecific chimeras using meristematic bulk tissue grafting[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 246:965-970.
- [25] Zhou J M, Hirata Y, Nou I S, et al. Interactions between different genotypic tissues in citrus graft chimeras[J]. Euphytica, 2002, 126 (3):355-364.
- [26] 王彩霞,田韦韦,田 敏,等. 文心兰黄化突变体的初步研究 [J]. 核农学报,2013,27(12):1845-1852.
- [27] Kulus D, Abratowska A, Mikula A. Morphogenetic response of shoot tips to cryopreservation by encapsulation-dehydration in a solid mutant and periclinal chimeras of *Chrysanthemum × grandiflorum*/Ramat./Kitam. [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2018, 40 (1):18.

有力地推动了转基因农作物技术的发展^[1]。然而相较于动物基因工程来说基因工程在植物上的研究相对较为滞后。主要的研究壁垒是植物细胞壁对于外界核酸分子的阻碍作用,为体外遗传物质向细胞内的递送转运提供了一个额外的物理屏障。这也是基因工程工具在植物研究中实施和使用速度较慢的关键因素之一^[2]。

目前常用的植物外源基因递送方式主要通过农杆菌转化法、基因枪法以及花粉管通道等,转化后可获得理想的转基因植株。但是目前常用的这几种方法都存在各自的局限性,农杆菌转化法是模仿或者利用天然的载体转化系统形成,但是其受体物种有限,在单子叶植物中的转化效果不理想,并且由于该基因转化是通过 T-DNA 输出、靶向和插入植物和基因组进行的^[3],其所携带的外源分子仅限于 DNA。基因枪法是一种通用于植物遗传转化的物理方法,虽然可以克服农杆菌转化法中所提到的宿主范围和携带分子的限制,但该法转化所需的外源分子量大并且对植物组织会造成比较严重的损伤^[4]。借助植物花粉管来进行转化的方法则会受到作物本身花期的限制。目前为止,植物转基因技术仍然缺乏一种成熟的手段和媒介来将不同的体外分子在不借助外力的情况下靶向高效地输送到植物物种中,并尽可能地降低对于目标植物组织的损伤程度。

近年来,由于纳米材料多种独特的理化性质,纳米技术在生物医药领域展现出了巨大的应用潜力^[5]。例如,纳米颗粒具有体积极小,良好的生物相容性以及可被多种官能团修饰等特性^[6],可以作为遗传转化中的分子转运载体,携带外界遗传物质绕过生物体的多道屏障以解决遗传物质的递送问题,并提高植物基因工程的应用水平。目前纳米颗粒已被验证可于中国仓鼠卵巢细胞(CHO)和人宫颈癌细胞(HeLa)等的亚细胞水平上进行定位和一系列的操作^[7]。并且通过对材料进行一系列的修饰和功能化,可将不限于 DNA、microRNA、siRNA 的一系列生物分子以及各种蛋白有效运输到生物细胞内发挥作用^[8-10]。而相较于动物细胞中较为广泛深入地研究,纳米基因载体在植物中的研究由于纳米颗粒的大小、表面所带电荷以及表面属性的不同及宿主本身所存在的物理屏障,使得植物体中的生物分子递送相较于动物细胞转化体系更具有挑战性^[11-13]。

目前,已有文献报道通过纳米颗粒于外界基因结合通过直接转化或者借助聚乙二醇(PEG)、电场驱动、超声波等外力的条件下将外源基因输送到植物体中^[14-15],在烟草种子及原生质体、拟南芥根、玉米以及水稻、小麦等组织或细胞中均成功实现了外源基因的表达^[16-20]。在多种纳米材料中,类水滑石纳米颗粒因具有良好的生物相容性,并且制备相对简单,同时基因的装载量大,转化效率高,相对稳定,不易聚沉等特点为植物的遗传转化提供了一个新的思路和研究方向。2001 年, Khan 等通过借助类水滑石材料的理化特性,对多种药物中的生物活性分子进行吸附证明药物分子可以在体外释放这一性质,为类水滑石材料作为生物分子的递送载体奠定了基础^[21]。此外, Li 等通过试验证明类水滑石可以很好地对所负载的核酸分子起到保护作用,避开体内多种水解核酸酶的消化酶解作用,进而为外源基因高效递送到细胞内发挥作用提供了可能^[22]。而 Mitter 等借助类水滑石材料将双链 RNA 分子运送到植物体内,对侵染作物的辣椒轻斑驳病毒(PMMoV)、黄瓜花叶病毒(CMV)同源基因沉默使得抗虫效果得到显著延长^[23]。不少研究也表明,外源生物分子在无机机械无外力辅助下也可通过纳米材料跨越细胞壁以及质膜等壁垒来实现细胞内化。例如, Bao 等利用类水滑石纳米片作为植物跨膜运输载体,成功将生物分子转入完整植物细胞^[24]。

本研究通过高速剪切以及水浴搅拌加热的方式,合成了粒径为 50 nm 左右的层状氢氧化物纳米片,并研究其作为植物基因运载体的性能。通过编码绿色荧光蛋白的 pAN580 质粒 DNA 来验证其携带外源基因进入成熟植株体内的可能性,以期对纳米基因载体在植物转基因中的研究与应用提供新的材料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用的编码绿色荧光蛋白(GFP)基因的质粒 pAN580 以及拟南芥、日本晴水稻(*Oryza sativa*)、本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)种子来自中国农业科学院生物研究所谷晓峰老师课题组,无内毒素质粒质粒提取纯化试剂盒购自天根生化科技有限公司; $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、NaOH、CaCl₂、LB 培养基和 DNA ladder 购自于赛默

飞世尔公司;FDA 染料购自上海源叶生物科技有限公司;纤维素酶和离析酶购自日本 Yakult 公司,脱氧核糖核酸酶 DNase I 购自南京诺维赞生物科技股份有限公司,其他试剂均为国产分析纯,购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 试验仪器

高速冷冻离心机(Eppendorf 公司,德国);琼脂糖凝胶电泳水平电泳仪和凝胶成像分析系统(BIO-RAD 公司,美国);摇床(Eppendorf Innova 42 型,德国);冷场发射扫描电子显微镜(JSM 6700F 型,日本);透射电子显微镜(Hitachi 公司,日本);傅里叶红外光谱仪(Bruker Optics 公司,Vertex70 型,美国);X-射线衍射仪(Bruker 公司,D8 Advance 型,美国);马尔文激光粒度仪(Malvern 公司,Zetasizer Nano ZS 型,英国);高速剪切机(HEVC 公司,A25 型,德国);超微量分光光度计(Thermo 公司,Nanodrop 2000 型,美国);激光共聚焦显微镜(Zeiss 公司,LSM980 型,美国)。

1.3 类水滑石纳米粒子的制备

取 1.6 g 的 NaOH 溶于 40 mL 的去离子水中,配制溶液甲;称取 0.75 g 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 与 1.538 g 的 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 10 mL 去离子水中,使用涡旋混匀器混匀为溶液乙。在室温下使用高速剪切机,开始剪切瞬间将配制的溶液乙加入溶液甲中,于 B 档剪切 100 s,之后切换 A 档继续剪切 20 s,得到纳米材料原液。之后在室温下将上述得到的材料原液在 8 000 r/min 转速下离心 10 min,弃上清液,用去离子水补充定容至初始体积后,将材料颗粒超声分散均匀后以同样条件离心,重复 3 次。然后将洗完补充至原体积的溶液置于 80 °C 水浴锅中加热搅拌 6 h,得到类水滑石纳米粒子(layered double hydroxide nanosheets,简称 LDHs),常温保存备用。

1.4 材料表征

取 2 μL 的制备好的 LDHs 材料溶液溶解于 4 mL 的去离子水中,均匀分散后,取 4 μL 分别滴加在晾干的硅片和铜网上,室温下自然干燥后利用扫描电子显微镜及透射电子显微镜观察该纳米粒子的形态特征。

首先将制备好的 LDHs 溶液置于 -80 °C 的超低温冰箱冷冻 24 h,利用冷冻干燥机将其制作为干粉备用,称取 2 mg 的 LDHs 材料与 30 mg 的 KBr 粉末研磨混匀,均匀分散在磨具中压片,在室温下利用

傅里叶变换红外光谱仪对材料进行红外光谱测试,其中扫描速度为 32 次/min,光谱范围是 4 000 ~ 400 cm^{-1} 。

在电压及电流分别为 40 kV 与 40 mA 的条件下,X-射线衍射仪在 5°~50°范围内扫描,对类水滑石纳米颗粒的物相组成与晶型结构进行分析。

将制备的 LDHs 材料使用去离子水稀释 50 倍,然后取稀释后的样品 1.3 mL 加入比色皿中使用马尔文激光粒度仪分析测试材料的粒度分布及 zeta 电位。

1.5 质粒的扩增与纯化

将含有 pAN580 质粒的大肠杆菌 DH5 α 于 LB 液体培养基(每升含 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g NaCl)中按照 1:100 的体积比活化,在 37 °C 恒温摇床中 180 r/min 培养过夜。按照质粒提取试剂盒说明书进行质粒提取,通过琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计鉴定质粒的大小、纯度和浓度,将制备好的符合纯度的质粒 DNA 保存在 -20 °C 中备用。

1.6 LDHs 与质粒 DNA 的结合及对 DNA 的酶切保护

为验证纳米材料对 DNA 的负载和保护能力,本试验选用了 5 个梯度质量比的组合。先配制 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 LDHs 单分散纳米粒子溶液,向上述纳米粒子悬浮液中加入质粒溶液。按照一定质量比例(1:1、1:2、1:3、1:4、1:5)与 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的质粒 DNA 结合,室温放置 30 min,使用琼脂糖凝胶电泳检测纳米粒子与 DNA 的结合情况。另外对 LDHs-DNA 复合物用 DNase I 于 37 °C 消化 10 min 后,进行琼脂糖凝胶电泳,验证纳米粒子对 DNA 的保护能力。

1.7 烟草 BY-2 悬浮细胞的培养

分别取 10、25、50、100、200、500 μg 的经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后的 LDHs 纳米粒子加入配制成功的 BY-2 细胞培养基中,其中该细胞培养基包含 4.3 mg/mL 的 (2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的维生素 B₁、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 2,4-D、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Myo-inositol、0.255 g/L 的 KH_2PO_4 以及 3% 质量比的蔗糖,均匀分散后于高压灭菌锅中 121 °C,灭菌 20 min。然后取长势均一的 BY-2 细胞在超净工作台中等量接种于已灭菌的各组培养基中,同样的环境下在 26 °C、150 r/min 恒温摇床避光培养 3~4 d。

1.8 水稻叶鞘原生质体的制备

在生长 2 周的日本晴水稻幼苗叶鞘中提取原生

质体。即将水稻幼苗叶鞘切成 1 mm 的小段,放入酶解液中(每 10 mL 酶解液含 1.093 g 甘露醇、0.1 g 纤维素酶、0.08 g 的半纤维素酶、0.1 g 的果胶酶、0.08 g 的离析酶和 0.1 mol 的 MES 溶液 0.2 mol CaCl_2 溶液、0.4 mol KCl 溶液)。然后置于 28 ℃、80 r/min 的恒温摇床中避光酶解 4 h。其后将释放出的原生质体用 150 目的筛子过滤到 50 mL 的离心管中,130 g 离心 5 min,并使用 W5 溶液洗涤 2 次,最后将纯化的原生质体重新悬浮于 W5 溶液中待用。为保持细胞活力须现配现用。

1.9 LDHs 对植物的毒性试验

1.9.1 对水稻叶鞘原生质体的毒性试验 取过滤除菌后的 LDHs 纳米悬浮液经 W5 溶液离心洗涤 3 次备用,然后在超净工作台中将新鲜制备的水稻叶鞘原生质体与不同质量浓度梯度(0、25、50、100、300、500 $\mu\text{g/mL}$)的 LDHs 纳米颗粒混合,之后置于试管中在 26 ℃恒温摇床上避光振荡培养,摇床转速设置为 40 r/min 每组均含有 2 mL W5 溶液,每个处理重复 3 次,每个重复观察 3 个视野。

1.9.2 对烟草 BY-2 细胞的毒性试验 取长势均一的烟草 BY-2 细胞在超净工作台中加入到含有不同质量浓度(0、25、50、100、300、500 $\mu\text{g/mL}$)LDHs 纳米颗粒的培养基中,并记录初始质量。所有组均置于 26 ℃恒温摇床上 130 r/min 的转速下进行避光培养,并记录细胞每日变化质量,每个处理重复 3 次。

1.9.3 对拟南芥植株的毒性试验 用浓度为 1.5% 的 NaClO 溶液对拟南芥种子进行杀菌消毒 10 min,使用灭菌后的双蒸水(ddH_2O)洗涤次后接种于含有不同质量浓度(0、25、50、100、300、500 $\mu\text{g/mL}$)LDHs 纳米颗粒的固体培养基中,每个培养皿接种 10 粒饱满的拟南芥种子。其中基础的拟南芥植株培养基中包含 2.2 mg/mL 的(2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺,3% 质量比的蔗糖和 10% 的植物凝胶(植物组培级)。所有组均置于 22 ℃,光照 16 h,黑暗 8 h 的人工气候箱中培养,记录种子萌发率,每个处理重复 3 次。

1.10 LDHs-DNA 的完整植株转化

经笔者前期预试验得知,LDHs 纳米片与 pAN580 质粒的最佳负载质量比为 1:3,按此比例取 1 μg 的质粒 DNA 与质量比为 1:3 的 LDHs 纳米颗粒混合,通过叶面无孔注射方式将此材料核酸复合物递送到 4 周龄的本氏烟草叶片中,于 24 ℃、光

照 16 h、黑暗 8 h 的人工气候箱中培养,共培养 4 d 后,在激光共聚焦显微镜下观察处理叶片中绿色荧光蛋白(GFP)的表达情况。每个处理重复 3 次,每个重复观察 3 个视野。

2 结果与分析

2.1 LDHs 的表征

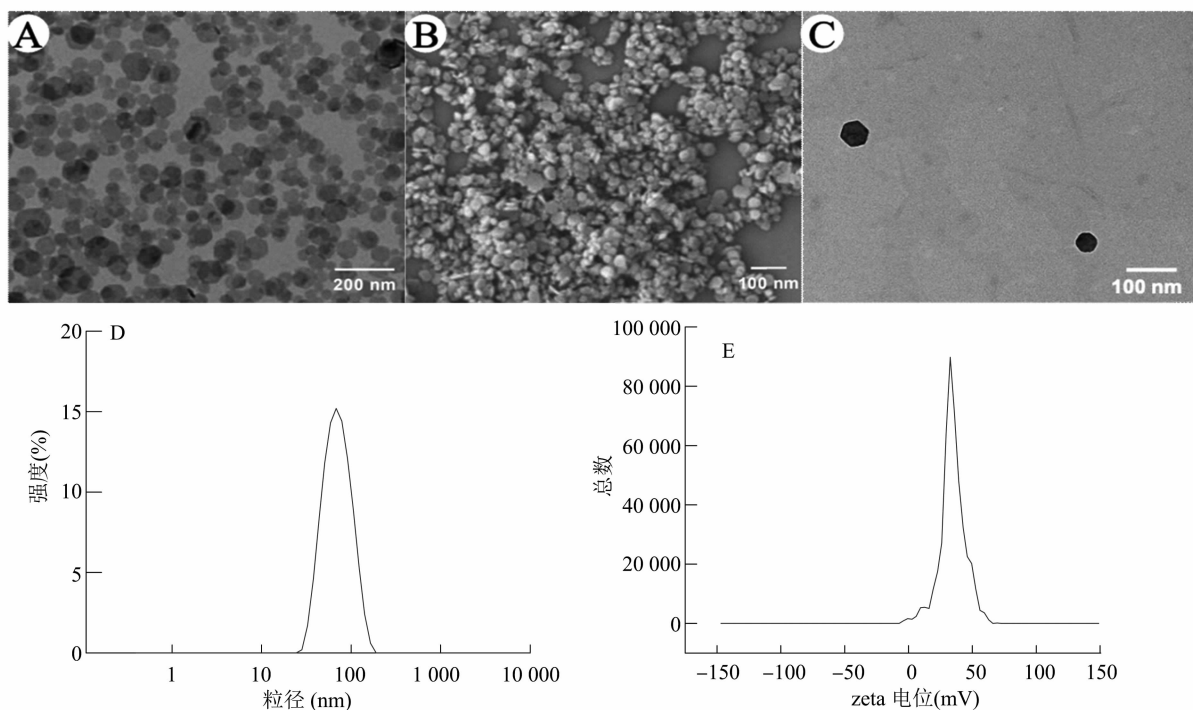
扫描电镜(SEM)图像显示,经过高速剪切法所合成的材料是较为规则的六边形层板结构,粒径约为 20~80 nm,且具与良好的分散性,符合类水滑石材料的基本特征;同时,透射电镜(TEM)图像中材料的层板结构明显,进一步的验证了上述结果。且相较于扫描电镜图像上纳米片聚集无法分辨其单层结构来看,大部分的 LDHs 材料呈现出较为清晰透彻的图像,这是因为笔者所在实验室制备的 LDHs 材料较薄,具有典型的二级结构。如图 1-D、图 1-E 所示,该材料的水合粒径为 (63.6 ± 1.8) nm, zeta 电位为 (39.8 ± 2.5) mV。同时其粒径分布强度(PDI)为 0.173(<0.300),表明制备的类水滑石材料分散性良好。

2.2 LDHs 的红外光谱分析及 XRD 衍射图谱分析

对 LDHs 采用红外光谱分析及 X 射线衍射分析确认类水滑石纳米颗粒是否制备成功。从图 2-A 可以看出,在 3498 cm^{-1} 处出现了氢氧化物层的特征宽带,峰值在 1384 cm^{-1} (水分子的弯曲振动)以及峰值在 655 cm^{-1} 处的 M—O—H 拉伸振动均符合类水滑石的红外光谱。从图 2-B 可以看出,笔者所在实验室制备的类水滑石具有明显的片层结构。在 $2\theta = 11.256^\circ$ 、 $2\theta = 22.65^\circ$ 这 2 处出现了较强的衍射峰为 α (003)、 α (006) 衍射峰,其中第 1 个峰的 d 值为 0.78 nm,接近报道的 LDHs(0.81 nm),第 2 个峰的 d 值为 0.39 nm^[25]。根据谢乐公式,(003) 衍射峰的半最大宽度(0.38°)对应 c 轴图谱中的 5.2 nm,所以每个 LDHs 纳米粒子中具有 6~7 层轻氧化物。XRD 的峰型规则,基本无杂峰出现,证明笔者所在实验室制备的类水滑石纳米材料具备规则的菱形(3R)模型。

2.3 LDHs 对 DNA 的负载和保护能力分析

为了确定 LDHs 纳米片对 pAN580 质粒 DNA(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)的负载能力,采用了几个梯度质量比的组合进行制备 LDHs-DNA 复合物,即 DNA:LDHs 质量比为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5,同时设置 2 组对照分别是单质粒 DNA 组和单纳米颗粒组,并进



A—LDHs 的 SEM 图; B—LDHs 的 TEM 图; C—LDHs 的 SEM 放大图; D—LDHs 的水合粒径; E—LDHs 的 zeta 电位

图1 LDHs 的表征

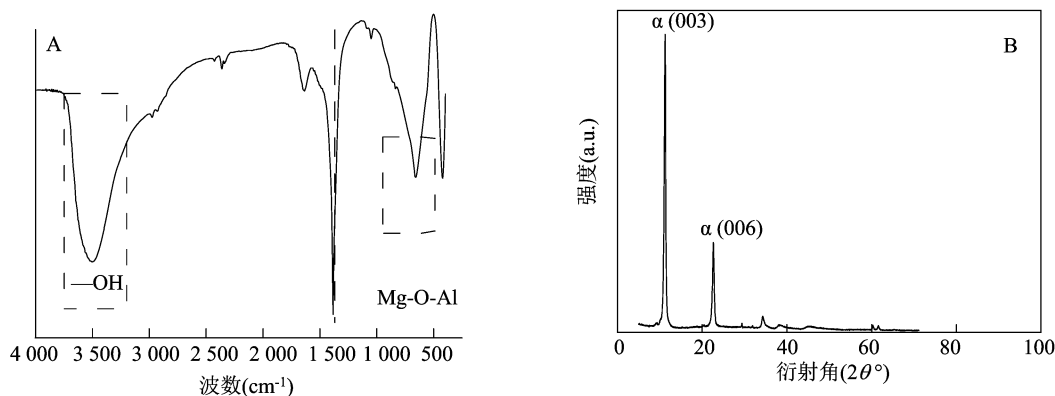


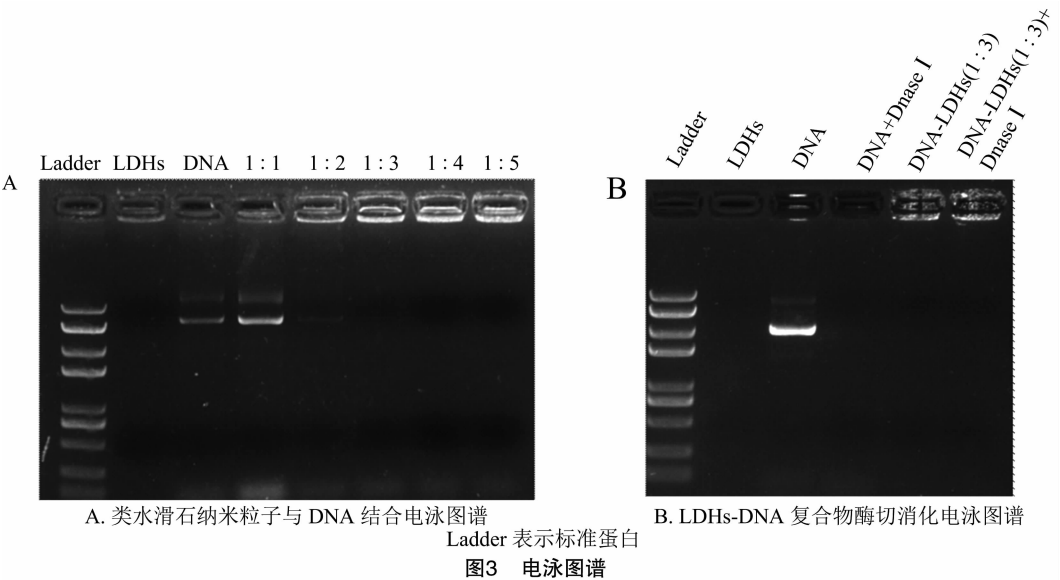
图2 LDHs 的 FT-IR 图谱(A)和 XRD 图谱(B)

行琼脂糖凝胶电泳。如图 3-A 所示,由于 LDHs - DNA 复合物的粒径增大,因此不能通过凝胶孔隙而滞留在上样孔中,在此处清晰可见有明显荧光条带。而随着 LDHs 浓度的提高,所结合的质粒 DNA 增加,游离的 DNA 逐渐减少,上样孔中的荧光强度逐渐增强直至全部质粒 DNA 被材料负载。结果表明 LDHs 可以有效负载 DNA。当质粒 DNA 与 LDHs 的质量比为 1 : 3 及以上时,LDHs - DNA 复合物全部滞留在上样孔中,泳道内对应质粒大小的位置未见任何条带,证明此时 DNA 与 LDHs 的结合已经达到饱和,为 pAN580 质粒与 LDHs 纳米颗粒的最佳结合负载比例。

将 LDHs 与 pAN580 质粒 DNA ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) 按照质量比 1 : 3 混合制备 LDHs - DNA 复合物,用 Dnase I 在 37°C 酶解消化 10 min,同时以添加 Dnase I 的等量质粒 DNA 组作为对照,并进行琼脂糖凝胶电泳试验。图 3-B 表明未添加 LDHs 的质粒 DNA 组被 Dnase I 酶完全消化,而与 LDHs - 结合的质粒 DNA 组中条带仍然保留在凝胶上样孔中,而且相比未加核酸酶的组条带亮度无明显差异,说明 LDHs 纳米基因载体能够很好地保护 DNA 免受 Dnase I 的降解。

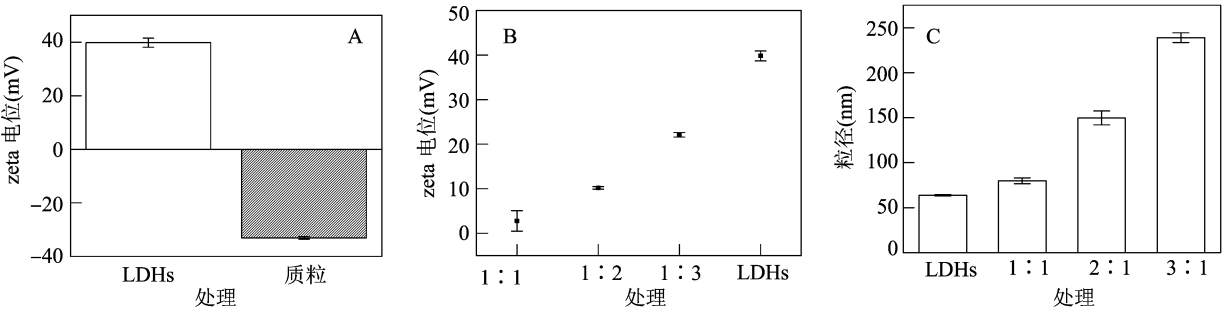
2.4 LDHs - DNA 纳米基因载体复合物的表征

粒度分布和 Zeta 电位分析是衡量纳米基因载



体性能的重要参数。zeta 电位是反应纳米颗粒在分散介质中的聚集和稳定程度的重要表征之一,即其 zeta 电位的绝对值越大,纳米颗粒之间的斥力就越大,这个纳米颗粒的分散体系就越稳定;反之,则体系越容易聚集甚至析出^[26]。同时,表面带有正电荷的纳米材料可以与携带负电荷的核酸分子上的磷酸骨架通过静电吸附的作用结合,形成纳米载体-基因复合物。载体-基因复合物在细胞膜表面的富集,可提高基因运送到胞内表达的概率,这对于

提高基因的表达量具有重要的意义^[27]。如图 4 所示,LDHs-DNA 复合物的粒径(后简称质粒)大于单材料(后简称材料)的粒径;且质粒的 zeta 电位为 $(-33.1 \pm 0.5) \text{ mV}$,材料的 zeta 电位为 $(39.8 \pm 2.5) \text{ mV}$,在材料结合了带负电的质粒 DNA 之后,LDHs-DNA 复合物的 zeta 电位随着材料结合比例的上升逐渐增加,表明 LDHs 能够有效地负载质粒 DNA,形成稳定的载体-基因复合物。



A、B—LDHs-DNA 复合物的 zeta 电位检测; C—LDHs-DNA 复合物的粒径

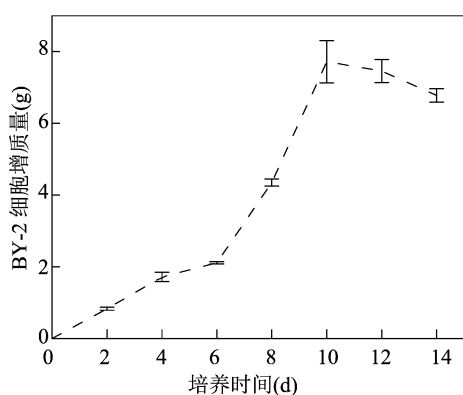
图4 LDHs-DNA 纳米基因载体复合物的表征

2.5 LDHs 对植物的毒性试验

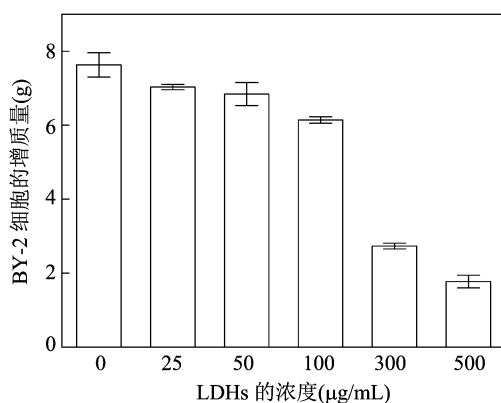
本试验应用台盼蓝染色法及 FDA 染色法检测不同浓度 LDHs 对烟草 BY-2 细胞及水稻叶鞘原生质体的细胞毒性,以确定其应用于基因递送的可行性及使用浓度。图 5-A 可以看出,其正常生长的 BY-2 细胞增质量在前 10 d 内呈指数型增长,在 10 d 时到达峰值之后逐渐下降,这符合烟草 BY-2 细胞的一般生长规律。从图 5-B 可知,随着培养基中材料浓度的增加细胞增质量逐渐减少,从

25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 过程中细胞增质量减少并无明显差异,然而当浓度继续增加时,细胞增质量出现明显降低并且在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到试验组最低值。因此在烟草植物细胞中,LDHs 的使用浓度应该不高于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

如图 6-A 所示,与未处理的对照拟南芥种子相比,在 1~2 d 时,所有组别的萌发率均维持在 60%~80%,无明显差异,证明不同浓度的 LDHs 对拟南芥种子的萌发均无显著毒性,即使是浓度高达



A. 正常培养基中 BY-2 细胞增殖质量

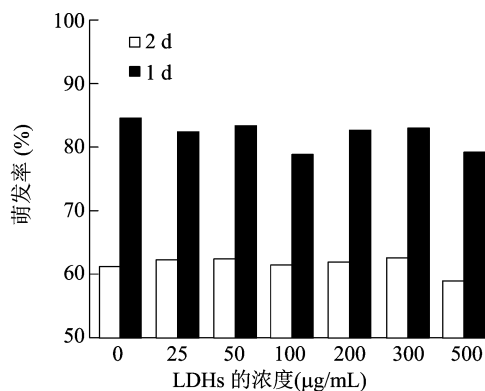


B. 添加不同浓度 LDHs 的 10 d 后 BY-2 细胞增殖质量

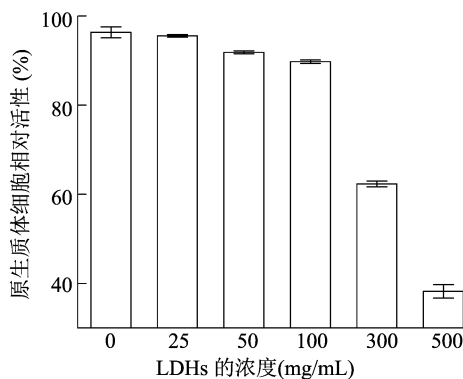
图5 LDHs 对烟草 BY-2 细胞的毒性

100 $\mu\text{g/mL}$ 。如图 6 - B 所示,通过血球计数板计数细胞数估算水稻原生质体的活力,对照组的原生质体细胞保持较高的活力水平,随着培养基中材料浓度的增加原生质体的个数逐渐减少,从 25 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 100 $\mu\text{g/mL}$ 过程中细胞个数减少量并无显

著差异,然而当浓度继续增加时,细胞个数出现明显降低(图 6 - B)。因此在水稻叶鞘原生质体中,LDHs 的使用浓度应该不高于 100 $\mu\text{g/mL}$ 。综上所述可知,LDHs 在植物中的使用浓度应该保持在不高于 100 $\mu\text{g/mL}$ 的水平。



A. 添加不同浓度 LDHs 的培养基中拟南芥种子萌发率



B. 不同浓度 LDHs 对水稻原生质体的影响

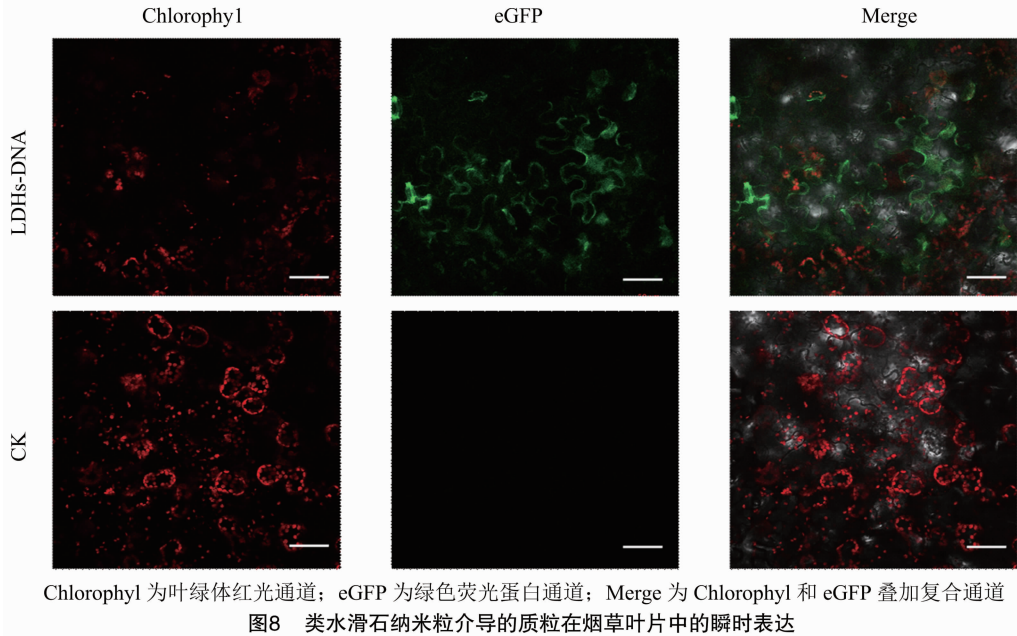
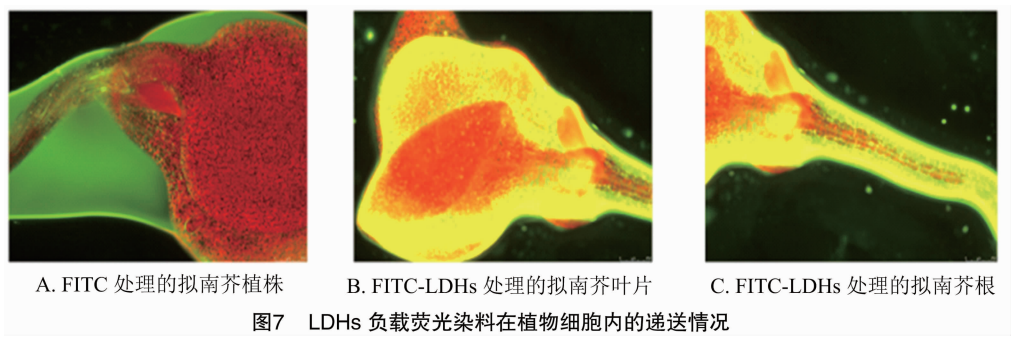
图6 LDHs 对拟南芥种子萌发和水稻原生质体的影响

2.7 LDHs 负载荧光染料进入植物细胞

植物细胞壁是由纤维素、果胶与半纤维素构成,具有一定的排阻效应。细胞壁是防止外界分子进入植物细胞的天然屏障之一。为了探究 LDHs 的生物分子递送能力,本试验选取常用的活体染料异硫氰酸荧光素 (FITC) 来测试 LDHs 在拟南芥植株上的分子递送能力。图 7 - A 可知,单荧光染料组中,大量的荧光染料分子富集到细胞外,在植物细胞外有明显的绿色荧光和植物体叶绿素自发的红色荧光未有重叠,证明单荧光染料很难进入到植物细胞中。由图 7 - B、图 7 - C 可以观察到,拟南芥植株外有明显的绿色荧光(与叶绿体自发红光合并后呈现出黄色光),进一步验证了 LDHs 纳米材料可以快速有效地运载外部荧光染料分子进入植物细胞。

2.8 LDHs/DNA 烟草植株的转化

选取质量比为 3 : 1 的 LDHs/DNA 的纳米材料 - 基因复合物浸润 4 周龄的本氏烟草植株叶片,培养 96 h 后置于激光共聚焦显微镜下观察。试验组中清晰可见有绿色荧光蛋白信号,而野生型对照组中的烟草叶片中无绿色荧光蛋白的表达。结果说明,LDHs 能够有效保护并负载质粒 DNA 通过植物细胞壁进入完整烟草植株叶片细胞内。用 Image J 图像处理软件进行荧光强度的定量测算,结果如图 8 所示,LDHs 纳米载体负载 pAN580 质粒处理的试验组的 GFP 平均荧光强度约为野生型对照组的 56 倍。证明 LDHs 可以有效负载外源质粒 DNA 并将其递送入完整的成熟植物体中表达,为植物的遗传转化提供了新的思路。



3 讨论与结论

纳米材料通过其独特的物理性质和化学性质,在现阶段的研究中纳米基因载体成为最热门的非病毒基因递送载体之一。在众多纳米材料中,类水滑石材料由于具有良好的生物相容性、制备简单、基因装载量大、转化效率高等多种优势,尤其在生物分子的负载与保护方面表现出的突出优势而成为植物纳米基因载体的优势材料之一。Desigaux 等通过自组装和合成及离子交换合成并得到了稳定的类水滑石-DNA 的复合物,通过体外转染试验证明该复合物可以进入 HeLa 细胞中并实现了表达^[28]。本试验采用高速剪切的方法合成了硝酸根插层的 LDHs 作为植物基因递送载体,其表面携带有高密度的正电荷,因此可以通过静电接枝的方法与表面带有负电荷的外源质粒 DNA 进行有效装载和吸附。而合适的基因运载体不仅要具有大的比表面积、有效负载外源基因,更重要的是要在细胞内保

护所携带的基因免受多种酶的水解,才能提高基因的表达效率^[29]。植物细胞内部环境复杂,含有多种水解酶,当基因运载体负载外源基因进入植物细胞后,如果载体材料不能有效地保护核酸分子,按照细胞的运输机制,那么外源的核酸分子将会大部分会被细胞内的溶酶体的水解作用等机制水解消化,从而大大降低基因的表达效率。因此纳米基因载体系统对于基因的保护作用是外源基因成功表达的必要条件之一。由本试验的琼脂糖凝胶电泳结果可知,LDHs 可以有效负载并保护质粒 DNA 免受外界核酸酶等物质的水解消化作用,可以推测类水滑石材料表面具有大量的正电荷,在与核酸分子磷酸骨架上的负电荷通过静电接枝而紧密结合的同时,导致 DNA 的构象发生改变,将外界的核酸酶等物质与核酸分子隔绝开来,可以保护其在植物细胞内免受各种水解消化作用,有效提高基因的表达效率。试验中发现,合成的 LDHs 材料可以直接转化外界核酸分子进入完整的植物细胞中,并检测到了

目标基因绿色荧光蛋白的表达。这说明,LDHs 可以负载外源基因跨过植物细胞壁的屏障运输进入完整的细胞中表达。证明笔者所在实验室合成的类水滑石材料是一种优越的植物纳米基因载体,在转基因植物的研究上展现出了一定的潜力,为植物稳定遗传与性状改良提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Abdallah N A, Prakash C S, McHughen A G. Genome editing for crop improvement: challenges and opportunities [J]. GM Crops Food, 2015, 6(4): 183–205.
- [2] Azencott H R, Peter G F, Prausnitz M R. Influence of the cell wall on intracellular delivery to algal cells by electroporation and sonication [J]. Ultrasound in Medicine & Biology, 2007, 33(11): 1805–1817.
- [3] Bevan M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation [J]. Nucleic Acids Research, 1984, 12(22): 8711–8721.
- [4] Liu G, Campbell B C, Godwin L D. Sorghum genetic transformation by particle bombardment [J]. Methods in Molecular Biology, 2014, 1099: 219–234.
- [5] 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]. Nature Nanotechnology, 2019, 14(5): 447–455.
- [6] 孔倩倩, 李志辉, 王 琼, 等. 纳米基因载体在植物遗传转化中的应用 [J]. 生物技术通报, 2010, 215(6): 6–12.
- [7] Mout R, Ray M, Yesilbag Tonga G Y, et al. Direct cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 – ribonucleoprotein for efficient gene editing [J]. ACS Nano, 2017, 11(3): 2452–2458.
- [8] Zhang H, Goh N S, Wang J W, et al. Nanoparticle cellular internalization is not required for RNA delivery to mature plant leaves [J]. Nature Nanotechnology, 2022, 17(2): 197–205.
- [9] Schwartz S H, Hendrix B, Hoffer P H, et al. Carbon dots for efficient siRNA delivery and gene silencing in plants [J]. Plant Physiology, 2020, 184(2): 647–657.
- [10] Swyer T W, Strom J, Larson D F. Nanoparticle oxygen delivery to the ischemic heart [J]. Perfusion, 2014, 29(6): 539–543.
- [11] Zhang H, Demirer G S, Zhang H L, et al. DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(15): 7543–7548.
- [12] Cunningham F J, Goh N S, Demirer G S, et al. Nanoparticle – mediated delivery towards advancing plant genetic engineering [J]. Trends Biotechnology, 2018, 36(9): 882–897.
- [13] An Z S, Cao B, Zhang J Z, et al. Efficient transient expression of plasmid DNA using poly [2 – (N, N – dimethylamino) ethyl methacrylate] in plant cells [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 805996.
- [14] Zhao X, Meng Z G, Wang Y, et al. Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers [J]. Nature Plants, 2017, 3(12): 956–964.
- [15] Chang F P, Kuang L Y, Huang C A, et al. A simple plant gene delivery system using mesoporous silica nanoparticles as carriers [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2013, 1(39): 5279–5287.
- [16] Demirer G S, Zhang H, Matos J L, et al. High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants [J]. Nature Nanotechnology, 2019, 14(5): 456–464.
- [17] Mitter N, Worrall E A, Robinson K E, et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses [J]. Nature Plants, 2017, 3: 16207.
- [18] Bao W L, Wan Y L, Baluška F. Nanosheets for delivery of biomolecules into plant cells [J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(6): 445–447.
- [19] Martin – Ortigosa S, Peterson D J, Valenstein J S, et al. Mesoporous silica nanoparticle – mediated intracellular cre protein delivery for maize genome editing via *loxP* site excision [J]. Plant Physiology, 2014, 164(2): 537–547.
- [20] Zolghadrnasab M, Mousavi A, Farmany A, et al. Ultrasound – mediated gene delivery into suspended plant cells using polyethyleneimine – coated mesoporous silica nanoparticles [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 73: 105507.
- [21] Khan A I, Lei L, Norquist A J, et al. Intercalation and controlled release of pharmaceutically active compounds from a layered double hydroxide [J]. Chemical Communications, 2001, 37(22): 2342–2343.
- [22] Li B, Gu Z, Kurniawan N, et al. Manganese – based layered double hydroxide nanoparticles as a T₁ – MRI contrast agent with ultrasensitive pH response and high relaxivity [J]. Advanced Materials, 2017, 29: 1700373.
- [23] Mitter N, Worrall E A, Robinson K E, et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses [J]. Nature Plants, 2017, 3(2): 16207.
- [24] Bao W L, Wang J Y, Wang Q, et al. Layered double hydroxide nanotransporter for molecule delivery to intact plant cells [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 26738.
- [25] Karami Z, Ganjali M R, Dehaghani M Z, et al. Kinetics of cross – linking reaction of epoxy resin with hydroxyapatite – functionalized layered double hydroxides [J]. Polymers, 2020, 12(5): 1157.
- [26] Zhang Y, Yang M, Portney N G, et al. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells [J]. Biomedical Microdevices, 2008, 10(2): 321–328.
- [27] Singh R, Kostarelos K. Designer adenoviruses for nanomedicine and nanodiagnostics [J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(4): 220–229.
- [28] Desgaulx L, Belkacem M B, Richard P, et al. Self – assembly and characterization of layered double hydroxide/DNA hybrids [J]. Nano Letters, 2006, 6(2): 199–204.
- [29] Rhaese S, von Briesen H, Rübsamen – Waigmann H, et al. Human serum albumin – polyethylenimine nanoparticles for gene delivery [J]. Journal of Controlled Release, 2003, 92(1/2): 199–208.