



## 纳米材料对 DNA 热变性行为的影响

张治洲, 季巧丽, 崔宝宁

(泰达 BIO-X 系统生物技术研究中心, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 在基因操作过程中经常需要对脱氧核糖核酸(DNA)进行高温处理,如在聚合酶链式反应 PCR 操作中就需要对模板 DNA 进行升降温的操作,因此,DNA 的热变性行为是关系到一些基因操作效率高低的关键.琼脂糖凝胶电泳实验显示,1 972 bp 的短链  $\lambda$  DNA 高温处理后在 1 000 bp 左右处出现额外一条下带,而且此条带经过 37 °C 处理数小时即可恢复到 1 972 bp,不像 48 000 bp 长链  $\lambda$  DNA 那样在高温处理后出现弥散现象.另外,显著添加不同的纳米材料对下带出现的温度有明显的影 响,意味着添加适量纳米材料可以改变 DNA 分子结构对温度的敏感性.所发现的下带可能具有尚未报道过的特殊结构.

**关键词:** 纳米材料; DNA; 高温处理; 热变性

中图分类号: Q523 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2009)01-0001-05

## Influence of Nanomaterials on Heat-Induced Denaturation Process of DNA

ZHANG Zhi-zhou, JI Qiao-li, CUI Bao-ning

(Teda Bio-X Center for Systems Biotechnology, College of Food Engineering and Biotechnology,  
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457)

**Abstract:** In the process of genetic manipulations, DNA is often treated by high temperatures, as in the polymerase chain reaction (PCR) where DNA is subjected to big temperature fluctuations. Therefore the heat-induced denaturation process is closely related with efficiencies of DNA manipulations. When a 1 972 bp short  $\lambda$  DNA fragment was treated by agarose gel electrophoresis at high temperature, a lower band with the size of about 1 000 bp repeatedly appeared; Moreover, the lower band can be resumed to 1 972 bp after a few hours incubation at 37 °C, while the 48 000 bp long  $\lambda$  DNA only demonstrated dispersion after the treatment of high temperature. In this study, it is found that different nanomaterials differentially influenced the heat-induced denaturation process of DNA by changing the behavior of the lower band that might possess a specific structure never reported. The results suggest that nanomaterials change the temperature sensitivity of DNA structure.

**Keywords:** nanomaterials; DNA; high-temperature treatment; heat-induced denaturation

纳米材料是自 20 世纪 80 年代初才发展起来的新兴研究领域,由于其具有一系列优异的力、电、光、磁和化学等独特性质,已经受到了国内外广泛的关注.近几十年来,随着纳米技术的迅猛发展,纳米材料被广泛应用到各个领域,其中纳米材料与 DNA 的结合作用,例如纳米金与 DNA 的相互作用<sup>[1-2]</sup>、碳纳米粉、碳纳米管与 DNA 结合的相关研究都有报道<sup>[3-5]</sup>,但是纳米材料对 DNA 热变性行为的影响国内外还报道不多<sup>[6-8]</sup>.本文试图探索不同纳米材料对 DNA 热变

性行为的影响,这对深入认识纳米材料增进基因扩增技术的机制非常必要.

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要材料

$\lambda$  DNA (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )、Lambda DNA/Hind III Marker、DL2000 Marker、琼脂糖、溴化乙锭,加拿大 BBI 公司; Taq 酶 (5U/ $\mu\text{L}$ )、10  $\times$  PCR buffer、dNTP

收稿日期: 2008-09-08; 修回日期: 2008-11-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30570401)

作者简介: 张治洲 (1967—), 男, 安徽阜阳人, 教授.

(2.5 mmol/L)、 $Mg^{2+}$  (25 mmol/L)、引物,北京博迈科技发展有限公司;无色纳米银胶体 (< 10 nm),上海沪正纳米科技有限公司;胶体金 (10 nm)、碳纳米粉、单壁碳纳米管、多壁碳纳米管, Sigma 公司;  $\Phi$  X174 单链 DNA、Mlu I 酶, NEB 公司;自制超纯水.

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 制备纳米颗粒悬浮液

纳米材料胶体可以直接使用. 其他纳米材料悬浮液制备方法:称取 10 mg 纳米材料于灭菌的 1.5 mL 离心管中,紫外灯照射 30 min,随后加入 990  $\mu$ L 灭菌超纯水. 盖盖后,放置到 KQ-250DB 超声波清洗机 200 W 超声 2~3 h,最终的超声时间随悬浮状态确定,此方法配置的为 10 mg/mL 的纳米材料悬浮液.

### 1.2.2 制备 1 972 bp DNA

选取  $\lambda$  DNA 作为模板,扩增 1 972 bp 的 DNA. 上游引物是 5'-GGCGTTTCCGTTCTTCTT-3', 下游引物是 5'-GCGTCTGTTCATCGTCGTG-3'. PCR 体系 (25  $\mu$ L): 2.5  $\mu$ L 10 $\times$  PCR Buffer, 2.5  $\mu$ L dNTP (2.5 mmol/L), 上、下游引物 (2  $\mu$ mol/L) 各 2.5  $\mu$ L, 0.5  $\mu$ L  $\lambda$  DNA (0.1 ng/ $\mu$ L), 1.5  $\mu$ L  $Mg^{2+}$  (25 mmol/L), 0.5  $\mu$ L Taq 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L), 剩余部分的体积用灭菌的超纯水 Molecular/1015c 型超纯水机补充. 按以下循环条件在 BIO-RAD MyCycler 170-9703 型基因扩增仪上进行 PCR 循环:92 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 30 个循环 (92 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min); 72 $^{\circ}$ C 完全延伸 10 min. PCR 产物检测方法为琼脂糖凝胶电泳 (含染色剂溴化乙锭): 1 $\times$  TAE 电泳缓冲液; 琼脂糖浓度 0.8%; 6 $\times$  Loading Buffer; 4 V/cm 电压. 电泳结束后用 BIO-RAD 170-8026 型凝胶成像仪成像并分析.

### 1.2.3 DNA 热变性情况的表征方法

实验中选择 48 000 bp、1 972 bp 的  $\lambda$  DNA 和非金属纳米材料:碳纳米粉 (CNP)、单壁碳纳米管 (SWCNTs)、多壁碳纳米管 (MWCNTs) 以及金属纳米材料:无色纳米银 (AG)、胶体金 (AU) 作为实验对象. 将不同的纳米材料按照浓度梯度要求,分别与 DNA 混合后,按照实验设计的温度梯度在 DK-8D 电热恒温水浴锅中加热处理 10 min,然后用琼脂糖凝胶电泳检测结果. 由于温度处理使 DNA 分子出现不同的条带,不同温度下不同纳米材料处理的效应可以直接在凝胶电泳上观察.

### 1.2.4 酶切实验

选用 20  $\mu$ L 酶切体系:2  $\mu$ L 10 $\times$  NEBuffer 3, 0.5  $\mu$ L Mlu I 酶,适量体积 DNA,剩余部分的体积用

灭菌的超纯水补充. 依据实验要求选择 DNA 的种类及浓度.

## 2 结果与分析

### 2.1 不同纳米材料对 $\lambda$ DNA 热变性行为的影响

#### 2.1.1 不同纳米材料对 48 000 bp $\lambda$ DNA 热变性的影响

图 1 所示为纳米材料对 48 000 bp  $\lambda$  DNA 热变性影响的琼脂糖凝胶电泳检测结果.

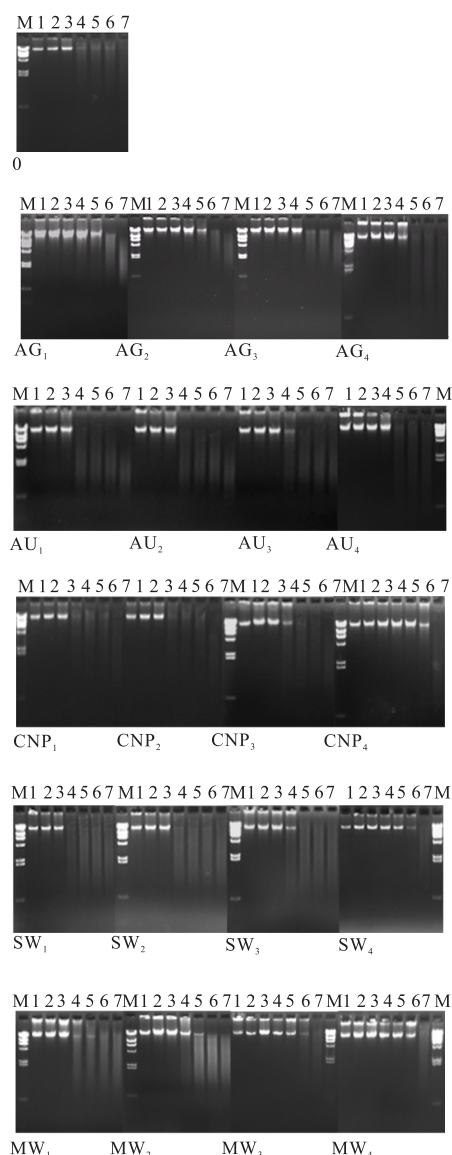


图 1 不同纳米材料对 48 000 bp  $\lambda$  DNA 热变性行为的影响  
Fig.1 Influence of different nanomaterials on heat-induced denaturation process of 48 000 bp  $\lambda$  DNA

图中编码 1—7 的热处理温度依次为实验设计的温度 (表 1). M 为分子质量标记 Lambda DNA/Hind

III). (0) 为未添加纳米材料; ( $AG_1/AG_2/AG_3/AG_4$ ) 为无色纳米银; ( $AU_1/AU_2/AU_3/AU_4$ ) 为胶体金; ( $CNP_1/CNP_2/CNP_3/CNP_4$ ) 为碳纳米粉; ( $SW_1/SW_2/SW_3/SW_4$ ) 为单壁碳纳米管; ( $MW_1/MW_2/MW_3/MW_4$ ) 为多壁碳纳米管. 从图中可见, 未添加纳米材料的  $\lambda$  DNA, 60 °C 开始发生弥散, 但是添加不同的纳米材料后, DNA 变性的温度有了很明显的变化. 如添加无色纳米银 0.1  $\mu$ L 时, DNA 弥散的温度就上升到 70 ~ 80 °C. 添加其他的纳米材料, DNA 的热变性温度都有相应的变化, 它们有一个共同的趋势, 也就是不同的纳米材料都有延缓 DNA 热变性的作用, 使其发生弥散的温度升高, 但是具体的作用强弱情况有较大的不同.

### 2.1.2 不同纳米材料对 1 972 bp $\lambda$ DNA 热变性的影响

不同纳米材料对 1 972 bp  $\lambda$  DNA 热变性的影响如图 2 所示.

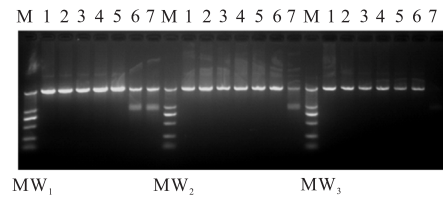
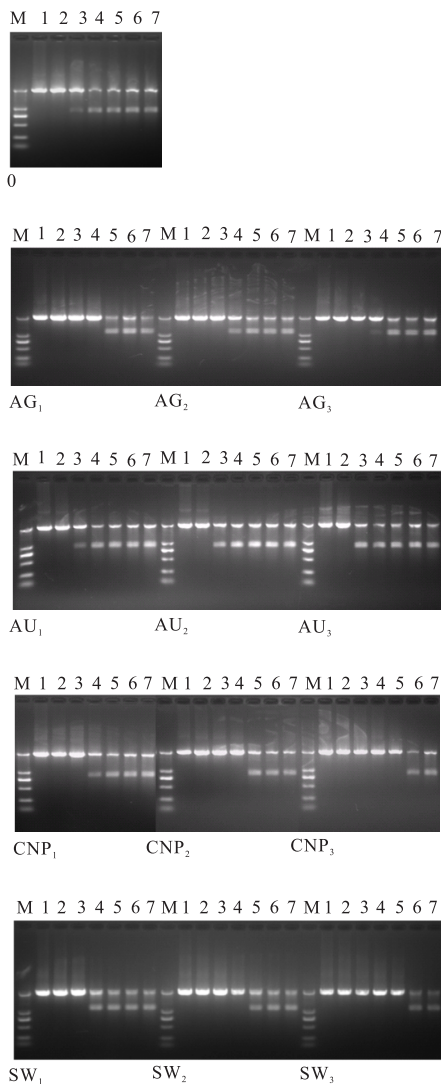


图 2 不同纳米材料对 1 972 bp 的  $\lambda$  DNA 热变性行为的影响  
Fig.2 Influence of different nanomaterials on heat-induced denaturation process of 1 972 bp  $\lambda$  DNA

图中编码 1—7 的热处理温度依次为实验设计的温度(表 1). M 为 DNA Marker (DL2000). (0) 为未添加纳米材料; ( $AG_1/AG_2/AG_3$ ) 为无色纳米银; ( $AU_1/AU_2/AU_3$ ) 为胶体金; ( $CNP_1/CNP_2/CNP_3$ ) 为碳纳米粉; ( $SW_1/SW_2/SW_3$ ) 为单壁碳纳米管; ( $MW_1/MW_2/MW_3$ ) 为多壁碳纳米管. 从图 2 可见, 未添加纳米材料的 1 972 bp  $\lambda$  DNA, 50 °C 开始发生“变化”; 但是添加不同的纳米材料后, 这个变化的温度有了明显不同. 同样可以看到, 不同的纳米材料对 1 972 bp 的 DNA 的热变性也有“保护”作用, 但是具体的作用的强弱情况也随着纳米材料的不同有所不同. 实验中还发现了特别的现象, 即温度处理后的 1 972 bp 的 DNA, 不是发生弥散, 而是在 1 000 bp 处出现另一条带(此后提到此条带以“下带”代指).

### 2.1.3 纳米材料对不同长度 DNA 热变性影响的比较

表 1 是将上述实验结果的归类分析, 比较后可知:

#### (1) 非金属纳米材料

CNP、SWCNTs 对  $\lambda$  DNA 和 1 970 bp DNA 热变性影响的实验结果是完全相同的; MWCNTs 的虽然不是和它们完全相同, 但是趋势是相同的, 而且相比较前两种, MWCNTs 的“保护效果”对于  $\lambda$  DNA 和 1 972 bp DNA 都是更强的, 即本实验中设计的非金属纳米材料都是对 DNA 起到保护作用的, 而且随着添加量的增加, 这种保护作用更强(所加的非金属纳米材料过多的话, 电泳时就无法看到包括主带在内的条带).

#### (2) 金属纳米材料

AG/AU 对于  $\lambda$  DNA 的热变性影响作用不同; 对于 1 972 bp DNA, 随着所加的 AG、AU 的浓度变化, 作用效果没有明显的变化, 但是无色纳米银对两种 DNA 都是存在一个较适合的浓度, 即对 DNA 的保护作用是随着所加入的浓度的增加, 先升高再降低.

从总体上来看, 添加合适浓度的纳米材料对于  $\lambda$  DNA 和 1 972 bp DNA 都是起到保护作用的.

表 1 不同纳米材料对不同长度 λ DNA 热变性影响的比较

Tab.1 Comparison of the influence of different nanomaterials on heat-induced denaturation process of λ DNA

纳米材料	添加量/μL	Lambda DNA (√为主带变暗或消失)							添加量/μL	1 972 bp DNA (√为主带变暗或消失, 1 000 bp 处出现条带)						
		1	2	3	4	5	6	7		1	2	3	4	5	6	7
空白对照					√	√	√	√				√	√	√	√	√
CNP	0.1				√	√	√	√	1				√	√	√	√
	0.5				√	√	√	√	3					√	√	√
	1						√	√	5						√	√
	5															√
SWCNTs	0.1				√	√	√	√	1				√	√	√	√
	0.5				√	√	√	√	3					√	√	√
	1						√	√	5						√	√
	5															√
MWCNTs	0.1							√	1						√	√
	0.5							√	3							√
	1								5							√
	5															√
Colorless AG	0.1							√	1					√	√	√
	0.5							√	3			√	√	√	√	√
	1						√	√	5			√	√	√	√	√
	5						√	√				√	√	√	√	√
AU	0.1				√	√	√	√	1			√	√	√	√	√
	1				√	√	√	√	3			√	√	√	√	√
	5					√	√	√	5			√	√	√	√	√
	10					√	√	√				√	√	√	√	√

注：添加量是指每 30 μL DNA 中添加的纳米材料量；Lambda DNA 实验中编码 1—7 依次为 25、37、50、60、70、80、90℃；1 972 bp DNA 实验中编码 1—7 依次为 25、65、70、75、80、85、90℃。

## 2.2 1 972 bp 的 λ DNA 热处理时出现“下带”的验证实验

### 2.2.1 “下带”出现的一般实验条件

如图 3 所示,热处理所得到的长度为 1 000 bp 的“下带”DNA,经过 37℃处理后,可以部分或全部恢复原来的长度.图中 M 为 DL2000 分子质量标记;样品 1 为 1 972 bp λ DNA;2 为 λ DNA 经 90℃温度处理 10 min 后立即放冰上 20 min,然后放 37℃ 2 h;3 为 1 972 bp λ DNA 90℃温度处理 10 min.

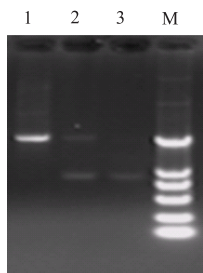


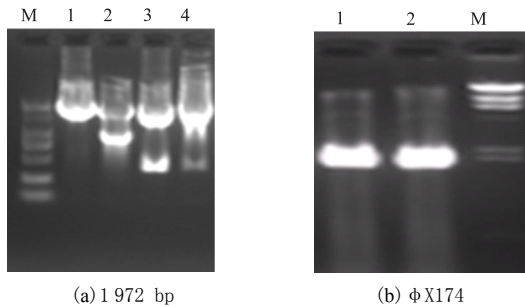
图 3 1 972 bp λ DNA 的热变性实验中出现“下带”

Fig.3 Experimental validation of the lower band which appears in the heat-induced denaturation of 1 972 bp DNA

### 2.2.2 酶切实验

DNA 是双链互补螺旋结构,用限制性内切酶可以定点切割 DNA 片断.如果内切酶识别位点的序列或空间结构发生改变,酶切效率将受到影响.如图 4(a),选用 4℃酶切过夜,以避免较高温度使下带自动恢复原来的长度.图中 M 为 DL2000 标记.样品 1 为 1 972 bp DNA;2 为 1 972 bp DNA 经过 90℃ 10 min 处理;3 为 Mlu I 酶 4℃酶切 1 972 bp DNA 过夜;4 为 Mlu I 酶 4℃过夜酶切同 2 进行相同处理后的 DNA.2 号条带表明 1 000 bp 的下带在 4℃下过夜放置后没有明显变化;由 3、4 号可以看出,经过高温处理后的此段 DNA 与未经过任何处理的此段 DNA 都可以被酶切,且 Mlu I 酶(酶切位点为 408/412)酶切后的 1 000 bp 的下带消失,但是 4 号条带表明下带的存在降低了酶切的速度.Φ X174 单链 DNA 有 Mlu I 酶的酶切位点,所以用此酶对 Φ X174 单链 DNA 进行酶切.图 4(b)中 M 为 DL2000 标记.样品 1 为 Φ X174 单链 DNA;2 为 Mlu I 酶酶切 Φ X174 单链 DNA.结果表明,Φ X174 单链 DNA 不能被酶切.而由图 4(a)可知 1 000 bp 下带可以被酶

切,因此它不是单链 DNA 或纯粹的单链 DNA,但是该下带一定也不是温度处理前的完整双链结构。



(a) 1 972 bp

(b)  $\phi$ X174

图4 Mlu I酶切处理后的DNA

Fig.4 Digestion of DNA with Mlu I

### 2.3 讨论

48 000 bp  $\lambda$  DNA 添加纳米材料(适量),会使DNA的变性温度升高,说明纳米材料对DNA的变性有延缓作用;非金属的纳米材料较金属系列的纳米材料的保护作用更强. 1 972 bp  $\lambda$  DNA: 对于短链的DNA,纳米材料的作用就较长链(48 000 bp)DNA有所不同,非金属、金属的纳米材料对DNA都有保护作用,但是它们保护作用又有很大的不同. 1 972 bp的DNA经过一定温度处理后的变性,经过电泳实验发现不是弥散而是在1 000 bp处出现条带. 此“下带”经过酶切实验证明不是单链,而且温度处理和酶切实验后的琼脂糖电泳结果表明,它可以恢复原来位置,并且经过高温处理的以“下带”形式存在的DNA的酶切结果,与未进行任何处理的DNA结果相同. 因此,“下带”DNA不可能发生如断裂、碱基重排等的变化,可能是一种介于完全双链与完全单链之间的“过渡”形式,随着条件的不同呈现1 972 bp DNA的形式或“下带”的形式,因此推测“下带”的可能结构如图5.

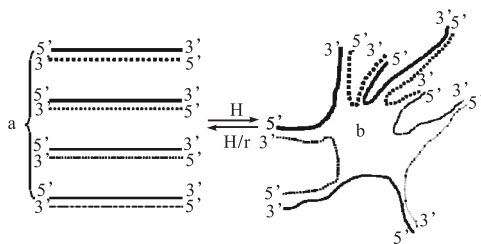


图5 1 972 bp DNA 热处理后出现的下带结构模拟示意图

Fig.5 Aschematic drawing of possible structures of the lower band

图5中(a)为1 972 bp DNA;(b)为下带DNA.其中H代表温度处理,r代表酶切作用.图5(b)可能只是下带具有的结构之一.原子力显微镜观察结果也初步支持该推测.添加不同的纳米材料对下带出现的温

度有明显的影响.这意味着添加适量纳米材料可以改变DNA分子结构对温度的敏感性.在温度升高的过程中纳米材料在大部分情况下阻碍图5(b)的出现,表明纳米材料可以在一定程度上稳定双链DNA的结构.

### 3 结 语

天然的细胞中与DNA相互作用的分子中包含了一批纳米级别的分子复合物,这些天然的相互作用与体外的纳米材料结合DNA<sup>[3]</sup>一定有所不同.另外,纳米材料如果能够影响DNA的结构,会带来潜在的生物安全问题.

在 $\lambda$  DNA中添加不同的纳米材料对DNA热变性的影响是显而易见的.对于不同长度的DNA,适量的纳米材料有“保护”作用,延缓其变性的发生,但是这些保护作用还不是纳米材料增强PCR效果的原因,还有待研究1 972 bp的 $\lambda$  DNA在温度处理后出现的“下带”的结构.

### 参考文献:

- [1] Haya M A. Colloidal Gold Principal Methods and Applications[M]. San Diego:Academy Press,1989:23.
- [2] 朱红平,米丽娟,陈仕谋,等. 胶体金和 Taq DNA 聚合酶的相互作用研究[J]. 中国化学,2007,25(09):1233-1237.
- [3] Zhang ZZ,Wang MC,An HJ. An aqueous suspension of carbon nanopowder enhances the efficiency of a polymerase chain reaction[J]. Nanotechnology,2007,18(355706).
- [4] Zheng M,Jagota A,Semke E D,et al. DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes[J]. Nature Material,2003,2:338-342.
- [5] Zhao W,Gao Y,Kandadai SA,et al. DNA polymerization on gold nanoparticles through rolling circle amplification:towards novel scaffolds for three-dimensional periodic nanoassemblies[J]. Angew Chem,2006,45:2409-2413.
- [6] 吴永宏,肖明芳,吕浩,等. 核酸酶 P1 催化水解热变性 DNA 的研究[J]. 生物加工过程,2005,3(2):53-57.
- [7] Prummer M,Hubner C G,Sick B,et al. Single-molecule identification by spectrally and time-resolved fluorescence detection[J]. Anal Chem,2000,72(3):443-447.
- [8] 苏界殊,龙云飞,李维. 罗丹明 S 与热变性 DNA 作用的共振光散射光谱研究及其应用[J]. 理化检验:化学分册,2007,43(7):594-596.