

聚乙烯亚胺-DNA复合物的形成和聚集行为研究

卢 韵, 姚 静, 周建平*, 王 伟, 邓祖媛, 关丽叶

(中国药科大学药剂学教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 是一种优良的非病毒基因传输载体材料, 本文对 PEI/DNA 复合物粒子的形成机制进行了初步探讨, 电泳阻滞实验和紫外测定实验表明, 复合物的形成过程中存在着某种过渡状态即珠串样结构, 透射电镜的结果提供了相应的例证。此外通过离子强度实验, 作者认为在 PEI 与 DNA 的复合过程尽管以静电作用力为主要作用力, 同时也可能存在着其他类型的非静电作用力。PEI/DNA 复合物粒子的表面电荷随着 N/P 的增加逐步增加, 但由于 DNA 的分子质量较大, 在 N/P 为 8 和 12 时表面电荷的绝对值较小, 容易聚集成葡萄串样聚集体, 离子强度实验表明该聚集过程的支配作用力可能是疏水作用力。PEI/DNA 复合物在 N/P 为 12 时的细胞转染效果与阳性对照组相当, 表明聚集的 PEI/DNA 复合物也具有一定的细胞转染能力。

关键词: PEI/DNA 复合物; 过渡态; 聚集; 静电作用力; 疏水作用力; 转染

中图分类号: R943.4

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 06-0667-07

Formation and aggregation behavior of polyethyleneimine-DNA complexes

LU Yun, YAO Jing, ZHOU Jian-ping*, WANG Wei, DENG Zu-yuan, GUAN Li-ye

(Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: *In vitro* gene delivery, polyethyleneimine (PEI) has been described as one of the most efficient nonviral vector. Herein the formation mechanism of PEI/DNA complexes is elucidated. The transition phase of “bead-on-string” structure in the formation of complexes was supposed to exist through spectroscopy, electrophoresis and transmission electron microscopy (TEM) technology. The construction of PEI/DNA complexes is related closely to the characteristics of PEI and DNA plasmid. As well as the dominant electrostatic effects, the nonelectrostatic interactions were thought to be partially responsible for the presence of PEI/DNA complexes even in the high ionic strength. The surface charge of complexes particles increased with the N/P ratio, but the absolute value of ζ potential was lower at the N/P ratio of 8 and 12, perhaps attributed to the use of larger DNA plasmid. As a result, the repulsion between particles was decreased and prone to aggregate to the structure like a clustered grape-string in the solution. Interestingly, contrast to the formation behavior of complexes, the PEI/DNA complexes aggregated primarily due to hydrophobic interactions while electrostatic attractions play a little role in the complexes particles aggregation in different concentrations of salt solutions. Comparable transfection efficiency in HepG2 cells was observed for the Lipofectamine2000 and PEI/DNA complexes at the N/P ratio of 12, and showed that larger or aggregatable complexes could transfet the cells in some different mechanisms.

Key words: PEI/DNA complex; transition phase; aggregation; electrostatic interaction; hydrophobic interaction; transfection

收稿日期: 2008-12-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672548).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271272, E-mail: zhoupj@126.com

基因治疗是最终解决因基因变异所引发疾病的首选策略^[1]。在基因治疗的具体实施过程中, 基因传输载体的选择至关重要。1995 年, Boussif 等^[2,3]首次

报道了聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 可作为一种优良的多功能非病毒载体, 具有较好的细胞黏附性, 可不依赖于溶酶体抑制剂而转染细胞, 它已经成为非病毒载体设计的一个“黄金对照准则”。但载有DNA的非病毒基因传输系统是一个非常复杂的体系, 从体外制备到胞内传输直至基因表达需要克服多重生理学屏障^[4, 5], 近年来, 研究者已经找到了多种非病毒载体^[6, 7], 并对影响基因传输过程的许多因素进行了考察^[6, 8], 其中研究非病毒载体/DNA复合物的形成机制以及复合物粒子的稳定性行为是一个非常重要的领域, 它与非病毒载体以及DNA自身的结构特性密切相关, 并直接影响复合物体内的摄取过程和转染效果^[9]。本文设计了一系列实验, 考察了从PEI/DNA粒子的复合过程到粒子形成后的聚集行为及其对细胞转染结果的影响, 并进行了初步的机制探讨, 阐述了复合物的形成和聚集之间存在着一定的前后关联。

材料与方法

材料 聚乙烯亚胺 (PEI, 25 kD, Sigma公司), 含有增强型绿色荧光蛋白的p53基因 (pDNA, ~13 kb, 由中国药科大学生命科学院生化药学教研室扩增和纯化), DNase I (Takara公司), Goldview染色剂 (上海赛百盛基因技术有限公司), 转染细胞 HepG2细胞 (中国药科大学药理学教研室提供), Lipofectamine 2000 (Invitrogen公司)。

仪器 BAYGENE BG-Power 600电泳仪 (北京百晶公司); Zetasizer Nano ZS激光粒度仪 (Malvern公司); H-7650透射电镜 (Hitachi公司); TU-1800紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); IX51型倒置荧光相差显微镜 (Olympus公司)。

PEI/DNA复合物的制备 精密称取适量PEI溶于PBS (pH 7.4, 150 mmol·L⁻¹), 制得1 mg·mL⁻¹的储备液。将储备液稀释成0.1 mg·mL⁻¹的PEI试液, 并与pDNA溶液 (0.1 mg·mL⁻¹) 按一定的N/P (PEI分子中氮原子与DNA分子中磷酸根基团的摩尔比例) 比例混合, 涡旋振荡30 s后于室温下放置30 min即得PEI/DNA复合物溶液。N/P的计算公式如下:

$$\text{N/P} = 7.55 \times \frac{m_{\text{PEI}}}{m_{\text{DNA}}}$$

其中 m_{PEI} 表示PEI的质量, m_{DNA} 表示DNA的质量^[10]。

紫外测定实验 制备PEI/DNA复合物溶液 (PBS, pH 7.4), N/P比例分别为0、0.2、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、8.0和10.0。

将样品溶液离心后 (3 000 r·min⁻¹, 5 min), 用紫外分光光度计在260 nm波长处测定溶液中游离DNA的吸收度并进行空白校正^[11], 计算DNA的含量并按下式换算成相对百分含量 (%), 以相对百分含量 (%)对N/P比例作图。

相对百分含量 (%) = $W_i / W_0 \times 100\%$ (其中 W_0 为N/P = 0时溶液中所含DNA量, W_i 为其他N/P比例下上清液中所含DNA量)。

电泳阻滞实验 制备PEI/DNA复合物溶液 (PBS, pH 7.4), N/P比例分别为0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0和4.0, 将样品溶液离心后 (3 000 r·min⁻¹, 5 min), 取溶液15 μL于0.8%琼脂糖凝胶 (含GoldviewTM染色剂) 中进行电泳实验。电压90 V, 电泳时间80 min, 在紫外灯下观察并成像。

PEI/DNA复合物外观形态

透射电镜 (TEM) 观察复合物外观 将新鲜配制的PEI/DNA复合物溶液稀释5倍, 吸取样品约10 μL滴至铜网上, 用1%的磷钨酸负染1 min, 待样品干燥后于透射电镜下观察, 加速电压80 kV。

动态光散射 (DLS) 测定粒径和电泳光散射 (ELS) 测定ζ电位 取新鲜配制的PEI/DNA复合物溶液100 μL, 用PBS溶液 (pH 7.4, 离子浓度150 mmol·L⁻¹) 稀释至1 mL, 使用激光粒度仪测定粒径和ζ电位。

离子强度对复合物形成的影响 将PEI溶液先与不同浓度的NaCl溶液混合, 使溶液中的离子浓度分别为0.15、0.3、0.5、1和2 mol·L⁻¹。在每组样品中加入一定量的DNA, 制备N/P比例分为3、8和12的复合物样品, 进行紫外测定, 计算溶液中游离DNA的相对百分含量。

离子强度对复合物聚集行为的影响 制备N/P为8的复合物溶液 (每份100 μL), 将溶液的离子浓度分别调至50、150、和300 mmol·L⁻¹等3个等级, 于0、0.5、1、2、4和24 h各取一组样品 (一组样品中包括上述3个等级离子浓度的复合物样品), 离心后 (3 000 r·min⁻¹, 5 min) 取出上清液90 μL, 分别在上清液和剩余的10 μL样品中加入肝素溶液 (10 mg·mL⁻¹) 20 μL, 涡旋5 min后加水稀释至200 μL, 于室温放置2 h后离心 (10 000 r·min⁻¹, 5 min) 并进行紫外测定。

细胞转染实验 将HepG2细胞用DMEM培养基按正常方法培养, 转染前24 h, 将对数生长期的HepG2细胞接种于24孔板, 使得次日细胞融合率达80%~90%。转染前4 h, 将细胞用无血清无双抗的培养基

孵育。将配制好的 PEI/DNA 复合物溶液 (N/P 为 0、3、8、12) 和阳性对照组溶液 (Lipofectamine 2000-DNA 复合物) 分别均匀加入各孔中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育培养 6 h, 更换有血清无双抗的培养基, 继续培养 48 h, 之后对细胞进行荧光检测, 观察绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达情况。

统计学分析 本文涉及单因素方差分析 (ANOVA), 所用软件为 SPSS16.0。

结果

1 PEI/DNA 复合物形成过程的紫外测定

如图 1 所示, PEI (25 kD) 能有效地复合 DNA, 随着 PEI 的不断加入, 溶液中游离 DNA 的含量迅速降低, 当 N/P 比例增加到 3 时, 溶液中剩余的游离 DNA 相对含量已经降到 3% 左右, N/P = 3 是整个复合过程曲线的拐点, 当 N/P 大于 3 时, DNA 的相对百分含量始终维持在 5% 以下。

2 凝胶电泳阻滞实验

不同 N/P 比例的 PEI/DNA 复合物的凝胶阻滞电泳效果如图 2 所示。随着 N/P 比例的增加, 明亮的 DNA 条带逐渐消失并弥散在泳道上, 当 N/P 增加至 2.0~2.5 时, DNA 已被阻滞在凝胶上样孔附近并发光。N/P 比例增至 3 时, DNA 亮条带已完全消失, 说明此时 DNA 已被 PEI “完全复合包裹”。

3 PEI/DNA 复合物的透射电镜观察

如图 3 所示, PEI/DNA 复合物在透射电镜下呈现类球形颗粒状。在 PBS 溶液中, 当 N/P 等于 1 时, DNA 链段的局部凝缩成复合物, 同时共存部分游离的 DNA (图 3A)。当 N/P 增至 3 时, 所形成的复合物粒子完整且分散 (图 3B), 粒子大小为 100~200 nm, 整个复合物类似线团样结构, 其表面不光滑 (图 3D)。当 N/P 等于 12 时, 粒子类似“葡萄串”样聚集结构,

粒径超过 1 μm (图 3C)。

4 PEI/DNA 复合物的 DLS 和 ELS 测定

复合物微粒在溶液中的形态与透射电镜下不同, 结果如图 4 和表 1 所示。在 N/P 为 3 时, 复合物的平均粒径最小 (135.4 nm), 但此时已有少量的粒子聚集 (峰 2 为 432.1 nm)。随着 N/P 比例的增加, 粒子聚集情况更为明显, 当 N/P = 12 时, 聚集物的粒子为 1 μm 左右。从 DLS 自相关曲线 (图 4B) 中也可见类似的粒径变化和粒子聚集。PEI/DNA 复合物的 ζ 电位随着 PEI 用量的增加由 -29.2 mV 逐步上升至 +2.5 mV。

5 离子强度对 PEI/DNA 复合物复合过程的影响

一般认为, PEI 和 DNA 两者通过静电作用力结合, 使得 DNA 从疏松线团样结构坍塌为球型粒子复合物。在溶液中加入不同浓度的盐 (如 NaCl) 可以调整溶液的离子强度, 可不同程度屏蔽两者之间的静电作用, 进而研究 PEI 与 DNA 两者之间的复合行为。不同离子强度的盐溶液对 PEI/DNA 复合物形成的影响如图 5 所示, 离子浓度在 0.3 mol·L⁻¹ 以下, 复合物的形成基本不受盐浓度的影响, N/P = 3~12 时溶液中游离的 DNA 含量都在 5% 以下。当离子浓度增加至 0.5 mol·L⁻¹ 以上, 溶液中的游离 DNA 含量逐渐增多; 离子浓度到达 2 mol·L⁻¹, DNA 已经完全处于游离状态。

Table 1 Properties of PEI/DNA complexes

N/P ratio	Mean size / nm	Peak 1	Peak 2	ζ Potential
1	215.0	215 (100%) [*]	-	-29.2 ± 3.6
3	135.4	103.9 (90.4%) [*]	432.1 (9.6%) [*]	-24.8 ± 4.1
8	631.8	631.8 (100%) [*]	-	-6.9 ± 3.4
12	960.6	960.6 (100%) [*]	-	2.5 ± 2.2

*The value in the parentheses represented the percent of particle number at peak 1 or peak 2. n = 3

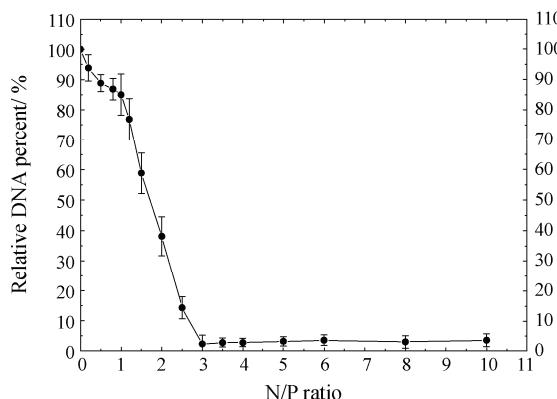


Figure 1 Characterization of PEI-DNA complexes determined by spectroscopy (n = 3)

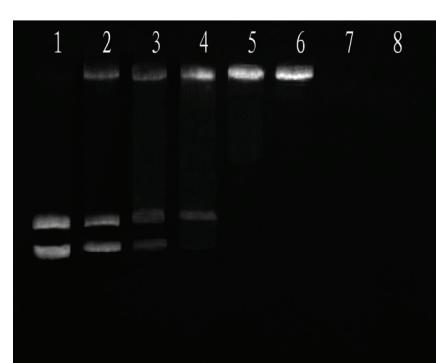


Figure 2 Agarose gel electrophoresis retardation assay for PEI/DNA complexes. 1~8: N/P ratio was 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, respectively

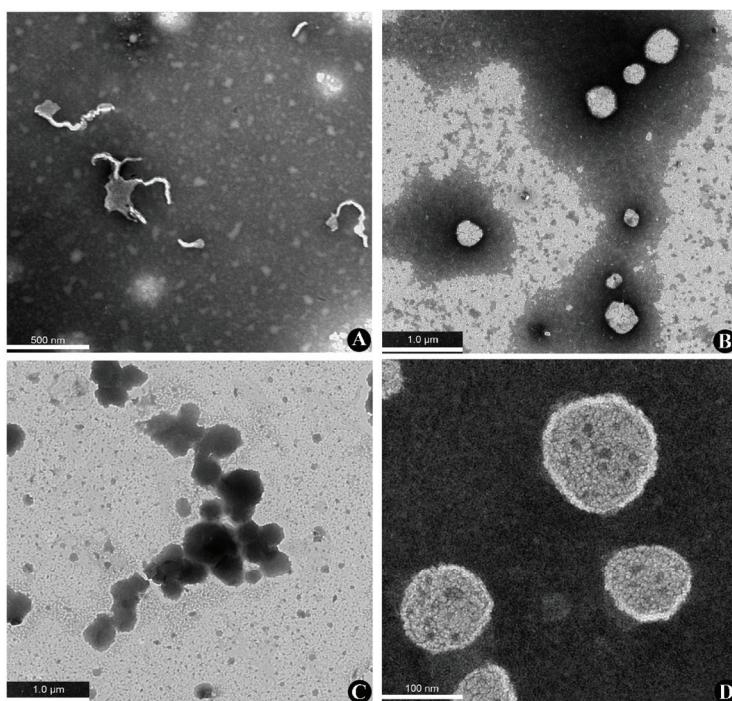


Figure 3 TEM of PEI/DNA complexes. A: N/P = 1 (bar was 500 nm); B: N/P = 3 (bar was 1.0 μm); C: N/P = 12 (bar was 1.0 μm); D: N/P = 3 (bar was 100 nm)

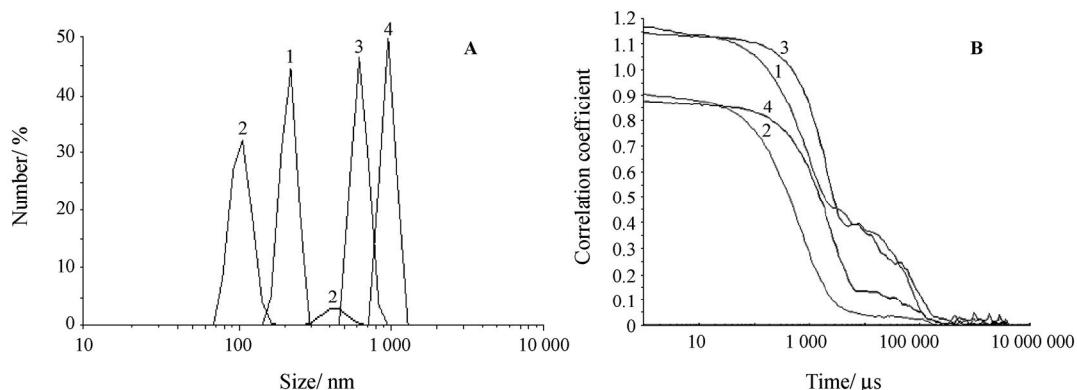


Figure 4 Measurement of particle size of PEI/DNA complexes by dynamic light scattering (DLS). A: Number-weighted size distribution of PEI/DNA complexes presented in PBS buffer; B: DLS correlogram of PEI/DNA complexes with different N/P ratio. 1–4: N/P ratio was 1, 3, 8, 12, respectively

6 离子强度对 PEI/DNA 复合物聚集行为的影响

PEI/DNA 复合物在溶液 (尤其是含盐溶液) 中容易聚集^[12]。由于复合物的形成过程主要受到静电作用力支配, 而且溶液中复合物粒子表面带有一定电荷, 在复合物形成后, 复合物粒子之间可能会通过静电作用而引起粒子聚集。基于以上假设, 本文通过调整复合物溶液的离子强度分析复合物粒子形成后的聚集行为。结果显示: PEI/DNA 复合物 (N/P = 8) 容易聚集, 75%以上的DNA 都存在于聚集物 (离心后可沉淀) 中, 但不同离子浓度 (50、150 和 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

的溶液对复合物的聚集过程影响无显著性差异 ($P > 0.05$), 经时过程也非常相似 (图 6)。上清液和聚集物 (沉淀) 中的 DNA 含量之和接近 100%。

7 细胞转染

在荧光倒置显微镜下可见 DNA 质粒所表达的 GFP, 细胞转染结果如图 7 所示, 随着 N/P 比例的增加, PEI/DNA 复合物的绿色荧光表达量也逐渐增加, 但 N/P 比例较低时 (3 和 8), 蛋白表达量较低, 当复合物 N/P 比例增至 12 时, 绿色荧光表达量与阳性对照组 (Lipofectamine 2000) 相近。

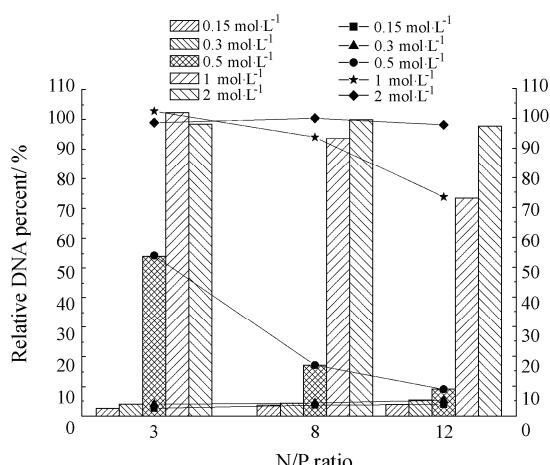


Figure 5 Effect of different salt concentration on the formation of PEI/DNA complexes at N/P = 3, 8, 12. $n=3$, all RSD values were lower than 5%

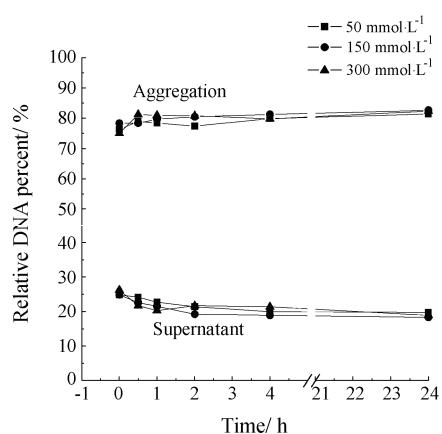


Figure 6 The time course of the concentration of DNA remaining in supernatant and aggregation at the different salt concentrations. N/P ratio of PEI/DNA complexes was 8. $n=3$, all RSD values were lower than 5%

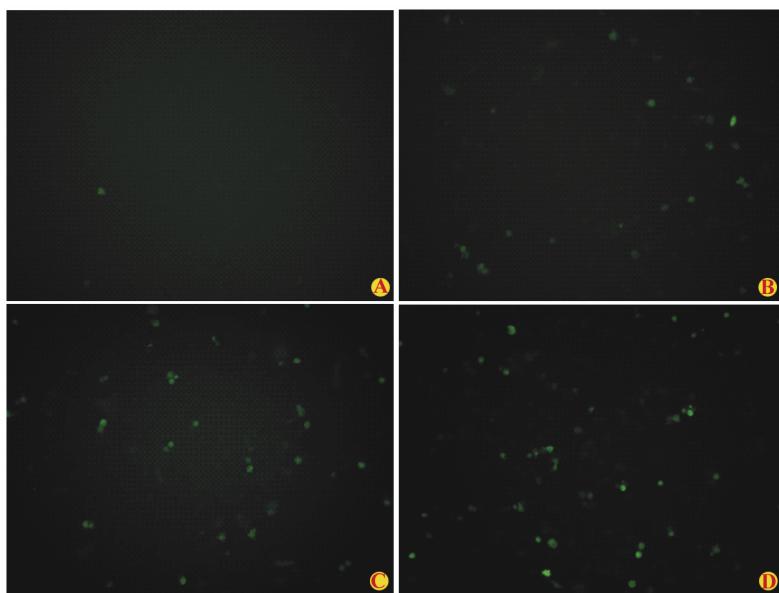


Figure 7 Comparison of GFP expression in HepG2 cells 48h after transfection with PEI/DNA complexes and Lipofectamine 2000. PEI/DNA complexes were formed at the N/P ratio: 3 (A), 8 (B), 12 (C) and Lipofectamine/DNA complexes were prepared with the protocol of Invitrogen (D). The naked DNA plasmid group was not observed any green fluorescence expression under the fluorescence microscopy

讨论

根据紫外测定结果, 本文中 N/P=3 是 PEI 完全复合 DNA 的比例, 与文献报道的值 (N/P=2~2.5)^[13, 14] 接近。从电荷中和的角度分析, 当 DNA 分子中的电荷被中和到 89%~90% 以上时, DNA 被完全复合^[15]。在 PBS 溶液中 (pH 7.4, 150 mmol·L⁻¹), PEI 结构中能质子化的氨基只有 15%~20%^[16, 17], DNA 中磷酸根则完全可以解离, 若按 N/P = 3 计算, 溶液中质子化的氨基可中和的 DNA 电荷只有 45%~60%, 这与文献提及的 90% 有一定差距。但由于文献数据是使用小分子表面活性剂的条件下获得, 作为阳离子多聚物的

PEI, 其复合 DNA 的机制与文献情况可能有所区别, PEI 可能不需要完全 (或 90%) 中和 DNA 的电荷便可以使 DNA 从游离的无规则线团状转变为球状粒子^[18]。另外从紫外测定曲线中还可看到当 N/P 比例介于 0~1 时, 溶液中只有 15% DNA 被复合, 但比例在 1~3 溶液中的 DNA 含量则迅速从 85% 降至 5% 以下。根据文献报道, 当 DNA 的分子质量较大时, DNA 在理论上的电荷中和点之前就开始出现局部 “坍塌”, 并逐步过渡到 “完全坍塌”, 会出现珠串样 (beads-on-string) 过渡态^[9, 19, 20], 该结论得到了 TEM 结果的证实 (图 3A)。凝胶电泳阻滞实验的结果也与上述结

论相符。在一定电场条件下, PEI/DNA 复合物在琼脂糖凝胶中的电泳是由其所负载电荷和空间尺寸共同决定^[21], 在未被完全复合前, 部分复合的 DNA(如串珠状 DNA 复合物) 和游离的 DNA 共存, 电泳凝胶前沿一直到上样孔都有一定的 DNA 条带, 到 N/P = 2.5 时, 此时溶液中游离 DNA 的含量已近于零, DNA 链段的绝大部分或大多数的 DNA 已被复合, 可以结合染料的 DNA 片段数量很有限。由于琼脂糖凝胶的孔径一般在 50~200 nm^[21], 复合物粒子却在 200 nm 以上(参见 DLS 测定的水合粒径值), 故被阻滞在点样孔附近。当 N/P 升至 3.0 以上时, DNA 分子链上已无与染料结合的位点, DNA 亮条带完全消失。

从复合物的复合过程来看, 当 N/P 比例为 3 时, 虽然 DNA 已从无规则线团状被压缩成颗粒状, 但由于 DNA 的分子质量较大(约 12 kb), 仍有 40%~55% 的电荷未被中和, 复合物颗粒表面表现出一定的负电性(约 -25 mV), 此时的颗粒由于负电荷过多而相互排斥, 仍能维持一定程度的分散状态^[20], 随着 PEI 的继续加入, 过剩的 PEI 可继续覆在 PEI/DNA 复合物的表面, 进一步增加其表面电荷, 最终使表面带上正电。但 N/P 为 12 时, 表面电荷数只有 +2.5 mV, 不足以对抗颗粒之间的聚集作用, 此时的粒子相比 N/P=3 时聚集程度反而更大。在透射电镜下可见从珠串样结构复合物过渡到完整复合物粒子的形成过程, 且复合物表面不光滑(图 3D)。当 N/P 比例达到 12 时, 复合物之间由于缺乏足够的电荷保护而相互聚集成葡萄串样结构(图 3C)。另外当 N/P 比例从 1 增至 12 时(除了 N/P = 3), DLS 的自相关曲线(图 4B)的末端都有抬高的趋势, 相关曲线的基线在 10⁷ μs 处仍出现杂峰, 表明此时溶液中存有大粒子或粒子间发生聚集^[22]。

根据文献^[9, 13]报道, 当加入的盐(如 NaCl)浓度为 0.5~1 mol·L⁻¹ 时, 可以极大的压缩双电层, 完全屏蔽 PEI 和 DNA 的表面电荷, 防止两者通过静电作用而结合, 而且此时的高渗透压也促使 PEI/DNA 复合物解聚^[13]。根据本文实验的结果, 尽管静电作用仍然是 PEI/DNA 形成复合物的主要作用力(在低于 300 mmol·L⁻¹ 的离子浓度时该种作用很明显), 但在 PEI 和 DNA 的电荷被完全屏蔽后(如离子浓度 1 mol·L⁻¹ 时), 仍然有部分的 PEI/DNA 复合物存在(N/P = 12 的溶液中有 25% DNA 处于非游离状态), 说明此时 DNA 和 PEI 还可能以其他非静电作用力而发生结合, 这与 Chen 等^[23, 24]报道的 DNA 与阳离子聚合物之间可能存在着氢键作用力的结论相似。

复合物形成后, 尽管复合物表面仍然保持有一定电荷, 但本文的结果表明当 N/P 比例大于 3 时, 表面的电荷不足以维持复合物粒子间的斥力而易发生聚集, 复合物(N/P = 8) 聚集行为经时过程显示, 聚集量随着时间的延长而稍有增加(从 75% 增至 82%)。但在一定范围内不同离子浓度(50、150 和 300 mmol·L⁻¹) 对 PEI/DNA 复合物的聚集行为的影响无显著差异, 表明在复合物形成后, 支配复合物粒子之间聚集过程的不是静电作用力, 而可能是粒子间的疏水作用力^[11]。本文推测随着 PEI 的不断加入, DNA 得以维持伸展结构的分子链之间的斥力^[9, 25](如亲水的磷酸根基团) 逐渐丧失, 生成了一个新的疏水相——PEI/DNA 复合物颗粒^[18, 20, 26], 复合物粒子在缺乏足够的电荷和空间结构保护时, 水相的巨大斥力使得疏水粒子间通过疏水作用力而聚集在一起以缩小与水相的接触面积, 进而自发形成聚集粒子, 故聚集行为可看作是复合物粒子形成后的一种延续表现。

裸 DNA 在转染过程中无法进入细胞并易被核酸酶降解^[5]。本文中制备的 PEI/DNA 复合物随着 N/P 比例的增加, 转染效果也逐渐增加, 当 N/P = 12 时, 其转染效果与阳离子脂质体相当。当 N/P 较低时(如 N/P = 3), PEI 对 DNA 的保护能力有限, 遇到核酸酶、RNA 等负电荷物质时, 可能会被竞争性解聚释放出 DNA 而失活^[13]。只有当 PEI 过量至一定程度(当表面带有正电荷时), 过剩的 PEI 分子可以覆在复合物表面充分地保护 DNA 不被核酸酶降解。有文献^[27, 28]记载较大的复合物粒子也有较好的转染效果, 本文的转染实验表明聚集的复合物大粒子也有一定的细胞转染能力。小粒子因布朗运动沉积作用较弱, 聚集后的较大粒子(1 μm 左右) 则可能通过沉积作用与细胞表面发生作用, 进而被细胞摄取转运^[28]。由于沉积的过程可能较慢, 故复合物在一定范围内延长孵育和表达时间可以提高转染效率(该数据未发表)。

本文通过一系列的实验设计详细考察了 PEI/DNA 复合物的形成以及复合物粒子聚集等相关特性, 并结合相应的实验结果对复合物形成机制和复合物聚集行为进行了初步的理论探讨, 认为复合物的相关生物理化性质(粒径和电位等) 与复合物的形成和粒子聚集行为密切相关。在复合物的形成过程中除了占主导地位的静电作用外还可能有少量的非静电结合力, 而且复合物形成后在含盐溶液中容易聚集, 聚集过程中疏水作用力起到支配作用。PEI/DNA 的

聚集物仍具有一定的细胞转染能力, 它可能通过沉积作用与细胞表面发生亲和。综上所述, 本文得到的结论希望能为非病毒基因载体的修饰和设计提供一定的借鉴。

References

- [1] Joseph P. Gene Therapy: Treating Disease by Repairing Genes [M]. New York: Facts On File Science, 2005.
- [2] Boussif O, Lezoualch F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 7297–7301.
- [3] Sundaram S, Lee LK, Roth CM. Interplay of polyethylenimine molecular weight and oligonucleotide backbone chemistry in the dynamics of antisense activity [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35: 4396–4408.
- [4] Pouton CW, Seymour LW. Key issues in non-viral gene delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 46: 187–203.
- [5] Wiethoff CM, Middaugh CR. Barriers to nonviral gene delivery [J]. J Pharm Sci, 2003, 92: 203–217.
- [6] Han CK, Lee M, You HB. Polymeric gene carriers [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2005, 15: 317–342.
- [7] Ping Y, Ma Q, Chen JH. Dextran-spermine polycation as a vector for gene transfection *in vitro* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2007, 42: 669–674.
- [8] Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, et al. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 60: 247–266.
- [9] Dias R, Lindman B. DNA Interactions with Polymers and Surfactants [M]. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2008.
- [10] Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, et al. Nomenclature for synthetic gene delivery systems [J]. Hum Gene Ther, 1997, 8: 511–512.
- [11] Sharma VK, Thomas M, Klibanov AM. Mechanistic studies on aggregation of polyethylenimine-DNA complexes and its prevention [J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 90: 614–620.
- [12] Wightman L, Kircheis R, Rossler V, et al. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery *in vitro* and *in vivo* [J]. J Gene Med, 2001, 3: 362–372.
- [13] Bertschinger M, Backliwal G, Schertenleib A, et al. Disassembly of polyethylenimine-DNA particles *in vitro*: implications for polyethylenimine-mediated DNA delivery [J]. J Control Release, 2006, 116: 96–104.
- [14] Fahrmeir J, Gunther M, Tietze N, et al. Electrophoretic purification of tumor-targeted polyethylenimine-based polyplexes reduces toxic side effects *in vivo* [J]. J Control Release, 2007, 122: 236–245.
- [15] Wilson RW, Bloomfield VA. Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid. a light-scattering study [J]. Biochemistry, 1979, 18: 2192–2196.
- [16] Suh J, Paik HJ, Hwang BK. Ionization of poly(ethyleneimine) and poly(allylamine) at various pH's [J]. Bioorg Chem, 1994, 22: 318–327.
- [17] Amiji MM. Polymeric Gene Delivery: Principles and Applications [M]. New York: CRC Press, 2005.
- [18] Clamme JP, Azoulay J, Mely Y. Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy [J]. Biophys J, 2003, 84: 1960–1968.
- [19] Raspaud E, Pelta J, de Frutos M, et al. Solubility and charge inversion of complexes of DNA and basic proteins [J]. Phys Rev Lett, 2006, 97: 068103.
- [20] Ayoubi MA, Zinchenko AA, Philippova OE, et al. Visualization of different pathways of DNA release from interpolyelectrolyte complex [J]. J Physical Chem B, 2007, 111: 8373–8378.
- [21] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [22] Malvern Instrument Ltd. Malvern Support Library (FAQ) of Dispersion Technology Software [M]. Worcestershire: Malvern Instrument, 2008.
- [23] Chen DJ, Majors BS, Zelikin A, et al. Structure-function relationships of gene delivery vectors in a limited polycation library [J]. J Control Release, 2005, 103: 273–283.
- [24] Ehtezazi T, Rungsardthong U, Stolnik S. Thermodynamic analysis of polycation-DNA interaction applying titration microcalorimetry [J]. Langmuir, 2003, 19: 9387–9394.
- [25] Bloomfield VA, Crother DM, Tinoco I. Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions [M]. California: University Science Books, 2000.
- [26] Yoshikawa K, Matsuzawa Y. Discrete phase transition of giant DNA dynamics of globule formation from a single molecular chain [J]. Physica D, 1995, 84: 220–227.
- [27] Ogris M, Steinlein P, Kursa M, et al. The size of DNA/transferring-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells [J]. Gene Ther, 1998, 5: 1425–1433.
- [28] Yang XR, Zong L, Yuan XY. Chitosan nanoparticles as gene vector: effect of particle size on transfection efficiency [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2007, 42: 774–779.