

拓扑 DNA 在壳聚糖纳米粒子中的固定化负载

Annang Elsie Odua¹, 张亚青¹, Chiteme Tafadzwa Evangelista¹,
柳永^{1,2,3}, 刘士旺^{1,2,3}

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室,
杭州 310023; 3. 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心, 杭州 310023)

摘要: 为了体外固定化不稳定单链拓扑 DNA, 采用阴阳离子共聚法制备壳聚糖/拓扑 DNA 复合纳米粒子, 并进行傅立叶变换红外光谱、粒径/zeta 电位和透射电子显微镜等分析表征。结果显示, 纳米粒子中 DNA 上磷酸基团振动峰显著减弱, 高温制备样品中双链 DNA 含量少于低温样品, 表明 DNA 的不稳定单链结构获得了体外固定化; 同时, 伴随 DNA 单链比例升高, 复合纳米粒子的平均水合粒径由 573.9 nm 降到 205 nm, zeta 电位由 19.53 mV 降到 9.75 mV, 复合纳米粒子结构由核壳结构转变为实心胶束结构。几种差异结构壳聚糖/DNA 纳米粒子的成功制备, 可为后续生物活性或载药研究提供良好的技术支持。

关键词: DNA; 壳聚糖; 拓扑结构; 固定化; 纳米粒子

中图分类号: O636.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-8798(2020)01-0001-06

Loading and fixation of topological DNA in chitosan nanoparticles

Annang Elsie Odua¹, ZHANG Yaqing¹, Chiteme Tafadzwa Evangelista¹, LIU Yong^{1,2,3}, LIU Shiwang^{1,2,3}

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and Biological Processing Technology of Farm Produce, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 3. Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agricultural Biological Resources Biochemical Manufacturing, Hangzhou 310023, Zhejiang, China)

Abstract: In order to immobilize unstable single-stranded DNA, an anionic-cationic co-assembly method was applied for preparation of chitosan/DNA composite nanoparticles. The chemical and physical properties of composite nanoparticles were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy, size distribution/zeta potential and transmission electron microscope. The results indicate that vibration peak of phosphate group on DNA gets weakened remarkably after DNA is coated in chitosan nanoparticles. The content of double-stranded DNA in

收稿日期: 2019-09-28

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31300091)

通信作者: 柳永(1978—), 男, 山东省烟台人, 副研究员, 博士, 主要从事微生物学与材料学交叉学科研究。
E-mail: lylyhaha1978@163.com。

nanoparticles prepared at high temperature is lower than that in the sample prepared at low temperature. These results show that single-stranded DNA has been immobilized in composite nanoparticles. At the same time, along with the increase of single-stranded DNA percentage, average hydrated particle sizes and zeta potentials of composite nanoparticles decrease from 573.9 nm to 205 nm and from 19.53 mV to 9.75 mV, respectively, coupled with structure transfer of composite nanoparticles from core shell to solid micelle. Successful preparation of several chitosan/DNA nanoparticles with different structures can provide sound technical support for subsequent research on biological activity or drug loading.

Keywords: DNA; chitosan; topological structure; fixation; nanoparticle

脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)是生物遗传信息的携带者,同时也是一种功能多样的生物高分子。双链 DNA(dsDNA)的解链构象-单链 DNA(ssDNA),既是基因编辑的重要靶标物^[1],也是 DNA 材料研究的常见原料^[2]。ssDNA 在体外常温下倾向于互补配对形成部分双链结构,这对常温下研究 ssDNA 生物学活性和操作 ssDNA 材料造成了阻碍。已知 dsDNA 在受热情况下,能够解链形成并保持 ssDNA 结构。如能将高温下的 ssDNA 结构固定化,则将为常温下研究 ssDNA 的生物学功能和 ssDNA 基功能材料研发提供有益参考。

壳聚糖(chitosan, CS)是天然阳性多糖,已被大量研究证实为优良的核酸载体。已见报道的 CS/DNA 复合物大致可以分为 4 类:1)非靶向 CS/DNA 纳米粒子,如 CS/超螺旋 DNA 和 CS/dsDNA/siRNA 复合纳米粒子^[3]、改性 CS/超螺旋 DNA 纳米粒子^[4]等,均表现出良好的哺乳细胞转染功能;2)靶向 CS/DNA 复合纳米粒子,如靶向大脑的锰福地吡-CS/siRNA/DNA 纳米粒子^[5]、靶向肿瘤细胞的 CS 纳米粒子^[6]等;3)智能响应 CS/DNA 复合纳米粒子,如 ATP 响应^[7]、氧化还原响应^[8]、磁场响应 CS 纳米转染剂^[9]等;4)CS/DNA 基人工模拟物,如 CS/DNA 基人工模拟酶,表现出高催化活性和高抗逆性^[10]。相比种类繁多的 CS/核酸复合纳米粒子报道,关于 CS 与核酸相互作用机制及其对细胞侵染效率的影响报道相对较少。现有研究表明,CS 与 DNA 间弱相互作用力有利于对哺乳细胞的转染^[11],CS 上氨基与 DNA 上磷酸基团的比例对转染效率存在显著影响^[12],具有支化结构的 CS 较线型 CS 具有更好的基因递送效果和更佳的细胞相容性^[13]等。这些研究虽对 CS/DNA 相互作用与其基因转染效果间关系进行了探索性研究,但对分子水平的相互作用机制研究报道仍较少。石幻君等^[14]发现磺化壳聚糖铁配合物可通过嵌插作用来解链 dsDNA。Shen 等^[15]通过动态分子模拟发现,DNA 上带负电磷酸基团与 CS 上带正电氨基之间的互作是壳聚糖负载 DNA 的主要机制。

综合以上研究可以发现,正电性 CS 与负电性 DNA 间的静电自组装是 CS 包埋 DNA 的主要作用机制。如能在体外制备携带单链区段的 DNA,并在保持 ssDNA 构象条件下引发壳聚糖与 DNA 间的共聚,则有可能实现不稳定 ssDNA 拓扑构象的固定化。因此,我们采用热处理的方法,制备携带单链区段的线型 DNA,并与 CS 共聚形成复合纳米粒子,对不稳定 ssDNA 在复合纳米粒子中的固定化负载效果进行分析评价。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

壳聚糖(粘均相对分子质量 150 kDa,脱乙酰度 90%以上),国药集团化学试剂有限公司;鲑鱼精 DNA(D1626),美国 Sigma-Aldrich 公司,其 0.25 mg/mL 水溶液 $A_{260}/A_{280} = 1.92$, $A_{260}/A_{230} = 2.35$; SYBR Green I 荧光染料,美国 MP Biomedicals 公司;其他常规生化试剂均为国产分析纯。

1.2 dsDNA 热处理及解链度测定

将鲑鱼精 DNA 溶解于超纯水中,配置质量浓度为 55 ng/ μ L 的 DNA 溶液。取 DNA 溶液 0.5 mL 与 SYBR Green I 原液($\times 10\ 000$ 母液)0.5 μ L 混合均匀,于 37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 1 h。将经过孵育的 DNA

溶液分装于 20 个 0.2 mL 平盖 PCR 管中, 在荧光定量 PCR 仪 CFX96 上, 分别于 25、60、90 °C 下测量 SYBR Green I 的绿色荧光信号强度。以 25 °C 下测得荧光信号值为 100% dsDNA 荧光信号值, 将 60 °C 和 90 °C 下荧光信号值与 25 °C 荧光信号值相除, 计算各温度下 dsDNA 的百分比含量。

1.3 携带单链区段 DNA 在壳聚糖复合纳米粒子中的负载

将 CS 溶解于 1% 醋酸溶液中, 并以 NaOH 溶液调节 pH 值, 配制质量浓度为 1 mg/mL, pH 值为 5.5 的 CS 溶液。将鲑鱼精 DNA 溶解于超纯水中, 质量浓度为 0.25 mg/mL。

在 25 °C 下, 按 CS 与 DNA 质量比为 4/1、1/1 和 1/2, 将 DNA 溶液在磁力搅拌下滴加到 CS 溶液中。在 60、90 °C 下, 按 CS 与 DNA 质量比为 4/1, 将 DNA 溶液在磁力搅拌下滴加到 CS 溶液中。DNA 滴加溶液逐渐呈现蓝白色荧光(后续检测表明 CS 与 DNA 共聚形成了复合纳米粒子)。

1.4 复合纳米粒子表征

傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR)分析采用傅里叶变换红外光谱仪 Paragon 1000 型(美国 Perkin Elmer 公司), 在 500~4 000 cm^{-1} 范围内扫描, 样品与 KBr 粉末混合后压成薄片测定; 差示扫描量热分(differential scanning calorimetry, DSC)分析采用差示扫描量热仪 DSC Q100 V9.9 Build 303 型(美国 TA Instruments 公司), 冷冻干燥样品质量为 3~5 mg, 先将样品从室温降到 -40 °C, 保持 3 min, 然后以 20 °C/min 升温到 250 °C; 粒径分布和 zeta 电位分析采用 Zetasizer 3000HS 型(美国马尔文仪器有限公司), 以纳米溶液直接测定; 透射电子显微镜观察(transmission electron microscope, TEM)采用 JEM-1200EX 型号(日本 JEOL 公司), 制样方法为悬滴法。

2 结果与讨论

2.1 不同温度处理下 DNA 的解链度

SYBR Green I 能够与 dsDNA 的小沟结合, 结合后的荧光信号可增强 800~1 000 倍。在 25 °C 下, dsDNA 结构稳定, SYBR Green I 与 DNA 充分结合, 在蓝光(497 nm)激发下发射绿色荧光信号(520 nm)。当温度升高到 60 °C 和 90 °C 时, dsDNA 部分解链产生 ssDNA 区段。在 ssDNA 区段上, DNA 小沟消失, SYBR Green I 从相关位点脱落, 520 nm 下荧光信号减弱。同时, 未解链 dsDNA 区段 SYBR Green I 仍结合于 DNA 小沟上, 荧光信号得到保持。将 60 °C 和 90 °C 下荧光信号值分别与 25 °C 下荧光信号值相除即可计算相应处理温度下的 dsDNA 的百分比含量, 并推算出相应的 ssDNA 百分比含量。结果显示, 在 60、90 °C 下 dsDNA 的百分比含量分别为 66.9%±1.8%、10.5%±1.3%, ssDNA 百分比含量分别为 33.1%±1.5%、89.5%±1.9%。表明在 25、60、90 °C 处理下, 获得了具有不同解链度的 DNA 样品。60、90 °C 处理下产生的 ssDNA 在温度降低后会重新形成链内或链间 dsDNA 结构, 表现为不稳定拓扑结构。

2.2 复合纳米粒子的 FT-IR 分析

CS/DNA 复合纳米粒子 FT-IR 分析结果如图 1 所示, A、B、C 对应样品为 25 °C 下 DNA 与 CS 质量比分别为 4/1、1/1、1/2 时制备纳米粒子; D、E 对应样品为 DNA 与 CS 质量比为 4/1 时, 分别在 60、90 °C 下制备纳米粒子; F 为 DNA, G 为 CS。从图 1 可知, DNA 在 1 236 cm^{-1} 和 1 095 cm^{-1} 处吸收峰分别为磷酸基团(PO_2^{1-})反对称伸缩振动和对称伸缩振动峰^[16-17], 在 CS 包埋 DNA 形成的复合纳米粒子中, 当 CS 与 DNA 比例(CS/DNA)为 4/1 或 1/1 时, 上述两处吸收峰微弱。在 CS/DNA 为 1/2 样品中,

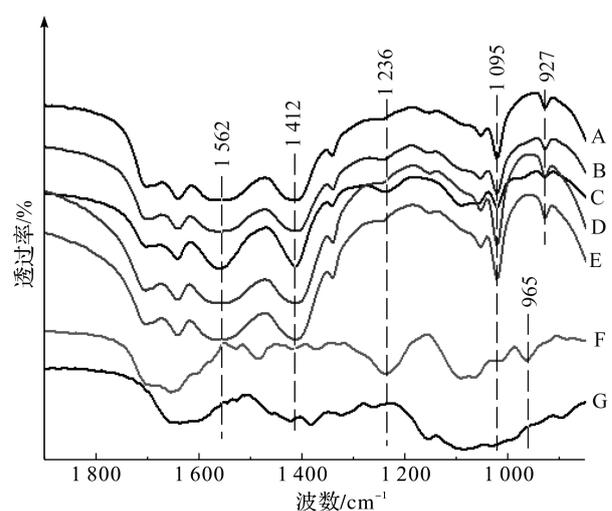


图 1 CS/DNA 复合纳米粒子 FT-IR 分析

Fig. 1 FT-IR curves of CS/DNA composite nanoparticles

上述两处吸收峰强度高于 4/1 或 1/1 样品。这表明,在 4/1 或 1/1 的 CS/DNA 比例下,DNA 上的磷酸基团被充分固定化,对称振动减弱;而在 1/2 比例下,较多磷酸基团保留了对称振动状态。磷酸基团是 DNA 骨架的主要结构基团,CS/DNA 复合纳米粒子中 DNA 磷酸基团的固定化,意味着 DNA 结构的固定化。Shen 等^[15]的 CS 负载 DNA 分子动态分子模拟研究报道,同样认为 DNA 上带负电磷酸基团与 CS 上带正电氨基之间的相互作用是壳聚糖负载 DNA 的主要机制。此外,DNA 在 $1\ 236\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰是 B-DNA 特征峰^[18],在 CS/DNA 复合纳米粒子中,该处吸收峰的减弱表明 CS 可能与其他多胺类高分子一样,能够诱导天然右手螺旋 B-DNA 转变为左手螺旋 Z-DNA^[19]。DNA 在 $965\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为其主链核糖振动吸收峰,在复合纳米粒子中该振动峰向低波数方向移动到了 $927\ \text{cm}^{-1}$,也表明复合纳米粒子中的 DNA 结构得到了固定化。对于复合纳米粒子中 DNA 解链度问题,由于 DNA 与 CS 之间及 DNA 碱基对之间存在多种氢键作用力且氢键构成基团相似,因此无法从傅立叶变换红外光谱中有效解析获得 DNA 的解链度信息。

2.3 复合纳米粒子 DSC 分析

CS/DNA 复合纳米粒子 DSC 分析结果如图 2 所示,A、B、C、D、E、F、G 对应样品与图 1 同。由图 2 可知,天然鲑鱼精 DNA 在 $43\sim 125\ ^\circ\text{C}$ 出现较平缓吸热单峰,峰值温度为 $83\ ^\circ\text{C}$,该峰为 dsDNA 解链形成 ssDNA 过程吸热所致。在 $227\ ^\circ\text{C}$ 附近出现的放热峰则为 DNA 氧化分解放热所致。CS 在 $-30\sim 250\ ^\circ\text{C}$ 未出现明显吸放热峰。相比天然鲑鱼精 DNA,CS/DNA 复合纳米粒子的峰形和数量发生了显著变化:首先,5 个 CS/DNA 复合纳米粒子样品(A、B、C、D 和 E)均在 $59\ ^\circ\text{C}$ 附近出现第 1 个吸热峰,该峰为 dsDNA 局部解链 DNA 呼吸增强所致;其次, $25\ ^\circ\text{C}$ 或 $60\ ^\circ\text{C}$ 下制备的 4 个 CS/DNA 复合纳米粒子样品(A、B、C 和 D),均在 $68.8\sim 117.3\ ^\circ\text{C}$ 间出现了第 2 个吸热峰,该峰为 dsDNA 完全解链吸热所致;最后, $227\ ^\circ\text{C}$ 附近未见 DNA 氧化分解放热峰出现,表明经 CS 包埋保护后 dsDNA 的分解温度得到了提高。比较样品 A、B 和 C 可以看出,当 CS/DNA 为 4/1 时,DNA 完全解链温度最高,为 $117.3\ ^\circ\text{C}$ 。这一升高 DNA 完全解链温度与较高 CS/DNA 比例下(4/1),过量 CS 与 DNA 饱和相互作用导致 DNA 热稳定性提高有关^[20],同时也表明 CS/DNA 为 4/1 下,DNA 与 CS 相互作用饱和度较高,有利于 DNA 拓扑结构的固定化。进一步比较样品 A、D 和 E 可以看出,相同 CS/DNA 比例下,制备温度分别为 25 、 60 、 $90\ ^\circ\text{C}$ 时,DNA 完全解链吸热峰逐渐向低温方向移动。由于在 DNA 序列相同的情况下,DNA 的解链温度与其双链区段长度呈正相关,因此制备温度从 $25\ ^\circ\text{C}$ 升到 $90\ ^\circ\text{C}$ 过程中,CS/DNA 复合纳米粒子中,dsDNA 区段呈逐渐缩短趋势,相应 ssDNA 区段呈增长趋势。这表明,在 60 、 $90\ ^\circ\text{C}$ 下产生的携带单链区段的 DNA 拓扑结构,在复合纳米粒子中得到了固定化。

2.4 复合纳米粒子的粒径分布与 zeta 电位

CS/DNA 复合纳米粒子粒径分布与 zeta 电位分析结果见表 1,A、B、C、D、E 对应样品与图 1 同。由表 1 可知,当制备温度为 $25\ ^\circ\text{C}$ 时,伴随 CS/DNA 比例降低,复合纳米粒子平均粒径和 zeta 电位均出现先升高后降低的变化;当 CS/DNA 比例固定为 4/1 时,伴随制备温度升高,复合纳米粒子平均粒径和 zeta 电位均呈降低趋势。制备温度为 $25\ ^\circ\text{C}$ 时,不同 CS/DNA 比例导致的平均粒径和 zeta 电

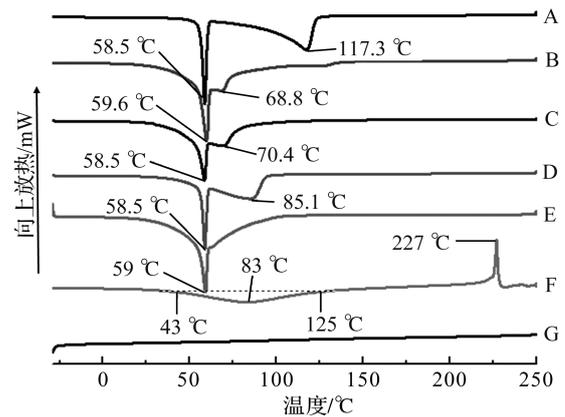


图 2 CS/DNA 复合纳米粒子 DSC 分析

Fig. 2 DSC curves of CS/DNA composite nanoparticles

表 1 CS/DNA 复合纳米粒子粒径分布与 zeta 电位分析结果
Table 1 Analytic results of particle size distribution and zeta potential of CS/DNA composite nanoparticles

样品	平均粒径/nm	zeta 电位/mV
A	573.9 ± 20.8	19.53 ± 1.2
B	750.1 ± 34.0	23.81 ± 3.1
C	388.2 ± 26.4	21.17 ± 1.9
D	205.0 ± 15.9	14.31 ± 1.2
E	210.5 ± 17.2	9.75 ± 0.8

位差异,可能与 CS 和 DNA 聚集程度不同有关。当 CS/DNA 比例均为 4/1 时,不同制备温度下(25、60、90 °C)出现的粒径和 zeta 电位差异,应与 DNA 的解链度不同有关。在 25 °C 下,天然鲑鱼精 DNA 主要以双链形式存在,分子刚性较强,与 CS 共聚形成较大纳米颗粒(平均水合粒径 573.9 nm);在 60、90 °C 下,鲑鱼精 DNA 发生解链,以双链/单链双重结构形式存在,分子刚性减弱,容易与 CS 共聚缠绕形成较小纳米颗粒(平均水合粒径分别为 205、210.5 nm)。而伴随制备温度升高,zeta 电位逐渐降低(由 19.53 mV 降到 9.75 mV),可能是较高制备温度下含量较高 ssDNA 的存在降低了 DNA 与 CS 的聚集度,导致了复合纳米粒子内正电性 CS 比例的降低。

2.5 TEM 分析

对 CS/DNA 比例均为 4/1,制备温度分别为 25、60、90 °C 的样品 A、D、E 进行了 TEM 观测,结果见图 3。从图 3 可以看出,3 个制备温度下复合纳米粒子形貌差异显著。在 25 °C 下制备样品(A),复合纳米颗粒粒径较大,存在大量粒径大于 100 nm 的复合纳米颗粒,且颗粒中部多存在低电子密度区域,应为电子密度较低的 DNA 集中分布区域。在 60 °C 下制备样品(D),粒径大于 100 nm 的复合颗粒减少,粒径小于 100 nm 的复合颗粒显著增多,颗粒中低电子密度区域明显减少。在 90 °C 下制备样品(E),仍存在部分粒径大于 100 nm 的复合颗粒,但以粒径小于 100 nm 的复合颗粒为主,颗粒内部低电子密度区域消失。由于 A、D、E 样品间的主要差别是制备温度不同,即 DNA 解链度不同,因此 3 个样品间复合纳米颗粒结构差异主要由构成复合纳米颗粒的 DNA 拓扑结构差异造成。同时也反映出,在 3 个制备温度下,携带不同比例 ssDNA 区段的稳定或不稳定 DNA 拓扑结构均被固定化负载到了复合纳米颗粒中。

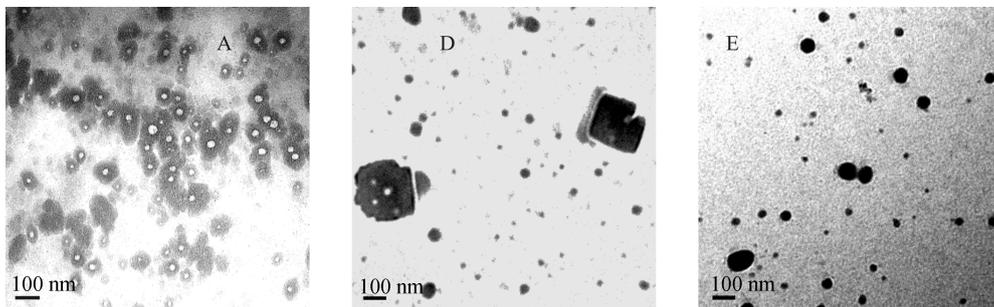


图 3 不同温度制备壳聚糖/DNA 复合纳米粒子透射电子显微镜下形貌

Fig. 3 Morphological characteristics of CS/DNA composite nanoparticles prepared at different temperatures

3 结 语

通过差异加热处理,制备了携带不同比例 ssDNA 区段的拓扑结构稳定或不稳定的 DNA,并在相应温度下制备了 CS/DNA 复合纳米粒子,使得 DNA 的拓扑结构在复合纳米粒子中得到了固定化。尤其在 CS/DNA 为 4/1 情况下,FT-IR 测试中 DNA 主链上磷酸基团和糖链振动均出现减弱;DSC 测试中第二吸热峰伴随制备温度升高向低温方向迁移的行为,也与热处理导致的 DNA 双链区段长度变化预期相符;粒径分布、zeta 电位和 TEM 测试等进一步反映出负载不同拓扑结构 DNA 的纳米粒子,在形貌和结构特征上存在显著差异。这些结果均有力地证明,携带单链区段的拓扑结构 DNA 在复合纳米粒子中获得了良好的固定化。

参考文献:

- [1] APARICIO T, DE LORENZO V, MARTINEZ-GARCIA E. CRISPR/Cas9-enhanced ssDNA recombineering for *Pseudomonas putida*[J]. Microbial Biotechnology,2019,12(5):1076.
- [2] JULIN S, KORPI A, NONAPPA N, et al. DNA origami directed 3D nanoparticle superlattice via electrostatic assembly[J]. Nanoscale,2019,11(10):4546.
- [3] PENG S F, YANG M J, SU C J, et al. Effects of incorporation of poly(γ -glutamic acid) in chitosan/DNA complex nanoparticles on cellular uptake and transfection efficiency[J]. Biomaterials,2009,30(9):1797.

- [4] RAMESAN R, SHARMA C P. Modification of chitosan nanoparticles for improved gene delivery[J]. *Nanomedicine*, 2012, 7(1):5.
- [5] SANCHEZ-RAMOS J, SONG S J, KONG X Y, et al. Chitosan-mangafodipir nanoparticles designed for intranasal delivery of siRNA and DNA to brain[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2018(43):453.
- [6] 孙平. H6R6 短肽修饰的壳聚糖纳米粒用于 siRNA 的递送及其在肿瘤治疗中的应用[D]. 北京:北京协和医学院, 2017.
- [7] ZHAO M H, ZHANG Y, YUAN S R, et al. ATP responsive DNA nanogels grown on biocompatible branches for anticancer drug delivery[J]. *Soft Matter*, 2019, 15(18):3655.
- [8] LIN J T, LIU Z K, ZHU Q L, et al. Redox-responsive nanocarriers for drug and gene co-delivery based on chitosan derivatives modified mesoporous silica nanoparticles[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 155:41.
- [9] SOHRABIJAM Z, SAEIDIFAR M, ZAMANIAN A. Enhancement of magnetofection efficiency using chitosan coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calf thymus DNA[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 152:169.
- [10] WANG Z G, LI Y Z, WANG H, et al. Enzyme mimic basing on self-assembled chitosan/DNA hybrid exhibits superior activity and tolerance[J]. *Chemistry*, 2019, 25(54):12576.
- [11] ALATORRE-MEDA M, TABOADA P, HARTL F, et al. The influence of chitosan valence on the complexation and transfection of DNA; the weaker the DNA-chitosan binding the higher the transfection efficiency[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 82(1):54.
- [12] ALAMEH M, LAVERTU M, TRAN-KHANH N, et al. SiRNA delivery with chitosan; influence of chitosan molecular weight, degree of deacetylation, and amine to phosphate ratio on in vitro silencing efficiency, hemocompatibility, biodistribution, and in vivo efficacy[J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(1):112.
- [13] MALMO J, VARUM K M, STRAND S. Effect of chitosan chain architecture on gene delivery; comparison of self-branched and linear chitosans[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(3):721.
- [14] 石幻君,程进征,王学东,等. 磺化壳聚糖铁配合物的制备及其与 DNA 相互作用研究[C]//中国化学会第八届全国配位化学会议. 大连:中国化学会, 2017:1.
- [15] SHEN J W, LI J C, ZHAO Z N, et al. Molecular dynamics study on the mechanism of polynucleotide encapsulation by chitosan[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):1.
- [16] LIU W G, SUN S J, CAO Z Q, et al. An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(15):2705.
- [17] MADY M, AWADW W, EI-GUENDY N, et al. Interaction of DNA and polyethylenimine: Fourier-transform infrared (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) studies[J]. *International Journal of Physical Sciences*, 2011, 6(32):7328.
- [18] DOVBESHKO G, GRIDINA N Y, KRUGLOVA E B, et al. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage[J]. *Talanta*, 2000, 53(1):233.
- [19] HACKL E V, KORNILOVA S V, BLAGIO Y P. DNA structural transitions induced by divalent metal ions in aqueous solution[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, 35(3/4):175.
- [20] EXPOSITO D, VECCHIO P D, BARONE G. Interactions with natural polyamines and thermal stability of DNA: a DSC study and a theoretical reconsideration[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119(11):2606.