



生物医学研究技术丛书

纳米生物 医学技术



主编 许海燕 王 琛

 中国协和医科大学出版社

国家科学技术学术著作出版基金资助出版

纳米生物医学技术

Nanotechnology in Biomedical Sciences

主 编 许海燕 王 琛

中国协和医科大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

纳米生物医学技术 / 许海燕, 王琛主编. —北京: 中国协和医科大学出版社, 2009. 2

(生物医学技术丛书)

ISBN 978 - 7 - 81136 - 130 - 8

I. 纳… II. ①许…②王… III. 纳米材料 - 应用 - 生物医学工程
IV. R318

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 002576 号

纳米生物医学技术

主 编: 许海燕 王 琛

责任编辑: 田 奇 刘 凯

出版发行: 中国协和医科大学出版社

(北京东单三条九号 邮编 100730 电话 65260378)

网 址: www.pumcp.com

经 销: 新华书店总店北京发行所

印 刷: 北京丽源印刷厂

开 本: 700 × 1000 毫米 1/16 开

印 张: 24.25

字 数: 380 千字

版 次: 2009 年 6 月第 1 版 2009 年 6 月第 1 次印刷

印 数: 1—3000

定 价: 66.00 元

ISBN 978 - 7 - 81136 - 130 - 8/R · 130

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其他质量问题, 由本社发行部调换)

内 容 提 要

本书围绕纳米技术在生物医学中的应用展开,是生物医学技术和纳米技术有机结合。全书共9章,详细阐述了纳米技术在生物医学若干领域的发展情况,包括纳米科技推动生命科学的发展、纳米粒子与药物载体技术、癌症早期建仓的纳米技术与材料、以医学应用为目标的纳米器件、用于生物传感器的纳米材料和技术、基于微纳加工技术的纳米生物传感器件、生命科学研究中的纳米表征技术——原子力显微术、再生医学中的多肽分子自组装技术、电纺丝制备纳米纤维技术及其生物医学应用研究、纳米材料对健康和影响及分析评价等;内容翔实、图文并茂,主要适合高等院校生物医学专业学生、研究生、研究人员等阅读参考。

序

我国的中长期科学和技术发展规划纲将纳米技术列入重大科学研究计划四项任务之一，是因为纳米科技正孕育着新的技术革命，给材料、信息、绿色制造、生物和医学等领域带来极大的发展空间，发展纳米科技将对社会与经济，乃至科技产生巨大的推动作用。

纳米技术是在纳米尺度上研究物质的结构与反应机制，进行纳米结构表征与检测，是涵盖材料、物理、化学、生物学与医学等多学科交叉的跨领域的新技术。纳米生物医学技术是纳米技术在生命科学研究中的应用，是生物技术和纳米技术的融合，研究纳米尺度的人造结构与细胞及分子之间的相互作用，利用纳米尺度物质所特有的物理、化学性能，开发针对疾病诊断和治疗的新型功能生物材料、医疗器件以及高效和高灵敏度的检测、诊断和治疗技术，提高疾病的诊治和预防、预警水平，促进人民健康。

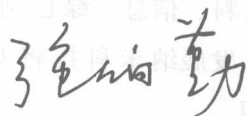
本书主编之一许海燕教授是中国医学科学院纳米医学联合研究中心主任，主要从事纳米结构生物材料及其在生物医学中的应用研究，并加强与分子生物学和临床医学的交叉与合作，在利用纳米技术发展组织修复材料及纳米药物传递系统方面取得了有意义的研究成果；王琛教授是国家纳米科学中心主任，主要从事扫描隧道显微技术的原理及应用研究，在利用扫描探针显微技术研究核酸凝聚现象等纳米尺度上物质表面的物理和化学现象方面，取得了多项有意义的创新性成果。两位主编约请了国内从事纳米技术研究的有关专家介绍纳米技术在生物和医学若干

领域中的研究进展，并着重于介绍这些领域中所应用的技术和材料，有利于从事生物学和医学的科技人员与从事纳米研究的工作者之间的交流沟通。

期望本书的出版有助于相关学科研究人员了解纳米技术在生物医学领域中可能的应用，推进我国纳米生物医学的发展。

中国科学院 院士

中国医学科学院北京协和医学院 教授



2009年3月16日

前 言

自 20 世纪 80 年代以来,纳米技术得到迅速发展并不断取得重要进展。同时,纳米技术快速向其他学科领域渗透,形成了许多全新的交叉学科。生命科学与纳米技术交叉融合所形成的纳米生物医学技术正是其中一个值得各领域研究者共同关注的新兴科学技术。纳米生物医学技术是纳米技术在生命科学研究中的应用,是生物技术和纳米技术的融合。这种融合的巨大潜能是十分显著的,这种全新的杂化形式意味着我们可以在原子水平上模仿和利用天然的生物系统,或者构建极微细的工具来研究生物系统的结构和性质。纳米技术正在生命科学中产生许多重要的作用。

纳米生物医学技术的研究正在不断形成众多分支,各分支的研究都在迅速发展,当前主要涉及在最基本的生物水平上研究纳米尺度的人造结构与细胞及分子之间的相互作用,利用纳米尺度物质所特有的物理、化学性能,开发针对重大疾病的早期诊断和有效治疗的新型功能生物材料、医疗器件,以及高效和高灵敏度的检测、诊断和治疗技术。从更加广义的角度来说,纳米生物医学技术是利用分子水平的工具和知识来诊断、治疗和预防疾病及创伤,解除疼痛,保持和促进人类的健康。

本书选取了一部分研究方向和相关的技术予以介绍。我们很荣幸地邀请到国内纳米生物医学研究领域中的部分专家学者来共同编写,包括,中国科学院力学所的靳刚教授、高能物理所的赵宇亮教授、化学所的方晓红教授、生物物理所梁伟教授、电工所的夏善红教授、国家纳米中心蒋兴宇教授、东南大学顾宁教授、四川大学赵晓军教授。各位作者都是活跃在研究一线的学者;分别承担着国家重大科学研究计划项目、“973 计划”项目、“863 计划”项目、国家自然科学基金项目的研究工作,他们在书中向读者介绍了若干领域的纳米生物医学的关键技术及其最新研究进展,旨在为不同领域中对纳米生物医学研究有兴趣的读者提

供尽可能前沿和实用的信息与技术,也希望能借助本书为各个不同研究领域研究人员进行多学科的交叉与协作尽微薄之力。

本书各章之间既可独自成书,也相互有一定的交叠和关联,彼此之间的联合也可以成为新的方向。由于各个分支的研究特点不同,各位作者在写法上也独具特色,分别从基本原理、实验技术等方面做了充分的阐述,同时对所处领域的研究现状和发展动态给予了综合评述。

本书在编写过程中一直得到中国科学院物理研究所解思深院士给予的鼓励、关心与多方面的支持与指导,在此表示衷心的感谢。

本书的编写也得到国家重大科学研究计划项目“生物医学纳米材料与细胞作用研究”的支持,特此致谢!

许海燕 王琛

2009年3月于北京

目 录

第一章 纳米粒子与药物载体技术	(1)
第一节 概述	(1)
第二节 脂质体	(2)
第三节 聚合物胶束	(10)
第四节 复合功能纳米粒子	(19)
第五节 二氧化硅纳米粒子	(25)
第六节 综述与展望	(29)
第二章 癌症早期检测的纳米技术与材料	(35)
第一节 概述	(35)
第二节 纳米技术为癌症的及早诊断提供基础	(37)
第三节 金属纳米材料与癌细胞检测	(38)
第四节 纳米晶量子点结合分子探针进行肿瘤 的在体检测	(44)
第五节 检测恶性肿瘤的磁性纳米材料与磁纳 米传感器	(49)
第六节 分子影像与纳米材料	(58)
第七节 基于纳米传感器的癌症早期检测技术	(66)
第八节 综述与展望	(81)
第三章 以医学应用为目标的纳米器件	(89)
第一节 概述	(89)
第二节 纳米器件制备方法	(90)
第三节 软刻蚀技术在细胞生物学中的应用	(99)
第四节 软刻蚀技术在生化分析中的应用	(112)
第五节 综述	(127)

第四章 用于生物传感器的纳米材料和技术	(133)
第一节 概述	(133)
第二节 纳米材料电化学生物传感器	(133)
第三节 磁性纳米颗粒生物传感器	(136)
第四节 多功能纳米颗粒	(139)
第五节 量子点生物传感器	(140)
第六节 纳米线生物传感器	(142)
第七节 光纤生物传感器	(144)
第八节 微悬臂生物传感器	(147)
第九节 芯片型生物传感器	(149)
第十节 压电纳米生物传感器	(152)
第十一节 离子通道生物传感器	(153)
第十二节 绿色荧光蛋白 (GFP) 变构生物传感器	(154)
第十三节 纳米孔生物传感器	(155)
第十四节 硅虫晶体管	(155)
第十五节 综述	(156)
第五章 基于微纳加工技术的纳米生物传感器件	(161)
第一节 概述	(161)
第二节 微纳加工技术介绍	(161)
第三节 微纳生物传感技术	(165)
第四节 生物芯片	(178)
第五节 其他纳米生物器件	(188)
第六节 综述	(189)
第六章 生命科学研究中的纳米表征技术——原子力显微术 ...	(193)
第一节 概述	(193)
第二节 AFM 的基本原理	(194)
第三节 AFM 高分辨成像	(196)
第四节 AFM 单分子力谱	(202)
第五节 展望	(213)
第七章 再生医学中的多肽分子自组装技术	(220)
第一节 概述	(220)

第二节 自组装多肽	(221)
第三节 自组装短肽在生物医学中的应用	(234)
第四节 实验部分	(238)
第八章 电纺丝制备纳米纤维技术及其生物医学应用研究	(279)
第一节 概述	(279)
第二节 天然细胞外基质的结构、成分和功能概述	(281)
第三节 高压静电电纺丝技术	(283)
第四节 用于高压静电纺丝的常用生物材料	(293)
第五节 纳米纤维结构对细胞生长行为的作用	(305)
第六节 纳米纤维结构支架在组织工程中的应用研究	(313)
第七节 纳米纤维支架作为药物和生物大分子载体的 研究	(322)
第八节 综述	(324)
第九章 纳米材料对健康的影响及分析评价	(331)
第一节 概述	(331)
第二节 纳米材料生物安全性的体内研究	(332)
第三节 纳米材料生物安全性的体外研究	(353)
第四节 纳米材料毒性作用的机制	(363)
第五节 纳米材料毒性的消除	(365)
第六节 综述	(366)

第一章 纳米粒子与药物载体技术

第一节 概 述

纳米技术涉及物理学、化学、生物学、电子学、计算机科学等众多科学领域，是一门综合性和交叉性极强的新兴学科，其中纳米给药系统的研究具有巨大的发展潜力和诱人的应用前景。“纳米”是一个长度单位，相当于 $1/1000$ 微米。当一种物质被不断切割至一定程度，其粒子小至纳米量级即为纳米材料，纳米尺度效应往往会赋予材料一些新的理化特性和生物学特性，使其在药物输送方面有许多优越性，包括可以跨越某些生物屏障、实现可控释放和靶向给药、延长药物作用时间、减少毒副作用等。因此，纳米给药系统有望成为攻克恶性肿瘤等多种顽疾的有力手段。

近年来，纳米生物技术的蓬勃发展吸引了全球科技界的目光，其中大小在 $1\sim 1000\text{nm}$ 之间的纳米粒是较早开发的一类亚微型粒子，最初的应用主要是通过将药物包在粒子内部或与粒子表面结合等方式改善药物在机体内的运输。尽管纳米粒子的种类在迅速增加，但从总体上说，纳米粒子可划分为两大类。

1. 以有机分子为构造单位的粒子，例如脂质体、纳米胶束、固体脂质纳米粒、树状体、纳米囊和纳米球等。
 2. 以无机物（主要是金属）为核心材料的粒子，例如磁性纳米粒、碳纳米管、量子点等。自从10多年前美国FDA批准了第一个多柔比星长循环脂质体药物（Duxil, Caelyx, 都可喜）以来，与纳米药物输送系统相关的论文和专利数量都一直保持持续的增长。据不完全统计，目前已上市和处于临床研究阶段的纳米药物制剂已有20余种。
- 本章中主要介绍脂质体、聚合物胶束、无机纳米粒子、复合型功能纳米粒子的制备技术及其作为药物载体的应用研究。

第二节 脂 质 体

一、脂质体概述

脂质体 (liposomes, 或称类脂小球) 是一种微小囊泡, 它具有类似生物膜结构的脂质双分子层。脂质体通过双层脂质膜与细胞发生吸附、融合、脂交换和吞入等相互作用, 可将部分包封的药物导入细胞中发挥作用。脂质体最初是由英国学者 Bangham 和 Standish 将磷脂分散在水中进行电镜观察时发现的, 1971 年, 英国 Rahman 等人开始将脂质体用于药物的输运载体。

脂质体的主要组成成分为磷脂^[1], 为调节脂膜的特性, 通常在脂膜中加入某种脂溶性成分, 如胆固醇。胆固醇具有两亲性, 可调节脂膜的流动性, 降低脂膜的通透性^[2], 与磷脂合用可制得相对稳定的脂质体。脂膜中掺入带电荷成分, 如十八胺、磷脂酸等, 可改变脂质体表面的荷电状态, 从而改变脂质体的包封效率等理化性质和在体内的动力学行为。

脂质体的分类方法很多, 主要依据其结构、组成和功能进行分类。按脂质体所包含脂质双分子层的层数可分为: 单室脂质体和多室脂质体^[3]。由一层脂质双分子层构成的脂质体称为单室脂质体。单室脂质体又分为大单室脂质体 (large unilamellar vesicles, LUVs, 粒径在 $0.1 \sim 1 \mu\text{m}$) 和小单室脂质体 (single unilamellar vesicles, SUVs), 粒径 $0.02 \sim 0.08 \mu\text{m}$; 小单室脂质体又称为纳米脂质体 (nanoliposomes), 是具有脂质双分子层结构的最小单位, 其大小依赖于介质的离子强度和膜的组成成分。由多层脂质双分子层构成的脂质体称为多室脂质体 (multilamellar vesicles, MLVs, 粒径在 $1 \sim 5 \mu\text{m}$), 一般包载药物的能力比较低。在单室脂质体中, 水溶性药物的溶液被一层脂质双分子层所包被, 称为内水相; 脂溶性药物则被包载于脂质双分子层中。在多室脂质体中, 脂质双分子层将内水相隔离开来, 水溶性药物存在于两膜层之间, 脂溶性药物则包载于脂质双分子层中。经超声波分散的脂质体悬液多为单室脂质体; 将多室脂质体通过限制孔径的膜滤后可以得到小单室脂质体^[3]。

按脂质体特有的组成和功能可分为普通脂质体、阳离子脂质体、长循环脂质体和免疫脂质体^[4]。

阳离子脂质体是一种带正电的脂质微囊。大多数阳离子脂质体是由一种中性磷脂和一种或多种带正电荷的成分通过单键、双键和多重键结合而成。阳离子脂质体主要作为非病毒介导的基因转染载体用于基因治疗^[5]。

长循环脂质体^[6]是基于普通脂质体在血液中易被单核巨噬细胞系统识别、摄取而被清除的特点发展起来的。它不仅延长了脂质体在血液循环中时间,而且提高了脂质体的体内外稳定性。

免疫脂质体是含有抗体或抗体片段的长循环脂质体。它是单克隆抗体修饰的脂质体的简称,集脂质体的组织特异性和抗体的靶向性于一体,是一种新型的载药系统。免疫脂质体主要用于恶性肿瘤的治疗,它在选择性地杀死或抑制肿瘤细胞生长的同时,对正常组织的毒副作用比较小,因此提高了化疗药物的治疗功效。免疫脂质体的制备方法通常有两大类:交联法和插入法。交联法指将抗体通过合适的偶联剂连接于脂质体的外表面。插入法指在抗体的一段引入亲脂性部分,然后通过脂溶性部分锚入脂质体的外层脂膜中。免疫脂质体的体外研究已取得了较好的效果,但体内实验的效果并不理想。

此外,还有根据肿瘤组织的微环境特征来构建的脂质体,如温度敏感型脂质体、磁性脂质体及 pH 敏感型脂质体。温度敏感型脂质体是指当温度达到脂质材料的相变温度时,脂质体双分子层膜的稳定性受到影响,膜的流动性和通透性增大,使所包封药物的释放速率增大,以达到治疗的效果。制备该类脂质体所用的脂质材料有二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl - phosphatidyl - choline, DPPC)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)和二棕榈酰神经鞘磷脂(DPSP),其相变温度为 41 ~ 43℃。温度敏感脂质体具有良好的热靶向性,如 Kakinuma^[7]应用此类脂质体携载化疗药物顺铂,同时给大鼠脑瘤局部加热(41℃),显著增加了药物在脑肿瘤部位的聚集。pH 敏感型脂质体是指可以体内微环境的 pH 值作为脂质体内药物释放的激发因子,脂质体在 pH 值变化的条件下不稳定,脂质双分子层被破坏而释放药物。

二、普通脂质体的制备方法^[3]

(一) 注入法 该法是将磷脂溶于乙醚或氯仿等有机溶剂中,然后注入与之互不相溶的介质中,如注入亲水性溶剂中。这个方法的优点是制备过程简单,有机相中磷脂浓度对脂质体的大小影响较小;缺点是有

机溶剂和高温会使大分子物质（如蛋白质等）变性或对热敏感的物质灭活，此外制得的脂质体粒径不易均匀。

（二）薄膜分散法 此方法是将磷脂或脂溶性药物等溶于有机溶剂中，在合适的容器中除去有机溶剂形成脂膜，再加入水或缓冲溶液，使脂膜水化并分散成为脂质体。该方法操作简便，可以得到具有典型多室结构的脂质体（多室脂质体），但是这种方法对药物的包封率较低。

（三）超声波分散法 对通过注入法或薄膜分散法得到的脂质体做进一步的超声波处理，可以得到单室脂质体悬液。通过该这种方法制得的脂质体尺寸小而分布均匀。

（四）逆相蒸发法 采用适当的方式将含有药物的水相均匀地分散于溶解有磷脂的有机溶剂相中，减压除去有机相后可以得到脂质体，由于在制备过程中发生了相的转变，故称此方法为逆相蒸发法。这种方法的特点是药物包封量大，体积包封效率可以比超声波分散法大近 30 倍，适合于包封水溶性药物及生物大分子活性物质，如各种抗生素、胰岛素、免疫球蛋白、碱性磷脂酶、核酸等。

（五）冻融法 上述方法制备得到的脂质体可进一步进行低温冷冻，然后加热熔融。如此循环若干次。冻融处理可改变药物在脂质体中的分布及相互作用方式。

除上述方法外，还有复乳法，透析法，离心法，前体脂质体法，钙融合法等。

三、制备脂质体的新方法和新应用

尽管传统脂质体的制备方法各有其优点，但由于其稳定性的问题，会产生药物渗漏、粒子聚集、磷脂氧化和水解、适用范围局限性较大等问题，影响了脂质体在临床上的应用。通过新技术、新材料的应用和对制备工艺改进，可以使这些问题得到有效的解决。本节主要介绍最近发展起来的制备脂质体的新方法和新用途，从其原理、材料、制备方法、表征及应用这几个方面进行举例说明。

（一）电荷中和法^[8]制备脂质体及其应用

1. 原理 以包载 siRNA 的脂质体制备为例。在组成脂质体的脂膜中掺入带正电荷的脂质成分，将其成膜，用含有等量负电荷的核酸片段的水溶液使脂膜水化，在适当的温度（脂质相变温度以上）孵育 30 ~ 60min。根据实验需要过不同孔径的聚碳酸酯微孔膜（50 ~ 1000 nm），

即可得到所需粒径的脂质体。

2. 材料 蛋黄磷脂 (ePC)、胆固醇 (Ch)、聚乙二醇 2000 - 二硬脂酰乙醇胺 (PEG₂₀₀₀ - DSPE)、二棕榈酰乙醇胺 (DPPE)、二油酰三甲胺丙烷 (DOTAP) 和罗丹明标记的二油酰乙醇胺 (Rho - PE) 均购自美国 Avanti Polar Lipids 公司; 三乙胺、CL - 4B 琼脂糖和聚乙二醇 3400 - 二对硝基苯碳酸酯 [PEG₃₄₀₀ - (pNP)₂] 均购自美国 Sigma 公司; 21 bp siRNA 由上海基因药物公司 (Shanghai GenePharma Co.) 合成, 有义链为 5' - GACUCGCAACACGCUAUUCTT - 3', 并于 3' 端进行荧光素 (FITC) 标记, 反义链为 5' - GAAuAGCGuGuuGCGAGUUCTT - 3'; 八聚精氨酸 (R8) (本实验室合成)。

3. 制备方法

(1) pNP - PEG₃₄₀₀ - DPPE 的合成 取浓度为 20mg/ml 的 DPPE 氯仿溶液 10ml, 置于 50 ml 的圆底烧瓶中, 滴加三乙胺 (TEA) 0.65 ml, 将 PEG₃₄₀₀ - (pNP)₂ (200mg/ml 氯仿溶液) 约 4.0 g 加入到上述混合液中, 吹入氮气, 密封, 避光, 于室温下磁力搅拌过夜。减压蒸干溶剂, 真空除尽残留氯仿, 加入 0.01mol/L 的 HCl 水溶液 100 ml, 超声处理后形成透明的胶束溶液。以 0.01mol/L 的 HCl 水溶液为洗脱液, 经 CL - 4B Sepharose 进行分离, 除去未反应的 PEG₃₄₀₀ - (pNP)₂ 和释放的 pNP, 收集含有 pNP - PEG - DPPE 胶束的洗脱液, 冷冻干燥, 用 TLC、HPLC、MS 和 NMR 对 pNP - PEG - DPPE 进行定性分析和定量检测。

(2) R8 - PEG₃₄₀₀ - DPPE 的合成 用 R8 取代 pNP - PEG₃₄₀₀ - DPPE 中的 pNP, 合成 R8 - PEG₃₄₀₀ - DPPE。取 100mg 所合成的 pNP - PEG₃₄₀₀ - DPPE 溶于 10ml 氯仿中, 置于 50ml 茄形烧瓶中, 于旋转蒸发仪上减压除去氯仿, 形成脂膜, 真空除尽残留氯仿。将 25mg R8 溶于 4ml 0.01mol/L 的 HCl 水溶液中, 加入到内壁涂布了脂膜的茄形烧瓶中, 于室温孵育 30min, 轻摇使脂膜充分分散。于混悬液中加入 10mmol/L (pH 9.0) 的 Tris 缓冲液 20 ml, 混匀, 氮气保护, 于 4℃ 孵育过夜。将样品置于截留分子量为 5kD 的透析袋中, 在 10mmol/L (pH 7.4) 的 Tris 缓冲液中透析约 4h, 再用去离子水于 4℃ 透析 24h, 取出袋内溶液, 冷冻干燥, 置 -20℃ 冰箱内保存。

(3) siRNA 脂质体的制备 将 ePC、Ch、PEG₂₀₀₀ - DSPE 和 DOTAP 的氯仿溶液按摩尔比 60:34:3.0:3.0 的比例混合, 如需标记脂膜, 可于上述混合液中加入占总脂质量摩尔比 0.1% 的 Rho - PE, 减压除尽氯

仿后形成脂膜。

将一定量的 siRNA 溶于经 DEPC 处理的超纯水中, siRNA 用量以完全中和 DOTAP 所带的正电荷来计算。在 50℃ 水浴中, 用含 siRNA 的水溶液将上述磷脂膜水化 30min, 形成包裹 siRNA 的脂质体。用手动挤出装置将初步形成的脂质体分别过孔径为 0.4 μm 和 0.1 μm 的聚碳酸酯微孔膜 (Whatman) 10 次, 得到粒径均一的脂质体。

取适量 R8-PEG₃₄₀₀-DPPE 溶于甲醇, 置于圆底烧瓶中, 氮气吹干成膜, 加入上一步骤中制备好的脂质体混悬液, 于 37℃ 水浴中温浴 2h, 使 R8-PEG₃₄₀₀-DPPE 定向地插入到脂质体的外层膜上。其中八聚精氨酸在脂质体中占总脂质成分的摩尔比一般为 0.5% ~ 1.0%, 根据实验需要可适当调整其比例。用动态激光散射、冰冻蚀刻电子显微镜、核酸电泳来检验八聚精氨酸修饰的包载 siRNA 的聚乙二醇化脂质体的理化特性。

4. 表征

(1) 冰冻蚀刻电子显微镜 冰冻蚀刻电子显微镜观察八聚精氨酸修饰的包载 siRNA 的脂质体的形貌和结构。标本置于 -196℃ 的液氮中, 进行冰冻。然后用冷刀骤然将标本断开, 升温后, 冰在真空条件下迅速升华, 暴露出断面结构, 蚀刻后, 向断面以 45° 喷涂一层蒸汽铂, 再以 90° 喷涂一层碳, 加强反差和强度。然后用次氯酸钠溶液消化样品, 把碳和铂的膜剥下来, 该复膜显示出了标本蚀刻面的形态, 并用电镜观察。冰冻蚀刻电子显微镜照片显示, R8-liposomal siRNA 的外形构造类似 SARS 病毒, 其大小在 50 ~ 200 nm, 由数个 15 ~ 30 nm 的小颗粒组装而成。

(2) 动态光散射 动态光散射测定其粒径, liposomal-siRNA 和 R8-liposomal-siRNA 粒径分布窄而均一, 平均粒径分别为 133nm 和 138nm, liposomal-siRNA 经 R8 修饰后平均粒径增大了约 5nm。

(3) 凝胶电泳 凝胶电泳显示, 包裹于脂质体内的 siRNA 不能被溴化乙锭染色; 用表面活性剂十二烷基磺酸钠处理脂质体后, 其中的 siRNA 会被释放出来, 并能被溴化乙锭染成明亮的条带 (紫外灯下), 该条带在凝胶上的位置与游离 siRNA 的条带一致。另外, 被脂质体包裹的 siRNA 在血清中的稳定性显著增加, 与血清共温育 24h 后未见分解。相反, 游离的 siRNA 与血清共温育 6h 即被完全分解。

5. 应用 当前世界范围内进行的基因治疗实验中约有 13% 运用非病