DNA 水凝胶分子设计、合成与应用

仰大勇^{①*}, 许传营^{①②}, 彭松明^①, 崔金辉^{①④}, 俞雁^②, 韩伟^③, 崔海信^④, 罗丹^{①⑤*}

① Department of Biological and Environmental Engineering, Cornell University, Ithaca, New York 14853, USA;

② 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240;

③ 上海交通大学药学院, 上海 200240;

④ 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081;

⑤ Kavli Institute at Cornell for Nanoscale Science, Ithaca, New York 14853, USA

* 联系人, E-mail: dy228@cornell.edu; dan.luo@cornell.edu

2013-04-02 收稿, 2013-06-27 接受, 2013-12-16 网络版发表

摘要 DNA 纳米技术是纳米生物技术的一个重要研究领域, 近年来发展迅猛. 通过理性设计和可控制备可以获得多种基于 DNA 纳米结构的材料. DNA 水凝胶作为宏量 DNA 材料的重要代表备受关注, 展现出很广泛的应用前景, 尤其是在生物医学应用领域. 本文介绍了 DNA 水凝胶的分子设计原理、合成方法和典型应用, 重点综述近年来该领域具有代表性的研究成果.

关键词

纳米生物技术
DNA 纳米技术
DNA 水凝胶
药物缓释
蛋白质生产
免疫调控

脱氧核糖核酸(DNA)是生命系统的核心分子之一, 主要功能是存储和编码基因信息^[1]; 30 多年前, Seeman^[2]设计并合成了人工的 DNA 纳米结构, 开启了 DNA 纳米技术的大门. 经过多年的发展, DNA 纳米技术受到化学、生物学和材料科学等领域的科研工作者的广泛关注, 多种 DNA 材料相继被设计合成, 并应用于多个领域, 尤其是在生物医学领域^[3-7]. 从材料和化学的角度来看, DNA 具有独特而优异的物理和化学性质, 从而使 DNA 结构具有可设计性、多样性和多功能性等优点^[4,5]. 最为显著的优点是 DNA 分子的可操控性, 比如, (1) DNA 分子由含 4 种不同碱基(A, T, C, G)的单体连接而成, 其序列可以根据设计要求任意排列组合; (2) 碱基两两特异性配对(A 只和 T 配对, C 只和 G 配对), 基于这个原则, 两条互补的单链 DNA(ssDNA)能够自组装成为双链 DNA(dsDNA), 这也是 DNA 纳米技术的核心基础(图 1(a)); (3) 一系列成熟的分子生物学方法为 DNA 的分子操

作提供了丰富的工具, 包括对 DNA 进行连接、剪切、扩增的各种酶, 以及广泛应用的聚合酶链反应(PCR)技术; (4) 存在很多对 DNA 进行化学修饰的方法.

因为 DNA 的这些独特之处, 科学家们理性设计、合成了多种 DNA 材料, 包括各种有序结构, 以及以这些 DNA 结构为模板的其他材料(比如纳米粒子、生物分子等)组装而成的更复杂的纳米结构^[5,8-11]. 对于 DNA 材料应用至关重要是实现 DNA 材料的宏量制备. DNA 水凝胶是 DNA 材料宏量制备的典型代表. 水凝胶材料种类繁多、应用广泛^[12-18], 而利用 DNA 制造水凝胶, 既利用了水凝胶的骨架功能, 也利用了 DNA 的生物功能, 实现了水凝胶材料结构与功能的统一融合.

按照水凝胶形成的机理, DNA 水凝胶大致分为两类: 化学水凝胶和物理水凝胶. 化学水凝胶是由化学键作为交联点而形成的水凝胶; 物理水凝胶则是由非化学键作为交联点而形成的水凝胶(图 1(b)).

引用格式: 仰大勇, 许传营, 彭松明, 等. DNA 水凝胶分子设计、合成与应用. 科学通报, 2014, 59: 107-115

Yang D Y, Xu C Y, Peng S M, et al. Molecular design, synthesis and applications of DNA hydrogel (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 107-115, doi: 10.1360/972013-384

图 1 DNA 和 DNA 水凝胶示意图

(a) 双链 DNA 双螺旋结构和 DNA 碱基配对原则; (b) 根据三维交联网络类型的不同, DNA 水凝胶分为化学水凝胶和物理水凝胶, 化学水凝胶由化学键交联, 物理水凝胶由物理相互作用(非共价键)交联

1 DNA 水凝胶分子设计与合成

1.1 化学水凝胶

化学水凝胶是由化学键作为交联点而形成的水凝胶。Um 等人^[19]在 DNA 碱基配对自组装的基础上, 引入酶催化交联步骤, 制备了完全由 DNA 构成的化学水凝胶, 该工作不仅第一次实现了全 DNA 水凝胶的酶催化合成, 并达到了宏量制备。在分子设计当中, 构成水凝胶的基本单元是分叉状 DNA 单体(branched DNA monomer, BDM), BDM 可以是 X-, T-或者 Y-形状的 DNA 纳米结构。以 Y-形状的 BDM(Y-DNA)为例, 如图 2 所示, 首先设计 3 条特殊序列的 ssDNA, 这 3 条 ssDNA 局部序列互补; 当它们在一起时, 通过程序调控温度变化, 会自组装成 Y-形状的 DNA 纳米结构。Y-DNA 的骨架犹如 3 条手臂, 手臂的主干部分是 dsDNA, 手臂末端留有一小段 ssDNA, 称为黏性末

端(free sticky-end), 黏性末端被设计成回文结构, 这样每个黏性末端结构自身互补配对。因此, Y-DNA 能够通过碱基配对互相连接起来, 形成三维网络结构。为了形成更稳定的三维网络, 加入的连接酶(T4 ligase)将 Y-DNA 通过磷酸键共价连接起来。该 DNA 水凝胶可以在不同形状的模具里合成, 得到了所设计的不同形状, 比如立方体、球形以及 CORNELL 单词等形状。电子显微镜照片和荧光显微镜照片都揭示了 DNA 水凝胶的微观结构是由纤维构成。除利用连接酶以外, 也可以利用 DNA 分子上的化学基团或者末端修饰基团进行化学交联, 以此制备化学水凝胶^[20,21]。

1.2 物理水凝胶

DNA 物理水凝胶是通过 DNA 分子间的非共价作用形成的三维网络结构, 非共价键作用包括以氢键为主的 DNA 碱基间的互补配对作用和 DNA 分子链间的缠绕作用(entanglement)等。

Xing 等人^[22]利用 DNA 本身具有的碱基间的互补配对作用制备了 DNA 物理水凝胶。他们采用的方法与 Um 等人^[19]的方法类似, 首先合成 Y-DNA, 在此基础上引入了一条能与 Y-DNA 黏性末端互补的衔接 DNA(Linker), 通过改变 Y-DNA 与衔接 DNA 的黏性末端长度、浓度和比例达到调控 DNA 水凝胶的各种性能(图 3(a))。结果显示, 当黏性末端长度达到 8 个碱基对(bp)时, 互补黏性末端提供的物理作用力足够使 Y-DNA 与衔接 DNA 交联形成水凝胶。当黏性末端继续增长到 12 个碱基对时, 所形成的水凝胶机械强度更强。这种物理水凝胶可以像 DNA 分子本身一样具有热反应可逆性(图 3(b)), 且可以通过限制性内切酶对含有特异性内切位点序列的水凝胶进行酶切分解。另外, Cheng 等人^[23]通过在 Y-DNA 3 个末端引入 i-motif, 利用 i-motif 在特定条件下形成链间互咬合(interlocking)结构形成的三维网络制备物理水凝胶(图 3(c))。i-motif 含有多个 C 碱基, 其构象能够被 pH 特异调节。当 pH 较低时, Y-DNA 通过黏性末端 i-motif 之间形成链间互咬合结构, 从而迅速形成水凝胶; 而在高 pH 时, 这种链间互咬合结构解链, 水凝胶转换为液体状态。这种物理 DNA 水凝胶的机械强度随着单体 Y-DNA 的浓度升高而增加, 并对温度变化也有所响应, 当温度升高时剪切模量降低(图 3(d)), 这种性质对于药物控释非常有利。

图2 化学水凝胶

(a) 分子设计和水凝胶合成路线图; (b) 宏量制备 DNA 水凝胶的宏观照片; (c) 水凝胶能形成与模具相同的图案, 比如 CORNELL 图案.
Reprinted with permission from [19]. Copyright 2006 Nature

图3 两种 DNA 物理水凝胶的分子设计原理和性质

(a), (b) 利用黏性末端杂交而形成的物理水凝胶; (c), (d) 利用 i-motif 所形成的特定链间互咬合结构而形成的物理水凝胶. Reprinted with permission from [22] and [23]. Copyright 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA and 2009 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

除了能以分子量较小的分叉 DNA 单体(比如上述的 Y-DNA)相互交联形成水凝胶, 还能用分子量较大的长链 DNA 相互缠绕形成水凝胶. 最近, Lee 等人^[24]通过精确而巧妙的分子设计, 合成了一种具有独特超材料性质的 DNA 水凝胶. $\phi 29$ 是一种高效的 DNA 多聚酶, 能够以环形 DNA 为模板, 滚环合成超长链 DNA^[25]. 利用 $\phi 29$ 多聚酶的这种特性, 设计多重引物, 从而合成了分子链巨大的线性 DNA. 这些 DNA 通过物理缠绕形成了 DNA 物理水凝胶. 具体合成路线如图 4(a)所示, 首先以环形 DNA 为模板, 加入引物 1(Primer 1), 在 $\phi 29$ 的催化作用下合成出长的

ssDNA 1; 然后在反应体系中加入引物 2 和引物 3, 引物 2 与 ssDNA 1 互补, 杂交在 ssDNA 1 上, 并以 ssDNA 1 为模板, 合成 ssDNA 2; 引物 3 与 ssDNA 2 互补, 杂交在 ssDNA 2 上, 并以 ssDNA 2 为模板合成 ssDNA 3, 依此形成一个循环的链式反应体系. 所生成的长链 ssDNA 相互交织缠绕成三维网络结构, 即 DNA 物理水凝胶. 值得一提的是, 水凝胶的微观形貌和常规的水凝胶材料的纤维状结构完全不同, 为一种超乎想象的“鸟巢”(birdnest)结构(图 4(b)). 这种结构来源于独特的分子设计和合成过程. 流变学表征确认了合成的产物确实是水凝胶(图 4(c)). 出乎意

图 4 具有独特机械性能的超材料物理水凝胶

(a) 合成路线图; (b) SEM 照片; (c) 机械性能测试; (d) 独特的机械性能: 水凝胶在水中呈现固态性质, 去除水后呈现液态性质, 重新注入水后水凝胶恢复原来的形状. Reprinted with permission from [24]. Copyright 2012 Nature Publishing Group

料的是,通过这种方式所形成的 DNA 水凝胶具超材料性质:在水中呈现出固态特性,能够长久保持其形状不改变;但是,在去除周围的水之后,则呈现出液态特性,水凝胶能够自由流动,形状可随容器而任意改变;当水凝胶重新浸入水中,会恢复其初始形状.这种奇特的固-液转换和形状记忆特性赋予了 DNA 水凝胶超材料性质,而且可以多次重复.例如,研究者们做出了 D, N, A 字母形状的水凝胶,在水中这 3 个字母形状清晰可辨;当去除水后,水凝胶变成液态, D, N, A 字母形状完全消失(变成试管底部形状);当再次加入水后,水凝胶很快地回复到固态(在 15 s 之内),字母形状完全恢复(图 4(d)).该结果首次合成了完全由 DNA 构成的具有超材料性质的物质.

除此以外,通过将 DNA 接枝到其他高分子上,并利用 DNA 互补配对作为交联点也可以合成高分子水凝胶^[26];DNA 还可以与其他纳米材料(比如,碳纳米管和石墨烯)形成复合水凝胶^[27,28],限于篇幅,在此不做详细介绍.

2 DNA 水凝胶表征

DNA 水凝胶表征主要包括形态和性能的研究,除此以外,对于具体应用,还有相应的表征手段(将在介绍应用时具体阐述).形态表征主要分为对宏观形态和微观结构的观察.宏观形态表征主要通过相机直接拍摄水凝胶获得,例如,Um 等人^[19]和 Lee 等人^[19,24]利用数码相机拍摄了宏量制备的 DNA 水凝胶的形貌(图 2(b)和(c));也可以将 DNA 用特定颜色的染料染色,在紫外光的照射下,拍摄荧光照片.微观结构表征包括利用光学显微镜、电子显微镜和原子力显微镜观察水凝胶.例如,Um 等人^[19]利用光学显微镜、扫描电子显微镜和原子力显微镜表征了 DNA 水凝胶的纤维状微观结构;Lee 等人^[24]用扫描电子显微镜表征了 DNA 水凝胶独特的“鸟巢”结构(图 4(b)).

流变学测试是表征 DNA 水凝胶机械性能的主要方法之一,流变学测试的两个主要参数是存储模量(G')和损失模量(G'').如果 G'' 大于 G' ,物质表现出液体性质;反之,如果 G' 远大于 G'' ,物质则表现出固体性质;而在水凝胶状态时, G' 稍大于 G'' .Cheng 等人^[23]利用流变学测试表征了不同条件下合成的水凝胶(图 3(d)):改变制备水凝胶单体的浓度获得的水凝胶具有不同的 G'/G'' 差异,当浓度较低时 G'' 大于 G' ,还未成胶,增加单体浓度, G' 和 G'' 都增加,但 G' 增加

的幅度更大,直至超过 G'' ,形成水凝胶.Lee 等人^[24]也用类似的方法表征了具有超材料性质 DNA 水凝胶的成胶情况,值得一提的是这种水凝胶的存储模量非常低(小于 10 Pa,图 4(c)),接近液体的存储模量.

3 DNA 水凝胶应用

DNA 水凝胶的生物相关性和分子结构可设计性的优点使其在众多生物医学领域都有广泛的应用.在此我们介绍在几个主要领域的应用,包括药物缓释、蛋白质生产和免疫调控等.

3.1 药物缓释

药物缓释方式对于疾病治疗至关重要.如果使用一般的给药方式,比如一次性注射(bolus injection),人体内的有效药物浓度只能维持较短的时间;而且,血液或体内组织中的药物浓度波动较大,有时超过病人的药物最高耐受剂量,有时又低于有效剂量.这样不但起不到应有的疗效,而且还可能产生不必要的副作用.因此,控制药物的缓慢释放(controlled drug release)在治疗中非常必要和重要.因此,科学家们研究制备了各种类型的控制药物缓释的载体材料^[29-32].DNA 作为药物缓释材料有其独特的优势,比如,DNA 材料具有生物相容性与生物可降解特性(降解产物是人体代谢本身所需要的核苷酸),以及 DNA 材料可以通过序列设计将基因信息融入到材料当中等.Um 等人^[19]将制备的 DNA 水凝胶用于药物长期可控释放.药物的包被过程在水凝胶制备时原位完成,所以药物(喜树碱,分子量为 348.3;胰岛素,分子量为 5777.6)的包被效率达到 100%.喜树碱和胰岛素在 0.2 mmol/L DNA 水凝胶中的释放曲线都显示出渐进缓慢的释放过程,而且没有观察到通常难以克服的释放量陡增的现象(burst effect).通过改变制备水凝胶的单体结构(Y-, X-或者 T-形状 DNA),可以调控药物释放的过程.这种调控作用归结于单体结构不同而致使的水凝胶微观结构的不同.这些结果显示可以利用 DNA 水凝胶独特的可操控性来调控多种药物的缓释.Nishikawa 等人^[33]也把 DNA 水凝胶应用于药物缓释,得到了类似的研究结果.

3.2 蛋白质生产

蛋白质生产在生物和医学领域有着广泛而重要的应用.传统的基于细胞的蛋白表达系统通常存在

耗时、成本高、操作复杂和不能表达多种蛋白等问题. 无细胞蛋白表达系统利用细胞裂解液转录和翻译 DNA 模板, 实现了蛋白质的简单快速体外表达, 而且可以表达大多数细胞不能表达的蛋白^[34-41]. 现有的无细胞蛋白表达系统大部分是液相系统(solution phase system, SPS), 产量较低. Park 等人^[42,43]报道了一种高效无细胞蛋白质生产的 DNA 水凝胶(protein producing DNA hydrogel, P-gel)系统, P-gel 系统极大地提高了蛋白质体外表达的产量, 最高产量可以高达 5 mg/mL, 并且表达效率是传统 SPS 方法的 300 多倍. DNA 水凝胶蛋白表达功能是通过分子序列设计来实现的, 如图 5 所示. 与合成一般的 DNA 水凝胶有所不同^[19], 把 X-形状 DNA(X-DNA)的黏性末端与线性质粒 DNA(Plasmid)的末端设计成回文互补, 这样通过碱基互补配对并在 DNA 连接酶的作用下, X-DNA 的黏性末端与线性质粒 DNA 共价连接, 最终形成含有基因的水凝胶. 与 SPS 相比, P-gel 的表达效率和产量有巨大提高(图 5). 利用 P-gel 系统, 绿色荧光蛋白、荧光素酶、膜蛋白和蛋白激酶等 16 种蛋白都得到了高效表达, 而且表达产物都具有活性. 由于

没有活细胞的参与, P-gel 系统甚至可以在非生理条件(如存在去垢剂或低温条件下)表达蛋白. 将 P-gel 与生物反应器或微流控技术相结合, 有望实现蛋白表达的量产化和自动化.

3.3 免疫调控

免疫调控是通过调节免疫系统中的免疫细胞和免疫分子之间, 以及与其他系统之间的相互作用, 使机体能够更好地实现“自我”(self)与“非我”(no-self)的免疫识别, 以维持机体内环境的稳定. 因此, 设计合适的免疫分子实现机体的免疫调控在疾病预防和治疗中意义重大^[44,45]. 通常, DNA 不能引起免疫反应, 所以绝大多数外源 DNA 可以通过食物的形式进入体内, 而不引起过敏反应; 人体细胞也会在体内释放自源 DNA, 但人体可以正常地将其代谢. 另一方面, 个别疾病, 比如红斑狼疮(lupus)的可能病理机制之一是对自身 DNA 的免疫反应^[46]; 人体自身 DNA 都是被甲基化的 DNA, 这是识别外源 DNA 的重要机制之一. 源于原核生物的非甲基化 CpG 基序(motif)是一种病原相关分子模式(pathogen associated molecular

图 5 DNA 水凝胶用于蛋白质生产

(a) P-gel 制备和蛋白生产原理图; (b) P-gel 与 SPS 蛋白生产对比; (c) P-gel 和 SPS 生产 Rluc 发冷光蛋白的照片对比. Reprinted with permission from [48]. Copyright 2009 Nature Publishing Group

patterns, PAMPs), 能够通过 Toll-样受体激活天然免疫系统(innate immune system), 进而对侵入的病原菌进行抵御. 利用这一特点, CpG 基序可以用来作为免疫佐剂或直接的免疫系统激活药物, 治疗病原微生物感染及癌症, 许多研究已进入临床阶段^[47-49]. Nishikawa 等人^[33]通过分子设计能够将 CpG 基序融合在 DNA 水凝胶的骨架上, 致使机体产生免疫反应, 应用于免疫调控. 具体而言, 首先将 X-DNA 单体中引入 CpG 基序, 然后通过 DNA 连接酶把 X-DNA 单体交联成为含有 CpG 基序的 DNA 水凝胶, 并且与水凝胶的药物缓释功能结合起来. 这种水凝胶所引起的免疫反应效果远好于同等数量 CpG 基序的 X-DNA 单体. 当这种水凝胶同时载入化疗药物阿霉素时, 药物的缓释与水凝胶所引起的免疫激活反应产生协同作用, 从而达到抑制体外癌细胞的生长. 进一步的体内试验的结果也证明载入化疗药物阿霉素的 CpG DNA 水凝胶能够更好地抑制肿瘤生长(图 6(a)), 从而有望实现癌症的免疫治疗.

3.4 DNA 超材料水凝胶相关应用

值得一提的是, 如前面所述, 具有超材料性能的 DNA 水凝胶具有独特的性质, 因此可以利用这些特性实现很多独特的应用. 比如, Lee 等人^[24]设计了一个以 DNA 超材料水凝胶为基础的电路, 出乎意料的是, 可以用水来控制这个电路的开与关(图 6(b)). 具体而言, 为了增加导电性, 在 DNA 超材料水凝胶中掺杂 10 nm 大小的金纳米粒子. 当把 DNA 超材料水凝胶周围的水去除, DNA 水凝胶立刻表现出液体性质, 可以流动伸长, 将两个电极连通, 电路导通(开); 当有水的时候, DNA 水凝胶迅速恢复到其初始的更短的形状, 从而导致水凝胶马上远离电极, 导致电流切断(关). DNA 超材料水凝胶也可以被应用到如药物缓释等生物医学领域, 其他领域的更多应用目前正在探索中. 此外, 最近 Hur 等人^[50]探索了 DNA 水凝胶在超级电容器方面的应用.

4 展望

纳米生物技术促进了生物、化学、材料等领域的交叉融合^[51], DNA 纳米技术是纳米生物技术的重要领域之一, 解决了生物和医学领域的众多问题. 尤其是, 将 DNA 既作为基因分子(genetic molecule), 又视为一般结构分子(generic molecule), 实现了化学功能

图 6 (a) DNA 水凝胶用于免疫调控; (b) 具有超材料性能的 DNA 水凝胶用于电路开关

(a) Δ, 5% 葡萄糖; ▲, 阿霉素; ○, 含有 CpG 基序的 DNA 水凝胶; □, 无 CpG 基序的 DNA 水凝胶; ●, 阿霉素/含有 CpG 基序的 DNA 水凝胶; ■, 阿霉素/无 CpG 基序的 DNA 水凝胶. Reprinted with permission from [33] and [24]. Copyright 2011 Elsevier and 2012 Nature Publishing Group

与生物功能的前所未有的统一融合. DNA 水凝胶作为 DNA 纳米技术在实际应用中的先驱和杰出代表, 从基础研究角度来看, DNA 水凝胶提供了在纳米尺度理性设计和精确调控分子的研究平台, 这种平台是其他大分子无法实现的; 同时在应用方面, DNA 水凝胶已经表现出很多难以实现和意想不到的性质, 而且可以宏量制备, 应用前景广泛多样、激动人心. DNA 水凝胶领域也存在着很多需要解决的问题, 比如, DNA 水凝胶力学性质的提高和调控, 多功能水凝胶的设计, 更多应用的探索与开发, 以及产业化相关的宏量制备^[4-6,52]. 我们相信, 通过不同领域的科学家共同努力, 这些问题一定会得到有效解决, 使 DNA 水凝胶在各个方面成为有实际应用的重要材料.

参考文献

- 1 Watson J D, Crick F H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953, 171: 737–738
- 2 Seeman N C. Nucleic-acid junctions and lattices. *J Theor Biol*, 1982, 99: 237–247
- 3 Feldkamp U, Niemeyer C M. Rational design of DNA nanoarchitectures. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 1856–1876
- 4 Luo D. The road from biology to materials. *Mater Today*, 2003, 6: 38–43
- 5 Yang D Y, Campolongo M J, Tran T N N, et al. Novel DNA materials and their applications. *Wiley Interdiscip Rev-Nanomed Nanobiotechnol*, 2010, 2: 648–669
- 6 Roh Y H, Ruiz R C H, Peng S M, et al. Engineering DNA-based functional materials. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 5730–5744
- 7 樊春海, 刘冬生. DNA 纳米技术——分子传感、计算与机器. 北京: 科学出版社, 2011
- 8 Tan S J, Campolongo M J, Luo D, et al. Building plasmonic nanostructures with DNA. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6: 268–276
- 9 Cheng W L, Campolongo M J, Cha J J, et al. Free-standing nanoparticle superlattice sheets controlled by DNA. *Nat Mater*, 2009, 8: 519–525
- 10 Cheng W L, Park N Y, Walter M T, et al. Nanopatterning self-assembled nanoparticle superlattices by moulding microdroplets. *Nat Nanotechnol*, 2008, 3: 682–690
- 11 Lan X, Chen Z, Liu B J, et al. DNA-directed gold nanodimers with tunable sizes and interparticle distances and their surface plasmonic properties. *Small*, 2013, doi: 10.1002/sml.201202503
- 12 Lee K Y, Mooney D J. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*, 2001, 101: 1869–1879
- 13 Vermonden T, Censi R, Hennink W E. Hydrogels for protein delivery. *Chem Rev*, 2012, 112: 2853–2888
- 14 Yu L, Ding J D. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chem Soc Rev*, 2008, 37: 1473–1481
- 15 Zhao F, Ma M L, Xu B. Molecular hydrogels of therapeutic agents. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 883–891
- 16 Hu J M, Zhang G Q, Liu S Y. Enzyme-responsive polymeric assemblies, nanoparticles and hydrogels. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 5933–5949
- 17 Yang Z, Liang G, Xu B. Enzymatic hydrogelation of small molecules. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 315–326
- 18 Xu F J, Kang E T, Neoh K G. Ph- and temperature-responsive hydrogels from crosslinked triblock copolymers prepared via consecutive atom transfer radical polymerizations. *Biomaterials*, 2006, 27: 2787–2797
- 19 Um S H, Lee J B, Park N, et al. Enzyme-catalysed assembly of DNA hydrogel. *Nat Mater*, 2006, 5: 797–801
- 20 Costa D, Valente A J M, Miguel M G, et al. Light triggered release of solutes from covalent DNA gels. *Colloid Surface A*, 2011, 391: 80–87
- 21 Roh Y H, Park J H, Ye J J, et al. Systematic studies of uv stability and photopolymerization efficiency of DNA-based nanomaterials. *ChemPhysChem*, 2012, 13: 2517–2521
- 22 Xing Y Z, Cheng E J, Yang Y, et al. Self-assembled DNA hydrogels with designable thermal and enzymatic responsiveness. *Adv Mater*, 2011, 23: 1117–1121
- 23 Cheng E J, Xing Y Z, Chen P, et al. A ph-triggered, fast-responding DNA hydrogel. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 7660–7663
- 24 Lee J B, Peng S, Yang D, et al. A mechanical metamaterial made from a DNA hydrogel. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7: 816–820
- 25 Blanco L, Bernad A, Lazaro J M, et al. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem*, 1989, 264: 8935–8940
- 26 Peng L, You M X, Yuan Q, et al. Macroscopic volume change of dynamic hydrogels induced by reversible DNA hybridization. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 12302–12307
- 27 Cheng E J, Li Y L, Yang Z Q, et al. DNA-swnt hybrid hydrogel. *Chem Commun*, 2011, 47: 5545–5547
- 28 Xu Y X, Wu Q O, Sun Y Q, et al. Three-dimensional self-assembly of graphene oxide and DNA into multifunctional hydrogels. *ACS Nano*, 2010, 4: 7358–7362
- 29 Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature*, 1998, 392: 5–10
- 30 Wei L, Cai C H, Lin J P, et al. Dual-drug delivery system based on hydrogel/micelle composites. *Biomaterials*, 2009, 30: 2606–2613
- 31 Du J Z, Sun T M, Song W J, et al. A tumor-acidity-activated charge-conversional nanogel as an intelligent vehicle for promoted tumoral-cell uptake and drug delivery. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 3621–3626
- 32 Khan M, Ong Z Y, Wiradharma N, et al. Advanced materials for co-delivery of drugs and genes in cancer therapy. *Adv Healthc Mater*, 2012, 1: 373–392
- 33 Nishikawa M, Mizuno Y, Mohri K, et al. Biodegradable cpg DNA hydrogels for sustained delivery of doxorubicin and immunostimulatory signals in tumor-bearing mice. *Biomaterials*, 2011, 32: 488–494

- 34 Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, et al. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 751–755
- 35 Sawasaki T, Ogasawara T, Morishita R, et al. A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 14652–14657
- 36 Spirin A S. High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends Biotechnol*, 2004, 22: 538–545
- 37 Xu Z N, Chen H Q, Yin X F, et al. High-level expression of soluble human beta-defensin-2 fused with green fluorescent protein in *escherichia coli* cell-free system. *Appl Biochem Biotechnol*, 2005, 127: 53–62
- 38 Katzen F, Chang G, Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol*, 2005, 23: 150–156
- 39 Spirin A S, Swartz J R. *Cell-free Protein Synthesis: Methods and Protocols*. Weinheim: Wiley-VCH, 2008
- 40 He M Y, He Y Z, Luo Q, et al. From DNA to protein: No living cells required. *Process Biochem*, 2011, 46: 615–620
- 41 Ge X M, Luo D, Xu J F. Cell-free protein expression under macromolecular crowding conditions. *PLoS One*, 2011, 6: e28707
- 42 Park N, Um S H, Funabashi H, et al. A cell-free protein-producing gel. *Nat Mater*, 2009, 8: 432–437
- 43 Park N, Kahn J S, Rice E J, et al. High-yield cell-free protein production from p-gel. *Nat Protoc*, 2009, 4: 1759–1770
- 44 Long E O. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17: 875–904
- 45 Liew F Y, Xu D M, Brint E K, et al. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 446–458
- 46 Tan E M, Schur P H, Carr R I, et al. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 1966, 45: 1732–1740
- 47 Bode C, Zhao G, Steinhagen F, et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*, 2011, 10: 499–511
- 48 Salem A K, Weiner G J. CpG oligonucleotides as immunotherapeutic adjuvants: Innovative applications and delivery strategies preface. *Adv Drug Delivery Rev*, 2009, 61: 193–194
- 49 Gurunathan S, Klinman D M, Seder R A. DNA vaccines: Immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 927–974
- 50 Hur J, Im K, Hwang S, et al. DNA hydrogel-based supercapacitors operating in physiological fluids. *Sci Reports*, 2013, 3: 1282
- 51 Whitesides G M. The “right” size in nanobiotechnology. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 1161–1165
- 52 Peng S M, Derrien T L, Cui J H, et al. From cells to DNA materials. *Mater Today*, 2012, 15: 190–194

Molecular design, synthesis and applications of DNA hydrogel

YANG DaYong¹, XU ChuanYing^{1,2}, PENG SongMing¹, CUI JinHui^{1,4}, YU Yan², HAN Wei³, CUI HaiXin⁴ & LUO Dan^{1,5}

¹Department of Biological and Environmental Engineering, Cornell University, Ithaca, New York 14853, USA;

²School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

³School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

⁴Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

⁵Kavli Institute at Cornell for Nanoscale Science, Ithaca, New York 14853, USA

DNA nanotechnology is one of the most important fields of nanobiotechnology, showing rapid development. A variety of DNA-based materials were prepared through rational molecular design and controlled synthesis. DNA hydrogel has been one of the most important bulk-scale DNA materials and exhibited very wide applications, especially in the biomedical field. This review introduces the molecular design principle, synthesis methods and applications of DNA hydrogel, highlighting the recent important progresses.

nanobiotechnology, DNA nanotechnology, DNA hydrogel, drug delivery, protein production, immune regulation

doi: 10.1360/972013-384