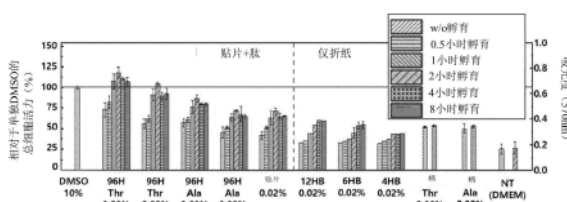


本发明涉及一种用于冷冻保护的组合物,所述组合物包含:核酸结构,其包括在预定位置处折叠并形成多条链的支架核酸,以及通过与所述链中的至少一条结合而形成双链且其至少一部分具有所述支架核酸的互补序列的多个订书钉核酸;与所述核酸结构的至少一部分结合的接头;和与所述接头的至少一部分结合的肽,其中所述组合物可以在细胞和组织的冷冻保存过程中增加细胞活力,并且当用于冰冻食物时允许保持所述食物的质地。



1. 一种用于冷冻保存的组合物, 包含:

核酸结构, 包括: 在预定位置处折叠以形成多链的支架核酸; 多个第一订书钉核酸, 其中其序列的至少一部分包含所述支架核酸序列的互补序列, 并且其与所述支架核酸的至少一条链结合以形成双链; 以及多个第二订书钉核酸, 其中其序列的至少一部分与所述支架核酸的序列互补, 但其至少一个末端不与所述支架核酸的序列互补, 并且其与所述支架核酸的至少一条链结合以在其末端处形成双链和单链;

与所述核酸结构中的至少一条单链偶联的接头; 和

与所述接头中的至少一个偶联的抗冻肽,

其中所述核酸结构包含4个至40个螺旋束, 并且

其中所述组合物包含以重量/体积百分比计为0.01%至0.5%的核酸结构。

2. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述接头是DNA、RNA或PNA。

3. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述接头具有5个核苷酸至20个核苷酸的长度。

4. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述肽具有由1至10个氨基酸组成的长度。

5. 根据权利要求4所述的组合物, 其中所述氨基酸是丙氨酸或苏氨酸。

6. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述核酸结构包括适于与冰晶接触的表面。

7. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述核酸结构包括扭曲或弯曲的螺旋束。

8. 一种用于细胞或组织冷冻保存的组合物, 其包含根据权利要求1至7中任一项所述的组合物。

9. 一种用于食物冷冻保存的组合物, 其包含根据权利要求1至7中任一项所述的组合物。

10. 一种用于细胞或组织冷冻保存的方法, 其包括在根据权利要求8所述的组合物的存在下, 将受试细胞或组织暴露于低于0°C的温度。

11. 一种用于食物冷冻保存的方法, 其包括在根据权利要求9所述的组合物的存在下, 将受试食物暴露于低于0°C的温度。

包含DNA纳米结构的冷冻保护组合物及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种包含DNA纳米结构的用于冷冻保存的组合物及其使用方法。

背景技术

[0002] 抗冻材料是指当存在于溶液中时,能够减少或抑制暴露于低于零(0) °C的温度的溶液中冰晶形成的化合物。目前,抗冻材料包括小分子、合成聚合物和抗冻蛋白质。在目前使用的小分子的情况下,需要非常高的有效浓度(例如,60%或更高),因此有时会引起组织毒性。此外,在天然存在的蛋白质的情况下,很难对其进行纯化和大规模生产,因此导致产品价格非常高的限制。

[0003] 生活在极低温度(“低温(cryogenic)”)环境中的生命有机体含有抗冻蛋白,其防止体液冰冻,从而保护细胞和组织。抗冻蛋白各自具有固有的结构。然而,已知称为苏氨酸的肽中的规则排列与冰晶的特定表面接合,并具有抑制晶体生长的效果。

[0004] DNA折纸是一种自下而上的制造技术,用于使用DNA的四(4)个独特碱基之间的互补结合特性形成纳米结构,其中该纳米结构使用称为支架DNA的非常长的单DNA链和多个短订书钉(staple)DNA形成,所述支架DNA通常具有7000个或更多个碱基,所述短订书钉DNA用于将单链DNA缀合成特定形状。

[0005] 这种DNA折纸技术允许以几个纳米(nm)内的高精度产生具有复杂形状的二维/三维纳米结构,该纳米结构不能通过常规的自上而下的制造技术来制备。通过这种技术,纳米结构的应用诸如在所期望位置精确排列不同的纳米材料成为可能。此外,由于使用生物分子,制造的纳米结构可以具有非常优异的生物相容性。

[0006] 冷冻保护剂在细胞的内部和外部复杂地起作用。具体地,细胞内部吸收的结构抑制细胞中冰晶的形成和生长。另一方面,存在于细胞外部的结构抑制细胞周围冰单元的形成和生长,并防止细胞被细胞外部的冰晶损害而刺穿细胞膜。

[0007] 同时,在二甲基亚砜(DMSO)作为本领域通常可获得的细胞冷冻保护剂之一的情况下,其应被大量使用以使得DMSO与细胞培养基的混合比率达到约10%(v/v)。此外,上述化合物是一种具有细胞毒性的物质,并对细胞活力(存活率)产生不利影响,因此造成的问题是在解冻后应尽快将其除去。

[0008] 此外,已经公开了对DNA折纸材料进行的证明没有发生细胞毒性的先前研究,然而,仍然没有完全弄清当具有抗冻能力的肽与上述DNA折纸材料组合时,是否表达细胞毒性或各种类型的细胞是否具有细胞毒性。因此,为了商业化,还需要对上述工作进行评估。

发明内容

[0009] [本发明要解决的问题]

[0010] 本发明的一个目的是提供一种用于细胞或组织冷冻保存的组合物,其包含DNA纳米结构。

[0011] 此外,本发明的另一个目的是提供一种用于食物冷冻保存的组合物,其包含DNA纳

米结构。

[0012] 此外,本发明的另一个目的是提供一种用于细胞或组织冷冻保存的方法。

[0013] 进一步地,本发明的另一个目的是提供一种用于食物冷冻保存的方法。

[0014] [用于解决问题的手段]

[0015] 为了实现上述目的,在本发明中采用以下技术方案。

[0016] 1.一种用于冷冻保存的组合物,包含:

[0017] 核酸结构,其包括:在预定位置处折叠以形成多链的支架核酸;多个第一订书钉核酸,其中其序列的至少一部分包含所述支架核酸的序列的互补序列,其与所述支架核酸的至少一条链结合以形成双链;和多个第二订书钉核酸,其中其序列的至少一部分与所述支架核酸的序列互补,但其至少一个末端不与所述支架核酸的序列互补,其与所述支架核酸的至少一条链结合以在其末端处形成双链和单链;

[0018] 与所述核酸结构中的至少一条单链偶联的接头;和

[0019] 与所述接头中的至少一个偶联的抗冻肽。

[0020] 2.根据上述1所述的组合物,其中所述接头是DNA、RNA或PNA。

[0021] 3.根据上述1所述的组合物,其中所述接头具有5个核苷酸至20个核苷酸的长度。

[0022] 4.根据上述1所述的组合物,其中所述肽具有由1至10个氨基酸组成的长度。

[0023] 5.根据上述4所述的组合物,其中所述氨基酸是丙氨酸或苏氨酸。

[0024] 6.根据上述1所述的组合物,其中所述核酸结构包括两个或更多个螺旋束和适于与冰晶接触的表面。

[0025] 7.根据上述1所述的组合物,其中所述核酸结构包括扭曲或弯曲的螺旋束。

[0026] 8.一种用于细胞或组织冷冻保存的组合物,其包含根据上述1至7中任一项所述的组合物。

[0027] 9.一种用于食物冷冻保存的组合物,其包含根据上述1至7中任一项所述的组合物。

[0028] 10.一种用于细胞或组织冷冻保存的方法,其包括在根据上述8所述的组合物的存在下,将受试细胞或组织暴露于低于0°C的温度。

[0029] 11.一种用于食物冷冻保存的方法,其包括在根据上述9所述的组合物的存在下,将受试食物暴露于低于0°C的温度。

[0030] [有益效果]

[0031] 本发明的组合物具有优异的细胞和组织冰冻保护(“冷冻保存(cryopreservation)”)效果。

[0032] 使用本发明的组合物可以增加细胞在冷冻保存时的细胞活力。

[0033] 本发明的组合物具有优异的食物冷冻保存效果。

[0034] 在使用本发明组合物的食物冰冻中,该食物可以保持其原始质地。

附图说明

[0035] 图1是示出支架核酸和订书钉核酸彼此结合以形成结构的情况的图。

[0036] 图2是示出几种核酸折纸结构的图,其中A是4螺旋束(刚性结构),B是4螺旋束(柔性结构),C是24螺旋贴片(helix patch)(Rothemund方形)结构,D是12螺旋束(刚性结构),E

是12螺旋束(90°弯曲结构),并且F是12螺旋束(45°弯曲结构)。

[0037] 图3是示出4、6和12螺旋束(HB)刚性结构的图。

[0038] 图4是示出4螺旋束柔性结构和6螺旋束柔性结构的图。

[0039] 图5是示出有或没有间隙的折纸结构的图。

[0040] 图6是示出用于测量再结晶抑制(RI)效果的方法的示意图。

[0041] 图7和8是示出在纯蒸馏水中仅含有MgCl₂的缓冲溶液的RI测量结果的照片和图。

[0042] 图9和10是示出其中存在非结构化单链DNA的溶液的RI测量结果的照片和图。

[0043] 图11和12是示出支架DNA样品的RI测量结果的照片和图。

[0044] 图13是示出4螺旋束刚性结构和柔性结构的图。

[0045] 图14是示出6螺旋束刚性结构和柔性结构的图。

[0046] 图15是示出24螺旋贴片结构的图。

[0047] 图16是示出12螺旋束坚固结构和弯曲结构的图。

[0048] 图17至20是示出DNA折纸结构的RI效应的照片和图。

[0049] 图21示出了关于6螺旋束刚性结构的冰晶随观察时间的生长过程。

[0050] 图22是示出DNA-PNA-肽贴片的设计图。

[0051] 图23示出了完成的DNA-PNA-肽贴片的琼脂糖凝胶电泳结果。

[0052] 图24示出了通过原子力显微镜(AFM)观察实验中使用的DNA折纸结构的实际外观的结果。

[0053] 图25示出了琼脂糖凝胶电泳实验的结果,其中分别在磷酸盐缓冲盐水(PBS)和细胞培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium,DMEM)中进行结构(无肽贴片结构)的稳定性测试。

[0054] 图26示出了在结构(无肽贴片结构)的稳定性测试后琼脂糖凝胶电泳实验的结果。

[0055] 图27示出了HSC-3细胞内部吸收的或吸收到所述细胞外部的结构的分布(紫色:肽贴片,蓝色:细胞核)。

[0056] 图28示出了当冰冻后解冻时观察细胞保护能力的结果,其中包括DNA贴片或对照(PBS缓冲液)。

[0057] 图29是示出与DMSO 10%相比,每种折纸结构的细胞活力随孵育时间推移的图(冷冻保存时间为24小时,在所有情况下都相同)。

[0058] 图30是示出在孵育24小时和冷冻保存1个月后测量细胞活力的结果的图。

[0059] 图31示出了原位确认DNA折纸的冷冻保存效果的结果。

具体实施方式

[0060] 在下文中,将对本发明进行详细描述。

[0061] 本发明涉及一种用于冷冻保存的组合物(“冷冻保存组合物”),其包括DNA纳米结构。

[0062] 如本文所用,冷冻保存是指保护细胞、组织和/或食物免受在细胞、组织和/或食物的冷冻保存过程中可能发生的冰冻损害。

[0063] 如本文所用,冰冻损害是指当细胞、组织和/或食物被冰冻时,细胞、组织和/或食物中可能发生的损害。例如,由于水的冰晶化,可能发生对细胞膜的损害。此外,当使用非侵

入性冷冻保护剂时,它仅影响细胞外盐浓度,因此所得高溶质浓度可能对细胞膜造成渗透应力。此外,玻璃化所需的高浓度冷冻保存剂由于低水化学势或化学毒性而可能造成损害。然而,不限于此。

[0064] 在本发明中,可以通过细胞和组织内部和外部的DNA纳米结构的组合作用而出现冷冻保存。例如,被吸收到细胞内部的结构可以抑制细胞内部冰晶的形成和生长,而存在于细胞外部的结构可以抑制细胞周围冰晶的形成和生长,并防止细胞被细胞外部的冰晶损害而刺穿细胞膜。然而,不限于此。

[0065] 本发明的用于冷冻保存的组合物可以包括用于保护活组织、细胞或有机体和食物免受冰冻损害的材料。

[0066] 根据本发明的一个实施方案,用于冷冻保存的组合物可以抑制冰晶的形成或生长。

[0067] 冰晶可以通过冰重结晶生长,冰重结晶是指从小冰晶生长到较大冰晶的过程,并且其生长根据Ostwald熟化机理发生。Ostwald熟化可以以溶解-扩散-再冰冻或升华-扩散-冷凝机理进行。换句话说,冰重结晶不是由于冰晶相互粘附而发生的,而是由于小冰晶在晶体之间融化,并向大冰晶扩散,由此在再冰冻时成为大冰晶的一部分。

[0068] 抑制冰晶的生长是指防止冰形成、降低冰形成的速度、防止冰重结晶、降低冰重结晶的速度或使冰晶的尺寸保持较小的行为。

[0069] 本发明的用于冷冻保存的组合物可以防止细胞或组织的冰冻。此外,当细胞冷冻保存后解冻时,细胞活力可以提高。

[0070] 防止和抑制细胞或组织冰冻的效果可以取决于与用于构建包含在组合物中的DNA纳米结构的碱基的类型和构型相关的亲冰特性(icephilic properties)的程度而改变。

[0071] 本发明的用于冷冻保存的组合物可以包括核酸结构。

[0072] 核酸结构可以是核酸折纸结构。

[0073] 核酸可以是DNA、RNA或PNA,但不限于此。

[0074] 如图1所示,核酸折纸结构是通过折叠支架核酸(图1中的DNA支架)的预定部分,同时结合多个订书钉核酸而形成的结构。

[0075] 支架核酸是单链核酸,其长度可以取决于有待形成的结构的长度、大小、形状等来适当选择,并且可以使用长度为约7000至8000个核苷酸(nt)的酸类型。在本发明的具体实施方案中,使用长度为7,249nt的M13mp18 DNA,但不限于此。当使用M13mp18支架DNA制备DNA结构时,所得结构的分子量为约5兆道尔顿,其相当于约 10^{-20} kg,但不限于此。

[0076] 在订书钉核酸中,其序列的至少一部分具有支架核酸的互补序列,从而允许支架核酸折叠或固定在特定位置处。

[0077] 在本发明中,订书钉核酸可以是多个订书钉核酸(下文中称为“第一订书钉核酸”),它们与支架核酸的至少一条链结合以形成双链。此外,订书钉核酸可以是多个订书钉核酸(下文中称为“第二订书钉核酸”),其中其序列的至少一部分与支架核酸的序列互补,但其一个末端不与支架核酸的序列互补,其与支架核酸的至少一条链结合以在其末端处形成双链和单链。

[0078] 第一订书钉核酸可以具有支架核酸序列的互补序列,因此可以与支架核酸结合以形成双链。

[0079] 第二订书钉核酸可以包括具有支架核酸序列的互补序列的一部分和在一侧上的至少一个末端(“一个末端”)处不与支架核酸互补的另一部分。例如,所述一个末端可以与支架核酸互补,或者两个末端都可以不与支架核酸互补,然而,不限于此。

[0080] 在本发明中,订书钉核酸可以包括多个单独的第一订书钉核酸、多个单独的第二订书钉核酸,或多个第一和第二订书钉核酸在一起,但不限于此。

[0081] 可以基于有待形成的结构的长度、大小或形状,适当选择订书钉核酸的长度,例如,长度可以范围为20至50nt,但不限于此。

[0082] 在本发明中,第二订书钉核酸的不与支架核酸互补的至少一个末端部分可以是这样设计的部分,使得通过在设计碱基序列时延伸订书钉核酸的碱基序列的一部分的长度,订书钉核酸的碱基序列的至少一个末端不与支架核酸的碱基序列互补结合。当第二订书钉核酸与支架核酸结合时,上述至少一个末端可以暴露于核酸折纸的一侧,这在下文中称为“柄(handle)”。核酸折纸结构是通过将订书钉核酸与支架核酸的特定位置结合并在所述特定位置处折叠订书钉核酸而形成的特定结构,并且设计订书钉核酸使得支架核酸具有这种特定结构。

[0083] 可以根据常规方法进行订书钉核酸的设计,并且例如,可以使用设计方案诸如caDNAno,但不限于此。

[0084] 可以使用常规的热退火技术制备核酸折纸结构。

[0085] 此技术通过将作为原料的支架核酸和订书钉核酸加热至高温(例如,80°C至95°C)开始,使得所有的核酸链都处于单链状态。核酸链具有根据其碱基序列的解链温度,并且在高于解链温度的情况下,核酸主要以单链存在,而在低于解链温度的情况下,核酸主要以双链存在。当缓慢降低反应溶液的温度时,核酸链开始以双链存在,同时互补结合,并且在核酸折纸中,约200个订书钉核酸结合到所设计的位置,同时协同结合,从而产生具有期望形状的结构。

[0086] 由于各自的订书钉核酸具有不同的碱基序列,因此结合时间彼此略有不同。然而,因为常规的热退火技术允许温度在足够的时间(超过几个小时)内逐渐降低,因此形成所有的订书钉核酸都足以结合的条件,并且因此不管碱基序列如何均可以制备具有期望形状的结构。

[0087] 支架核酸在预定位置处折叠以形成多条链,而订书钉核酸具有被设计成允许支架核酸在预定位置处折叠的序列。因此,支架核酸形成预定的结构,而订书钉核酸通过上述方法与支架核酸结合。

[0088] 支架核酸链和订书钉核酸可以彼此结合以形成双链(双螺旋),其中核酸折纸结构可以具有例如2至50、2至45、2至40、2至35、2至30、2至25、2至20、2至12或4至12个螺旋束,并且具体地可以具有4至12个螺旋束,但不限于此。图2和4示出了具有不同数量螺旋束的核酸折纸结构。

[0089] 接头可以与核酸结构中的至少一条单链结合。具体地,接头可以与存在于第二订书钉核酸末端处的单链中的至少一条结合,但不限于此。

[0090] 接头可以是任何核酸,其至少一部分在柄处具有互补的碱基序列,并且可以包括核酸链,例如DNA、RNA、PNA等,但不限于此。接头可以是其上另外附接有功能材料诸如磷、肽等的链,但不限于此。

- [0091] 接头与上述柄中的至少一个结合,可以与一个或多个或所有柄结合,但不限于此。
- [0092] 可以基于柄的长度、碱基的构型以及有待形成的结构的长度、大小、形状等适当选择接头的长度。例如,接头的长度可以范围为5个核苷酸(nt)至50nt,具体地,5nt至30nt,但不限于此。
- [0093] 在本发明中,抗冻肽可以是与上述接头中的至少一种结合的肽。
- [0094] 抗冻肽可以与接头的至少一部分结合。接头的至少一部分是指核酸结构的单链中的一条或多条链,或者接头之一的完整碱基序列的全部或一部分。例如,所述肽可以与接头的一个末端或接头的两个末端结合。接头和抗冻肽之间的结合可以通过氢键、共价键、肽键等进行,但不限于此。
- [0095] 在本发明的一个实施方案中,可以设计具有柄部分的碱基序列的互补碱基的接头(例如,肽核酸链(PNA)),并且肽可以与接头中的至少一个结合(下文中称为“探针”)。当在水溶液中形成核酸折纸结构时,探针可以与柄结合作为设计的一部分(参见图24)。
- [0096] 如本文所用,所述肽是指具有抗冻效果的肽。抑制冰晶生长的效果可以根据基于肽的类型和肽排列密度的亲冰特性的程度而改变。
- [0097] 在本发明的一个实施方案中,所述肽可以包括单一或组合类型的氨基酸聚合物。所述氨基酸可以具有抗冻效果。例如,所述氨基酸可以包括丙氨酸或苏氨酸,但不限于此。
- [0098] 可以基于接头的长度和碱基构型,暴露的单链的长度或碱基构型,有待形成的结构的长度和大小、形状等适当选择氨基酸聚合物的长度。例如,氨基酸聚合物的长度范围可以为1至20个氨基酸、1至10个氨基酸或2至10个氨基酸,但不限于此。
- [0099] 在本发明的核酸折纸结构中,抗冻肽可以以预定的间隔排列。在本发明的一个实施方案中,可以在核酸折纸结构的一侧上形成抗冻肽的排列。
- [0100] 由于折纸结构具有更多的柄,附接至柄的抗冻肽的数量也可以增加,从而提高抗冻效果。在本发明的一个实施方案中,具有以16nt的间隔排列的96个抗冻肽的折纸结构,其存在于核酸折纸片层结构(在图22中,抗冻肽在所有的柄部分处排列的结构)的一侧处的横向方向上,比具有在横向方向上以32nt的间隔排列的48个抗冻肽的折纸结构表现出更高的细胞活力(参见图29)。
- [0101] 本发明的结构可以被吸收到细胞内部或粘附至细胞外壁以便包封所述细胞。细胞内部吸收的材料可以抑制在冰冻/解冻细胞的过程中在细胞内部产生的冰晶的形成和生长。此外,细胞内部吸收的材料可以防止和抑制细胞和组织被冰冻。此外,当细胞在冷冻保存后解冻时,细胞活力可以提高。
- [0102] 粘附至细胞外部的结构可以抑制在细胞周围产生的冰晶的形成和生长,抑制冰晶渗透到细胞中,并保护细胞膜免受损害。此外,粘附至细胞外部的结构可以防止和抑制细胞和组织被冰冻,并防止对其的损害。此外,当细胞在冷冻保存后解冻时,细胞活力可以提高。
- [0103] 本发明中使用的结构可以具有在水溶液中为0.001%至0.03%并且在细胞培养基中为0.001%至0.003%的重量/体积比(百分比)。
- [0104] 与用于需要高达百分之几十的高重量/体积比的现有组织保存的渗透性小分子相比,本发明的核酸结构即使在相当低的重量/体积比下也可以具有冰晶生长抑制作用,并且可以进一步表现出细胞或组织的抗冻作用。此外,当细胞在冷冻保存后解冻时,细胞活力可以提高。

[0105] 在这点上,根据本发明的核酸折纸结构可以包括扭曲或弯曲的螺旋束。

[0106] 例如,螺旋束扭曲的方向可以通过插入或删除碱基来控制,并且所述束可以通过将碱基插入螺旋中而向右扭曲,或者可以通过删除碱基而向左扭曲。扭曲的程度可以通过碱基的数量来控制。有待插入或删除的碱基数量可以是螺旋旋转两圈的每21个碱基长度中的一个或两个,并且即使碱基数量超过上述范围,只要在保持结构方面没有问题,也没有特别的限制。

[0107] 此外,例如,将碱基插入多个螺旋中的一个螺旋中而不将所述碱基插入其他螺旋中,或者删除所述碱基,以使螺旋之间的长度不同,从而使得螺旋束可以是弯曲的。

[0108] 此外,在抑制冰晶形成或生长、即冰重结晶方面,核酸折纸结构可以包括可与冰重结晶表面接触的表面。还可以通过使核酸折纸结构的表面与冰重结晶表面以平面而不是线的形式大面积接触来使冰重结晶抑制效果最大化。此外,核酸折纸结构可以是平面形式的大面积,细胞或组织的抗冻效果可以最大化。

[0109] 此外,本发明涉及一种用于细胞或组织冷冻保存的组合物,包括上述组合物。

[0110] 当冷冻保存细胞或组织时,在融化冷冻保存的细胞或组织以供后续使用的过程中,细胞膜可能由于冰重结晶而受损,从而由于发生细胞脱水而导致细胞和组织受损。生活在低温环境中的有机体可能更容易受到冰重结晶的损害。

[0111] 包含在本发明组合物中的纳米结构可以被吸收到细胞和组织内部,或者粘附至细胞和组织的细胞外壁,以便包封食物。被吸收到细胞和组织内部的材料可以抑制在冷冻/解冻细胞和组织的过程中在细胞和组织内部产生的冰晶的形成和生长。此外,被吸收到细胞和组织内部的材料可以防止和抑制食物被冰冻。此外,粘附至细胞和组织外部的结构可以防止和抑制细胞和组织被冰冻,并进一步防止对其的损害。

[0112] 本发明的组合物可适用于通常被冰冻用于保存的所有细胞,并且可以包括例如原核细胞;真核细胞;微生物;动物细胞;癌细胞,精子;卵;干细胞,包括成体干细胞、胚胎干细胞和去分化的干细胞;血细胞,包括脐带血、白细胞、红细胞和血小板;以及组织细胞,包括肾细胞、肝细胞和肌肉细胞,但不限于此。

[0113] 此外,本发明的组合物可适用于通常被冰冻用于保存的所有组织,并且可以包括例如所有组织,诸如角膜、肾、心脏、小肠、胰腺、肺、肝等,但不限于此。

[0114] 本发明的组合物可以进一步包括用于细胞和/或组织冷冻保存的防腐溶液。防腐溶液可以包括例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、各种细胞培养基,但不限于此。

[0115] 本发明的组合物可以包括0.001%至0.5% (w/v) 的核酸结构,并且具体地0.01%至0.03% (w/v),但不限于此。

[0116] 当前组织保存方法中使用的渗透性小分子需要高达百分之几十的高重量/体积比,而本发明的核酸折纸结构即使在极低的含量下也可以具有冰重结晶抑制作用,这对于细胞和组织冰冻后的保存可能是更有利的。此外,当细胞在冷冻保存后解冻时,细胞活力可以提高。

[0117] 此外,本发明涉及一种用于细胞或组织冷冻保存的方法,所述方法包括在所述组合物的存在下,将受试细胞或组织暴露于低于零度的温度。

[0118] 当在所述组合物的存在下冰冻受试细胞或组织时,可以通过抑制随后解冻时的冰重结晶来防止细胞或组织受损。

[0119] 此外,本发明涉及一种包括上述组合物的用于食物冷冻保存的组合物,以及一种用于食物冷冻保存的方法,所述方法包括在上述组合物的存在下,将受试食物暴露于低于零度(0°C)的温度。

[0120] 本发明的组合物可以应用于所有冰冻食物,并且当使用所述组合物时,可以在随后解冻时使食物质地的下降最小化。

[0121] 例如,本发明的结构可以被吸收到食物中或粘附至食物的外壁,以便包封食物。被吸收到食物中的材料可以抑制在冰冻/解冻食物的过程中在食物内部产生的冰晶的形成和生长。此外,被吸收在食物中的材料可以防止和抑制食物被冰冻。此外,粘附至食物外部的结构可以防止和抑制食物被冰冻,并进一步防止对其的损害。

[0122] 在下文中,将参考实施例详细地描述本发明。

[0123] 实施例

[0124] 1. 通过实验鉴定阳离子和DNA结构对冰重结晶的抑制作用

[0125] 1.1 冰重结晶的实验方法

[0126] 将本领域公知的泼溅冷却实验技术用于测量RI效应(参见图6)。首先,将盖玻片放置在用液氮预冷却的金属板上(盖玻片表面的温度为约-150°C),并且在约1.5m的高度滴下20 μ l含有分散于其中的用于测量RI效应的材料的溶液。一旦所述溶液接触盖玻片,它就薄薄地扩散并在被快速冷却的同时冰冻,并且由于快速冷却而形成许多非常小的冰晶。然后,将盖玻片转移至具有钻孔的冷台,通过所述钻孔可以用光学显微镜观察冰晶。将冷台保持在-6°C,并且观察其中冰晶生长为逐渐融合的小晶体的状态30分钟。此后,测量冰晶的大小,以比较与对照(仅含有溶液而不含冰冻对照材料的样品)相比,冰晶生长少了多少。

[0127] 1.2. 观察含阳离子水溶液和非结构DNA样品中RI效应

[0128] 首先,对在纯蒸馏水中仅含有MgCl₂的缓冲溶液进行RI测量实验,并且证实随着离子浓度增加,冰重结晶被抑制(参见图7和8)。基于此实验的结果,在随后的实验中将参比缓冲溶液的MgCl₂浓度设定为5mmol (mM)。通过比较样品与参比缓冲液的相对RI性能来测量样品的RI性能,这意味着值越小,RI性能越高。

[0129] 接下来,对含有非结构化单链状态的DNA的溶液进行RI测量实验。将实验中使用的DNA浓度设定为50至200ng/ μ L,这与通过常规制造工艺制备的DNA结构的浓度相似。作为测量其中形成6螺旋束刚性结构的169种类型的订书钉DNA以单链状态混合的样品的RI性能的结果,观察到其具有0.87至1.0的值,与缓冲液相比几乎没有冰重结晶抑制作用(参见图9和10)。换句话说,实验证实,尽管DNA链具有聚集Mg²⁺离子的效果,但不可能保持Mg²⁺离子,除非它们在水溶液中形成具有恒定形状和刚性的结构,从而在宏观水平上几乎不发生RI效应。

[0130] 此外,以相同方式进行的支架DNA样品的RI值经测量高达约0.7(参见图11和12)。与订书钉DNA相比,支架DNA具有轻微RI性能的原因被认为是由于长支架DNA的特征,它形成二级结构,其中整个区域不以单链状态存在,而是一些部分以彼此互补的方式结合成双链。

[0131] 1.3. 结构化DNA折纸的设计

[0132] 此后,对DNA结构进行实验,其中DNA链彼此紧密连接,由此具有恒定的横截面形状和刚性。设计作为DNA折纸技术的实例的9种类型的结构包括:(1)4螺旋束刚性结构;(2)4螺旋束柔性结构(间隙5nt);(3)6螺旋束刚性结构;(4)6螺旋束柔性结构(间隙3nt);(5)6螺旋

束柔性结构(间隙5nt);(6)24螺旋贴片;(7)12螺旋束刚性结构;(8)12螺旋束弯曲结构(90°);和(9)12螺旋束弯曲结构(45°)。

[0133] 每种结构的设计方法如下。

[0134] (1)4螺旋束刚性结构和(2)4螺旋束柔性结构(间隙5nt)

[0135] 结构(1)和(2)具有由四条双链DNA组成的横截面,其中一边被包装成约4.5nm的正方形(图13)。它们具有基于约192nt的长度重复相同形式的连接的结构,并且分别具有约600nm的总长度。(1)的刚性结构被设计成使得结构中存在的的所有订书钉DNA的相对末端(5'末端和3'末端)彼此直接接触,而(2)的柔性结构由ssDNA组成,其中150个相邻订书钉DNA的相对末端之间的间隙为5nt。

[0136] (3)6螺旋束刚性结构、(4)6螺旋束柔性结构(间隙3nt)和(5)6螺旋束柔性结构(间隙5nt)

[0137] 结构(3)、(4)和(5)具有由六条双链DNA组成的横截面,它们被包装成六边形(图14)。它们具有基于约168nt的长度重复相同形式的连接的结构,并且分别具有约400nm的总长度。(3)的刚性结构被设计成使得结构中存在的的所有订书钉DNA的相对末端彼此直接接触,而(4)和(5)的柔性结构由ssDNA组成,其中169个相邻订书钉DNA的相对末端之间的间隙分别为3nt和5nt。

[0138] (6)24螺旋贴片

[0139] 结构(6)具有由24个双链DNA组成的横截面,它们排列成直线以形成片状(参见图15)。所述结构具有约90nm(256nt)的长度和约55nm的宽度。这种结构被设计成使得结构中存在的192个订书钉DNA的所有末端彼此直接接触。

[0140] (7)12螺旋束刚性结构、(8)12螺旋束弯曲结构(90°)和(9)12螺旋束弯曲结构(45°)

[0141] 结构(7)、(8)和(9)具有由12条双链DNA组成的横截面,它们被包装成六边形(参见图16)。(7)的刚性结构被设计成使得180个订书钉DNA的所有末端彼此直接接触。结构(8)和(9)通过去除存在于结构中间的11个订书钉DNA而具有长度为42nt的柔性区域,并且形成这样的形状,其中连接所述结构相对末端的DNA长度分别缩短至357nt和189nt,并且其中心部分分别弯曲90°和45°。

[0142] 1.4DNA折纸的制备和RI效应的观察

[0143] 此后,证实了构造成具有恒定横截面形状和大小的DNA结构的冰重结晶抑制效果。制备折纸结构的方法如下:在混合原材料和缓冲液之后,然后将混合物加热至80°C,在1小时内将温度降低至65°C,随后进行热退火技术,以便以每小时1°C将温度降低至25°C。为了分离通过热退火技术制备的结构,使用由Amicon公司制造的离心纯化过滤器来过滤未反应的材料。使用260nm波长处的吸光度测量所述结构在纯化后的浓度,随后用缓冲液稀释所述结构以便达到目标浓度。

[0144] 通过AFM测量根据上述设计制备的结构的形状(参见图17、18和19的第一列图像)。作为对具有至少两种类型不同密度的至少九种类型的DNA结构进行RI实验的结果,测量到最大值为0.53的RI值(参见图20)。其余样品表现出比具有最窄横截面积的4螺旋束(样品1和2)更高的RI性能,并且所述结构的浓度越高,总体上RI性能越高。据信这是因为Mg²⁺离子可以充分地集中在所述结构附近,使得当横截面积处于一定水平时可以表现出RI性能,并

且随着水溶液中结构数量的增加,能够抑制冰重结晶的区域也增加。关于6螺旋束刚性结构,作为30分钟后观察冰生长过程的结果,观察到在经过约2小时后,冰生长至与不含所述材料的缓冲液中的冰晶大小相似的大小(参见图21)。

[0145] 通过一系列实验,证明了包括其中富集有阳离子的DNA结构的组合物可以比不形成所述结构的DNA发挥更高的冰重结晶抑制效果。

[0146] 2.DNA-PNA-肽折纸结构的制造

[0147] 2.1.设计DNA-PNDA-肽折纸结构

[0148] 设计了分别具有支架DNA、订书钉DNA、柄、Cy3染料和PNA-肽结合位点的DNA-PNA-肽结构(参见图22)。

[0149] 2.2.DNA-PNA-肽折纸结构的制造(参见图23)

[0150] 为了制造附接有PNA-肽探针的结构,同时混合用于构建所述结构的所有核酸材料,即支架DNA、包括柄的订书钉DNA和PNA-肽。此后,根据与DNA折纸结构制造中相同的热退火过程,形成DNA-PNA-肽结构,其中DNA-肽探针附接至DNA折纸的柄位点。使形成的DNA-PNA-肽结构经受与用于DNA折纸结构相同的纯化过程。

[0151] 3.DNA结构对细胞保护能力的确认

[0152] 3.1.实验材料和条件

[0153] 本实验使用HSC-3细胞作为癌细胞来进行。实验中使用的核酸折纸结构的浓度分别为100ng/uL和200ng/uL。当附接肽探针时,使用浓度为300ng/uL的所述结构。通过以9:1的体积比混合细胞培养基和冷冻保存材料,制备浓度为10ng/uL至30ng/uL的用于细胞实验的最终材料。

[0154] 首先,仅在没有肽探针的情况下,使核酸折纸结构经受对所述结构的冰冻保护效果的测定。此后,将粘附有抗冻肽诸如丙氨酸和苏氨酸的PNA探针用于实施测量DNA-肽组合材料的冰冻保护能力的实验。

[0155] 用于确定细胞保护能力的核酸折纸分别具有以下形状:(1)4螺旋束结构;(2)6螺旋束结构;(3)12螺旋束结构;和(4)24螺旋贴片结构。此外,通过AFM确认根据上述设计过程形成的结构的形状(参见图24)。

[0156] 3.2.在盐水和细胞培养基条件下结构稳定性的确认

[0157] 为了证实DNA折纸结构在与细胞相互作用期间是否可以保持自身的结构,将DNA结构与10%磷酸盐缓冲盐水(PBS)和DMEM细胞培养基以9:1的比率混合,随后在37℃下孵育最多8小时。

[0158] 在1、2、4和8小时内,完成孵育,随后通过AFM和琼脂糖凝胶电泳观察DNA结构的外观,以便确认其结构稳定性(参见图25和26)。

[0159] 3.3.细胞吸收的确认

[0160] 通过共聚焦荧光显微镜监测制备的贴片结构是否被吸收到细胞的内部/外部以及附接于其上(参见图27)。

[0161] 作为荧光标记,将Hoechst 33258用于细胞核染色,而将Cy3用作DNA折纸材料。将细胞核用蓝色染色,而将折纸所在的位置用品红色指示。

[0162] 将包含DNA-PNA-肽贴片的溶液以10%的混合比混合在细胞培养基中,随后进行孵育。作为分别在孵育后立即、1小时后和2小时后观察的结果,证实了存在于细胞内部/外部

的贴片的量随孵育时间而逐渐增加。

[0163] 3.4.细胞活力的确认

[0164] 3.4.1.冰冻后立即解冻时通过显微镜确认细胞活力的变化

[0165] 首先,通过显微镜证实了典型DNA贴片结构的冰冻保护能力。然后,在将细胞与10% PBS和DNA贴片结构混合并孵育后,如RI实验一样使混合物经受冰冻-解冻,随后从图像中确认细胞的存活。作为实验的结果,证实了处于PBS状态的所有细胞几乎被破坏,但与DNA贴片结构混合的相当多的细胞存活(参见图28)。

[0166] 3.4.2.24小时冷冻保存后解冻时通过MTT测定确认细胞活力。

[0167] 当细胞在37°C下在包含各种DNA结构和与其结合的各种PNA-肽的细胞培养基中孵育时,证实了细胞随时间的活力(参见图29)。

[0168] 对于包括贴片(PNA-肽探针)的样品,当孵育2小时时,发现最高的细胞活力。其中,当含有具有浓度为300mg/u1的五(5)个苏氨酸(Thr×5)的探针的DNA结构在液氮温度下孵育2小时,然后在冷冻保存24小时后解冻时,其在所有样品中显示出最高的细胞活力。

[0169] 同时,对于束型结构,细胞活力倾向于随孵育时间而增加。

[0170] 在折纸结构样品和冷冻保护剂DMSO 10%之间比较和确定细胞活力(参见图29)。

[0171] 层状形式的贴片结构显示出最优异的细胞保护能力,这是因为上述结构相对于材料体积和柔性具有最宽的横截面积,由此所述结构可以有效地与细胞膜相互作用,从而表现出冰冻保护能力。

[0172] 其中丙氨酸和苏氨酸肽附接至贴片结构的材料被证实具有高得多的冰冻保护能力。从此结果证实了具有冰冻保护能力的肽在细胞内部和周围表现出优异的冰晶形成和生长抑制性能。在使用96探针附接苏氨酸的材料的情况下,证实了这种材料具有比作为本领域可商业获得的冷冻保护剂DMSO 10%更优异的性能。

[0173] 3.4.3.长期冷冻保存后解冻时细胞活力的确认

[0174] 基于显示最高细胞活力的2小时孵育的实验条件,为了确认在超过24小时的长期冷冻保存中的细胞活力,将细胞在液氮温度下冷冻保存1个月,然后解冻,随后测量细胞活力(参见图30)。

[0175] 结果,证实了具有Thr×5探针的DNA结构具有最高的细胞活力,这与24小时冷冻保存后获得的结果基本相同。此外,还证实了分别在200ng/u1和300ng/u1下的结构与DMSO 10%对照相比仍具有更高的性能。从此结果可以理解,使用折纸结构的冷冻保护剂可以用于长期冷冻保存。

[0176] 3.5.原位RI和细胞状态的确认

[0177] 类似于实施例1.1中描述的实验方法,在-6°C下进行30分钟的用于确定细胞内部材料的RI性能的实验。分别对细胞的细胞核部分(蓝色染色)、细胞质部分(绿色)和细胞膜部分(红色)进行染色,并通过荧光显微镜观察其与温度变化相关的特征。对于对照(PBS缓冲液),低温冰冻后的细胞的细胞核受损并具有不规则的形状,因此很难找到细胞核。对于细胞质,细胞内部冰晶的大小在RI测量期间快速增加,并且解冻后冰晶残留非常少。因此,可以证实,由于细胞损害,大部分细胞质消失了。此外,可以证实细胞膜最初被扭曲,然后被破坏(参见图31)。

[0178] 在其中浓度为10%的贴片结构与细胞培养基混合的实验组的情况下,证实了经历

低温冰冻的细胞的细胞核保持与初始阶段相似。此外,通过细胞质观察到的细胞内部冰晶的大小比对照小得多,因此,证实了所述材料甚至在细胞内部也具有抑制冰晶生长的效果。此外,甚至在冰冻后解冻时,细胞质的亮度也得以保持,因此,可以确认对细胞的损害非常小。此外,因为即使在冰冻和解冻后,细胞膜的荧光图像也类似地保持,由此观察到所述材料的细胞冰冻保护效果。

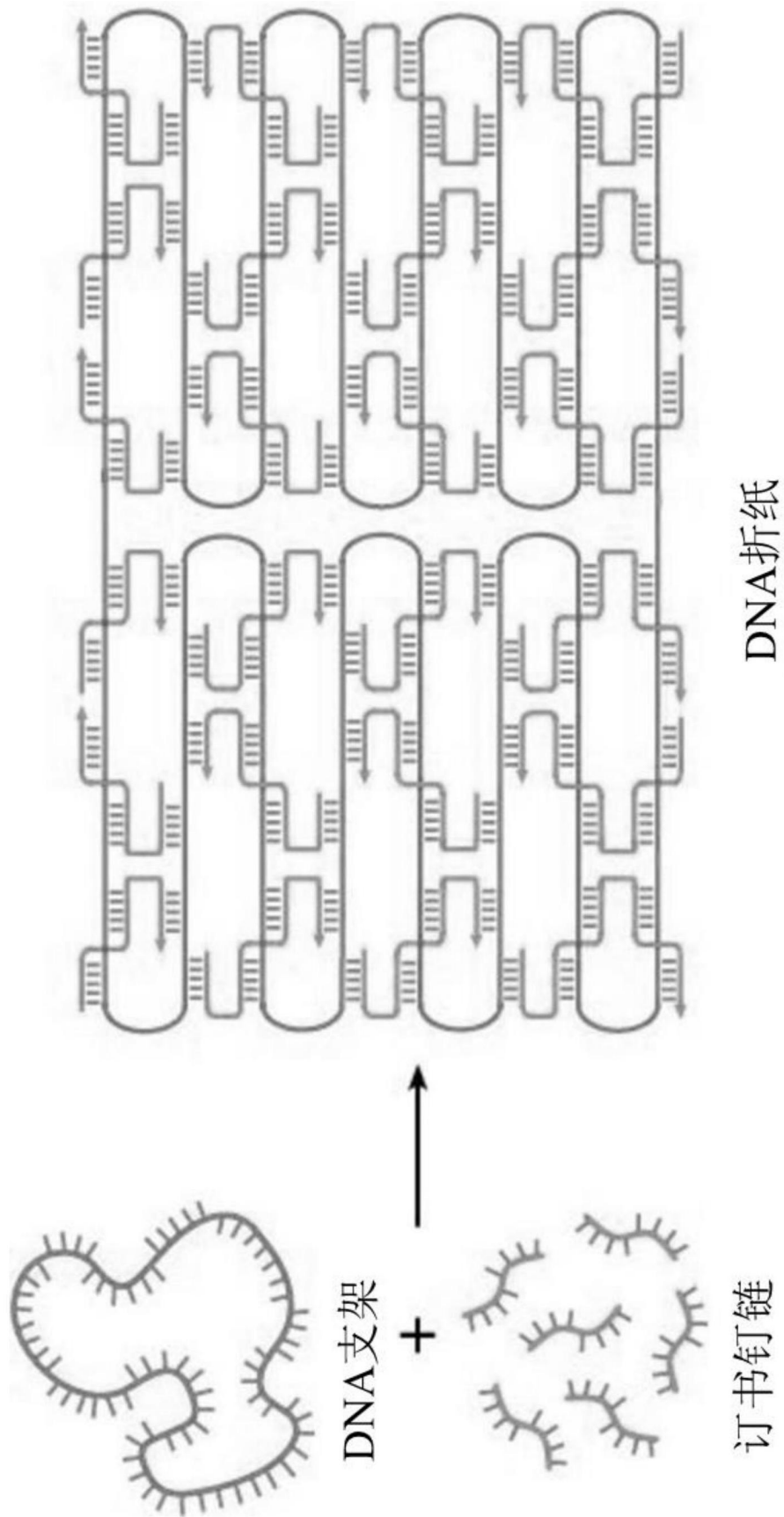
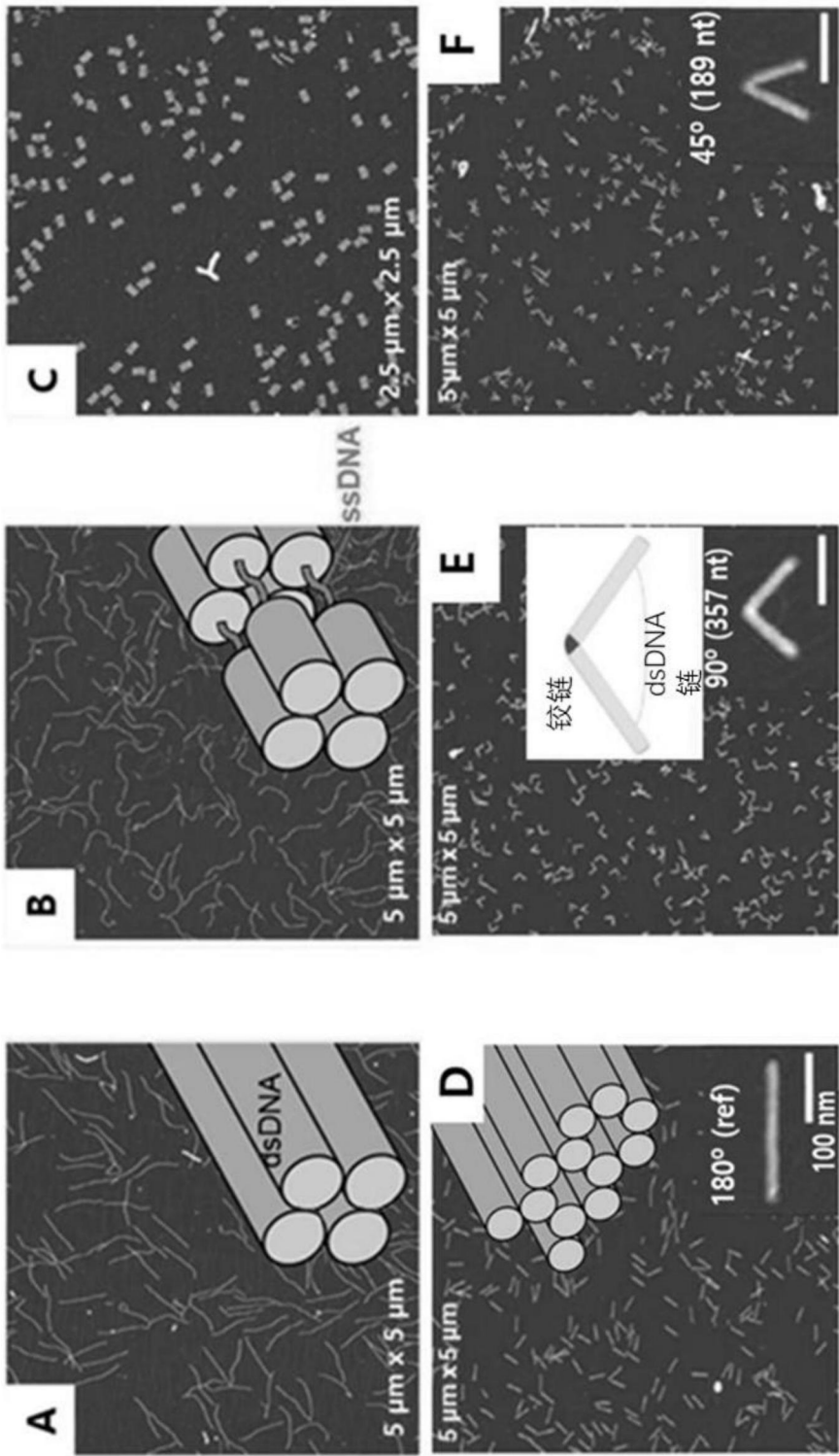


图1



A. 4螺旋束-刚性
B. 4螺旋束-柔性 (ssDNA间隙: 5 nt)
C. Rothemund方形
D. 12螺旋束-刚性
E. 12螺旋束-弯曲 (90°)
F. 12螺旋束-弯曲 (45°)

图2

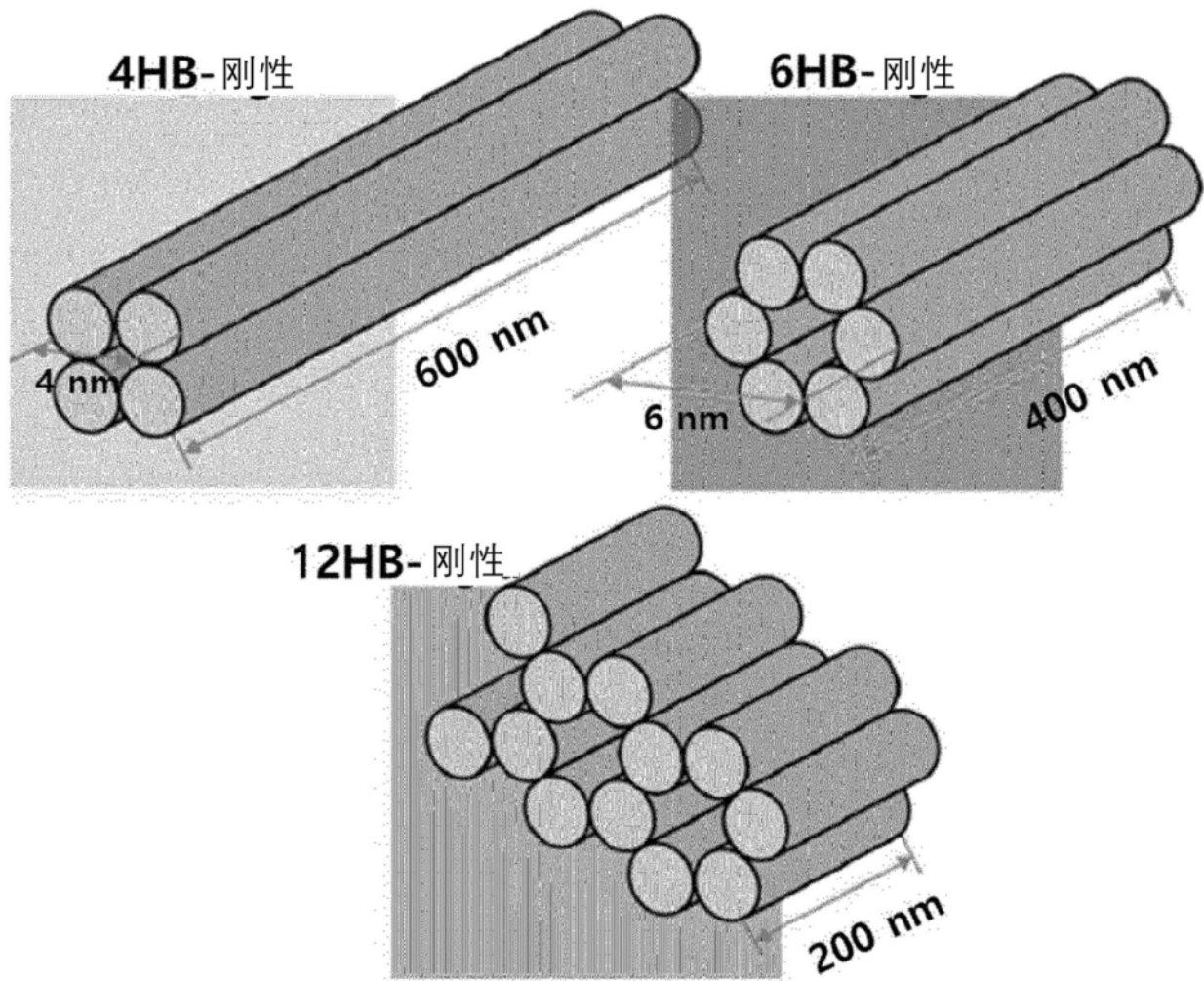


图3

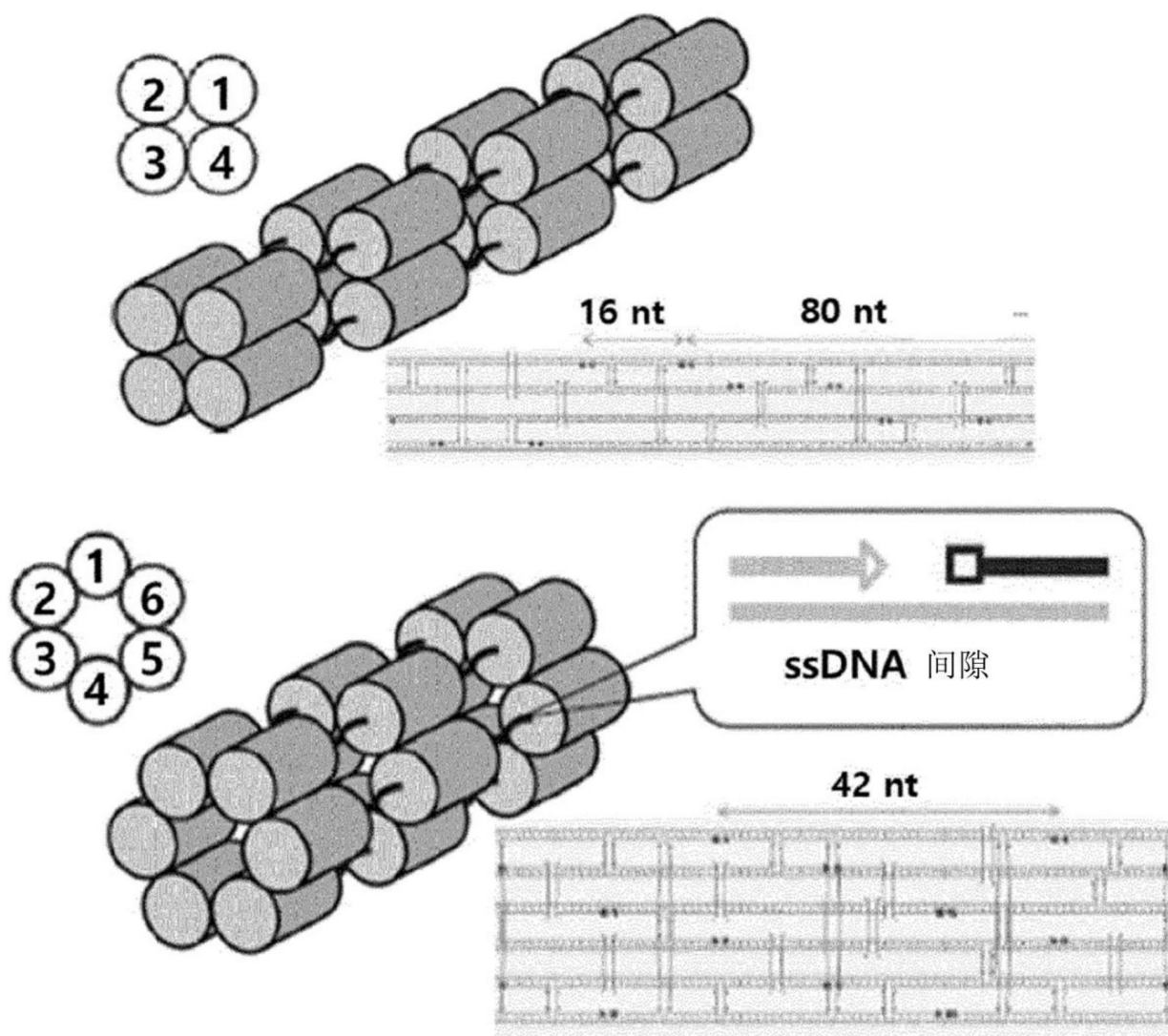


图4

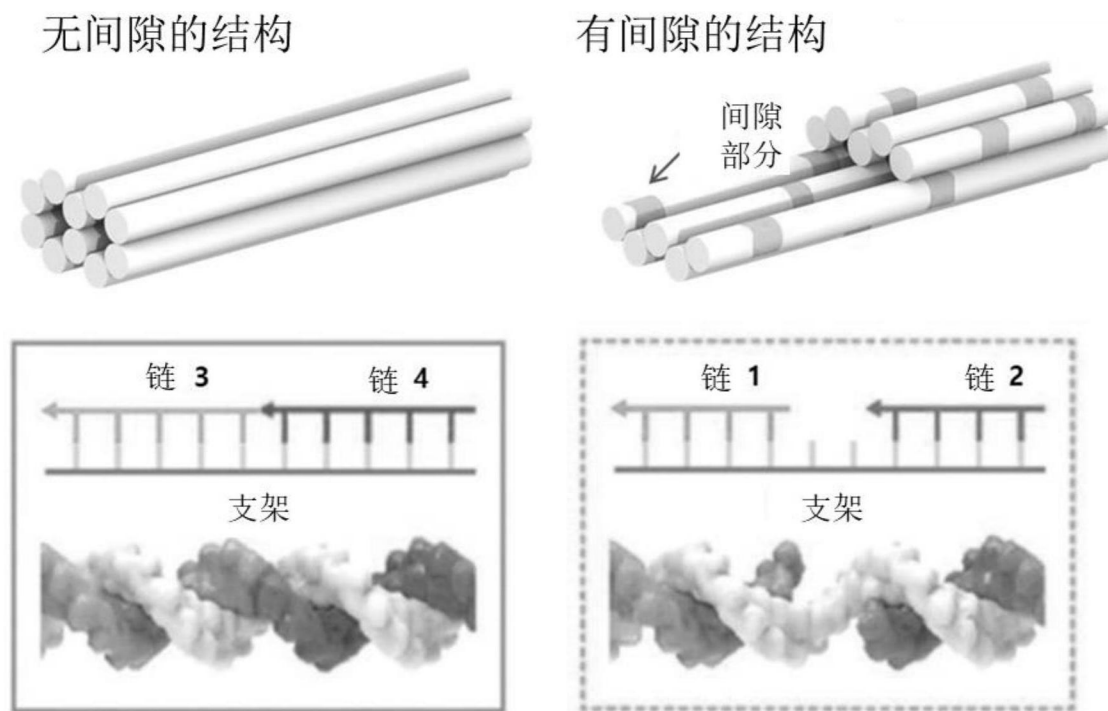


图5

1. 使用液态N₂快速冰冻后立即（在-6° C下0 min）
2. 观察上述 (1) 30分钟后（此时，冰箱温度：10° C）
3. 使用ImageJ对前10个冰粒进行量化

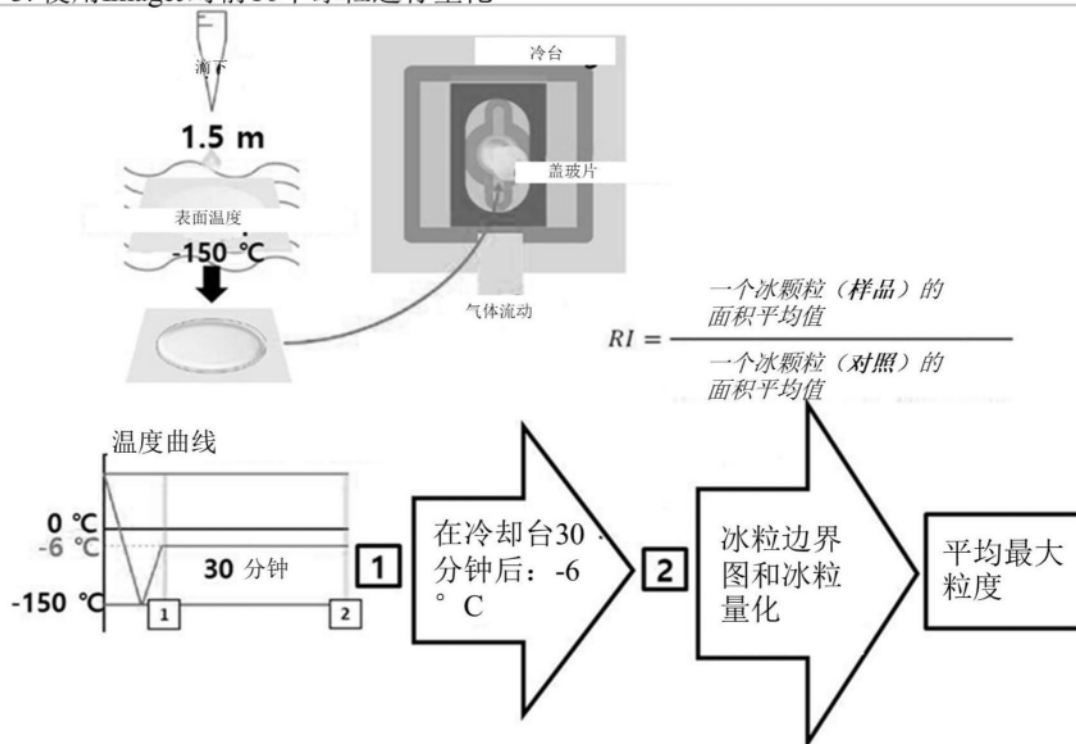


图6

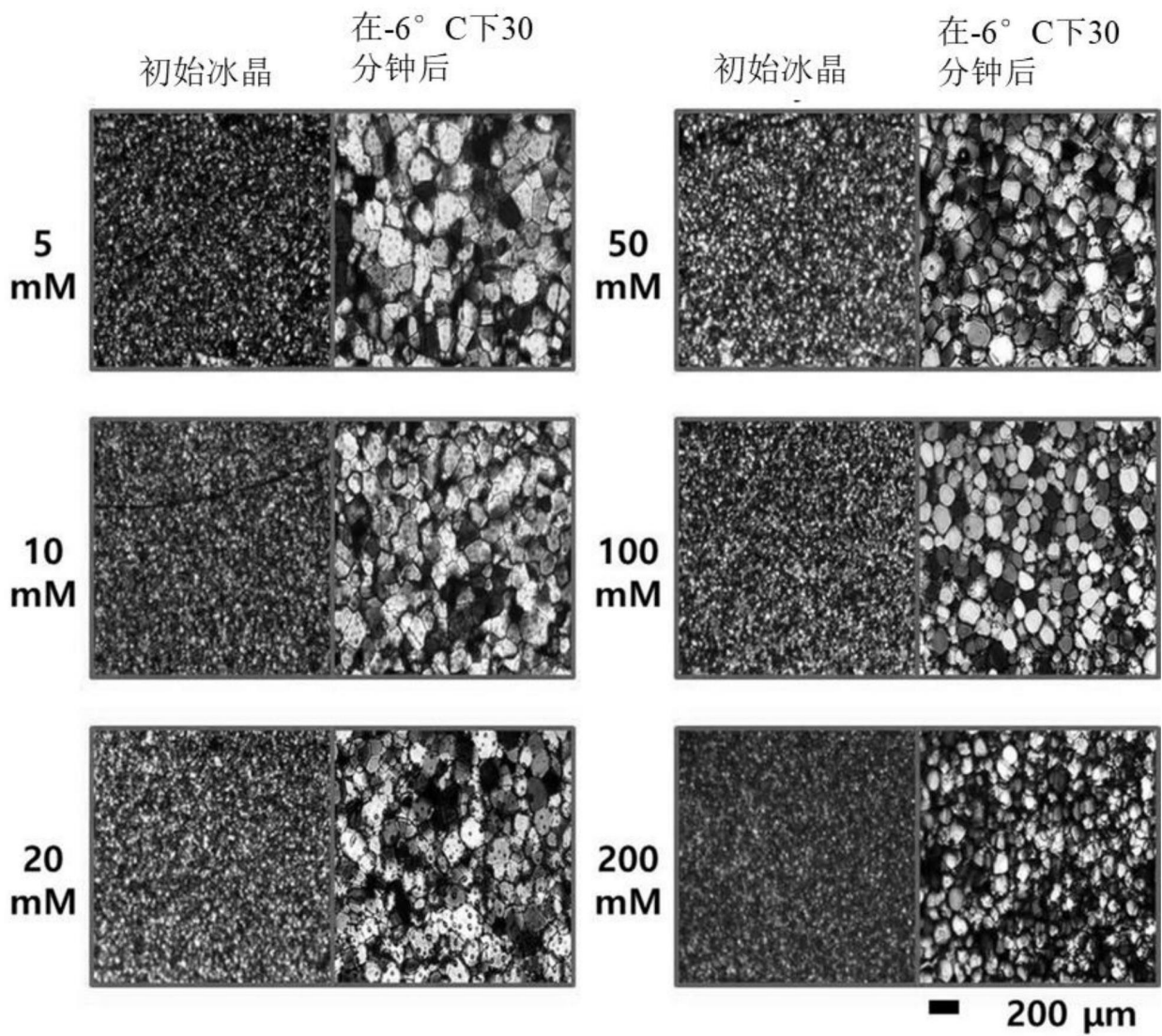


图7

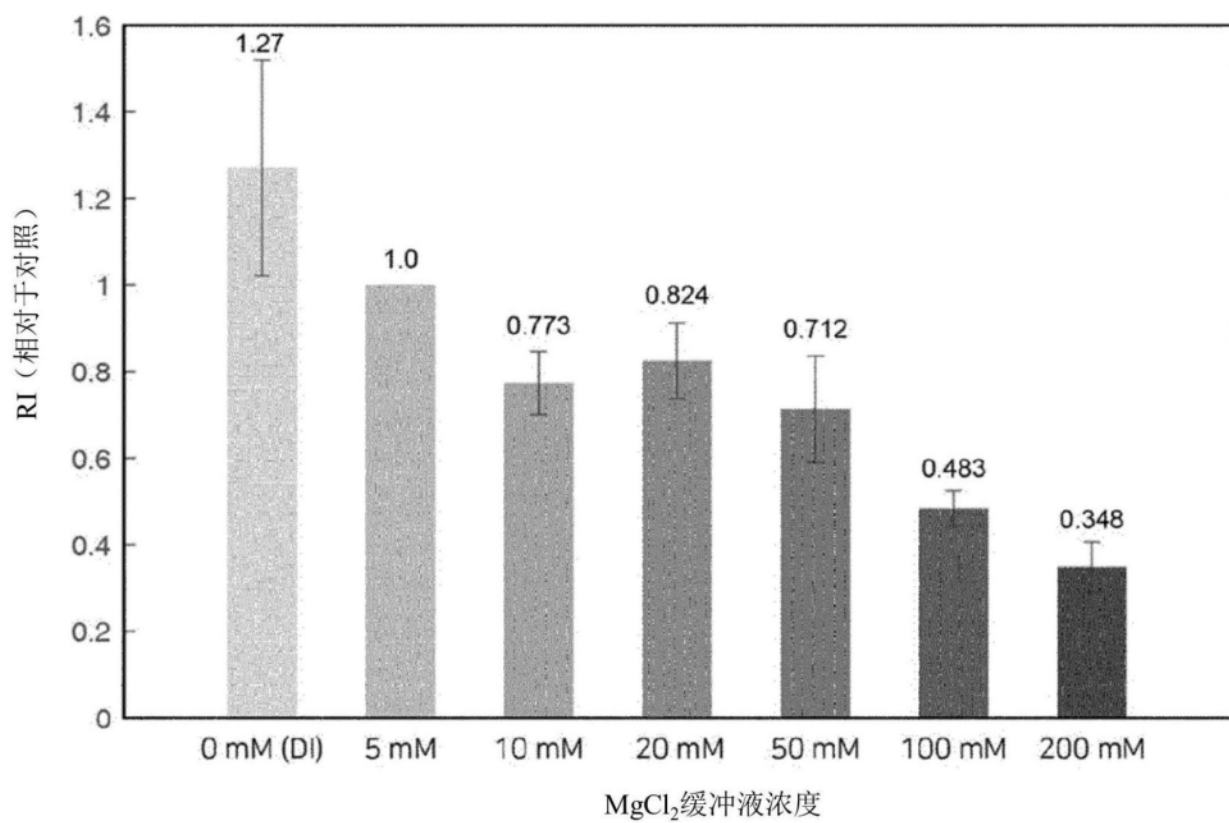


图8

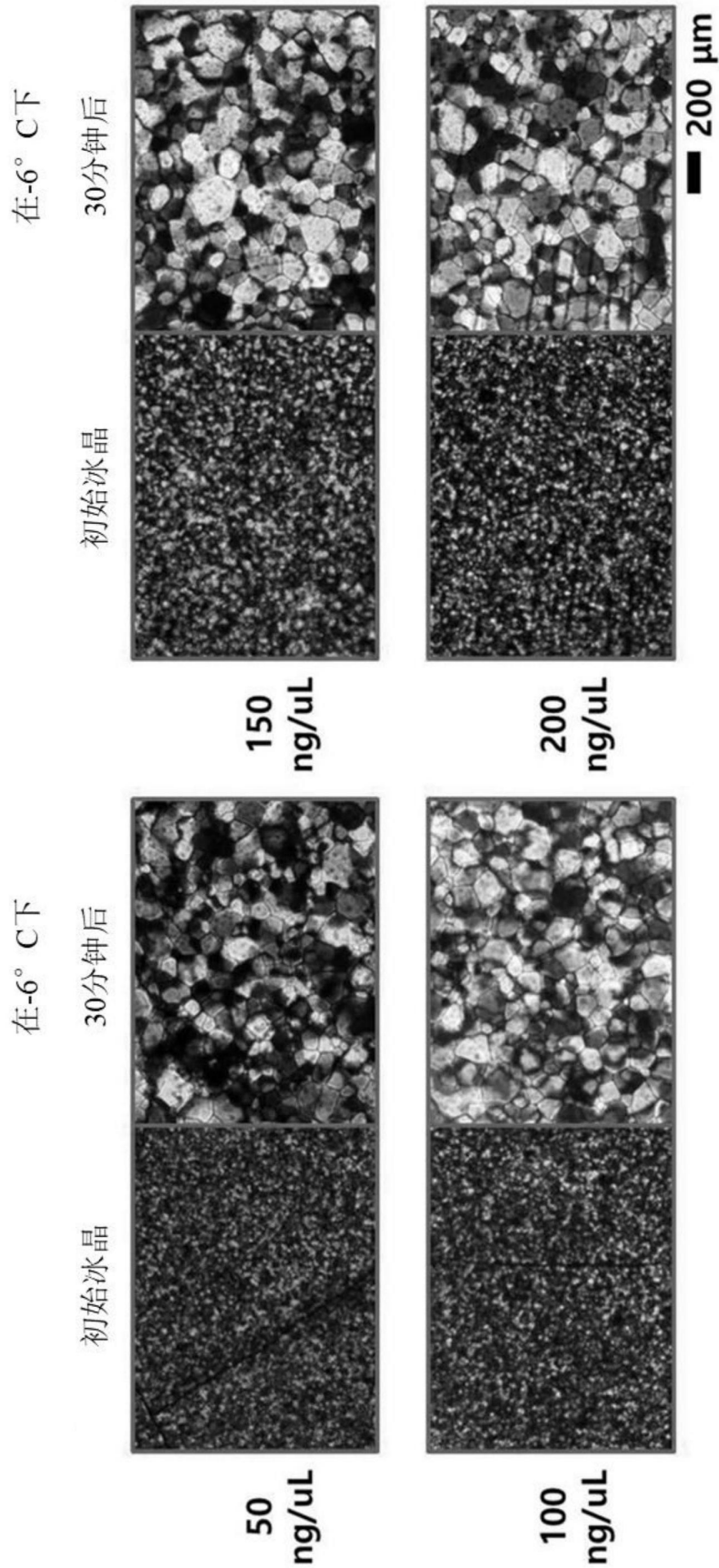


图9

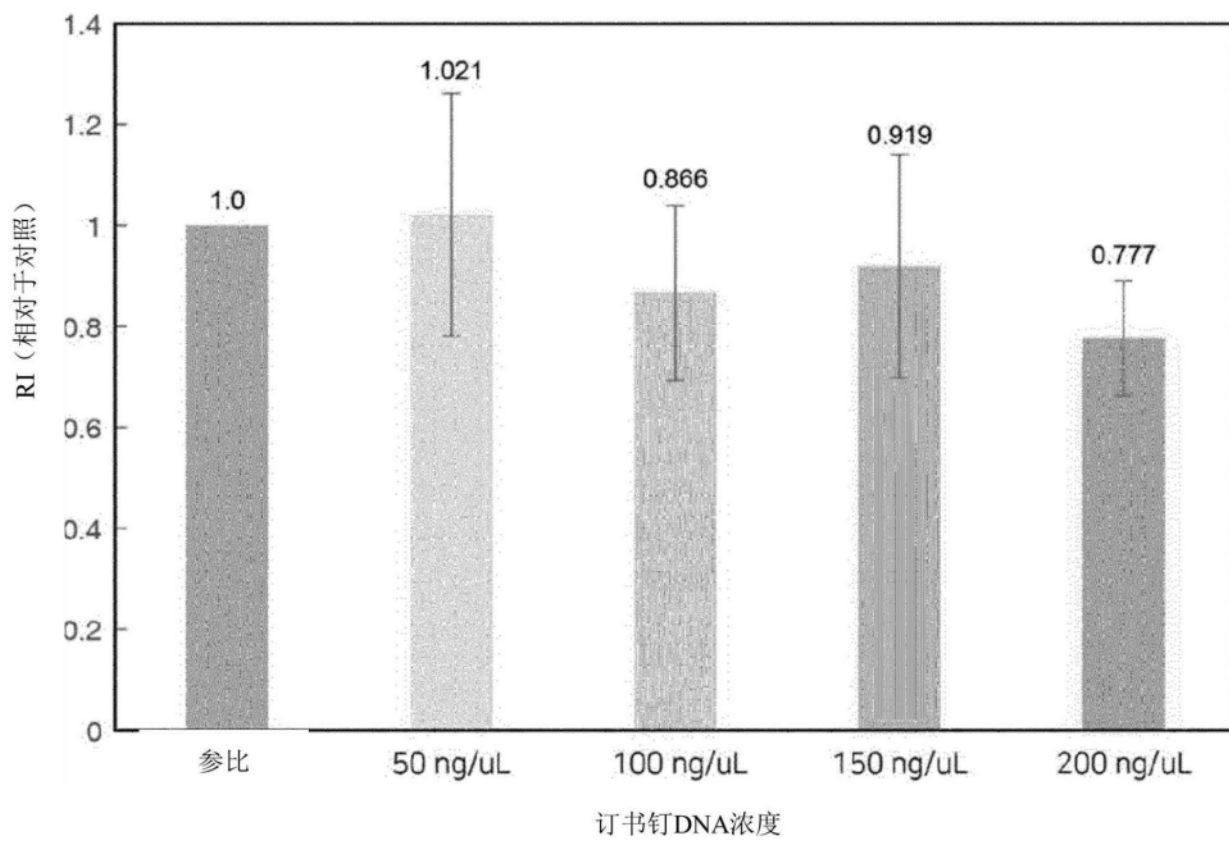


图10

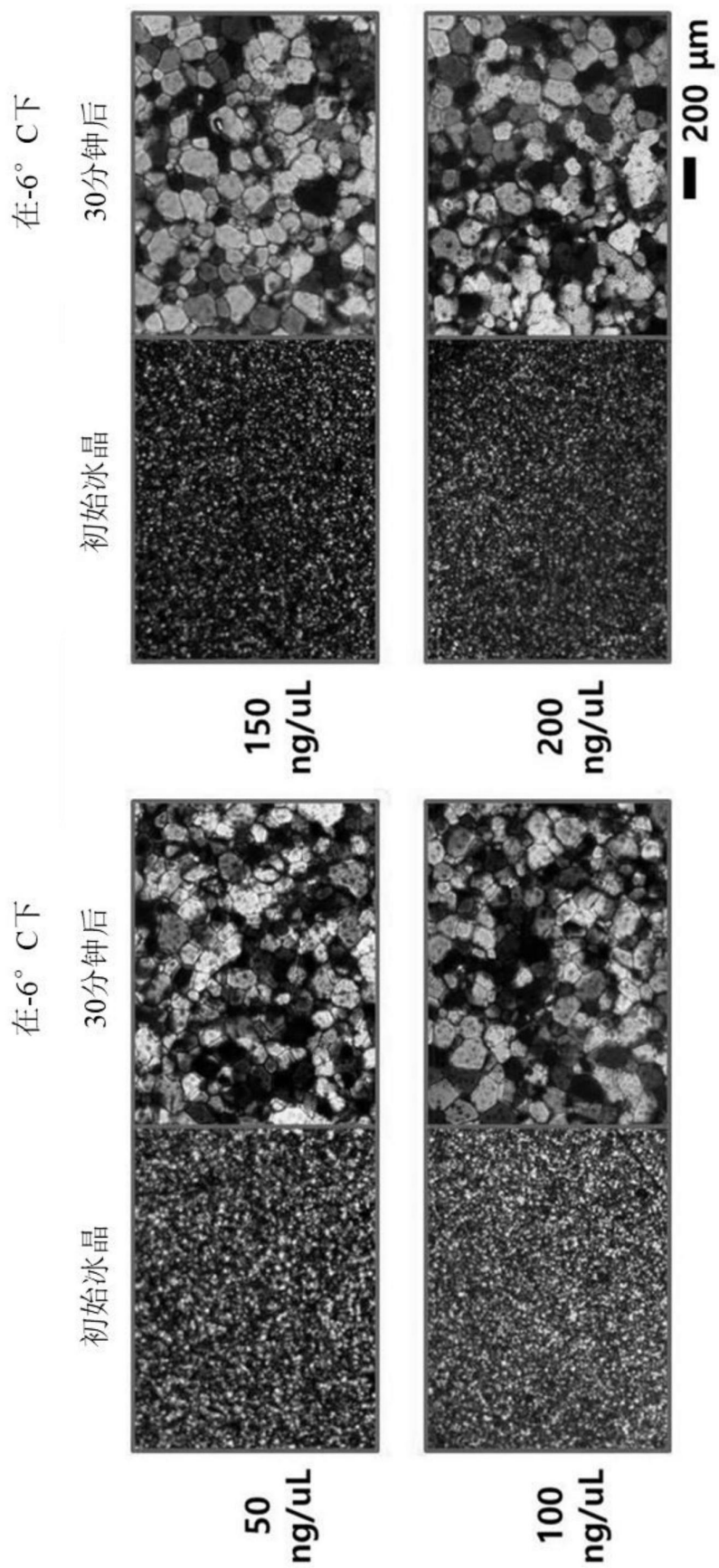


图11

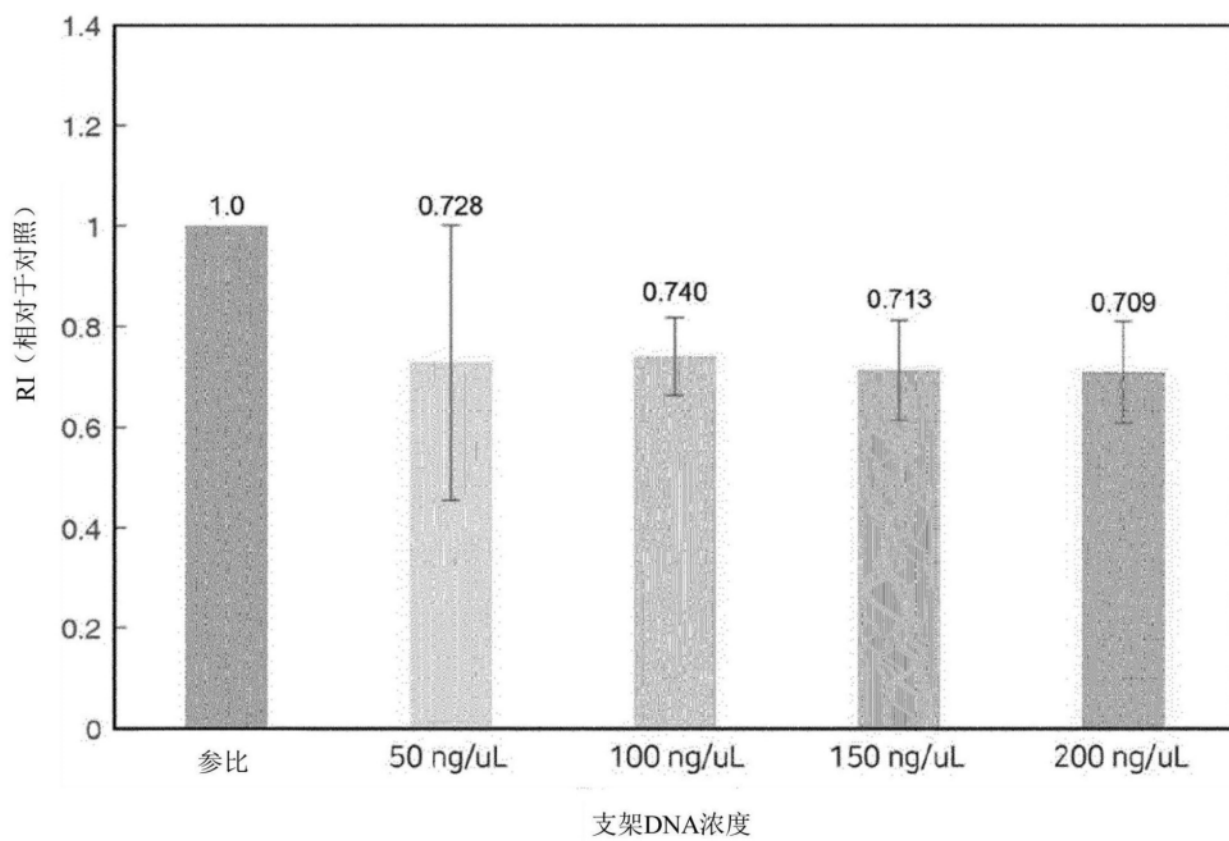


图12

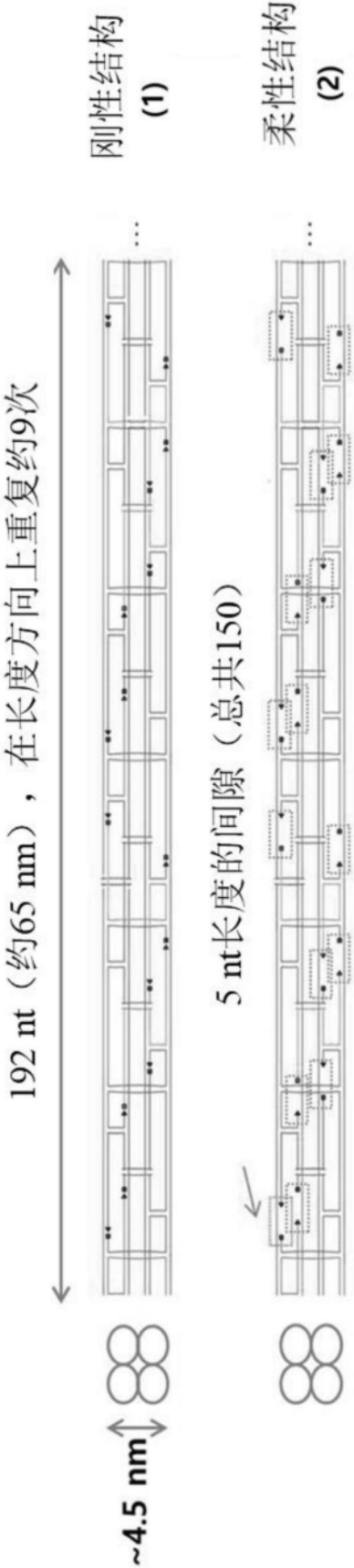


图13

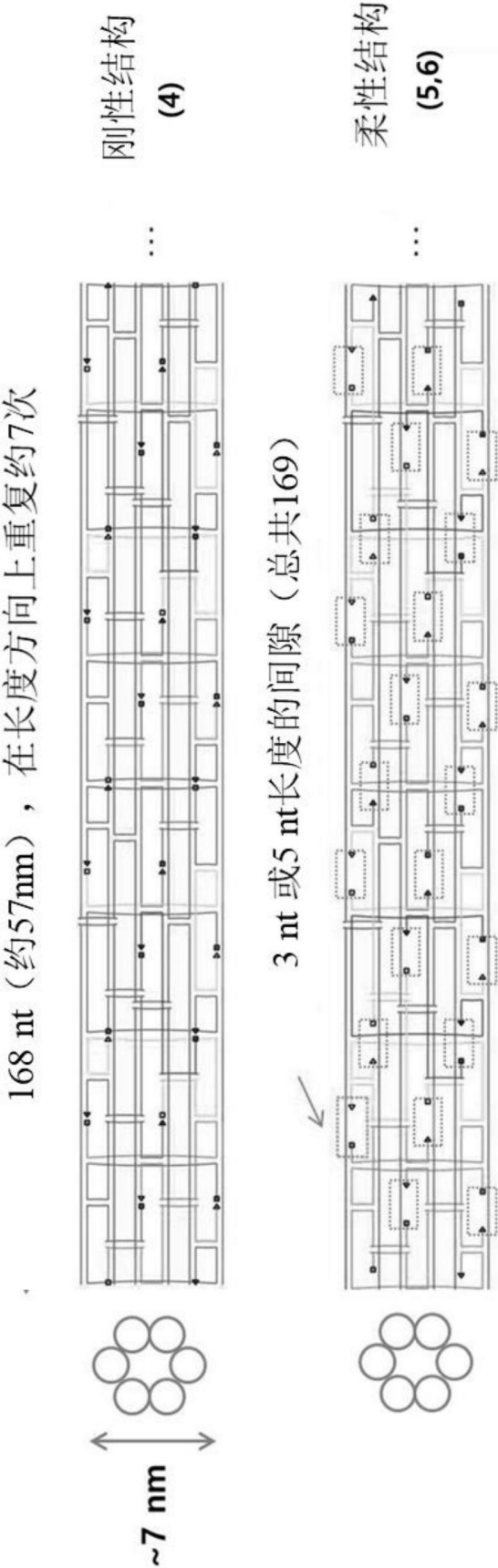


图14

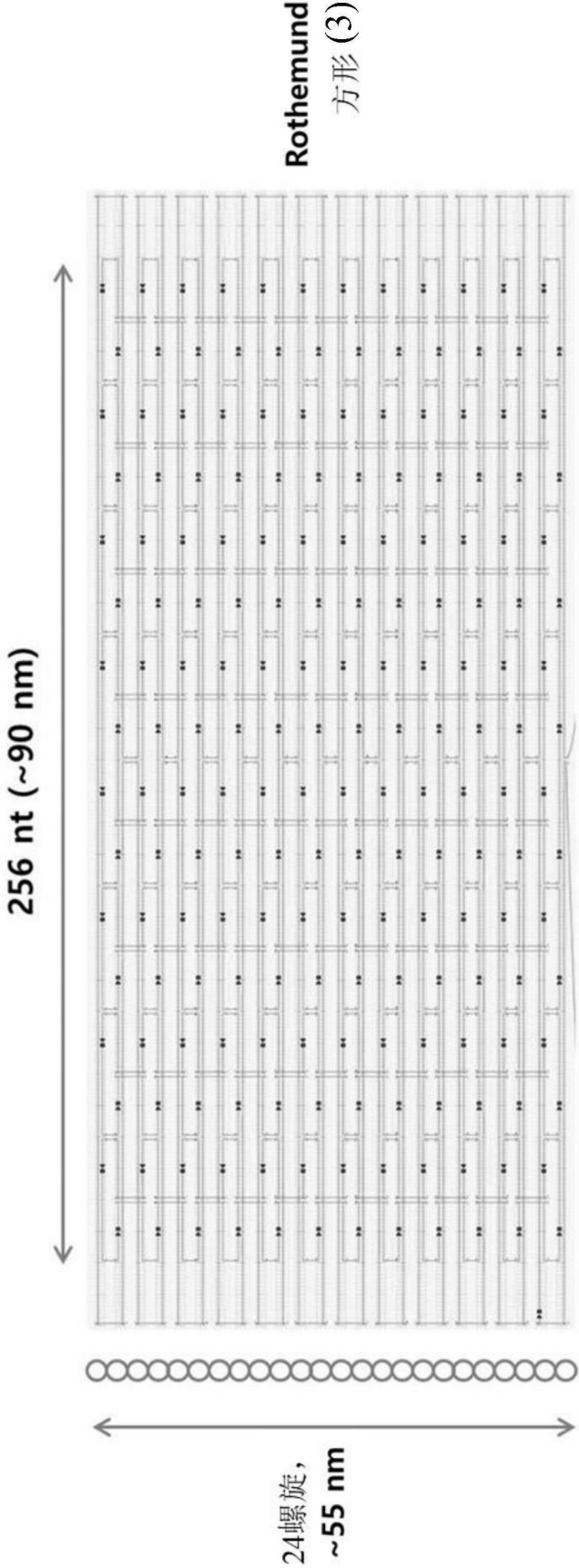


图15

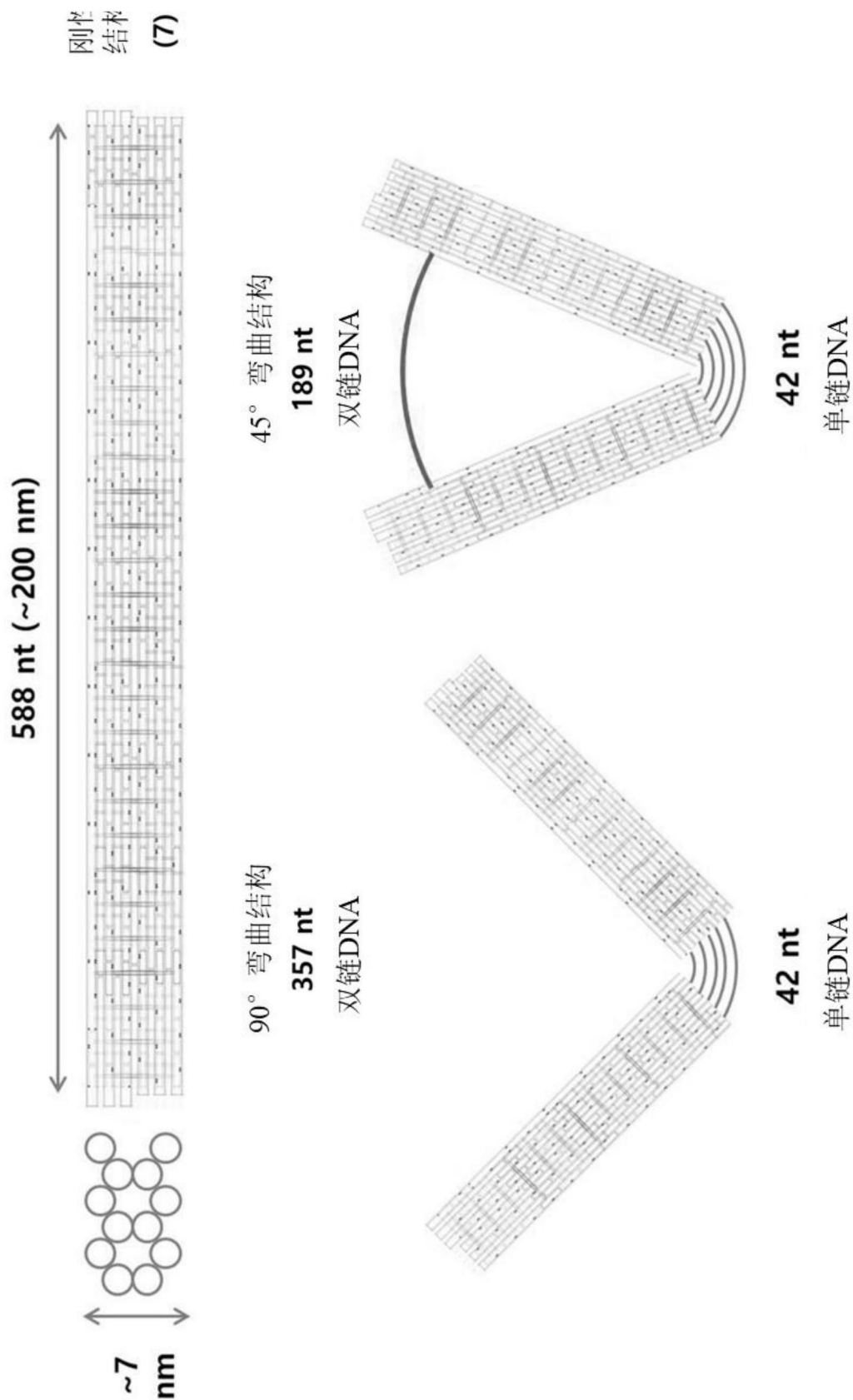


图16

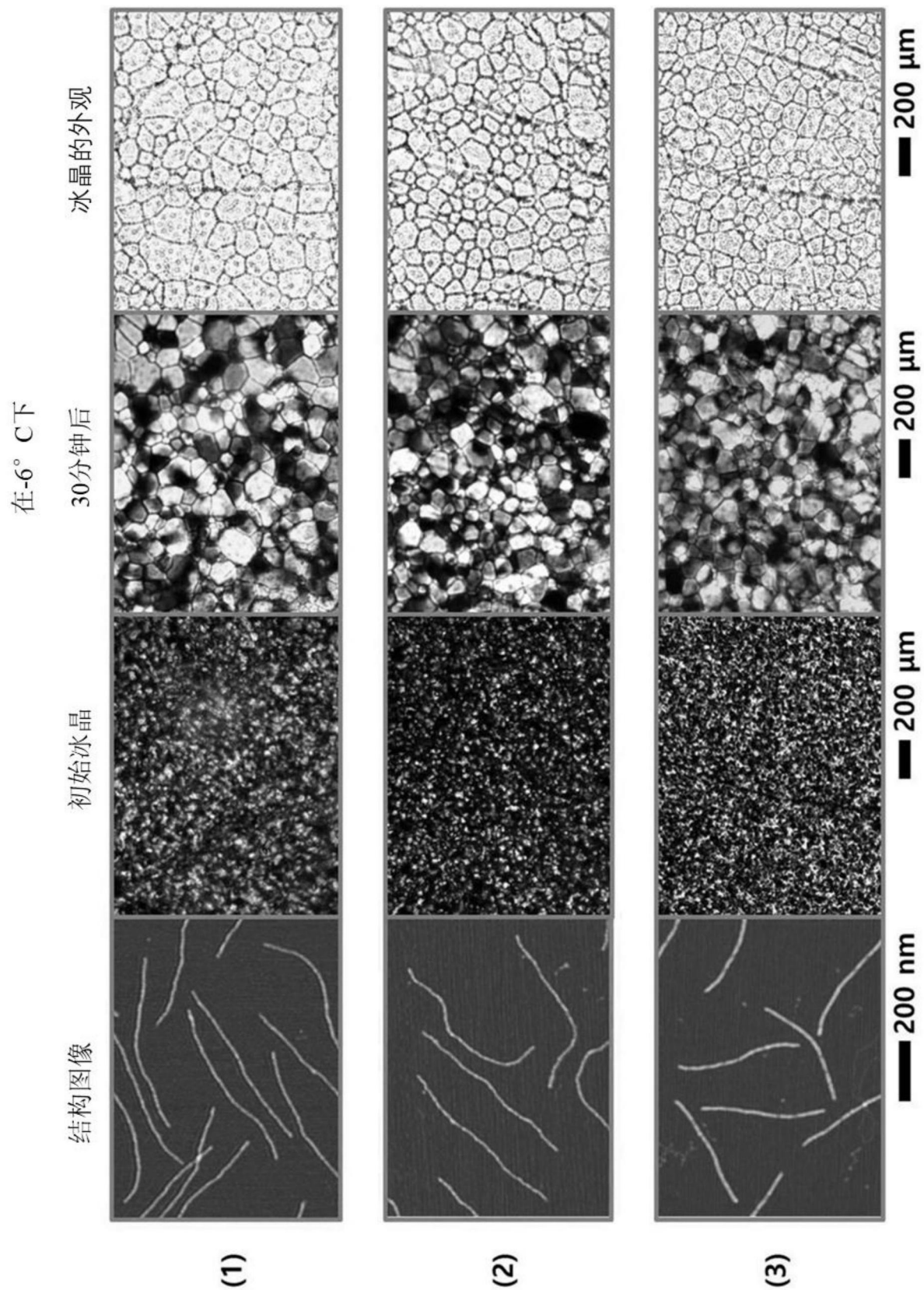


图17

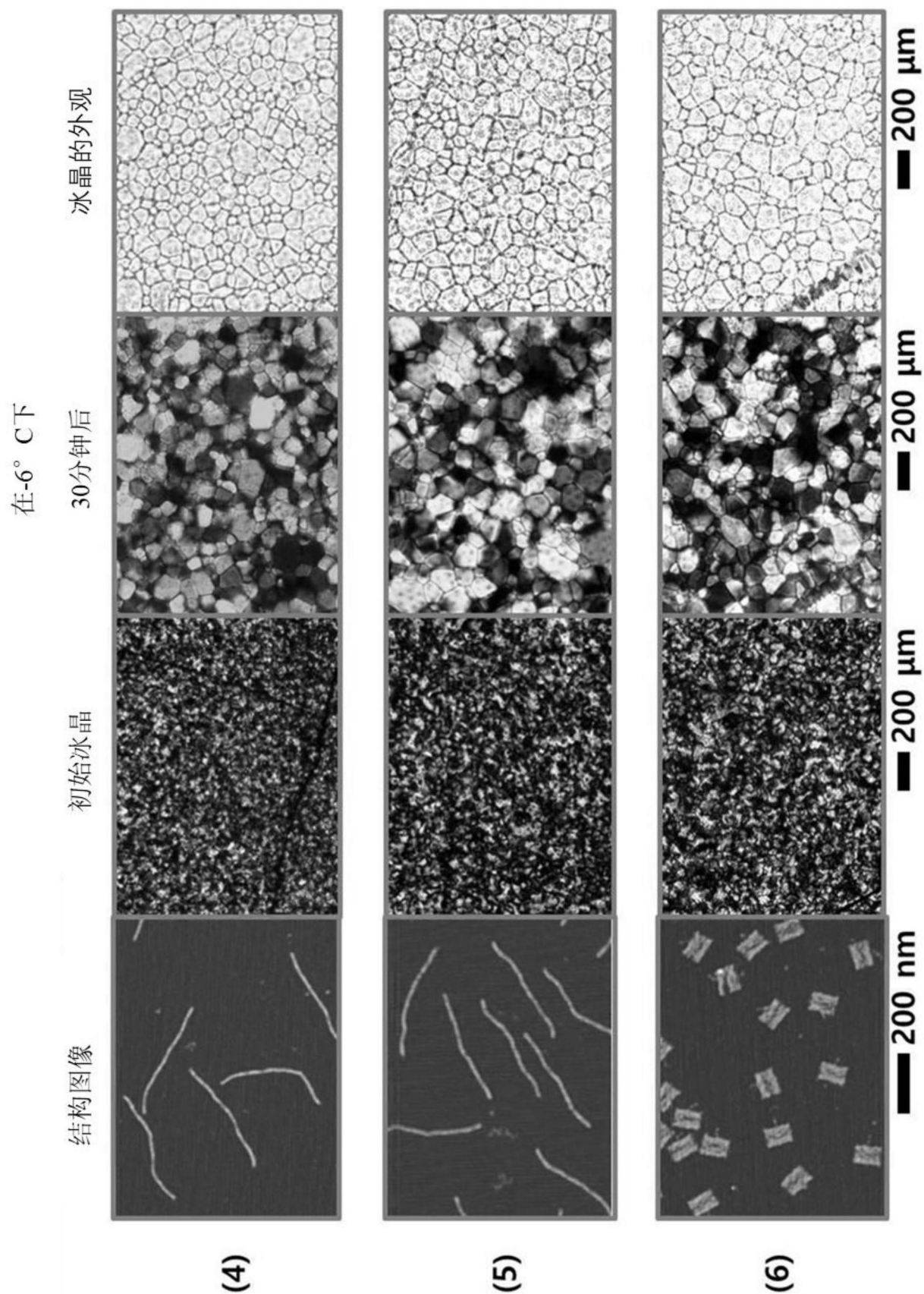


图18

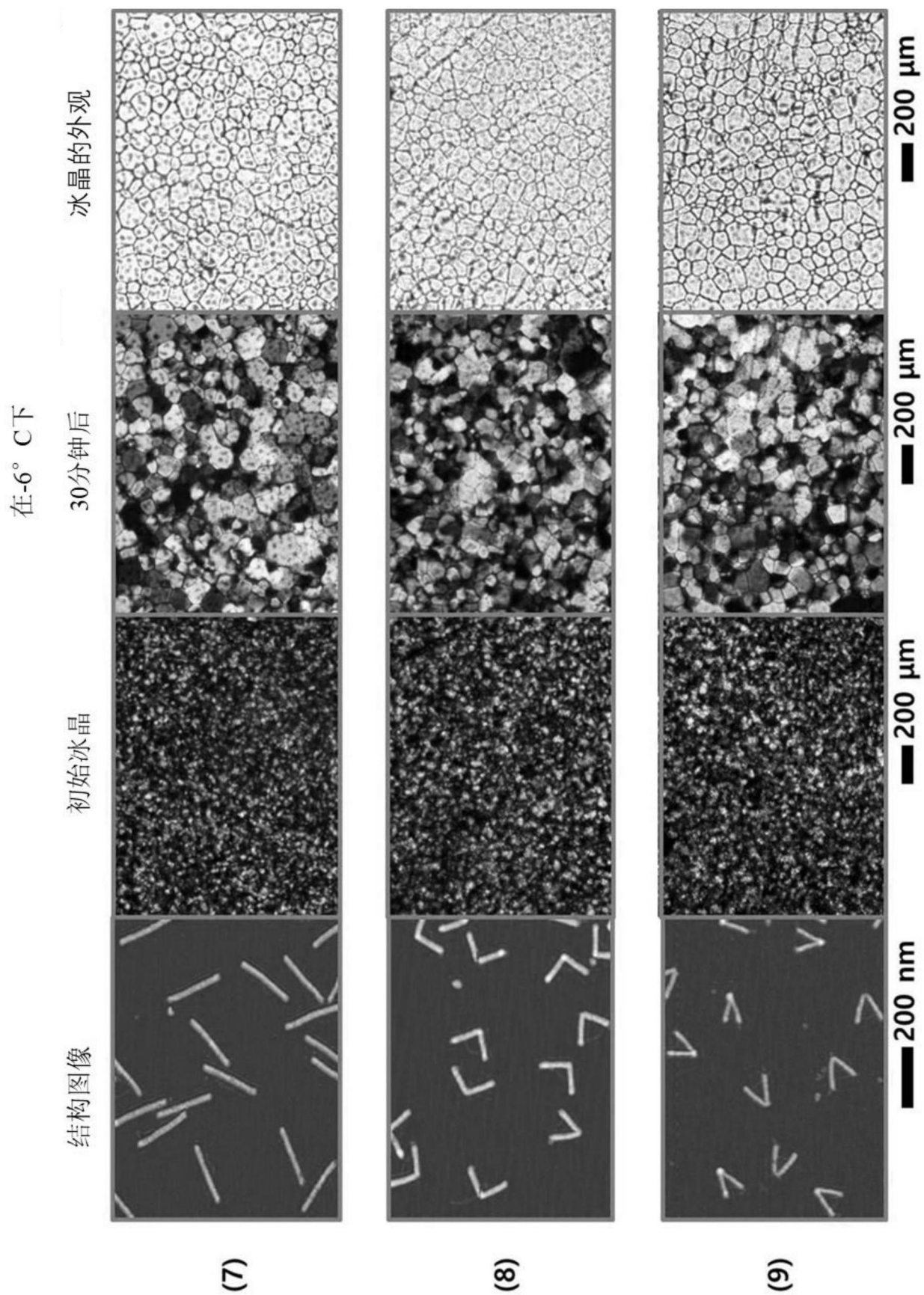


图19

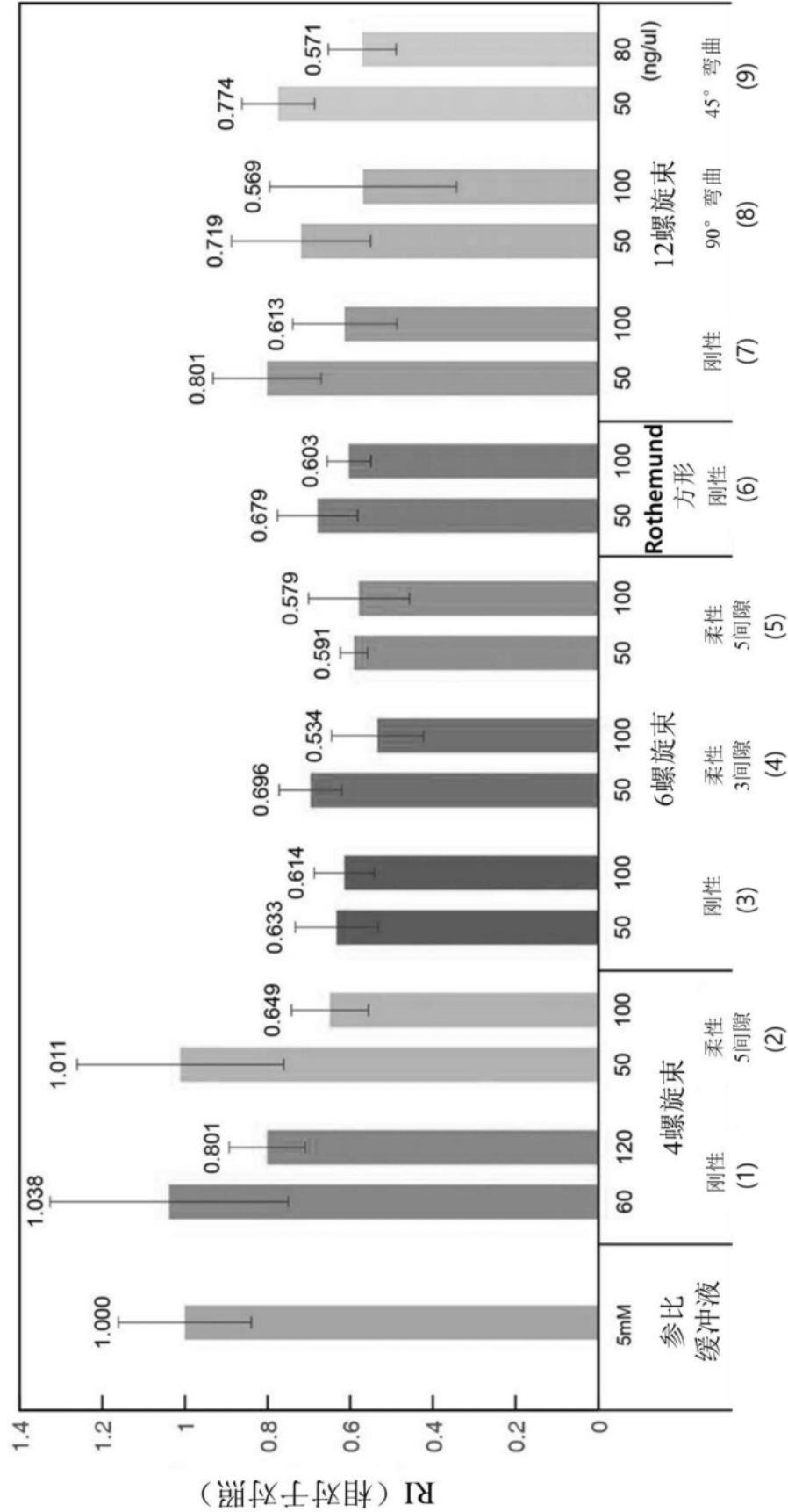


图20

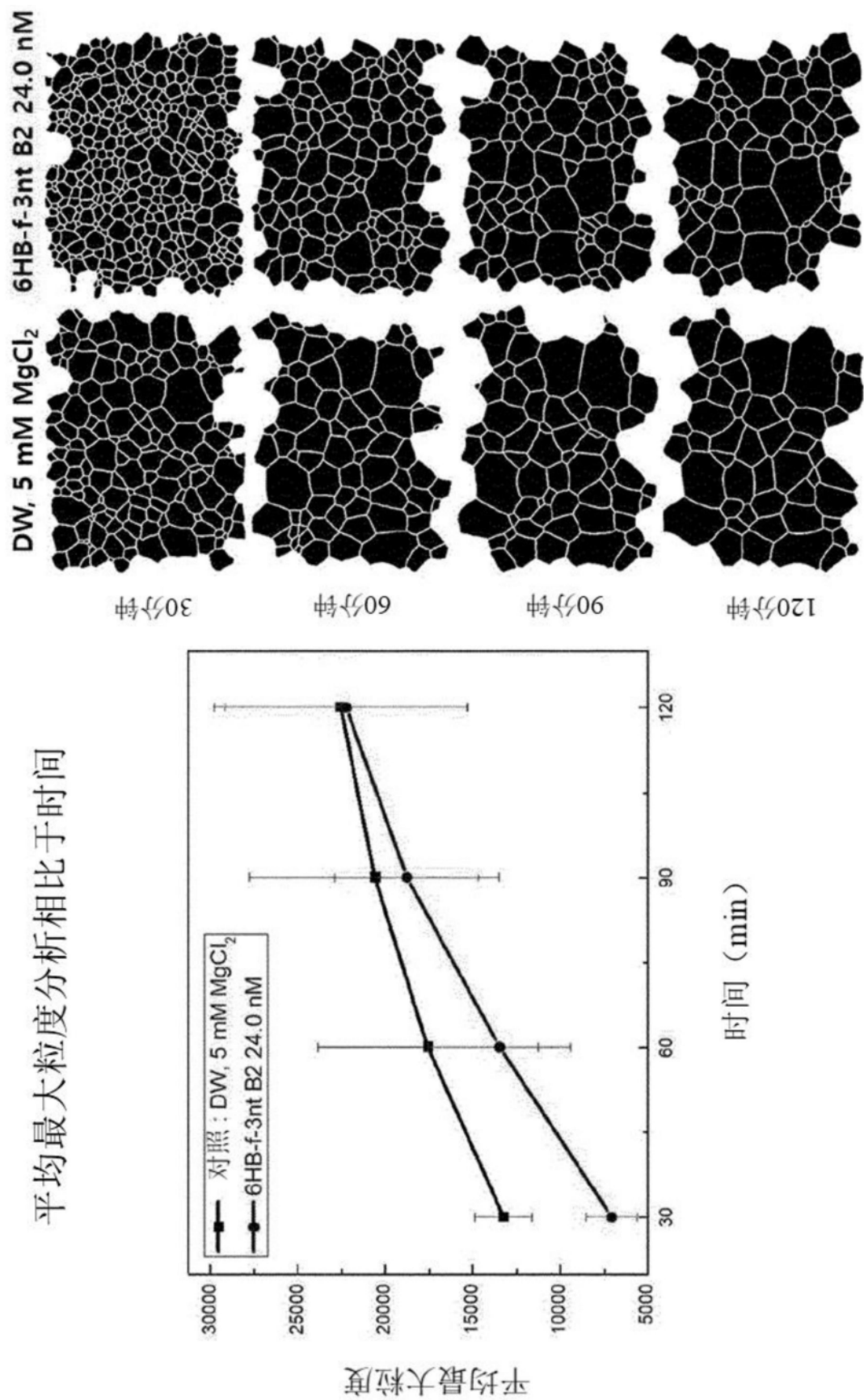


图21

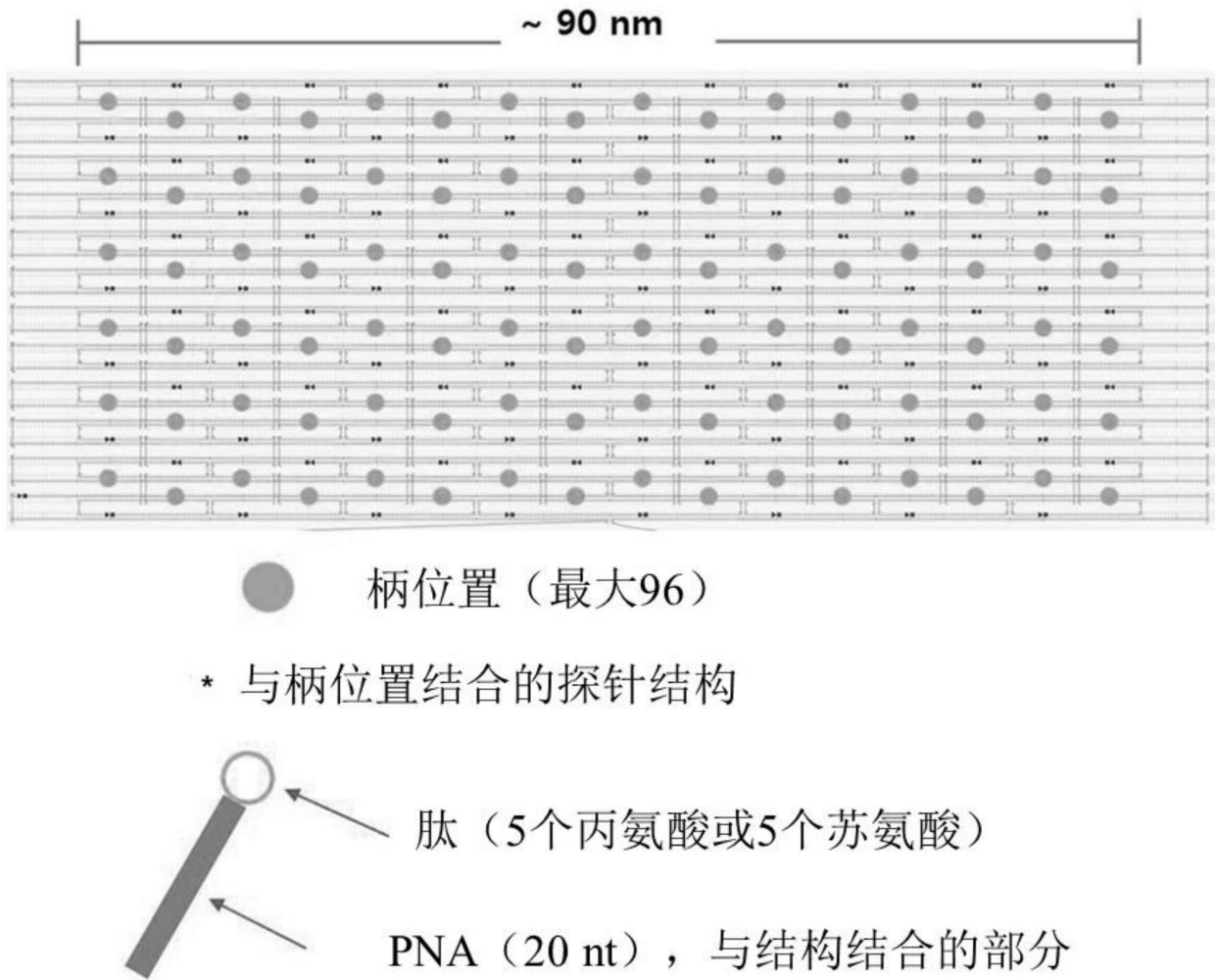


图22

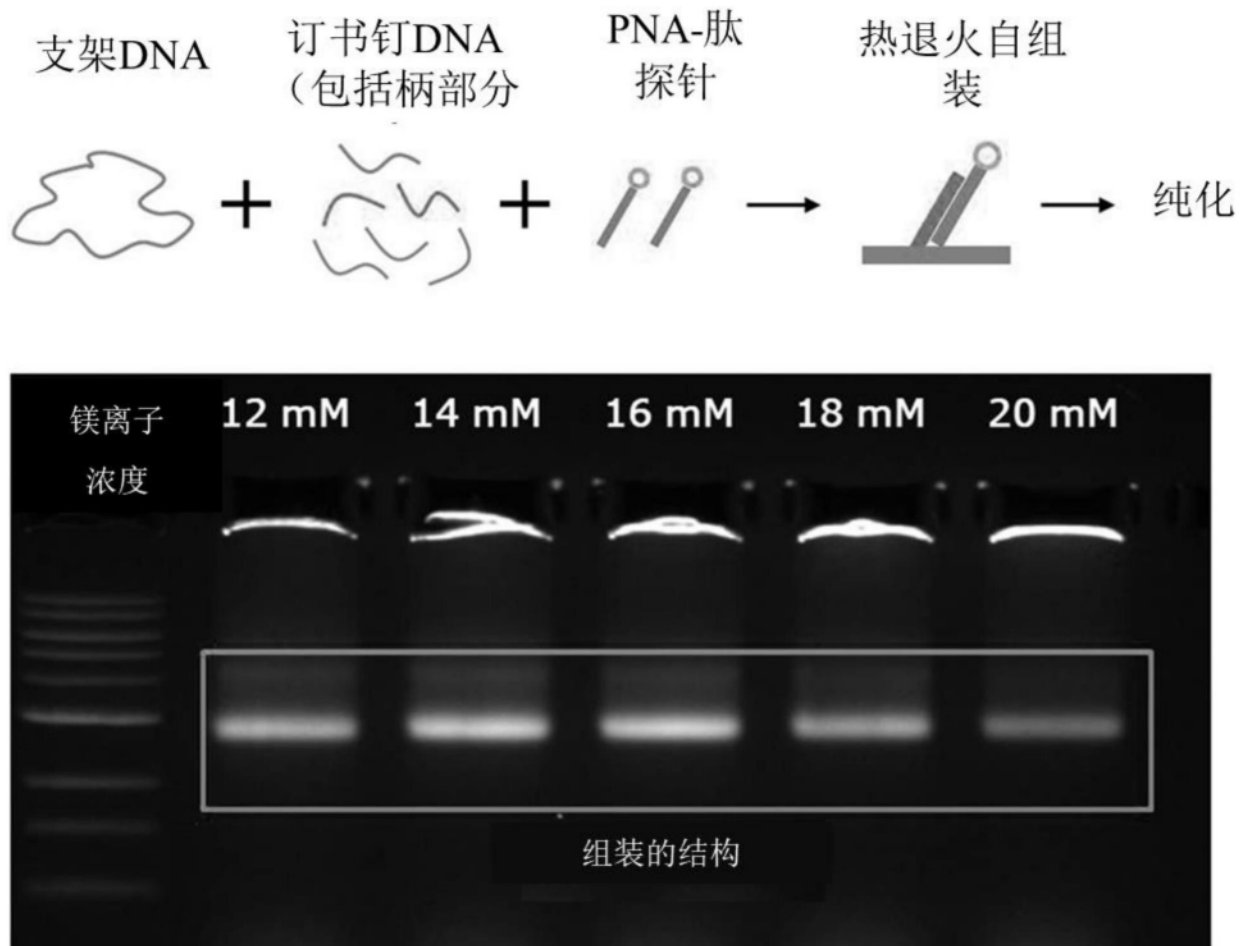


图23

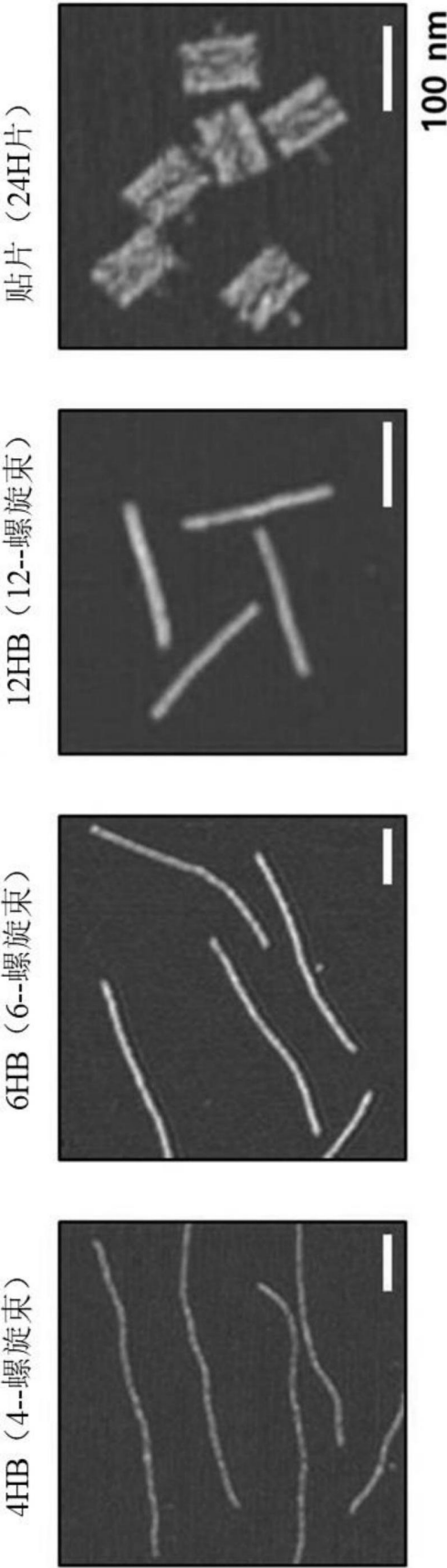


图24

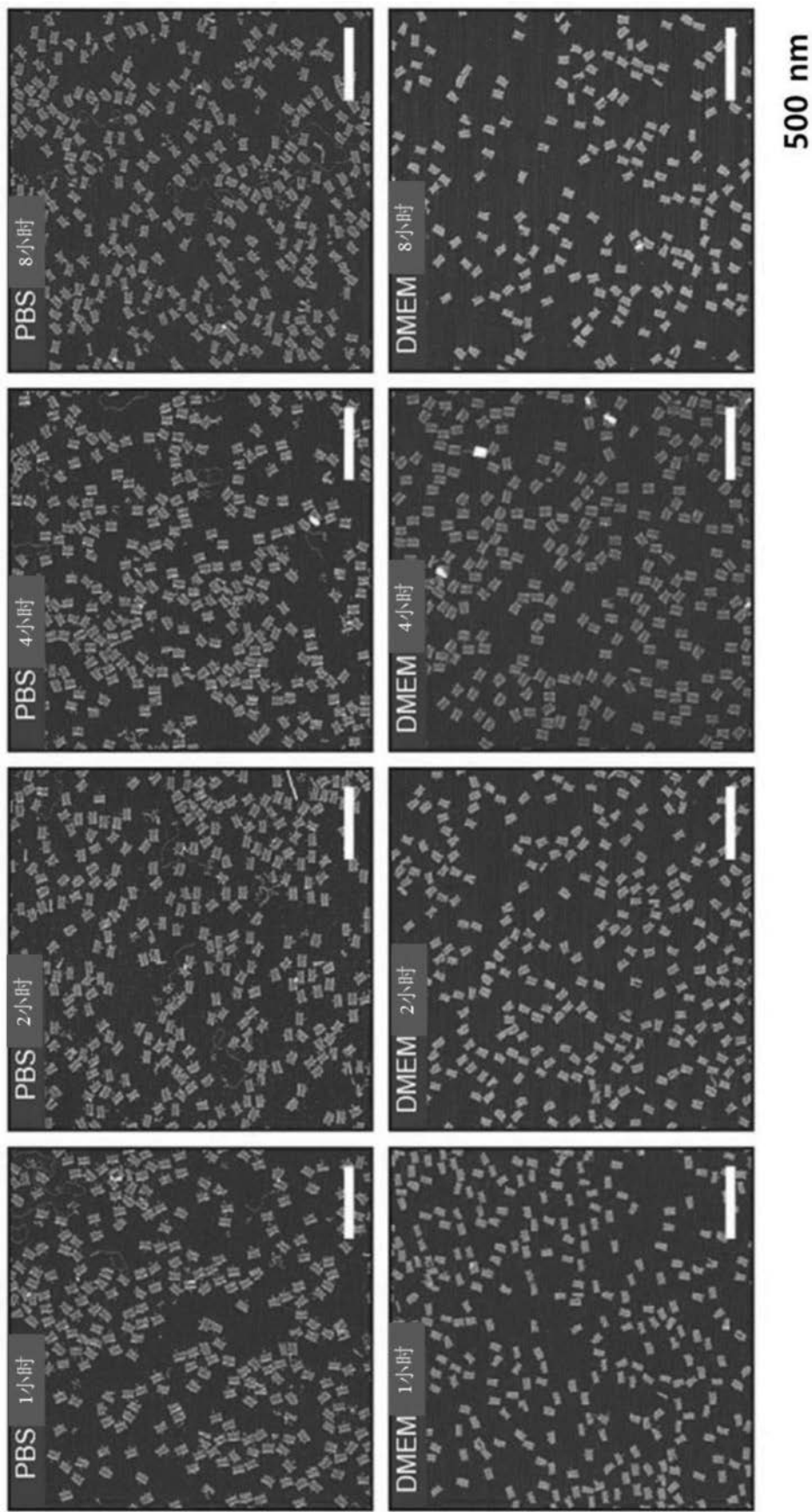


图25

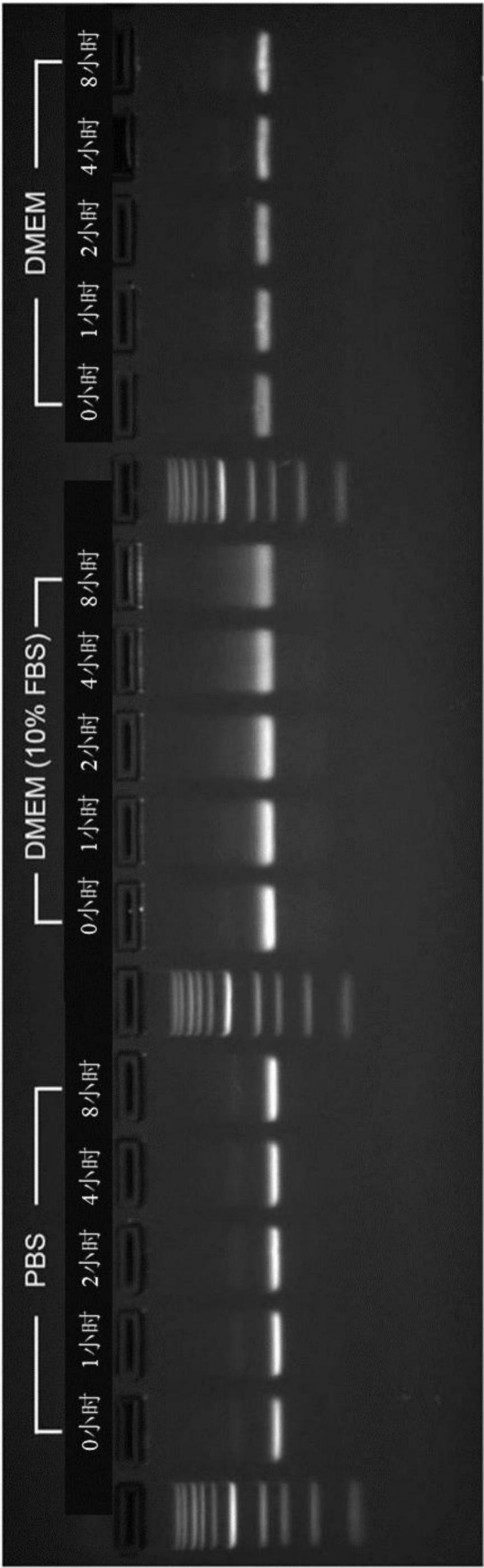


图26

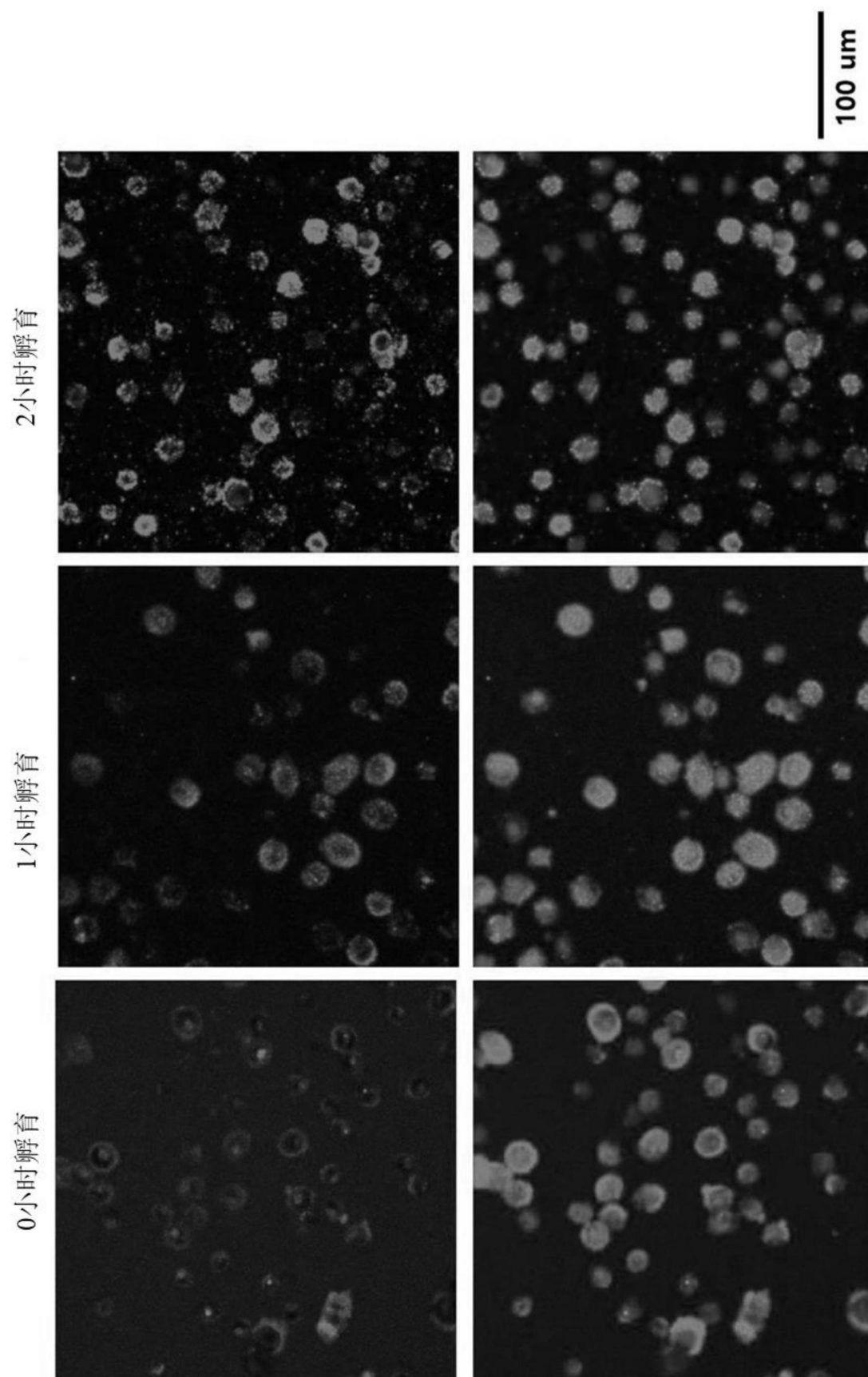


图27

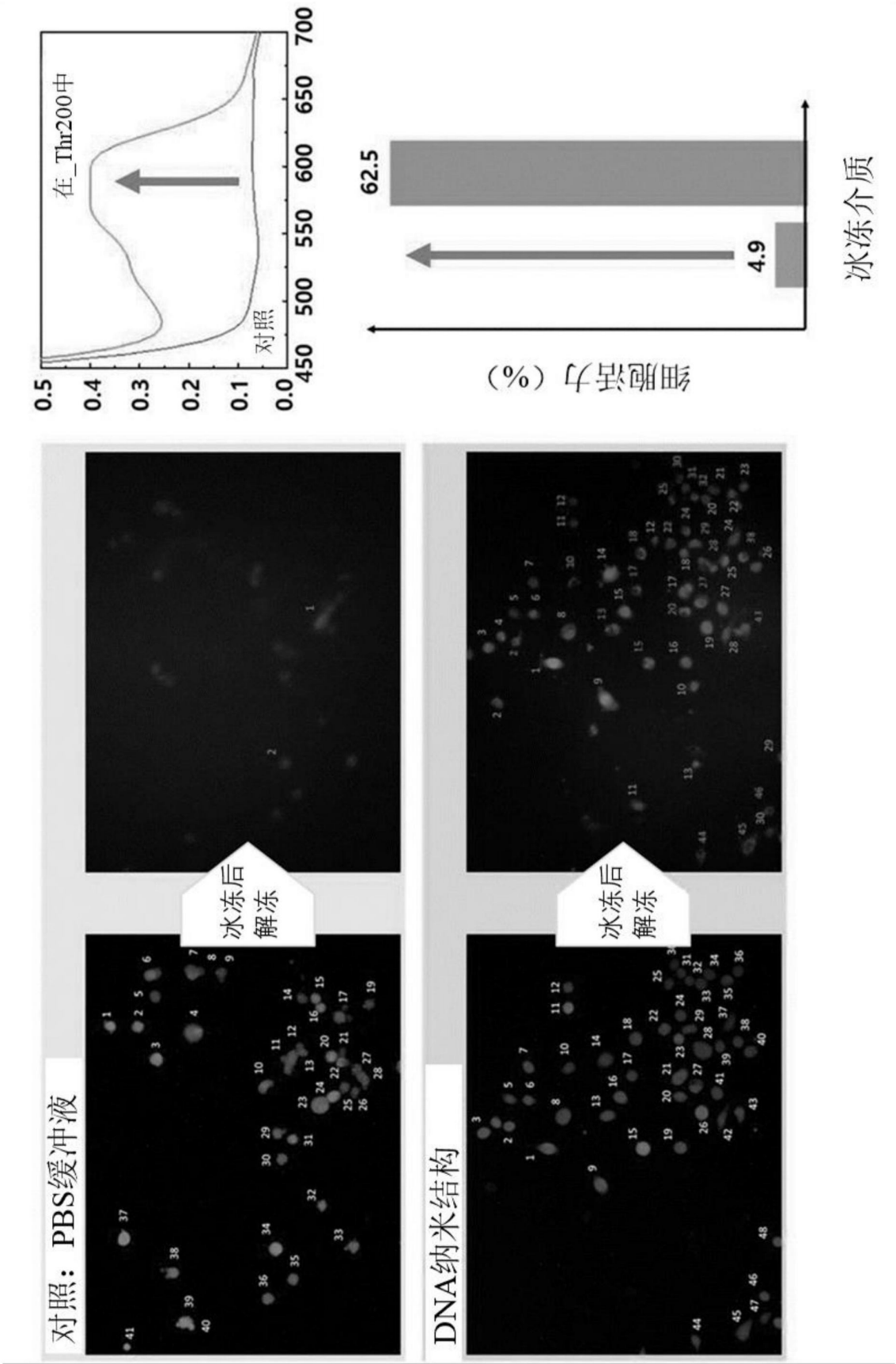


图28

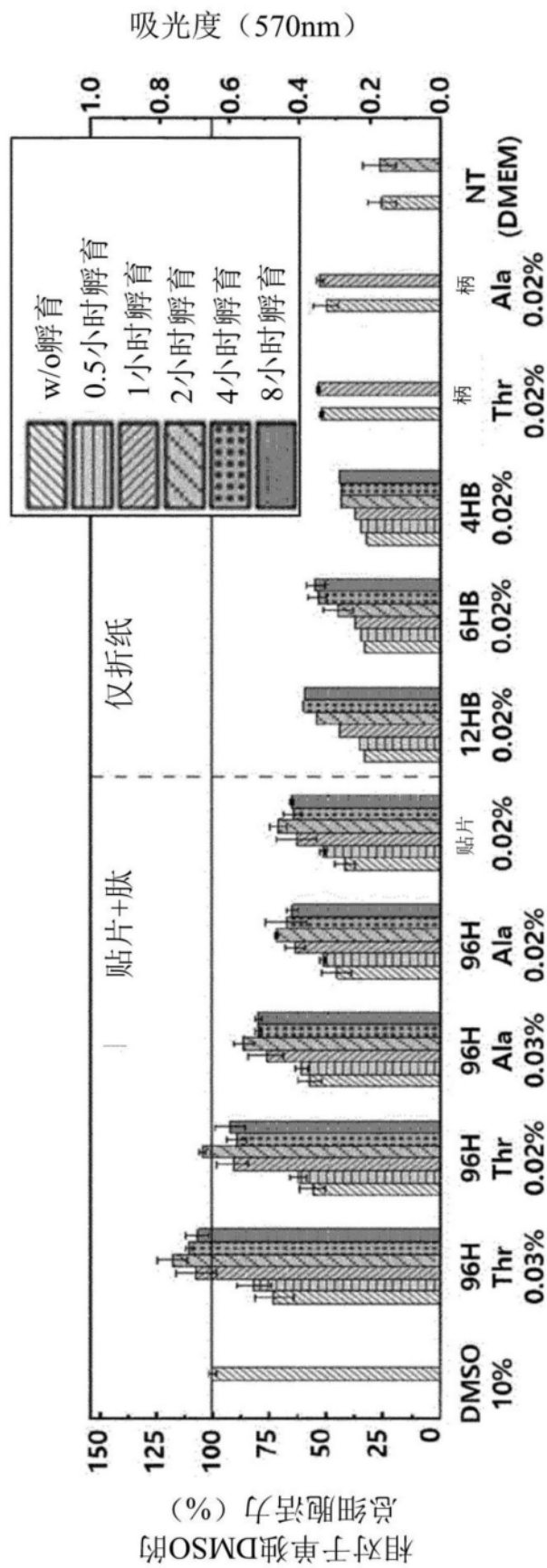


图29

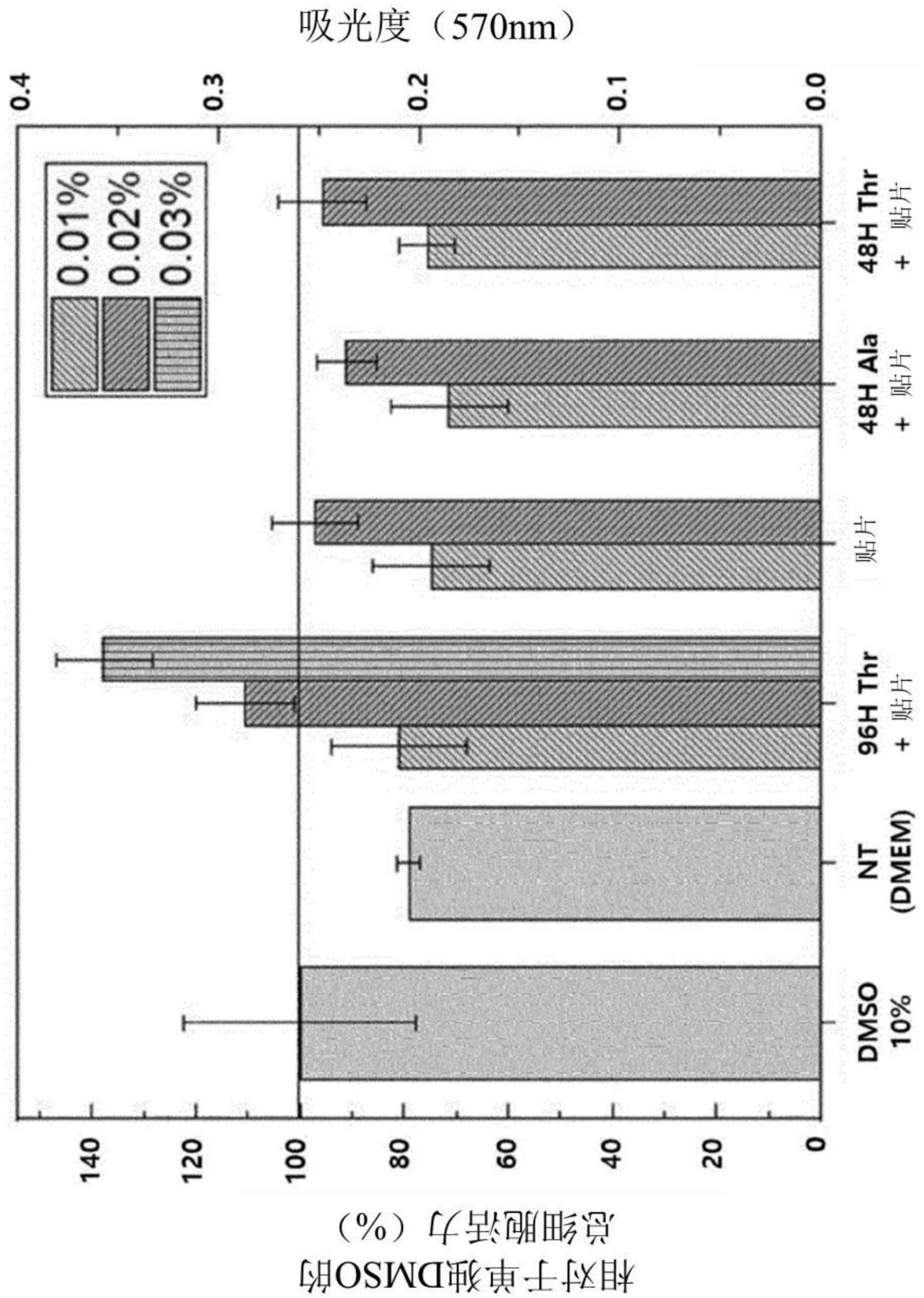


图30

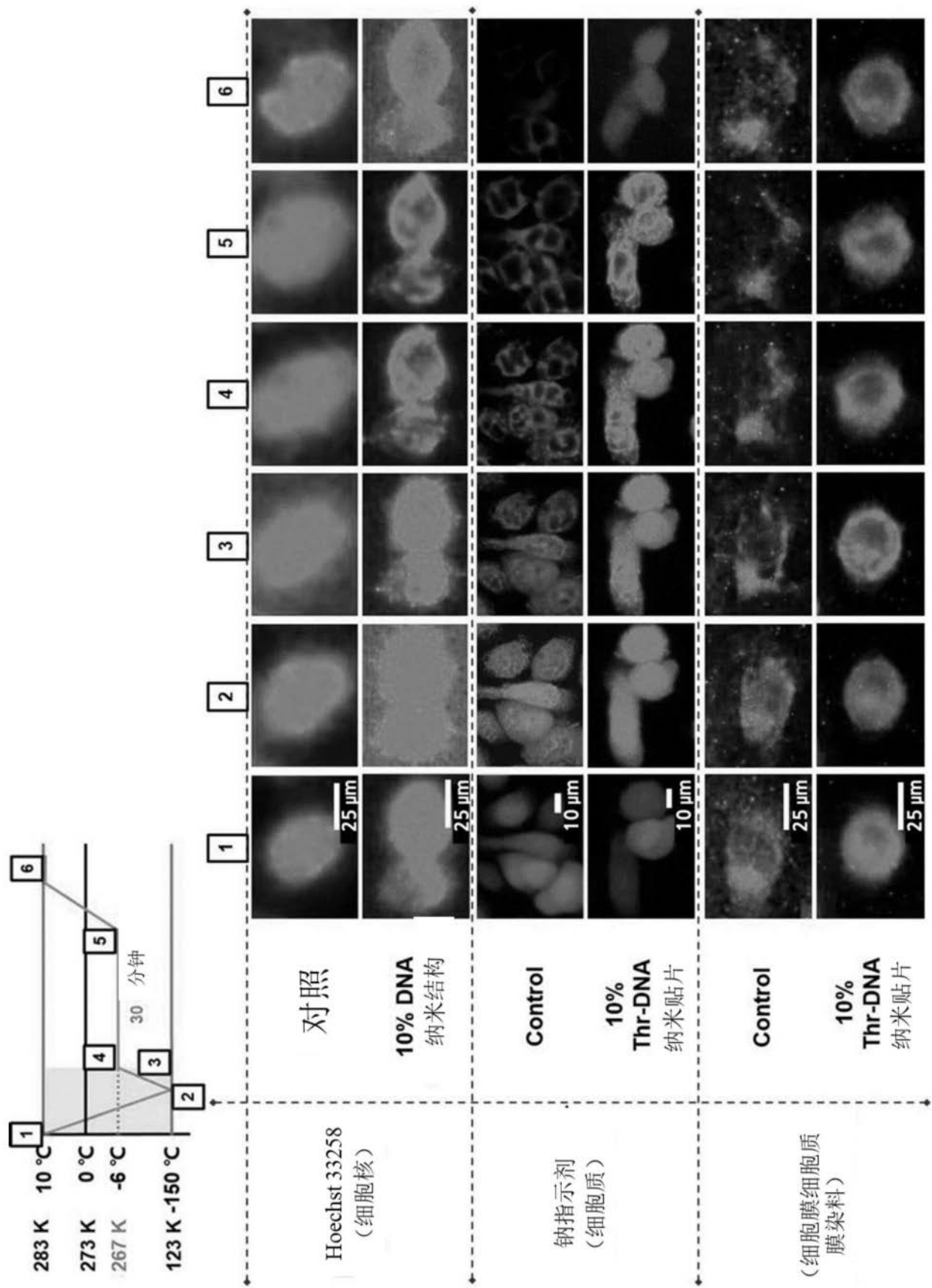


图31