

DNA 纳米结构仿中国地图

钱璐璐 汪颖 张钊 赵健 潘敦 张益 刘强*
樊春海* 胡钧* 贺林*

(上海交通大学Bio-X中心DNA计算机交叉团队, 上海 200030; 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800; 中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所, 上海 200031. * 联系人, E-mail: qliu@bio-x.cn, fchh@sinap.ac.cn, jhu@sjtu.edu.cn, helin@bio-x.cn)

摘要 用 DNA 在纳米尺度构造了中国地图形状. 所构造的纳米结构由 DNA 折叠而成, 直径约 150 nm, 分辨率约 6 nm. 通过原子力显微镜观测到的图形与设计图形几乎完全一致. 该图形的构造方法采用了 Rothemund 于 2006 年发明的 DNA 折纸术. 该研究证明了 DNA 折纸术具有构造几乎任何复杂二维纳米级图形的能力, 为基于自下而上方法的纳米构造技术提供了新方法.

关键词 DNA 折纸术 自组装 纳米 中国地图 原子力显微镜

相比于传统的自上而下的形状构造方法, 自下而上的自组装方法无疑是重要的新型结构(特别是纳米级结构)制造方法. DNA 的知识和技术积累以及 DNA 自身的编码能力使基于 DNA 的自组装构造方法成为最有潜力的自组装方法.

用DNA自组装来构造纳米级图形的研究一直层出不穷^[1-6]. 1989年, Seeman^[1]首次提出了一种十字形结构作为DNA自组装的基本单元. 之后, Yan等人^[2]将这种十字形结构进一步完善, 自组装成网格, 并用AFM观测到清晰的网格结构. 1998年, Winfree等人^[3]构造出DNA链缠绕成两排的自组装单元, 称为DX模块, 每个DX模块都有4个黏性末端, 可以自组装成二维阵列. DX模块通过设计可以自组装成三角形^[4]以及管状结构^[5]. 2000年, LaBean等人^[6]又构造出DNA链缠绕成三排的自组装单元, 称为TX模块, 每个TX模块都有6个黏性末端, 可以形成更为稳定的二维阵列. 这些DNA自组装的共同思路是由小的基本单元通过黏性末端的Watson-Click互补性拼接成大的图形, 基于这样的特点, 它们也形成了共同的局限性, 即很难构造出不规则图形等复杂图形.

2006年, Rothemund^[7]首次提出了一种全新的DNA自组装的思路, 即DNA折纸术, 它可以成功构造出各种相对比较复杂的纳米级形状和图案, 是DNA自组装领域的重大突破. Rothemund用DNA折纸术的方法构造出6种直径约为100 nm的形状, 包括方形、矩形、五角星、笑脸以及美洲地图等若干种图案. DNA折纸术事实上是将一条长的DNA单链用若干条短的DNA单链进行固定, 即通过可编程的长链与短链在特定位置的互补, 将DNA折叠成各种预期

的二维形状. 同时还可以对短的DNA单链进行修饰, 将其作为纳米尺度的像素, 在二维形状的表面组合出各种特定的图案.

本研究用DNA折纸术的方法, 将一根7000多个碱基的DNA单链和两百多根与之不同部位互补的短的DNA单链自组装成直径约150 nm的中国地图形状的DNA双链结构. 将长的DNA单链想像成一根绳子, 通过水平方向的反复折叠填满中国地图的形状; 而短的DNA单链就类似于很多钉子, 在适当的位置上对折叠好的中国地图进行固定. 该结构通过原子力显微镜成像, 观测到清晰的纳米级中国地图形状. 本研究运用DNA折纸术的方法, 构造出非对称的复杂的二维形状, 进一步证明了DNA折纸术具有构造几乎任何复杂二维纳米级形状的能力, 为基于自下而上方法的纳米构造技术提供了新方法.

1 材料和方法

1.1 设计 DNA 序列

用DNA折纸术的方法构造纳米级中国地图的设计思路是用一根长的DNA单链(称为脚手架链)折叠成中国地图的形状, 然后用若干根短的DNA单链(称为订书钉链)通过和脚手架链的互补来固定该形状.

其设计过程主要分为以下两个步骤:

() 根据中国地图的轮廓画出脚手架链的折线图.

将脚手架链当作一根长的直线, 通过水平方向的折叠来填满中国地图的形状. 中国地图的特点是存在彼此分开的东北部分和西北部分, 即我们通常所说的中国地图类似于公鸡形状的鸡头和鸡尾, 所

以不可能仅仅由自北向南的走向来完成折叠。如图 1 所示，将中国地图的主体部分以海南岛的中心为准垂直划分为东西两个区域，东北部分和西北部分也分别垂直划分为两个区域；折线以海南岛最南端的中点为起点，由南向北水平折叠，完成西侧的区域，到达西北部的最北端时转而由北向南折叠，以同样的方式完成东北部的折叠；进一步完成主体部分东侧的区域，最后回到海南岛最南端的中点。台湾岛和大陆不相连且不在中心线上，成为用 DNA 模拟中国地图形状的难点，对此，用脚手架链上的两段 DNA 进行牵引，这两个线段不计入水平方向的折叠。模拟的中国地图形状没有包含南海诸岛。

折线图上每个水平线段的长度与脚手架链上的碱基数目相对应。双链 DNA 的一个螺距约等于 10.67 个碱基，而每一段双链 DNA 的长度必须是半螺距的整数倍(如 $10.67 \times 0.5 \times 3$ (螺距数) ≈ 16 个碱基)，这样才能保证 DNA 链在折叠处的扭力最小。一个螺距的长度约等于 3.6 nm，宽度约等于 2 nm，水平排列的两段 DNA 双链之间的距离取决于和脚手架链互补的短的订书钉链之间的距离，将订书钉链的间距设定为 1.5 个螺距，则水平排列的 DNA 双链的间距约为 1 nm。所以，在画折线图时，水平线段之间的距离也要满足这个比例。同时还要考虑到选择长度为 7000 多个碱基的单链 M13mp18 DNA 作为脚手架链，折线图上对应的碱基总数不能超过但应尽可能接近这个数目。

因此，图 1 所示的折线图可以表示为如下的一组数据，每个数依次表示折线图上自起点到终点的每个水平线段的长度之间的比例，也表示脚手架链上从 5 端到 3 端的每一段水平排列的 DNA 的碱基数，而这组数据也就是下一步程序的输入(16 16 6 6 32 32

112 112 107 107 112 112 208 208 230 230 256 256 267 267 272 112 112 112 80 80 48 48 32 48 16 16 16 48 48 64 64 256 80 80 64 64 32 32 48 48 32 32 16 32 16 48 48 80 80 64 64 64 64 32 32 16 112 64 64 80 80 96 96 112 112 112 112 96 96 128 16 16 128 48 48 6 6 16 16)。这组数据是在手工测量中国地图的基础上得到的。在使它们尽可能满足测量所得线段长度之间比例的情况下，将数据调整为 16 的整数倍，或者除以 16 的余数是 6 或 11。这样可以使订书钉链的间距为 1.5 个螺距时，所有 DNA 链在折叠处的扭力最小。在 Rothemund 文章的附录 1 中有相关的讨论。

() 编程得到订书钉链的序列。

可以想像，当一根长的直线被折叠成如图 1 所示的中国地图的形状之后，就需要在水平的行间以及竖直的缝隙间进行固定。这是通过 DNA 的互补碱基间的作用力来实现的。根据 Watson-Crick 原则，DNA 链上的 A 与 T 互补，C 与 G 互补，因此可以通过已知的脚手架链的序列来编程设计订书钉链的序列。订书钉链可以分为 a~h 8 种类型(图 2(a))，a~d 4 种类型的订书钉链用来对水平的行间进行固定(图 2(b))，它们的重复组合可以完成各种水平行间的固定。其中缺少若干碱基的某类型的订书钉链仍然算作该类型。例如，在图形的上边缘会出现缺少 3 端 8 个碱基的 a 或 b 类订书钉链，在图形的左右边缘也会出现缺少更多碱基的情况。e~h 4 种类型的订书钉链用来对竖直的缝隙间进行固定(图 2(c))，它们的重复组合可以完成竖直缝隙间的固定。除了出现在图形边缘处的某些订书钉链之外，绝大部分订书钉链的长度为 32 个碱基。所有订书钉链的间距为 1.5 个螺距(16 个碱基)。

本研究根据以上的设计思路，用 PERL 编写了 DNA 折纸术序列设计程序。程序输入的脚手架链序

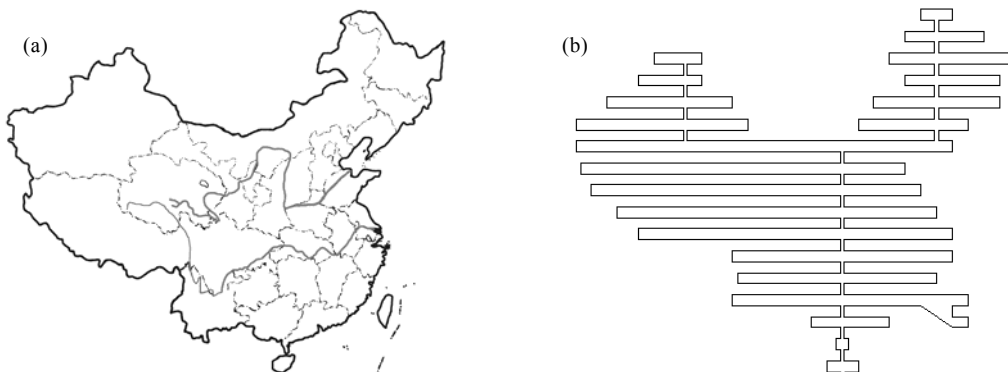


图 1 中国地图示意图(a)及根据中国地图的轮廓设计的脚手架链图(b)

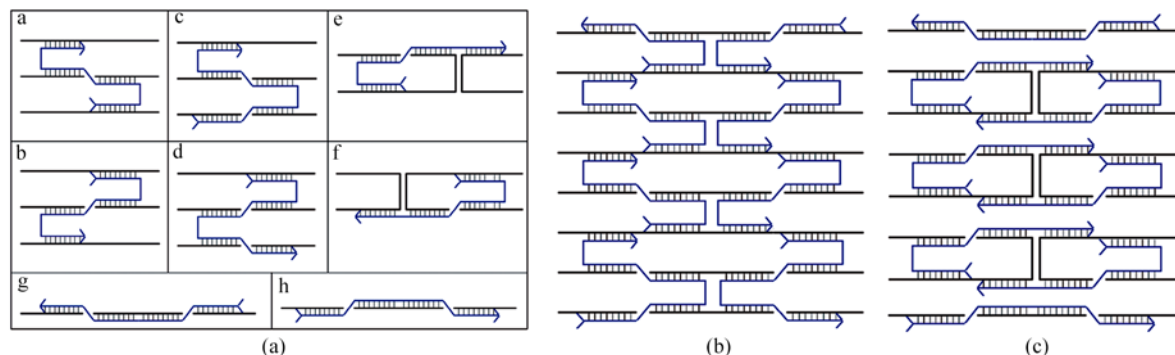


图 2 8 种订书钉链(a)以及订书钉链对水平间的固定(b)和订书钉链对竖直缝隙间的固定(c)
粗黑线表示脚手架链, 粗蓝线表示订书钉链(箭头所指方向为 5' 3'), 细黑线表示碱基之间的互补

列为环状病毒 M13mp18 的基因组 DNA 序列, 全长为 7249 个碱基. 找出其中的一个茎长 20 个碱基并包含了 *BsrB* 酶切位点的发夹结构, 模拟去除酶切掉的 73 个碱基, 留下长度为 7176 个碱基的 DNA 序列. 进而得到构成中国地图的 219 条订书钉链序列, 与剩余脚手架链互补的 8 条长度为 23 个碱基的 DNA 链序列, 以及与连接台湾的脚手架链互补的 2 条长度为 32 个碱基的 DNA 链序列. 程序输出的所有订书钉链序列如图 3 所示. 该图的 PDF 文件见网络版附录 1, 放大后可以看到脚手架链和订书钉链上的每个碱基以及用“>”和“<”表示出的订书钉链的走向.

1.2 实验步骤

() 用 *BsrB* 酶切单链 M13mp18 DNA(NEB 公司). 先加缓冲液 37 孵育 15 min, 然后加 *BsrB* 酶切 2 h. 酶切产物用酚氯仿抽提, 酒精沉淀.

() 将合成的 229 条短 DNA 链(Invitrogen 公司)与第一步得到的 M13mp18 DNA 混合. 每条订书钉链浓度为 160 nmol/L, M13mp18 DNA 浓度为 1.6 nmol/L,

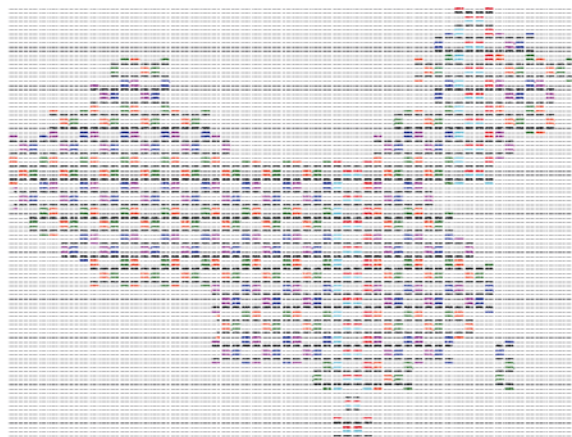


图 3 中国地图形状的序列设计

脚手架链序列为黑色, 相邻的订书钉链序列用不同的颜色区分

总体积为 100 μ L.

() 将混合后的溶液在 PCR 仪上从 94 退火至 4, 每秒钟降低 0.01.

() 将自组装好的样品用原子力显微镜成像.

1.3 原子力显微镜成像

一滴 5 μ L 自组装好的样品滴加于新解理的云母上, 将云母用双面胶粘在铁片上后置于原子力显微镜(Nanoscope IIIa Multimode AFM, Veeco 公司)样品台上. 将装有针尖(NP-S, Veeco 公司. 共振频率~9.4 kHz, 力常数~0.38 N/m)的液体槽置于样品上方, 向槽中注入 30 μ L 的 1 \times TAE/Mg²⁺缓冲液后即可开始成像. 为使成像清晰并避免样品受到针尖和样品间相互作用力的损伤, 应尽量减小施加在针尖上的力. 为减少成像过程中缓冲液中气泡带来的干扰, 可以在注入前先对缓冲液进行抽气处理.

2 结果

原子力显微镜成像结果显示所得到的中国地图最长处约 150 nm, 最宽处约 120 nm, 高度为 2 nm, 如图 4(a)所示, 符合原先的设计.

我们将符合原设计的结构(如图 4(b)中的 a 和 b)与所有可分辨的结构(如图 4(b)中的 c)之比定义为自组装的产率, 用它来粗略地衡量一个设计合成的成功与否. 在我们的设计中, 产率为 59%(样本数为 125 个). 影响产率的主要原因有自组装图形较严重的形变(如图 4(b)中 c)以及订书钉链在自组装图形上的堆积(如图 4(b)中的 d 的亮点). 同时, 有一些图形出现了聚集的情况(如图 4(b)中的 b 和 d), 另外一些图形并没有和其他图形相连(如图 4(b)中的 a 和 c). 总的来说, 图形之间由 DNA 双链平末端的相互作用引起的聚集现象并不严重. 由于我们所设计的图形是非对

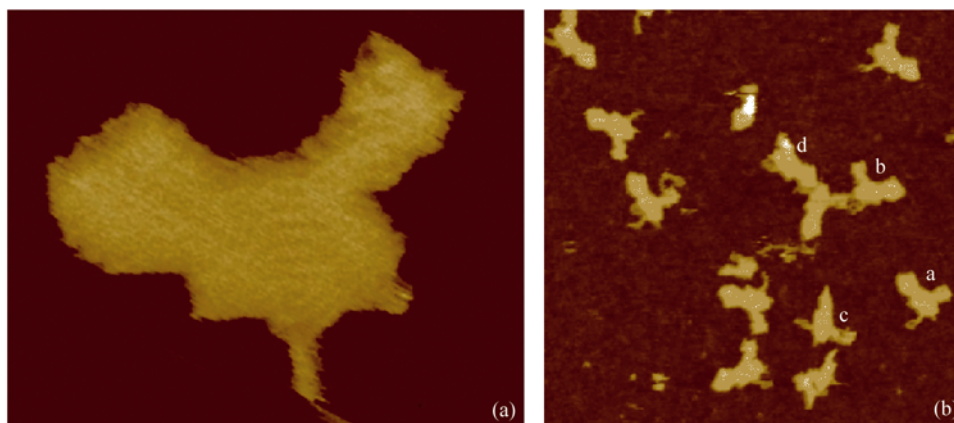


图 4 原子力显微镜成像图

(a) 一个符合原先设计的图形; (b) 一群可分辨的形成图形. a 和 b, 符合原先设计的自组装图形; c, 严重变形的自组装图; d, 订书钉链堆积的自组装图形

称的, 还产生了对称图形无法发现的问题. 我们观察到在成功自组装的图形中仅有 9% 是以与设计相同的方向吸附在基底上, 而其余的 91% 是反向吸附的. 这可能意味着在缓冲液中自组装的图形并不是一个二维平面.

单链 M13mp18 DNA 的长度为 7000 多个碱基, 因此所构造的中国地图的大小和精度也受到限制. 在目前的精度下, 图形的边缘和真实的中国地图还存在一定的差距, 台湾和海南岛也尚与原貌不完全一致. 如果选取更长的脚手架链, 则可以改善这个问题.

3 讨论

本研究所构造的中国地图是一个特殊的纳米级图形, 而我们的目标是构造更多具有实用价值的纳米结构, 因此还需要考虑以下几个问题: () 脚手架链的选取. 脚手架链的长度限制了自组装的图形的规模, 故应当在设计的时候先考虑所需要的纳米级图形的大小和精细程度再决定所要选取的脚手架链的长度. 合成 DNA 单链的造价非常昂贵, 因此为了构造更复杂的纳米结构, 我们需要寻找除了 M13mp18 以外更长的天然存在的 DNA 单链. () 纳米级图形从 DNA 到其他材质的转换. 如果由 DNA 构成的纳米级图形可以转换成其他材质, 将会产生更为广泛的应用, 比如微电子领域. 因此, DNA 金属化等技术成为推进这一应用的关键. () 三维纳米结

构的构造. 一个三维图形可以分解为若干个二维的切面图, 如果可以通过某些类型的订书钉链来实现二维图形之间的固定, 则可以完成这个设想.

致谢 本工作为上海市科学技术委员会交叉领域创新团队资助项目(批准号: 03DZ14025).

参 考 文 献

- 1 Seeman N C. Nanoscale assembly and manipulation of branched DNA: A biological starting point for nanotechnology. In: Lewis J, Quél J L, eds. *NANOCON Proceedings*. NANOCON, P.O. Box 40176, Bellevue, WA 98004, 1989. 101—107
- 2 Yan H, Reif J H, LaBean T H. DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires. *Science*, 2003, 301: 1882—1884[DOI]
- 3 Winfree E, Liu F, Seeman N C, et al. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature*, 1998, 394: 539—544[DOI]
- 4 Rothemund P W, Papadakis N, Winfree E. Algorithmic self-assembly of DNA Sierpinski triangles. *PLoS Biol*, 2004, 2: 2041—2053
- 5 Rothemund P W, Ekani-Nkodo A, Winfree E, et al. Design and characterization of programmable DNA nanotubes. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 16344—16352[DOI]
- 6 LaBean T H, Reif J H, Seeman N C, et al. Construction, analysis, ligation, and self-assembly of DNA triple crossover complexes. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 1848—1860[DOI]
- 7 Rothemund P W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 2006, 440: 297—302[DOI]

(2006-09-30 收稿, 2006-11-19 接受)