

二维 DNA 晶体的多重熔解过程研究

宋 琤 陈亚清 刘小鹏 魏 帅 王 晶 肖守军* 游效曾

(南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 可人工编程设计的刚性 DNA 分子瓦(DNA tile)中的 DX 分子(double-crossover, 双交叉)能自组装形成二维 DNA 晶体。将含有二维 DNA 晶体的缓冲溶液程序升温, 用紫外-可见分光光度计在 260 nm 处测定二维 DNA 晶体的熔解曲线, 观测到了 DNA 晶体的多重熔解过程。AFM 显微镜的研究也观测到了二维 DNA 晶体受热带解后的图像, 表明二维 DNA 晶体的熔解过程首先发生在 DX 分子瓦间的黏性末端, 然后是 DX 分子瓦的解体, 由此推测, 在 DNA 晶体生长过程中单链 DNA 相互结合成分子瓦后, 分子瓦进一步自组装成晶体。

关键词: 二维 DNA 晶体; DNA 分子瓦; 紫外升温扫描; AFM

中图分类号: O611.2; Q523

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2005)01-0021-04

The Melting behavior of 2D-DNA Lattices

SONG Cheng CHEN Ya-Qing LIU Xiao-Peng WEI Shuai

WANG Jing XIAO Shou-Jun* YOU Xiao-Zeng

(State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract: The synthetic sequences are designed to self-assemble into four double-crossover (DX) DNA tiles. The 'sticky ends' of these tiles that associate according to Watson-Crick's base pairing are programmed to build up specific periodic patterns upto tens of microns. UV thermal scans were carried out with increasing the temperature of the 2D-DNA buffer solution. Melting curves were collected at 260 nm. According to the melting process and AFM imaging, we infer that the DNA lattices were first split into 4 DNA DX tiles, then into single oligonucleotides. It is proposed from the melting process that the 22 oligonucleotides self-assemble into four DNA tiles, then into the 2D-DNA crystal.

Key words: 2D-DNA crystal; DNA tiles; DNA melting curves; AFM

DNA 分子是自然界中最精确和最能程序化自组装的稳定体系之一。人工设计的 DNA 晶体自组装技术由 Seeman 小组发展起来^[1], 通过编程设计和组装合成的 DNA 短链, 可以得到多种二维 DNA 晶体。我们将组成 DNA 晶体的 22 条 DNA 单链中的一条 DNA 链的 5' 端磷酸化, 得到了具有固定几何构型的二维磷酸化 DNA 晶体^[2](图 1)。理论上能用 DNA 分子瓦构建多种二维和三维的 DNA 纳米结构^[3-8], 通过碱基序列的精确配对, DNA 分子瓦能够识别并

且与其他的 DNA 分子瓦一起构成 DNA 晶体, 刚性 DNA 分子瓦的设计与构造成为研究人工 DNA 晶体的关键。程序化自组装 DNA 晶体不仅在 DNA 运算上有重大意义, 在医药、生物和材料化学中都有巨大的潜在价值。DNA 分子如何自组装成复杂的纳米结构, 如何利用和修饰这个结构, 都需要有对 DNA 晶体在纳米尺度的分析, 其中研究 DNA 晶体生长的机理显得尤为重要。本论文通过研究二维 DNA 晶体的多重熔解过程中紫外 260 nm 处 DNA 的特征吸

收稿日期: 2004-09-01。收修改稿日期: 2004-10-12。

国家重点基础研究发展规划(No.G200077500)、教育部留学回国人员科研启动基金和南京大学 985 计划基金资助。

*通讯联系人。E-mail: sjxiao@netra.nju.edu.cn

第一作者: 宋 琤, 女, 29 岁, 博士研究生; 研究方向: DNA 纳米技术的研究。

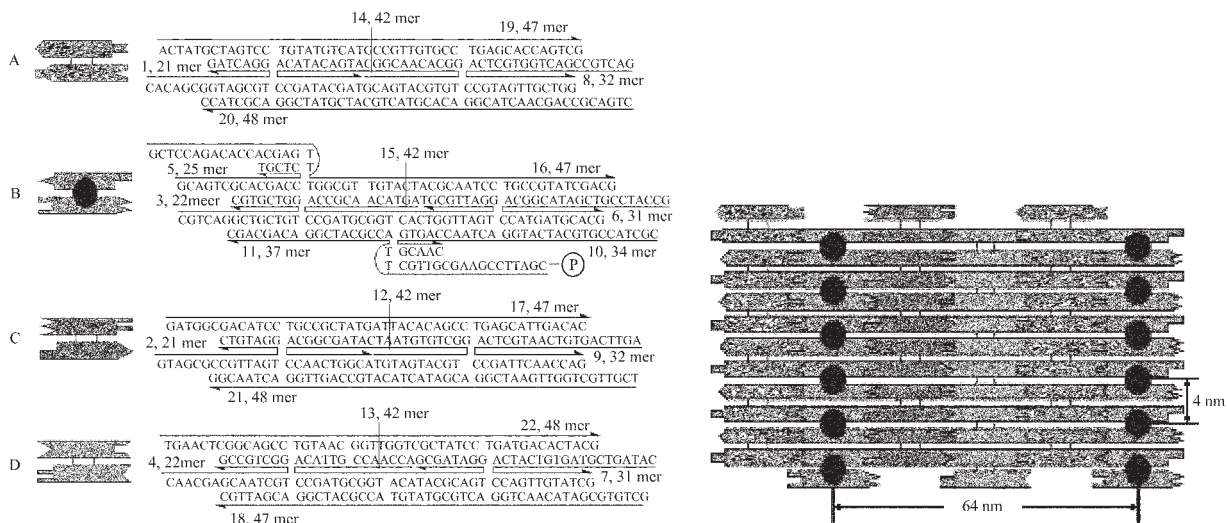


图 1 由 22 条 DNA 链组成的四个分子瓦(A,B,C,D)及其排列形成的二维 DNA 晶体的示意图

Fig.1 Sequences of the four DX molecules (A, B, C and D) and the tiling pattern to assemble the 2D DNA crystal used in this work

The sequences of the 22 DNA strands are shown with corresponding symbolic representations in left. The 3'-end of each strand is indicated by an arrowhead. Each molecule B contains two protruding structures that extend out of the crystal plane, one above and one below. The dark dots in the figure represent the protruding structures. In the final DNA assembly shown in right, the spacing between these features is 64 nm in the horizontal direction and 4 nm in the vertical direction.

收峰强度的变化,提出了二维 DNA 晶体的生长机理。

1 实验部分

1.1 实验原料

22 条 DNA 寡核苷酸序列(见图 1),上海申能博彩生物科技有限公司;Tris, 分析纯, Sigma 公司; EDTA, 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司;乙酸双氧铀, 分析纯, 中国兰州四零四厂。所有的溶液均用 Millipore 超纯水配置。

1.2 主要仪器

Hitachi X-650 透射电子显微镜, Nanoscope AFM (Veeco/Digital Instruments, Santa Barbara, CA) 原子力扫描显微镜, Hitachi U-3200 紫外-可见分光光度计, Hitachi SPR-10 程序控温仪和温度探针。

1.3 实验方法

按文献^[1]报道的方法将购买的 DNA 单链纯化、脱盐、浓缩到 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将纯化后的 22 条 DNA 寡核苷酸单链按文献^[4,9]报道的方法, 在 $\text{pH}=7.40$ (± 0.02) 缓冲液从中 95°C 缓慢降至室温 (48 h)。用透射电子显微镜 (TEM) 和原子力显微镜 (AFM) 扫描生成的 DNA 晶体。

将含有 DNA 晶体的缓冲溶液置于紫外-可见分

光光度计内扫描, 260 nm 左右有 DNA 的特征吸收峰。样品按 $0.1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度升温, 直至 80°C , 其中温度误差小于 0.1°C 。每升高 1°C 扫描 1 次。为防止受热后缓冲溶液中的水分挥发改变浓度, 在缓冲溶液的液面上加入少量液体石蜡。

2 结果与讨论

紫外 260 nm 附近是 DNA 链的特征吸收区, 紫外吸收峰的强度说明了 DNA 链的浓度。TEM 和 AFM 证实生成了 2D-DNA 晶体(图 2)。形成 2D-DNA 晶体后, 绝大部分的寡核苷酸单链自组装在一起, 形成不溶的 2D-DNA 晶体悬浮物, 因此在室温下只有少量游离的 DNA 链, 造成含有 DNA 晶体的缓冲溶液很低强度的紫外吸收(图 3a)。DNA 晶体受热后会逐渐解体, 直至全部变成单链 DNA, 我们把此过程称为 2D-DNA 晶体的熔解过程。体现在紫外吸收中 DNA 的特征峰逐渐增强, 直至 68°C 左右达到平衡, 二维 DNA 晶体结构被完全破坏(图 4)。从图 3a、b 可见, 此缓冲溶液升温过程中 2D-DNA 晶体的熔解是一个复杂的多重变化过程。从室温 20°C 到 58°C 的过程中, A 值增加速度缓慢, 说明在这个升温过程中 2D-DNA 晶体受热熔解出的 DNA 链比较少。图 4 是 65°C 时此缓冲溶液的 AFM 照片, 此时 DNA 晶体已

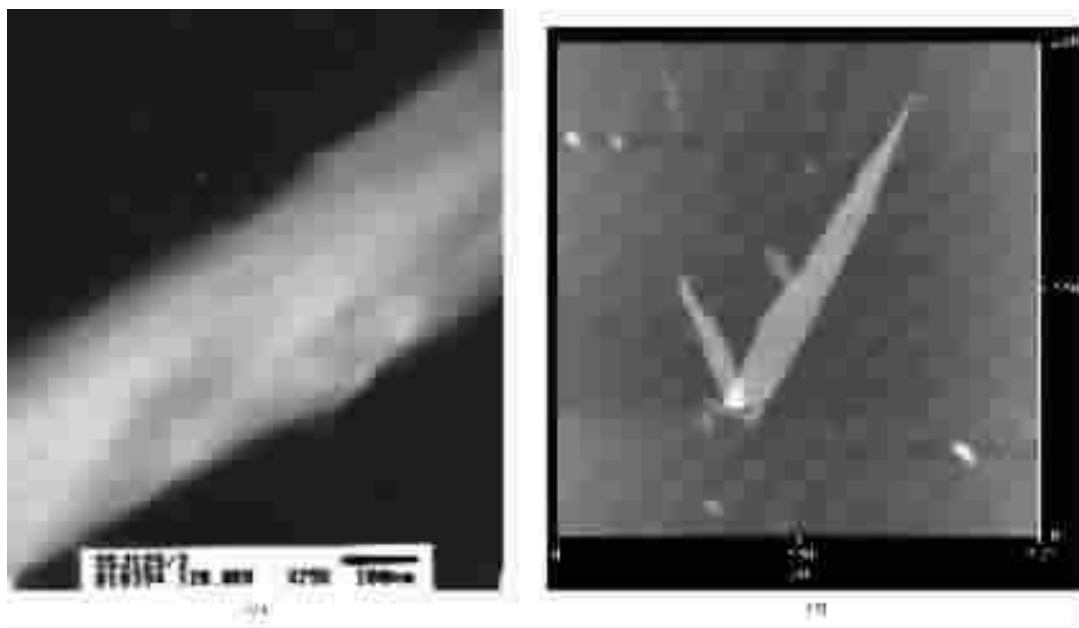


图 2 2D-DNA 晶体的 TEM(a)和 AFM(b)照片

Fig.2 TEM (a) and AFM (b) images of 2D-DNA crystals

The alternate dark-gray and light-gray bands in the TEM image are the result of uranyl acetate staining, while in AFM image dark stripes are lower than bright stripes. The dark lines are parallel to B tile, which is each containing two protruding structures (11 and 16) that extend out of the crystal plane, one above and one below the plane. The major spacing (dark-to-dark) between gray bands is 64 nm.

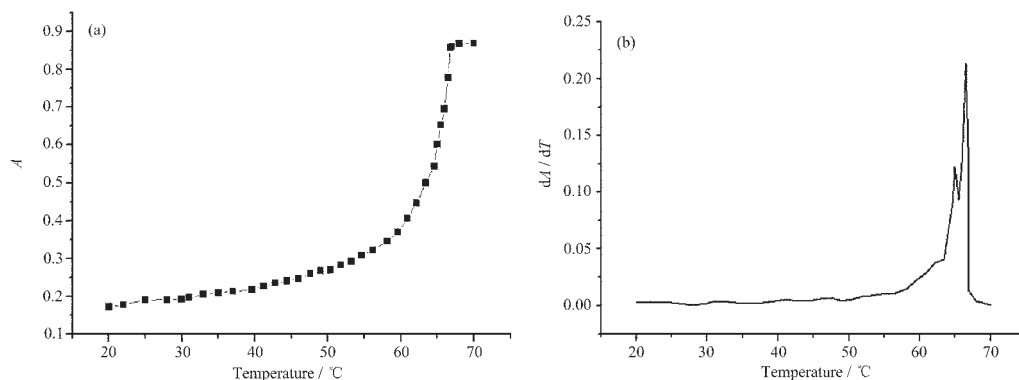


图 3 2D-DNA 晶体的受热变性研究曲线

Fig.3 Thermal denaturation of 2D-DNA crystals

(a) The change of the absorbance intensity at 260 nm as a function of temperature.

(b) The differential melting behavior of the 2D-DNA crystals.

经解体变成很多缠绕在一起的 DNA 碎片结构。从图 3b 中可见,59 °C 开始 A 值增加速度加快,在 65 °C 时 dA/dT 是一个尖峰,66 °C 时 dA/dT 的峰高最大说明在这个温度下 A 值增加速度最快,高于这个温度 AFM 观察不到类似于图 4 中的结构,我们认为这是由于 DNA 晶体完全解体成单链 DNA,而只有 21 到 48 个碱基的单链 DNA 在 AFM 下很难观察到。随着温度继续升高, A 值很快达到平衡,不再有明显改变。

晶体受热后先解体成构成 DNA 晶体的结构单元 DNA 分子瓦,因为分子瓦之间是依靠含有 6 个相互配对的碱基(黏性末端)相互结合(图 1),它们间的作用力远没有通过若干碱基配对互相结合在一起的 DNA 分子瓦强。图 4 中的结构是晶体熔解后缠绕在一起的 DNA 碎片。随着温度的增加,单链 DNA 间相互配对的碱基之间的作用力被完全破坏,DNA 分子瓦也随之解体成 DNA 链。图 3b 中 dA/dT 最大时的

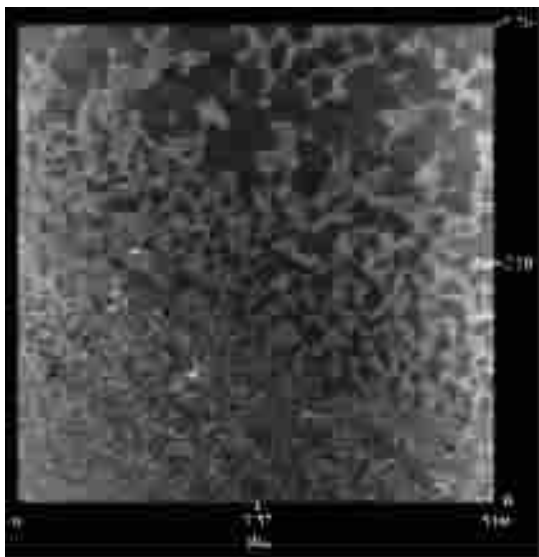


图 4 2D-DNA 晶体加热至 65 °C 时的 AFM 图像

Fig.4 AFM image of 2D-DNA aggregates after heating to 65 °C

温度是 DNA 晶体的熔解温度, $T_{\text{melt}}^{[10]}$, 表示 DNA 晶体受热完全解体时的温度, 每种 DNA 晶体由于结构不同, 它们的 T_{melt} 也不同。在此条件下, 这种结构的 2D-DNA 晶体的 $T_{\text{melt}}=66\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2D-DNA 晶体在缓冲溶液中降温生长和升温熔解过程互为逆过程。我们推论, 在晶体生长的降温过程中, 高温时游离的 DNA 链首先通过碱基相互配对自组装成 4 个带有黏性末端的 DNA 分子瓦, 随着温

度下降 DNA 分子瓦通过黏性末端和带有与之相匹配的黏性末端的 DNA 分子瓦相互结合, 自组装成 2D-DNA 晶体。

参考文献:

- [1] Winfree E, Liu F, Wenzler L A, et al. *Nature*, **1998**, **394**:539~544
- [2] SONG Cheng (宋 琤), CHEN Ya-Qing(陈亚清), WEI Shuai (魏 帅), et al. *Kexue Tongbao(Chinese Science Bulletin)*, **2004**, **49**(7):639~641
- [3] Qiu H, Dewan John C, Seeman N C. *J. Mol. Biol.*, **1997**, **267**:881~898
- [4] Mao C, Sun W, Shen Z, et al. *Nature*, **1999**, **397**:144~146
- [5] Liu F, Sha R, Seeman N C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, **121**:917~922
- [6] Mao C, LaBean T, Reif J H, et al. *Nature*, **2000**, **407**:493~496
- [7] Sha R, Liu F, Millar D P, et al. *Chemistry & Biology*, **2000**, **7**(9):743~751
- [8] Liu D, Wang M S, Deng Z X, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, **126**:2324~2325
- [9] LaBean T, Yan H, Kopatsch J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, **122**:1848~1860
- [10] Marky L A, kallenbach N R, Mcdonough K A, et al. *Biopolymers*, **1987**, **26**:1621~1634