

# pH/退火方式控制 DNA 纳米笼的选择性组装

叶超\*, 曹行行, 张荣荣

(合肥工业大学化学与化工学院, 安徽 合肥 230009)

**摘要:**通过调控溶液的 pH、选择不同速率热退火方式,以四点星 DNA 分子瓦为建筑模块,根据沃森-克里克碱基互补配对原则和 Hoogsteen 氢键配对连接,选择性地组装成不同的 DNA 多面体结构。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳表征结果表明,在酸性条件(pH 5.5)及退火时间 5.0 h 下,分子瓦自组装成 DNA 变形四面体(tTET)结构;在中性条件(pH 8.0)及退火时间 24.0 h 下,自组装形成 DNA 八面体(OCT)结构。在中性条件(pH 8.0)下,只改变分子瓦黏性末端碱基的数目,直至形成不同数目的碱基对来产生不同强度的作用力,也能类似地组装成不同的 DNA 多面体结构。该结果也由非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行了表征。

**关键词:**DNA; 选择性组装; pH; 退火方式; Hoogsteen 氢键

**中图分类号:**Q523; Q71; O641

**文献标志码:**A

**文章编号:**0253-4320(2020)04-0179-05

**DOI:**10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2020.04.038

## Selective assembly of DNA nanocages controlled by pH/annealing

YE Chao\*, CAO Hang-hang, ZHANG Rong-rong

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** By regulating pH value of the solution and selecting different speeds of thermal annealing methods, four-point-star DNA molecular tiles are selectively assembled into different DNA polyhedral structures according to Watson-Crick base complementary pairing principle and Hoogsteen hydrogen bond pairing connection. Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) shows that the tiles can be self-assembled into a DNA transmutative tetrahedron (tTET) under acidic condition (pH=5.5) for 5.0 h of annealing. DNA octahedra (OCT) can be formed under neutral condition (pH=8.0) for 24.0 h of annealing. Going further and changing only the number of sticky end bases of tiles under neutral condition (pH=8.0), they can form different numbers of base pairs with different strengths, which can be similarly assembled into different DNA polyhedral structures. This result is also characterized by non-denaturing PAGE.

**Key words:** DNA; selective assembly; pH value; annealing mode; Hoogsteen hydrogen bond

由于明确定义的双螺旋结构和高度特异性的碱基互补配对原则使 DNA 成为各种纳米结构和器件的建筑材料<sup>[1-4]</sup>。除了形成双链 DNA 结构外,碱基引导核酸也可自组装成其他的纳米结构如 i-基序结构<sup>[5]</sup>、G-四联体结构<sup>[6]</sup>、三链 DNA 结构<sup>[7]</sup>。这些 DNA 纳米结构在适当的外部环境(如 pH<sup>[8]</sup>、光<sup>[9]</sup>、热<sup>[10]</sup>等)下将功能核酸整合到自组装 DNA 结构中至关重要,其中 pH 触发是应用最广泛的策略之一。在大多数报道中,已经存在 pH 响应的 DNA 结构可逆自组装<sup>[11-12]</sup>,但他们均受到 2 个单一 DNA 结构可逆转化的限制。如果有一种方法可以控制分子瓦的不可逆性,使其根据 pH 分别组装成不同的结构,将大大扩展 DNA 纳米结构的应用和多样性。然而,

这种策略尚未见报道。

三链 DNA 纳米结构可以由 pH 或碱基对相互作用触发<sup>[13]</sup>。在酸性溶液中,胞嘧啶(C)被半质子化为 C<sup>+</sup>,通过 Hoogsteen 氢键与 G-C 碱基对相互作用,形成 C<sup>+</sup>G-C 三链体,在中性条件下分离为双链结构<sup>[14]</sup>。因此,由于三链区的强相互作用,整个 DNA 结构趋于热力学较不稳定的更小结构。反之,只有双链结构的弱相互作用会形成热力学更稳定的更大结构。此外,双链 DNA 还可以通过增加黏性末端碱基的数量来增强作用力以形成更小结构,这与上述 pH 的作用是一致的。

在此,提出了一种 pH/退火方式控制的策略,其核心是对 pH 敏感的 DNA 三链体通过将三链体引

收稿日期:2019-06-06;修回日期:2020-02-04

基金项目:中央高校基本科研业务费(JZ2016HGPA0734)

作者简介:叶超(1994-),男,硕士研究生,研究方向为生物化工,通讯联系人,15755191440@163.com。

入粘性末端尾链区域,控制不同强度的相互作用,在 2 个不同的 pH(5.5、8.0)下,选用合适的热退火速率,不可逆地组装成不同的 DNA 多面体结构。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

北京六一 DYY-6C 电泳仪电源;DYCZ-24DN 垂直电泳仪;岛津 UV-2450 紫外-可见分光光度计;科宁特 KNRT-Z-10 超纯水机;HC-2517 高速离心机;D1008 低速掌上离心机;FA2004 电子分析天平;QL-901 旋涡混合器;PHS-3C pH 计。

### 1.2 试剂

丙烯酰胺(acrylamide)、*N,N*-亚甲基二丙烯酰胺(bis-acrylamide)、醋酸镁 $[(CH_3COO)_2Mg \cdot 4H_2O]$ 、醋酸、EDTA $\cdot Na_2 \cdot 2H_2O$ 、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、硼酸(Boric acid)、尿素(Urea)、过硫酸铵(APS)、*N,N,N',N'*-四甲基乙二胺(TEMED)、染料(Stains-All)、1 kb DNA ladder(用于 DNA 条带分析)。

## 2 实验步骤

### 2.1 四点星 DNA 分子瓦的设计

四点星 DNA 分子瓦如图 1 所示,包含 9 条不同的 DNA 链,其中 1 条 DNA 长链(L)、4 条不同的中链( $M_A$ 、 $M_B$ 、 $M_C$ 、 $M_D$ )和 4 条不同的短链( $S_A$ 、 $S_B$ 、 $S_C$ 、 $S_D$ )。在分子瓦每个分支的末端都有 2 个黏性末端,每个分支由 2 个反向平行的伪连续 DNA 双链组成,他们通过链交叉连接在一起。特别地,在 A/B 端的末尾,各有 1 个额外的尾链向外延伸。根据碱基互补配对原则和设计,A 和 B 端的黏性末端互补,

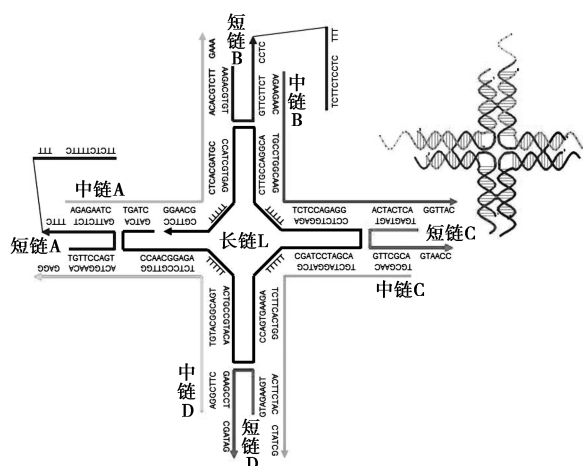


图 1 四点星 DNA 分子瓦示意图及 DNA 序列

C/D 端的黏性末端均是自我互补。在酸性溶液(pH 5.5)中,由于三链形成,刚性 DNA 双链弯折后,在更强的相互作用下,会形成较不稳定的 tTET 结构;在中性溶液(pH 8.0)中,当相互作用较弱时,会形成最小的稳定 OCT 结构。

### 2.2 pH 5.5 下 tTET 的制备

将 9 条 DNA 单链按合适的分子比加入到  $1 \times$  AE/ $Mg^{2+}$  溶液(20 mmol/L 醋酸、2 mmol/L EDTA、12.5 mmol/L 醋酸镁、18 mmol/L Tris)中,调整 pH 为 5.5,整个 DNA 模块的浓度为 40 nmol/L,将样品置于 2 L 烧杯中,从 95℃ 水浴速退火至室温,整个退火过程总计约 5 h。

### 2.3 pH 8.0 下 OCT 的制备

将 9 条 DNA 单链按合适的分子比加入到  $1 \times$  TAE/ $Mg^{2+}$  溶液(20 mmol/L 醋酸、2 mmol/L EDTA、12.5 mmol/L 醋酸镁、40 mmol/L Tris)中,调整 pH 为 8.0,整个 DNA 模块的浓度为 40 nmol/L,将样品置于 2 L 烧杯中水浴慢速退火,烧杯置于聚乙烯泡沫盒中,从 95℃ 缓慢退火至室温,整个退火过程总计约 24 h。

### 2.4 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳表征

将含 3% 聚丙烯酰胺(摩尔比为 19:1 的丙烯酰胺/二丙烯酰胺)的凝胶置于电泳装置中,于室温常压 100 V 下运行。电泳的缓冲液、凝胶中的缓冲液和模块中的缓冲液相同。TAE/ $Mg^{2+}$  缓冲液和 AE/ $Mg^{2+}$  缓冲液分别作为 pH 8.0 和 5.5 的缓冲液。电泳后用 Stains-All 染料染色,然后用数码相机成像。

## 3 结果与讨论

### 3.1 溶液不同的 pH 及浓度成分表

溶液不同的 pH 及浓度成分表如表 1 所示。

表 1 不同的 pH 及具体浓度成分

pH	c(Tris)/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	c(醋酸)/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	c(EDTA)/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	c(醋酸镁)/ (mmol·L <sup>-1</sup> )
5.5	18.0	20	2	12.5
6.0	20.8	20	2	12.5
6.5	22.0	20	2	12.5
7.0	23.6	20	2	12.5
7.5	26.0	20	2	12.5
8.0	40.0	20	2	12.5

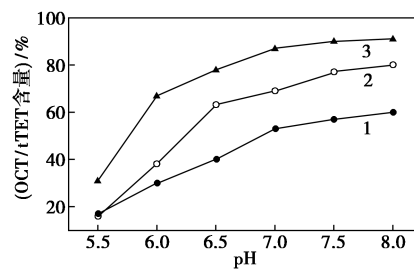
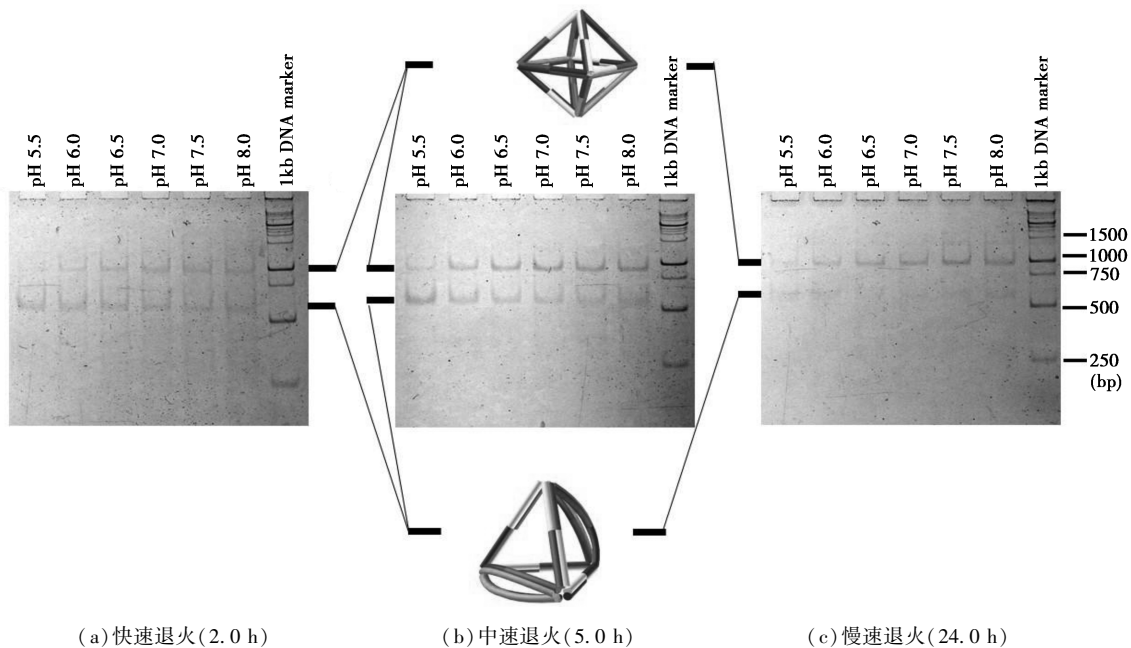
从表 1 可以看出,只改动 Tris 的浓度,不改动其他物质浓度来控制溶液的不同 pH。

### 3.2 四点星 DNA 分子瓦的组装及非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳表征

#### 3.2.1 不同 pH(5.5~8.0) 不同退火方式对 DNA 分子瓦组装的影响

不同 pH(5.5~8.0) 下快速退火(2.0 h)、中速退火(5.0 h)和慢速退火(24.0 h)组装的多面体的 PAGE 胶图如图 2(a)~图 2(c)所示。由图 2(a)~图 2(c)可以看出,各个 pH 组装的样品均在 pH 5.5 缓冲液中跑胶。利用图象处理软件—ImageJ 分析

组装产物,结果如图 2(d)所示。从图 2(d)中可以看出,对于各种退火方法,随着 pH 的增加,OCT/tTET 的比例也在增加。可以明显观察到退火对多面体结构生长的影响:快速退火时,多面体结构生长主要受动力学控制,容易形成最简单的不稳定的 tTET 结构;而在慢火退火过程中,多面体结构的生长主要受热力学控制,因此往往形成最稳定的 OCT 结构;中速退火是介于两者之间,但分布梯度最明显。



1—快速退火;2—中速退火;3—慢速退火  
(d)OCT 与 tTET 的相对含量图

图 2 不同 pH 不同退火方式下的多面体组装的 PAGE 胶图及 OCT 与 tTET 的相对含量图

#### 3.2.2 最佳条件下 2 种不同结构的组装

由图 2(d)可以明显看出,当 pH 为 5.5、中速退火(5.0 h)时,tTET 的纯度最高;当 pH 为 8.0、慢速退火(24.0 h)时,OCT 的纯度最高。因此,选用这 2 种条件进行相应的组装,组装结果如图 3 所示。图 3(a)与图 3(b)的 DNA 样品组成完全相同,仅在不同 pH 缓冲液下跑胶,DNA 样品已经标注于图片上,且条带的成分也在标注在胶图的边上。在这里,还

准备了由毛诚德课题组<sup>[15]</sup>报道的 Mao 八面体作为对照。在酸性环境(pH 5.5)下,三链形成,主要组装产物为由 4 个四点星分子瓦形成的 tTET 结构;在中性环境(pH 8.0)下,三链无法形成,主要组装产物为由 6 个四点星分子瓦形成的 OCT 结构。

#### 3.2.3 不同黏性末端长度的分子瓦对组装产物的影响

除了上述 pH 和退火方法影响多面体结构的组

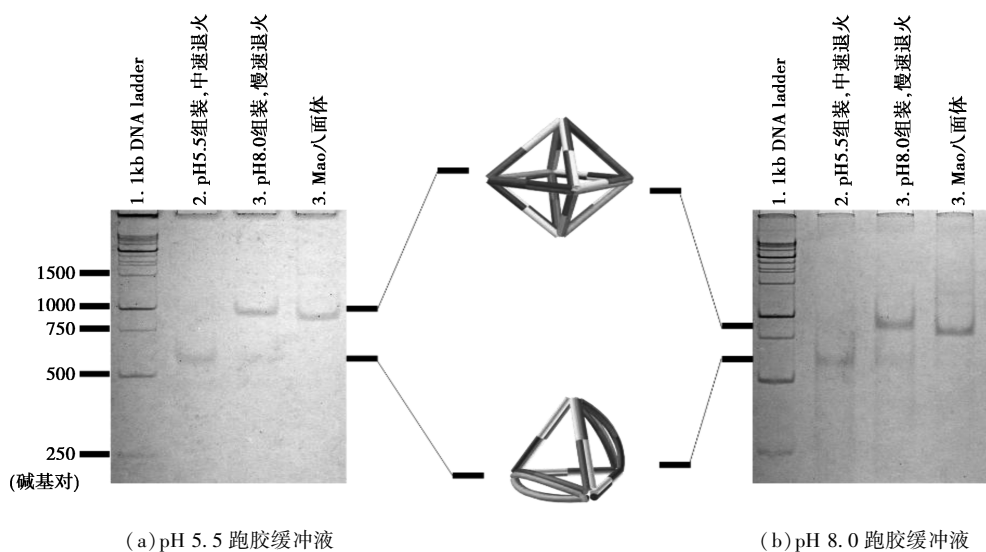


图 3 DNA 八面体与包含三链结构的变形四面体组装胶图

装,直接增加分子瓦黏性末端碱基的数量即生成更多沃森-克里克碱基对来探究其对多面体结构的生长影响。正如上面提到的,在不同 pH 和退火方法

下组装不同的多面体结构,其分子瓦在 A/B 端各有额外的尾链和黏性末端分别有 4/4 个碱基。而新的 3 种分子瓦均没有额外尾链,如图 4 所示。

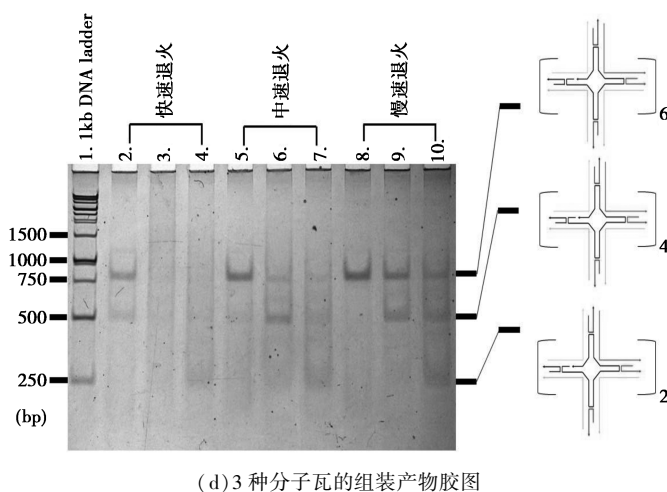
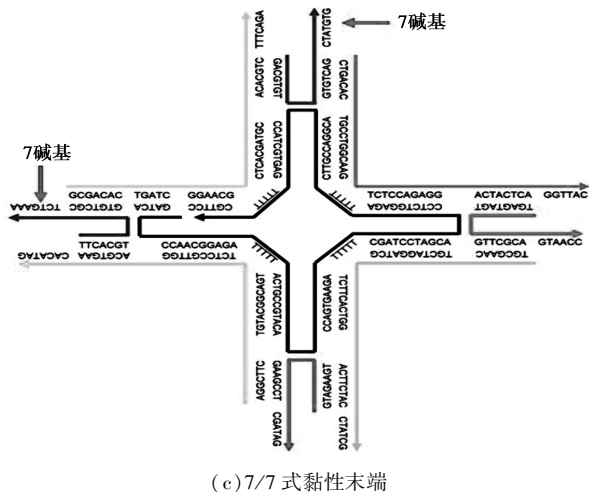
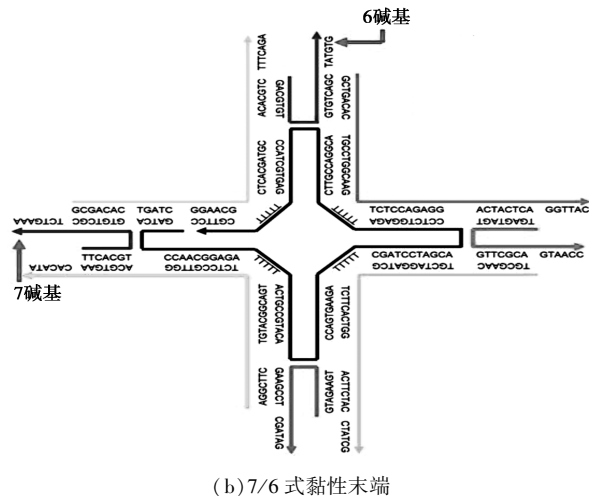
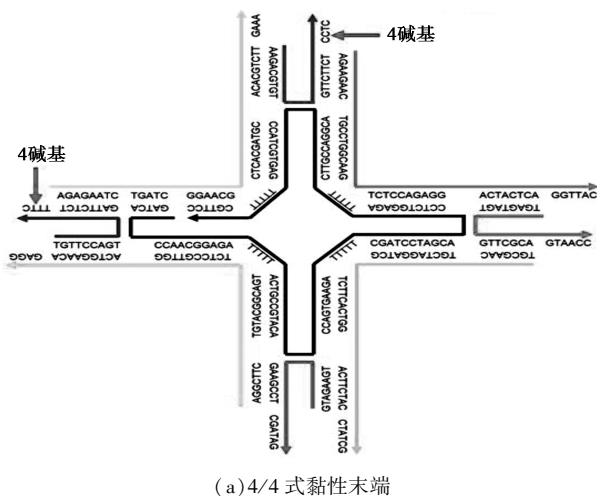


图 4 3 种不同的黏性末端长度的四点星分子瓦示意图及组装产物胶图

从图4(a)~图4(c)中可以看出,3种分子瓦分别在A/B端的黏性末端各有4/4、7/6、7/7个碱基,其组装产物分别对应图4(d)中泳道2、5、8;泳道3、6、9和泳道4、7、10。DNA样品已经标注于图片上,且条带的成分也标注在胶图的边上,所有样品均在TAE/Mg<sup>2+</sup>缓冲液中制备。从泳道3、6、9中可以清楚的发现,当增加A/B端的黏性末端至7/6个碱基时,即使pH为8.0,除了八面体结构,也可以发现较大产率的四聚体结构;进一步加大碱基,从泳道4、7、10可以发现,当增加A/B端的黏性末端至7/7个碱基时,除了八面体结构、四聚体结构外,甚至出现了二聚体结构,且结果在慢速退火条件下最为明显。这些结果从本质上说明了该方法与pH的作用效果相同,即都是由于环境变化引起的不同分子间作用力来形成不同的多面体结构。

#### 4 结论

提出了一种全新的策略方法,用同一分子瓦根据不同的pH/退火方式不可逆地组装成不同的结构。在酸性条件(pH 5.5)及中速退火5.0 h下,DNA分子瓦由动力学控制自组装成tTET结构;在中性条件(pH 8.0)及慢速退火24.0 h下,由热力学控制自组装形成OCT结构。此外,在中性条件下,当增加分子瓦黏性末端碱基的数目时,由于分子间作用力增强,分子瓦也能形成四聚体甚至二聚体结构。调控溶液pH以及退火速率使DNA模块进行选择性地组装,不仅开发出一种选择性定向组装成不同纳米结构的新方法,而且有助理解热力学和动力学对DNA自组装情况的影响。

#### 参考文献

- [1] Seeman N C. DNA in a material world [J]. *Nature*, 2003, 421 (6921): 427-431.
- [2] Zhang F, Nangreave J, Liu Y, *et al.* Structural DNA nanotechnology: State of the art and future perspective [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136 (32): 11198-11211.
- [3] Zhang C, Tian C, Guo F, *et al.* DNA-directed three-dimensional protein organization [J]. *Angewandte Chemie*, 2012, 51 (14): 3382-3385.
- [4] He Y, Ye T, Su M, *et al.* Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra [J]. *Nature*, 2008, 452 (7184): 198-201.
- [5] Li T, Famulok M. I-motif-programmed functionalization of DNA nanocircles [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135 (4): 1593-1599.
- [6] Collie G W, Parkinson G N. The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines [J]. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40 (12): 5867-5892.
- [7] Liu Z, Li Y, Tian C, *et al.* A smart DNA tetrahedron that isothermally assembles or dissociates in response to the solution pH value changes [J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14 (6): 1711-1714.
- [8] Amodio A, Adedeji A F, Castronovo M, *et al.* pH-controlled assembly of DNA tiles [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138 (39): 12735-12738.
- [9] Yang Y, Endo M, Hidaka K, *et al.* Photo-controllable DNA origami nanostructures assembling into pre-designed multiorientational patterns [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134 (51): 20645-20653.
- [10] Chen C, Geng J, Pu F, *et al.* Polyvalent nucleic acid/mesoporous silica nanoparticle conjugates: Dual stimuli-responsive vehicles for intracellular drug delivery [J]. *Angewandte Chemie*, 2011, 50 (4): 882-886.
- [11] Zhu J, Kim Y, Lin H, *et al.* pH-responsive nanoparticle superlattices with tunable DNA bonds [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 9 (1): 1-11.
- [12] Green L N, Amodio A, Hkk S, *et al.* pH-driven reversible self-assembly of micron-scale DNA scaffolds [J]. *Nano Letters*, 2017, 17 (12): 7283-7288.
- [13] Soto A M, Loo J, Marky L A. Energetic contributions for the formation of TAT/TAT, TAT/CGC (+), and CGC (+)/CGC (+) base triplet stacks [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124 (48): 14355-14363.
- [14] Chen Y, Lee S H, Mao C. A DNA nanomachine based on a duplex-triplex transition [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43 (40): 5335-5338.
- [15] He Y, Su M, Fang P A, *et al.* On the chirality of self-assembled DNA octahedra [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49 (4): 748-51. ■

《现代化工》欢迎广大作者踊跃投稿,投稿系统:<http://www.xdhg.com.cn>