

基于核酸外切酶 Exo I 的 DNA 折纸结构纯化方法

雷云翔,梅治超,程岚军,何雨晴*

(合肥工业大学化学与化工学院,安徽 合肥 230009)

摘要:基于核酸外切酶(Exo I)选择性降解单链 DNA 的性质,为增加 DNA 折纸结构纯化方法的多样性,开发了一种快速除去剩余 DNA 单链、纯化 DNA 折纸结构的新方法。以三角形和矩形 DNA 折纸结构为研究对象,对缓冲液环境、酶用量、反应温度、反应时间等实验条件进行了优化,采用琼脂糖凝胶电泳方法与原子力显微技术对产物进行分析与表征。结果表明,该方法可以达到快速除去 DNA 单链、纯化 DNA 折纸结构的目的,Exo I 酶处理不影响 DNA 折纸结构的完整性及后续的应用开发。

关键词: DNA 折纸术;核酸外切酶;纯化;自组装

中图分类号: Q523; Q71

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2023)02-0163-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2023.02.031

Exonuclease I assisted purification of DNA origami nanostructures

LEI Yun-xiang, MEI Zhi-chao, CHENG Lan-jun, HE Yu-qing*

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

Abstract: In order to increase the diversity of purification methods for DNA origami structure, a new method for fast purification of DNA origami nanostructures is developed by taking advantage of the property of selectively digestion of single-stranded DNA by Exonuclease I (Exo I). Triangle and rectangle-shaped DNA origami nanostructures are used for testing the hypothesis. The experimental conditions, including the usage of exonuclease I, buffer environment, reaction time and temperature, are optimized. Agarose gel electrophoresis and atomic force microscopy (AFM) techniques are employed to characterize DNA origami samples. The gel results and AFM data demonstrate that the Exo I-based method can be utilized for fast removing excess staple oligonucleotides and thus purifying the DNA origami nanostructures.

Key words: DNA origami; exonuclease I; purification; self-assembly

20 世纪 80 年代,美国纽约大学 Nadrian C. Seeman 教授提出以 DNA 分子为基本单元,利用其序列可编程、碱基配对作用高度专一等特性开展微纳米可控组装,发展了 DNA 纳米技术这一交叉研究领域^[1]。在近 40 年的研究历程中,科学家们发展了多种不同的组装策略^[3-6]。其中,Paul W. K. Rothemund 教授于 2006 年提出的 DNA 折纸术^[2],近年来受到了全世界众多科研工作者的广泛关注,被应用于药物递送等诸多领域^[7-12]。DNA 折纸术的基本组装原理:一条数千个碱基的单链 DNA(称之为 DNA 骨架链),在数百条短链 DNA(称之为 DNA 锚定链)的辅助下,折叠形成各种预先设计的精巧结构,如一维纳米棒、二维矩形结构、三维多面体等。DNA 折纸纳米结构的组装过程中,通常加入过量的 DNA 锚定链,以提高组装产率及保证所得组装产物结构完整。然而,剩余的 DNA 锚定链

通常会给后续的应用开发带来许多不利与限制,因此,去除剩余 DNA 锚定链、纯化 DNA 折纸结构具有重要意义。

目前,除去 DNA 锚定链的主要方法有琼脂糖凝胶电泳技术和超滤法等^[13-14],纯化过程步骤较多且繁琐、耗时较长。核酸外切酶(Exo I)可选择性从 3' 至 5' 端逐步降解 DNA 单链,而不降解 DNA 双链。因此,笔者利用 Exo I 酶的这一特性开发了一种高效快速除去 DNA 锚定链、纯化 DNA 折纸结构的简便方法。

1 材料与试剂

1.1 试剂与仪器

试剂:琼脂糖(Agarose)、乙二胺四乙酸钠(EDTA)、冰醋酸(CH₃COOH)、乙酸镁[(CH₃COO)₂Mg·4H₂O]、三羟甲基-氨基-甲烷(Tris-base)、DNA 锚

收稿日期:2022-03-11;修回日期:2022-12-08

基金项目:中央高校基本科研业务费(JZ2016HGPA0734)

作者简介:雷云翔(1996-),男,硕士研究生,研究方向为生物化工、DNA 纳米技术,2019110488@mail.hfut.edu.cn;何雨晴(1995-),女,博士生,研究方向为超薄二维纳米材料的可控制备及性能研究,通讯联系人,2502397143@qq.com。

定链,生工生物工程(上海)股份有限公司生产; M13mp18 DNA 骨架链、核酸外切酶(Exo I), New England Biolabs Inc.(NEB)生产。

仪器:水平电泳仪(DYCP-31DN)、电泳仪电源(DYY-6C),北京六一生物科技有限公司生产;超纯水机(KNRT-Z-10),合肥科宁特生产;电子分析天平(FA2004),上海舜宇恒平仪器有限公司生产;原子力显微镜(Bruker Dimension Icon),德国布鲁克生产。

1.2 DNA 折纸结构与序列

三角形、矩形 DNA 折纸结构示意图如图 1 所示。DNA 锚定链序列见文献[15-16]。

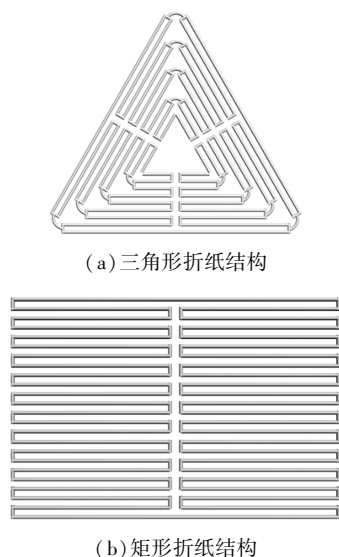


图 1 DNA 折纸结构示意图

2 实验方法

2.1 溶液配制

50×TAE:称取 242.2 g 三羟甲基-氨基-甲烷、37.2 g 乙二胺四乙酸钠,移取 57.1 mL 冰醋酸,混合、溶解,加入超纯水定容至 1 L,置于 4℃ 冷藏保存。

10×TAE/Mg²⁺:移取 200 mL 50×TAE 缓冲液,称取 26.8 g 醋酸镁,加入超纯水定容至 1 L。置于 4℃ 冷藏保存。

2.2 DNA 折纸结构组装

在 1.5 mL 离心管中,依次加入超纯水、0.5×TAE/Mg²⁺缓冲液、2 nmol/L DNA 骨架链、20 nmol/L DNA 锚定链,混合均匀。然后快速退火:95℃/5 min、65℃/10 min、50℃/10 min、37℃/10 min 和常温 10 min。组装好的样品 4℃ 冷藏保存。

采用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析组装产物,电泳

缓冲液为 1×TAE/Mg²⁺,电压为 50 V,溴化乙锭染色后于紫外灯下拍照。

2.3 Exo I 酶降解实验条件优化

缓冲液环境:平行准备 3 份 DNA 折纸组装样品(各 20 μL),1 号样品作为对照样;2 号样品中加入 1.00 μL Exo I 酶;3 号样品中加入 1.00 μL Exo I 酶以及 2.40 μL 10×Exo I buffer。常温下反应 3 h,然后采用琼脂糖凝胶电泳进行分析。

酶用量:平行准备 6 份 DNA 折纸组装样品(各 20 μL),1 号样品作为对照样,2~6 号样品中依次加入 0.20、0.50、1.00、2.00、4.00 μL Exo I 酶。常温下反应 3 h,然后采用琼脂糖凝胶电泳进行分析。

反应温度:平行准备 4 份 DNA 折纸组装样品(各 20 μL)。1 号样品作为对照样,2、3、4 号样品中各加入 1.00 μL Exo I 酶,分别于 4℃、常温、37℃ 下反应 3 h,采用琼脂糖凝胶电泳进行分析。

反应时间:平行准备 5 份 DNA 折纸组装样品(各 20 μL)。1 号样品作为对照样,2、3、4、5 号样品中各加入 1.00 μL Exo I 酶,常温下分别作用 0.5、1、3、16 h,采用琼脂糖凝胶电泳进行分析。

2.4 原子力显微镜表征

移取 3.00 μL DNA 折纸样品滴至云母表面,保持 30 s,用 2 mmol/L 醋酸镁溶液(30 μL)洗云母表面样品 1 次,吹干。采用轻敲模式表征成像。

3 结果与讨论

3.1 DNA 折纸结构的组装

DNA 折纸结构组装凝胶电泳图如图 2 所示,泳道 1 是作对照的 M13mp18 DNA 骨架链样品,泳道 2 是快速退火组装的 DNA 折纸样品。由图 2 中可以看出,三角形 DNA 折纸结构的电泳速率明显变小,矩形 DNA 折纸结构电泳速率稍微减小,这是由于 DNA 骨架链在 DNA 锚定链的辅助下折叠组装成更为紧凑的纳米结构。另外,在组装过程中,DNA 链

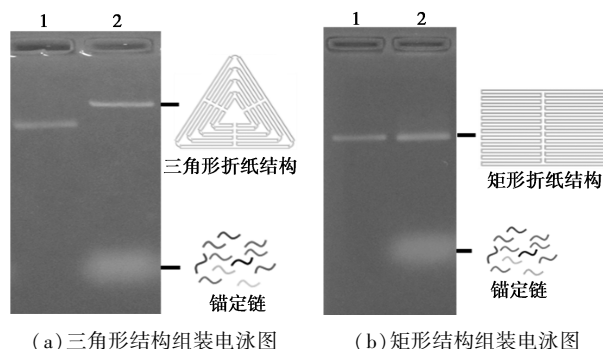


图 2 DNA 折纸结构组装凝胶电泳图

间的高效协同组装发生在特定的温度范围内,因此, DNA 折纸结构的制备不需要采用耗时较长的慢速退火方式,通过快速退火即可实现高产率组装。泳道 2 中电泳速率较快的条带,即为剩余的 DNA 锚定链。

3.2 不同缓冲液环境对酶降解效果的影响

在酶促反应中,样品所处的缓冲液环境对酶的活性影响十分显著。Exo I 酶通常在 $1\times$ Exo I buffer 缓冲液环境下使用,但是 DNA 折纸结构的组装溶液为 $0.5\times$ TAE/ Mg^{2+} ,因此,比较 $0.5\times$ TAE/ Mg^{2+} 和 $1\times$ Exo I buffer 2 种缓冲液环境下 Exo I 酶降解效果,探究是否可以直接在 $0.5\times$ TAE/ Mg^{2+} 溶液中进行 Exo I 酶的降解实验。

不同缓冲液环境对三角形 DNA 折纸结构 Exo I 酶降解纯化效果的影响如图 3 所示,1 号泳道为对照样,2 号泳道样品的缓冲液为 $0.5\times$ TAE/ Mg^{2+} ,3 号泳道样品的缓冲液为 $1\times$ Exo I buffer。凝胶电泳结果表明:在 $0.5\times$ TAE/ Mg^{2+} 和 $1\times$ Exo I buffer 2 种缓冲液环境下,Exo I 酶的降解活性没有区别。因此,酶降解实验中,可以直接使用 DNA 折纸结构的组装缓冲液 $0.5\times$ TAE/ Mg^{2+} ,不需要再将缓冲液替换为 $1\times$ Exo I buffer。后续实验都选择 $0.5\times$ TAE/ Mg^{2+} 缓冲液环境下进行。

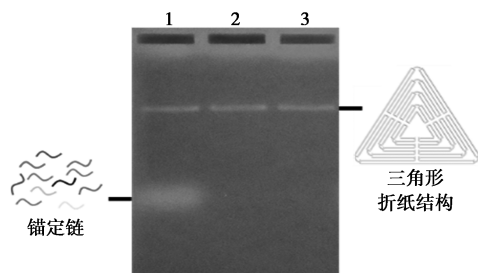


图 3 不同缓冲液环境对三角形 DNA 折纸结构 Exo I 酶降解纯化效果的影响

3.3 不同酶用量对酶降解效果的影响

在酶促反应中,酶用量是影响降解效果的重要因素之一。筛选出 Exo I 酶的最佳用量,使其刚好能够完全降解剩余的 DNA 锚定链,而又不至于因为过量对后续应用产生影响。

Exo I 酶用量对不同 DNA 折纸结构酶降解纯化效果的影响如图 4 所示。从图 4(a)中可以看出,1 号泳道为对照样,2~6 号泳道样品中依次加入了 0.20、0.50、1.00、2.00、4.00 μ L Exo I 酶。分析 2~6 号泳道结果可得:Exo I 酶的最佳用量为 1.00 μ L (对应 20 μ L 2 nmol/L DNA 折纸组装样品)。如果

Exo I 酶的加入量较少, DNA 锚定链不能完全降解除去。从图 4(b)中可以看出, Exo I 酶用量对矩形 DNA 折纸结构降解效果与三角形折纸结构的趋势基本相同, Exo I 酶的最佳用量为 1.00 μ L。后续实验都选择 20 μ L 2 nmol/L DNA 折纸组装样品中对应加入 1.00 μ L Exo I 酶。

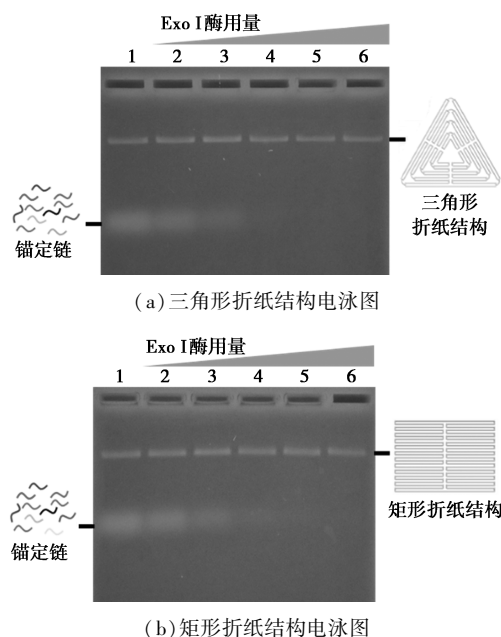
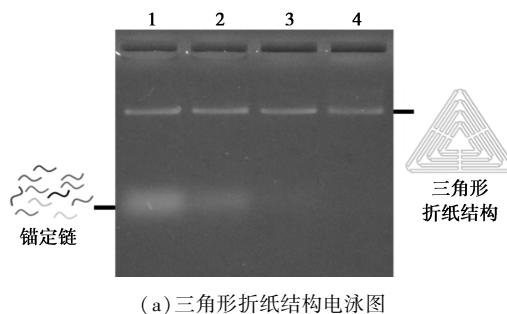


图 4 不同 Exo I 酶用量对 DNA 折纸结构酶降解纯化效果的影响

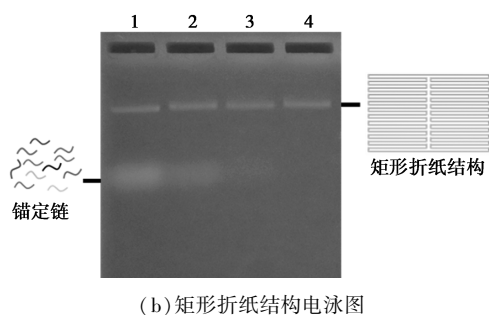
3.4 不同反应温度对酶降解效果的影响

温度是影响酶促反应的一个重要因素。由于 4 $^{\circ}$ C、常温、37 $^{\circ}$ C 是 DNA 纳米组装研究中常用的环境温度,因此,研究了这 3 个不同温度下 Exo I 酶的降解效果。

三角形和矩形 DNA 折纸结构在不同温度下 Exo I 酶降解的凝胶电泳结果如图 5 所示。1 号泳道为对照样,2~4 号泳道分别为 4 $^{\circ}$ C、常温、37 $^{\circ}$ C 条件下加入 1.00 μ L Exo I 酶反应 3 h 的 DNA 折纸样品。凝胶电泳实验结果表明,在 4 $^{\circ}$ C 下,反应后还有大量 DNA 锚定链未被降解,纯化效果不好,这是由于 4 $^{\circ}$ C 低温下 Exo I 酶的活性较低;在常温下, DNA



(a) 三角形折纸结构电泳图



(b) 矩形折纸结构电泳图
图 5 反应温度对不同 DNA 折纸结构的 Exo I 酶降解纯化效果的影响

锚定链基本降解完全;在 37℃ 下, DNA 锚定链降解完全。矩形 DNA 折纸结构的电泳速率出现较小变化,这是因为矩形 DNA 折纸结构部分区域的稳定性较弱而导致结构发生少许变化。不过,后续原子力显微结果证实结构未发生明显变化,仍保持了完整的组装结构。后续实验选择在常温下进行。

在合适的温度区间(15~37℃)内,选择相对较高的温度酶的降解纯化效果相对更好。如果需要在相对低温环境下进行,也可以通过采用适当延长作用时间的方法来实现较好的纯化效果。

3.5 反应时间对酶降解效果的影响

反应时间是酶促反应的重要条件之一。Exo I 酶对三角形 DNA 折纸结构不同作用时间的凝胶电泳分析结果如图 6 所示。常温下,加入 1.00 μL Exo I 酶,作用时间分别为 0.5、1、3、16 h,分别对应泳道 2、3、4、5。凝胶电泳实验结果表明,反应 0.5 h,尚有少许的 DNA 锚定链残余;反应 1 h, DNA 锚定链完全降解除去;延长反应时间,对 DNA 折纸结构本身不会造成破坏。因此,选择 Exo I 酶降解的作用时间是 3 h。

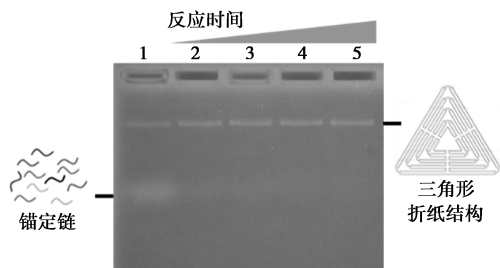
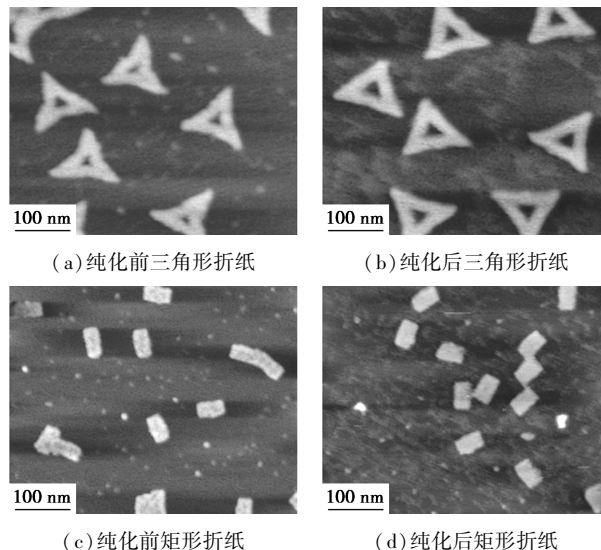


图 6 反应时间对三角形 DNA 折纸结构 Exo I 酶降解纯化效果的影响

3.6 原子力显微表征结果

琼脂糖凝胶电泳实验结果已证实, Exo I 酶降解法可以很好地实现除去剩余 DNA 锚定链、纯化 DNA 折纸结构的目的。为了进一步确认 Exo I 酶处理后的 DNA 折纸样品仍然保持完整的结构,采用原

子力显微技术(AFM)对 DNA 折纸结构样品进行了表征。Exo I 酶处理前后的三角形和矩形 DNA 折纸结构原子力显微图像如图 7 所示。



(a) 纯化前三角形折纸 (b) 纯化后三角形折纸
(c) 纯化前矩形折纸 (d) 纯化后矩形折纸
图 7 DNA 折纸结构的 Exo I 酶降解纯化前后的原子力显微图像

从图 7 中可以看出, Exo I 酶处理前后, DNA 折纸结构没有发生变化,即 Exo I 酶处理不影响 DNA 折纸结构的完整性。因此,基于 Exo I 酶降解法除去 DNA 锚定链、纯化 DNA 折纸结构的方法可行。

4 结论

利用核酸外切酶(Exo I)选择性降解单链 DNA 的特性,开发了一种快速、高效除去剩余 DNA 锚定链、纯化 DNA 折纸结构的简便方法。筛选后的实验条件为:20 μL 2 nmol/L DNA 折纸组装样品对应加入 1.00 μL Exo I 酶、反应缓冲液为 0.5×TAE/Mg²⁺、反应温度为常温、反应时间为 3 h。该方法不依赖昂贵的精密仪器,也不需要复杂的实验操作以及要求严苛的实验环境。基于酶降解的纯化方式为 DNA 折纸结构的纯化提供了新的途径,为 DNA 折纸结构后续应用开发提供了良好的技术支持。

参考文献

[1] Seeman N C. Nucleic acid junctions and lattices[J]. Journal of Theoretical Biology, 1982, 99(2): 237-247.
[2] Rothemund P W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns[J]. Nature, 2006, 440(7082): 297-302.
[3] He Y, Ye T, Su, M, et al. Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra [J]. Nature, 2008, 452(7184): 198-201.

(下转第 172 页)

3 结论

(1) 合成了一种 pH 响应型表面活性剂作为乳化剂来稳定 W/O 丙烯酰胺单体乳液, 并进行反相乳液聚合, 得到具有 pH 响应能力的聚丙烯酰胺乳液。

(2) 聚合物乳液溶解在 $\text{pH} > 8$ 和 $\text{pH} < 6$ 的水中即可得到聚合物溶液。与常规的粉剂和乳剂相比, 该聚合物体系展现出了使用便捷性和速溶性, 在 1 min 内便能快速起黏。为开发性能优良的新型聚丙烯酰胺聚合物体系提供了方向。

(3) 在聚合物质量分数为 0.5% 的情况下, 于 $\text{pH} = 10$ 的水中, 1 min 内减阻率可达到 63%; 在模拟高含盐返排液条件下, 减阻率仍能达到 60%, 满足了滑溜水减阻剂的一般要求, 具有很好的应用价值。

参考文献

- [1] 李远照, 李婷, 王犁, 等. 基于刺激响应策略的可控滑溜水研究 [J]. 钻井液与完井液, 2020, 37(6): 784-788.
- [2] 贾金亚, 魏娟明, 贾文峰, 等. 页岩气压裂用滑溜水胶液一体化稠化剂研究 [J]. 应用化工, 2019, 48(6): 1247-1250.
- [3] 姚奕明, 魏娟明, 杜涛, 等. 深层页岩气压裂滑溜水技术与应用 [J]. 精细石油化工, 2019, 36(4): 15-19.
- [4] 蒋其辉, 杨向同, 于筱溪, 等. 国内外滑溜水减阻剂研究进展 [J]. 化学工业与工程, 2022, 39(2): 76-83.
- [5] 刘倩, 管保山, 刘玉婷, 等. 滑溜水压裂液用减阻剂的研究与应用进展 [J]. 油田化学, 2020, 37(3): 545-551.
- [6] Jing X, Liu Y, Li W, *et al.* Using water-miscible nonionic hydrophobic monomer associating HPAM as drag reducing agent [J]. J Appl Polym Sci, 2019, 136(48): 48362.
- [7] 彭飞, 方波, 卢拥军, 等. 四元两性疏水聚合物溶液流变和减阻性能 [J]. 钻井液与完井液, 2016, 33(1): 92-96.
- [8] Scott A J, Romero-Zerón L, Penlidis A. Evaluation of polymeric materials for chemical enhanced oil recovery [J]. Processes, 2020, 8(3): 361.
- [9] 刘甜甜, 白梦迪, 韩鑫, 等. 影响油水乳液液转相点的因素研究 [J]. 广东化工, 2016, 43(15): 42-43.
- [10] 韩洪升, 崔玮琳, 宋灵剑. 亲水性破乳剂对油水乳液液流变影响的实验研究 [J]. 中国石油和化工标准与质量, 2013, 34(5): 19-20.
- [11] 李树刚, 魏振吉, 孙中磊, 等. 油包水型乳化压裂液配方研究及性能评价 [J]. 天然气与石油, 2012, 30(5): 63-7+109.
- [12] Sanders M, Felling K, Thomson S, *et al.* Dry polyacrylamide friction reducer: Not just for slick water [C]. Proceedings of the SPE Hydraulic Fracturing Technology Conference, F, 2016. D011S002R009.
- [13] 宋玉新, 田森林, 李英杰, 等. 环境刺激响应型乳液体系的研究现状 [J]. 化工进展, 2017, 36(S1): 380-387.
- [14] 龚成易, 于浩, 王琦琦, 等. 刺激响应性 Pickering 乳液及其应用研究进展 [J]. 日用化学工业, 2021, 51(6): 554-563.
- [15] 张洪涛, 黄锦霞编著. 乳液聚合新技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [16] Wang L, Guan X, Zheng C, *et al.* New low-energy method for nanoemulsion formation: pH regulation based on fatty acid/amine complexes [J]. Langmuir, 2020, 36(34): 10082-10090.
- [17] 陈馥, 杨晓春, 刘福梅, 等. AM/AMPS/AA 三元共聚物压裂液稠化剂的合成 [J]. 钻井液与完井液, 2010, 27(4): 71-3+100-1.
- [18] Song H, Zhang S, Ma X, *et al.* Synthesis and application of starch-graft-poly (AM-co-AMPS) by using a complex initiation system of CS-APS, Carbohyd [J]. Polym, 2007, 69: 189-95.
- [19] Abdollaht Z, Frounchi M, Dadbin S. Synthesis, characterization and comparison of PAM, cationic PDMC and P (AM-co-DMC) based on solution polymerization [J]. J Ind Eng Chem, 2011, 17(3): 580-586.
- [20] Gui Z, Qian J, An Q, *et al.* Synthesis, characterization and flocculation performance of zwitterionic copolymer of acrylamide and 4-vinylpyridine propylsulfobetaine [J]. Eur Polym J, 2009, 45(5): 1403-1411.
- [21] Ma J, Zhang H, Tan M, *et al.* Synthesis, characterization, and flocculation performance of anionic polyacrylamide P (AM-AA-AMPS) [J]. J Appl Polym Sci, 2013, 129(4): 1984-1991. ■
- [4] Zhang C, Su M, He Y, *et al.* Conformational flexibility facilitates self-assembly of complex DNA nanostructures [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(31): 10665-10669.
- [5] Zhang C, Ko S H, Su M, *et al.* Symmetry controls the face geometry of DNA polyhedra [J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(4): 1413-1415.
- [6] He Y, Su M, Fang P A, *et al.* On the chirality of self-Assembled DNA octahedra [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2010, 122(4): 760-763.
- [7] Lu C H, Bilha W, Itamar W. DNA nanotechnology: From sensing and DNA machines to drug-delivery systems [J]. ACS Nano, 2013, 7(10): 8320-8332.
- [8] Jiang L, Fan C H, Pei H, *et al.* Smart drug delivery nanocarriers with self-assembled DNA nanostructures [J]. Advanced Materials, 2013, 25(32): 4386-4396.
- [9] Yan J, Hu C Y, Liu X W, *et al.* Recent developments of new DNA origami nanostructures for drug delivery [J]. Current Pharmaceutical Design, 2015, 21(22): 3181-3190.
- [10] Chao J, Liu H J, Su S, *et al.* Structural DNA nanotechnology for intelligent drug delivery [J]. Small, 2014, 10(22): 4626-4635.
- [11] Zhou F, Sun W, Karen B Ricardo, *et al.* Programmably shaped carbon nanostructure from shape-conserving carbonization of DNA [J]. ACS Nano, 2016, 10(3): 3069-3077.
- [12] Je Moon Yun, Kyoung Nan Kim, Ju Young Kim, *et al.* DNA origami nanopatterning on chemically modified graphene [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2012, 124(4): 936-939.
- [13] Evi S, Thomas G M, Florian P, *et al.* Facile and scalable preparation of pure and dense DNA origami solutions [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 53(47): 12735-12740.
- [14] Alan S, Erik B, Högberg B. Purification of functionalized DNA origami nanostructures [J]. ACS Nano, 2015, 9(5): 4968-4975.
- [15] Suchetan P, Deng Z T, Wang H N, *et al.* DNA Directed self-assembly of anisotropic plasmonic nanostructures [J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(44): 17606-17609.
- [16] Jaswinder S, Rahul C, Casper S A, *et al.* Toward reliable gold nanoparticle patterning on self-assembled DNA nanoscaffold [J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(25): 7820-7821. ■

(上接第 166 页)