

用于金刚石表面单分子有序固定的 DNA折纸制备*

魏一成^{1,2)} 余佩^{1,2)} 陈明^{1,2)} 孙梓庭^{1,2)} 曾俨³⁾姜继忠³⁾ 陈三友^{1,2)**} 石发展^{1,2)**} 杜江峰^{1,2)}⁽¹⁾ 中国科学技术大学, 合肥微尺度物质科学国家研究中心, 合肥 230026;⁽²⁾ 中国科学技术大学近代物理系和中国科学院微观磁共振重点实验室, 合肥 230026;⁽³⁾ 中国科学院生物物理研究所, 中国科学院核酸生物学重点实验室, 北京 100101)

摘要 近年来兴起的以金刚石氮-空位(NV)色心为量子传感器的微观磁共振技术得到快速发展, 已经实现单个生物分子磁共振谱的探测, 正在向单分子结构和功能的研究推进. 这其中需要解决一个重要的技术问题, 即单分子在金刚石表面的有序分散和固定. DNA的自组装为解决这一问题提供了可行途径, 本文使用DNA折纸技术, 制备了一种60 nm边长的正方形双层DNA折纸作为单分子载体, 并与金刚石表面结合. 首先采用双层结构提高了DNA折纸的稳定性, 其次通过在DNA折纸边缘添加发卡结构减少了DNA折纸结构间的聚团, 最终成功将DNA折纸装配到金刚石表面. 通过原子力显微镜图像进行表征显示其结构完整、分散均匀. 本工作为后续的单分子磁共振技术在单分子生物物理领域的应用推广奠定了样品制备的基础.

关键词 金刚石, DNA折纸, 单分子磁共振, 样品制备

中图分类号 Q6, Q-3

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0208

单分子的直接检测及其结构和功能的研究是生命科学追求的重要目标之一. 不同于系综实验的统计平均探测, 单分子技术可以用来检测单个生物分子独特的结构、动力学和功能关系, 因此单分子技术正发展成一种用来研究生物大分子普遍使用的技术^[1]. 目前, 用于生物学研究的单分子技术主要有: 单分子荧光技术^[2]、膜片钳技术^[3]、原子力显微镜(AFM)技术、光镊技术和磁镊技术^[2, 4-5]等. 磁共振谱学作为结构生物学的基本手段之一, 已经得到广泛应用, 当前通用的磁共振谱仪受制于探测方式, 其研究对象通常为数十亿个分子, 无法观测到单个分子的独特信息. 近几年采用新兴发展起来的金刚石单自旋量子传感器技术取得了单分子磁共振检测的突破, 即以金刚石中的氮-空位色心(下文简称NV色心)单电子自旋作为磁信号传感器, 实现微观磁共振^[6], 在生命科学领域有广泛的应用前景^[7-15].

金刚石晶格中存在一种点缺陷, 其由一个替换

碳原子的氮原子和一个相邻的空位构成, 因此被称为氮-空位色心(NV色心). NV色心固态单电子自旋体系是量子信息的载体, 当将其电子自旋制备到量子叠加态时, 它可以作为一个灵敏的磁信号传感器, 通过与分子中自旋的磁偶极耦合实现对生物分子的检测. 基于NV色心的新型磁共振技术能将研究对象从数十亿分子推进到单分子, 成像分辨率提升至纳米级^[16]. 前期的研究工作使用NV色心在室温下分别得到了单蛋白质分子的顺磁共振谱^[10, 17]和核磁共振谱^[14]及水溶液环境单个DNA分子的顺磁共振谱^[13]等.

* 国家重点研发计划(2016YFA0502400), 国家自然科学基金(81788101, 31600685)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0551-63600469

石发展. E-mail: fzshi@ustc.edu.cn

陈三友. E-mail: sanyou@ustc.edu.cn

收稿日期: 2019-09-05, 接受日期: 2019-10-23

为实现单分子磁共振的检测,研究者使用了poly-L-lysine包被^[10]和化学交联剂连接^[13-14]的方法,将蛋白质或DNA分子放置在金刚石表面.这两种方法都是将被测分子无序地放置在金刚石表面,只能通过控制总分子质量来控制分子之间的平均距离,具有随机性,不利于推广应用.此外,将被检测分子放置在检测表面还可以使用氨基、二硫键、生物素-链霉亲和素、抗体和组氨酸等标签辅助结合或非特异结合方式^[1].尽管这样,依然缺乏一种可控的单分子放置策略.DNA的自组装为解决这一问题提供了可行途径,最近发展起来的DNA折纸(DNA origami)术^[18-19]是DNA自组装的典型代表.

DNA折纸是一种新兴的人工DNA纳米结构.如图1a所示,DNA折纸的制作原理是使用较长的

单链环形DNA作为骨架,然后通过添加与长链各个位置的序列碱基互补配对的短链作为铆钉,引导DNA结构有序折叠,最终形成特定三维结构的DNA纳米结构.DNA折纸由于其设计便捷、可编程且结构稳定的特点受到人们的关注.DNA折纸术在生物、物理、化学、医学等多个领域获得应用,例如基于DNA折纸的电压光学测量^[20]、DNA货物递送机器人^[21]、基于DNA折纸的长度测量等^[22].使用DNA折纸术,可以经过精心设计,通过碱基互补配对和生物素连接等方式分别将DNA(或RNA)和蛋白质结合在DNA折纸上的几乎任意位置.再将DNA折纸技术和金刚石表面的化学修饰结合,可以将蛋白质和核酸等生物大分子可控地制备在金刚石表面.

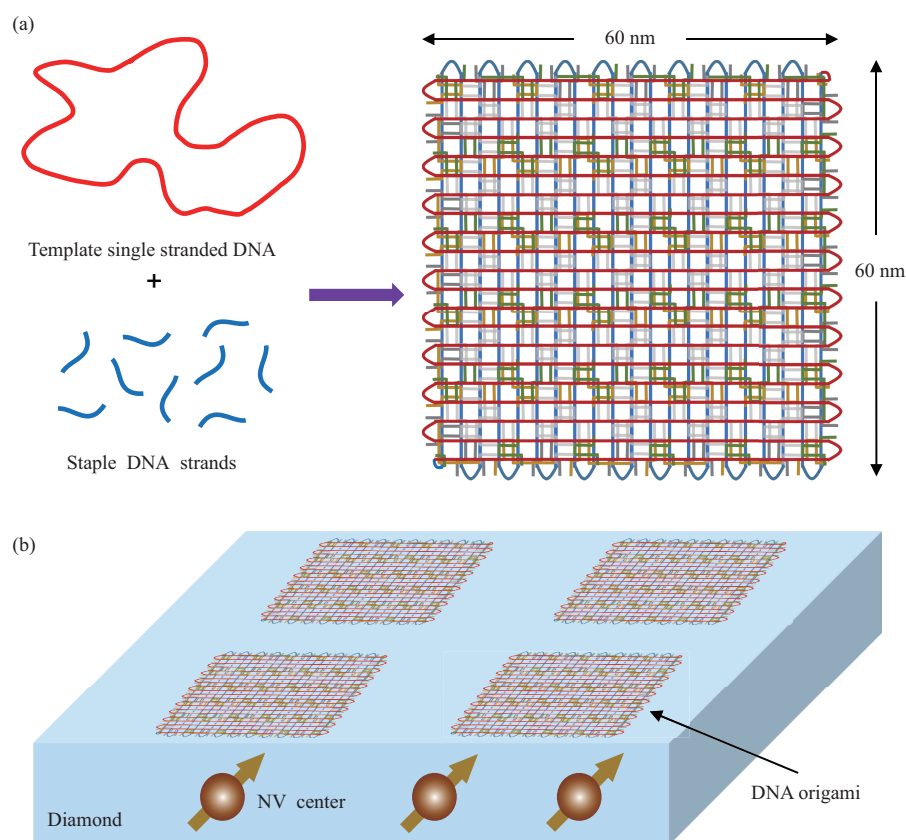


Fig. 1 The schematic of experiments

(a) The preparation and structure of the DNA origami. (b) Schematic of DNA origami on a diamond.

如图1所示,为了在金刚石表面实现上述的分子可控排布,首先DNA折纸样品需要在金刚石表面保持结构完整,且具有较高的分布密度.为此,本文选取了一类平面正方形结构的DNA折纸,经

过一些工艺改进,在金刚石表面成功实现了DNA折纸的制备,为后续基于NV色心的单分子磁共振探测打下了技术基础.

1 材料与方法

1.1 DNA折纸的制备

用于制备DNA折纸的模板单链DNA为M13mp18 (New England BioLabs, N4040S); 所有铆钉DNA短链都由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 用去离子水溶解. 实验中所用缓冲液为50×TAE缓冲液(2 mol/L Tris-乙酸, 50 mmol/L EDTA, pH 8.0), 添加MgCl₂; 用于纯化DNA折纸的是100 ku超滤浓缩管(Millipore, FC510096).

本文的DNA折纸使用one-pot法合成^[18]. 每个50 μl的反应体系中含有1 μl 50×TAE, 其中添加有MgCl₂ (终浓度为12.5 mmol/L); 10 nmol/L单链模板DNA M13mp18; 各种铆钉DNA混合液, 各100 nmol/L; 最后用去离子水补齐到50 μl. 混合好的反应体系在PCR仪(Biometra TOne 96G)中进行退火: 先在90°C加热5 min, 然后从90°C到20°C缓慢降温, 降温速率为0.1°C/6 s, 最后维持在4°C待用. 退火完成后使用100 ku超滤管进行纯化, 以去除过量的铆钉DNA. 50 μl反应物中加入450 μl 1×TAE (含12.5 mmol/L MgCl₂), 在4°C环境2 500 g离心12 min, 加入400 μl 1×TAE (含12.5 mmol/L MgCl₂)再次离心, 重复3次以上. 最后剩余约50 μl, 样品保存在4°C备用.

1.2 云母和金刚石上DNA折纸的附着

云母是一种广泛使用的DNA折纸载体, 为便于对比, 我们同时使用云母和金刚石开展实验. 用于附着DNA折纸的云母为0.15 mm厚度的超薄云母(01873-MB SPI Chem Mica, Grade V-1, 9.5 mm Discs × 0.15 mm Thick); 用于附着DNA折纸的金刚石为厚度0.5 mm、边长2 mm的正方形样品.

用单面胶带粘贴云母表面, 撕开表层, 以露出干净的内层用于实验. 分别取10 μl和5 μl DNA折纸样品滴加到处理好的云母和金刚石上, 分别室温静置3 min和5 min, 然后用1×TAE/Mg缓冲液换洗5次, 制备好的样品用于原子力显微镜(AFM)检测.

1.3 原子力显微镜成像

AFM图像是检验实验成败的直接证据, 我们使用的原子力显微镜为Bruker的Dimension Icon, 扫描模式采用空气中的tapping模式, 探针为NANOSENSORS公司的ATEC-NC-20型号探针.

1.4 金刚石的表面处理

金刚石表面的羧基化修饰. 将洁净的金刚石按顺序依次在浓硝酸、氢氧化钠溶液(1 mol/L)和盐酸(1 mol/L)中分别在90°C条件下处理1 h, 中间和最后用超纯水清洗5次以上, 最终得到表面带有羧基的金刚石.

金刚石表面的氨基化修饰. 首先, 用食人鱼洗液(浓硫酸与30%的过氧化氢溶液以3:1的比例混合)在180°C处理金刚石4 h. 食人鱼洗液具有很强的氧化性, 经过处理的金刚石表面被羟基化. 接着, 经过羟基化的金刚石用氨基硅烷(APTES)溶液处理, 其中含有甲醇4.7 ml、APTES 250 μl、乙酸50 μl, 将金刚石浸入其中, 室温静置10 min后超声处理20 min, 处理完用超纯水清洗, 最终得到表面带有氨基的金刚石.

2 结果与分析

2.1 单层DNA折纸

为实现DNA折纸在金刚石表面的制备, 首先组装了单层的方形DNA折纸, 并将其分别附着在洁净的云母和金刚石表面. AFM成像结果显示, 在云母表面可以看到较完好的方块结构, 大小和高度都符合DNA折纸的特征(图2a), 因此我们认为DNA折纸制备是成功的. 相对应地, 把同批次的DNA折纸滴加在金刚石表面后, AFM图像显示只有极少数疑似DNA折纸的结构, 大部分是碎颗粒结构(图2b). 我们将DNA折纸在金刚石表面的静置吸附时间从几分钟增加到1 h, 甚至10 h以上, 都没有明显改善上述情况. 说明使用的单层DNA折纸在金刚石表面不能保持完整.

2.2 双层DNA折纸

金刚石材料相对惰性, 表面性质特殊, 表面以C—H和C—O键为主^[23], 具有较强的疏水性, 可能影响了DNA折纸在金刚石表面的附着. 从图2b中能看到金刚石表面亚纳米级的打磨痕迹, 表明其相对云母表面平整度较差, 这可能也影响了DNA折纸的完整性. 为了解决上述单层DNA折纸在金刚石表面不完整的问题, 我们首先考虑增加DNA折纸结构的稳定性. 我们借鉴了Qian团队^[21]工作中使用的DNA折纸设计, 采用双层结构的方形DNA折纸. 双层DNA折纸的模板链取向互相垂直, 使得结构更加稳定. AFM成像结果表明, 上述双层DNA折纸在金刚石表面的覆盖率增加, 完整比例也明显增加(图3b), 与云母上的结果类似(图

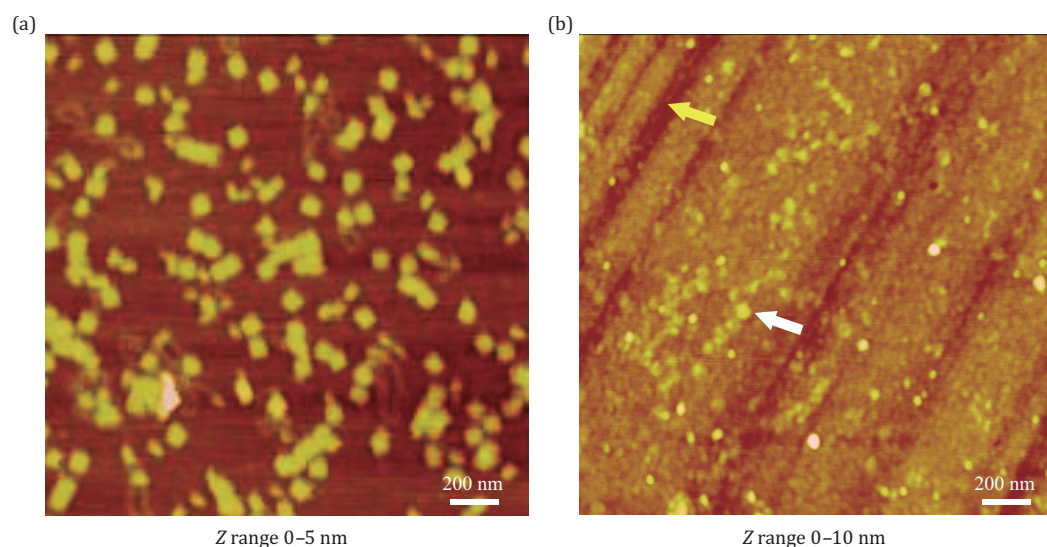


Fig. 2 Single-layer DNA origami

(a) A representative AFM image of DNA origami on a mica. The scanning area is $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$. (b) AFM image of DNA origami on a diamond. The scanning area is $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$. The white arrow marks a suspected intact DNA origami. The yellow arrow marks the trace of polishing on diamond.

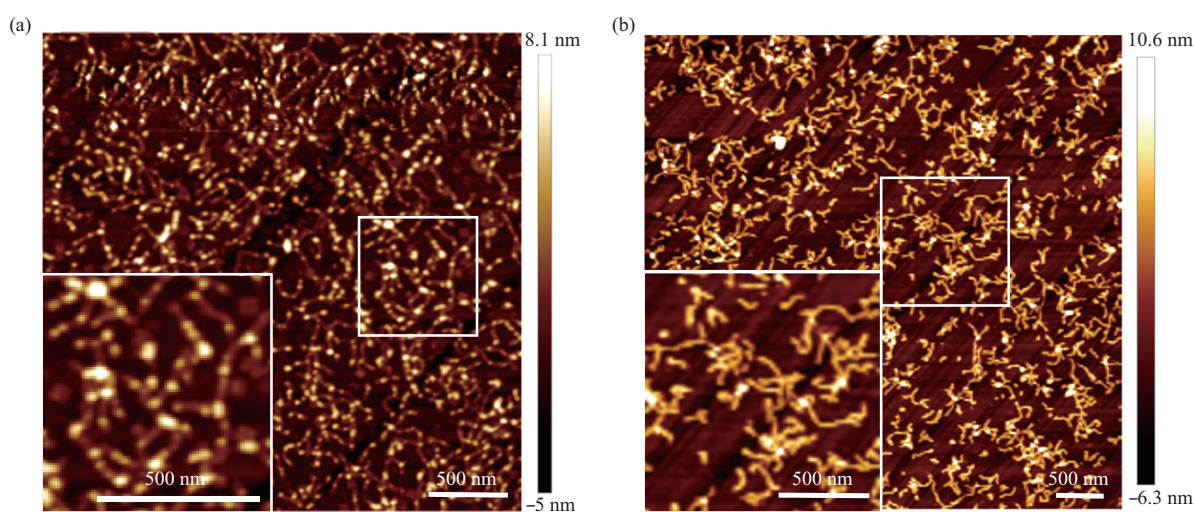


Fig. 3 Double-layer DNA origami.

(a) AFM image of DNA origami on a mica. The scanning area is $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$. (b) AFM image of DNA origami on a diamond. The scanning area is $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$. Insets display magnified images of areas in dashed frames.

3a) .但由于表面附着的DNA折纸密度增加,相邻DNA折纸更容易通过边缘处的未配对碱基互相结合,导致大量DNA折纸首尾相连,呈串状排列,形成聚团.

2.3 引入发卡结构

为解决上述DNA折纸串连的问题,我们做了进一步改进,在折纸边缘处的短链DNA两端引入了发卡结构(hairpin)(图4a).发卡结构通过

DNA 链内部形成高级结构, 可以有效屏蔽末端容易解链的碱基, 防止不同 DNA 折纸间边缘的结合, 从而有效降低 DNA 折纸间的串连和团聚^[24]. AFM 结果显示, 增加发卡序列的 DNA 折纸在云母和金刚石上都呈分散分布, 且保持结构完整, 分布均匀 (图 4b, c). 该结果表明, 我们对 DNA 折纸结构的优化是有效的, 实现了 DNA 折纸在金刚石表面的有效制备.

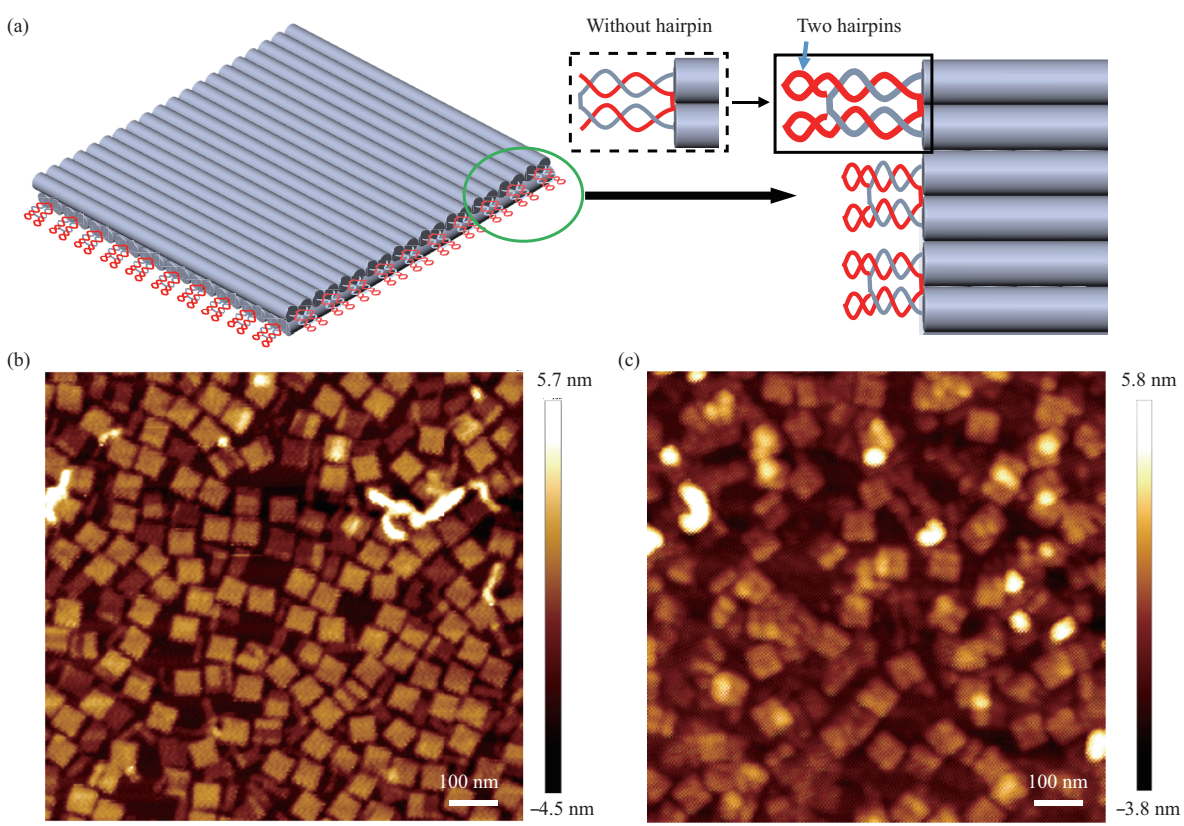


Fig. 4 Double-layer DNA origami with hairpins

(a) Illustration showing the structure of a DNA origami with hairpins. The right view displays the molecular structure of hairpins. (b) AFM image of DNA origami with hairpins on a mica. The scanning area is 1 $\mu\text{m}\times 1\ \mu\text{m}$. (c) AFM image of DNA origami with hairpins on a diamond. The scanning area is 945 nm $\times$ 945 nm.

2.4 金刚石表面化学修饰

考虑到金刚石表面特殊的物理化学环境, 我们尝试探索不同金刚石表面性质对 DNA 折纸的影响. 为此, 对金刚石进行了一系列表面处理, 分别制作了羧基修饰和氨基修饰的金刚石表面, 然后附着了

带发卡结构的双层 DNA 折纸. 从图 5 的 AFM 结果可以看到, 在羧基和氨基修饰的金刚石表面, DNA 折纸都有较高的密度和完整的结构, 与未做修饰的金刚石上的结果相似 (图 4c).

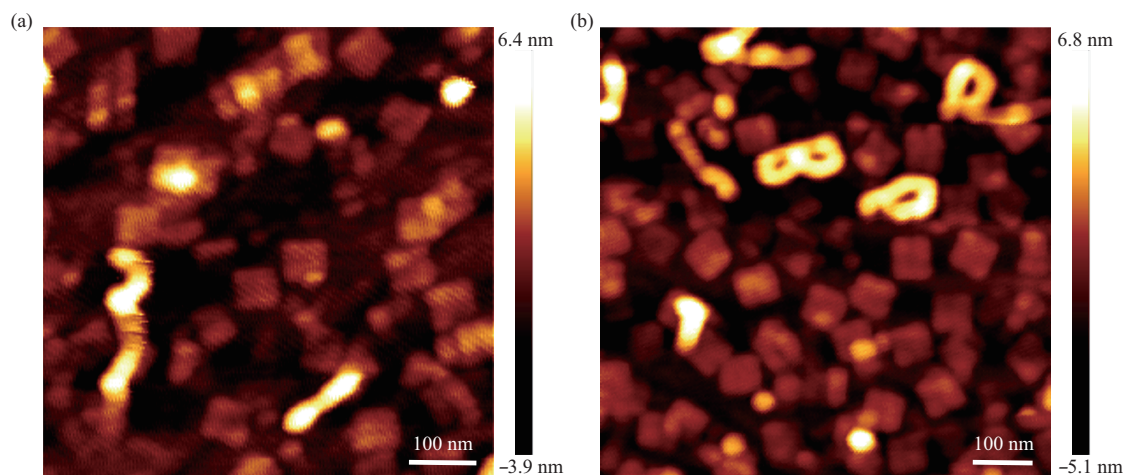


Fig. 5 DNA origami on chemically modified diamonds

(a) AFM image of DNA origami on a carboxyl modified diamond. The scanning area is 664 nm×664 nm. (b) AFM image of DNA origami on an amino modified diamond. The scanning area is 750 nm×750 nm.

3 讨 论

为了满足基于金刚石 NV 色心技术在纳米尺度磁共振（尤其是单分子磁共振）方面发展的需要，针对金刚石材料的特殊性质，本文通过对 DNA 折纸结构的一系列优化，提高其稳定性和分散性，成功实现了 DNA 折纸在金刚石表面的有效制备。这为基于 NV 色心的单分子磁共振技术的广泛应用打下了很好的基础。

最常用的 DNA 折纸检测基底是云母，云母表面平整度很好，而本文中抛光过的金刚石表面能看到亚纳米级的起伏条纹，这可能扭曲或破坏了单层 DNA 折纸的结构甚至导致解链，双层 DNA 折纸抵抗了这种影响。我们不排除其他设计的 DNA 折纸也能成功制备在金刚石表面，但由于不同生产工艺和不同批次金刚石的差异，可能需要优化一些实验条件。我们的实验结果显示，未经处理、羧基修饰和氨基修饰的金刚石表面的 DNA 折纸没有明显差异，证明我们的 DNA 折纸设计可以适用于一些需要进行金刚石表面修饰的实验。电双层和电荷反转效应可能可以解释为什么 3 种表面环境都能得到成功的结果^[25]。

在本工作的针对金刚石 DNA 折纸制备工艺基础上，使用 DNA 折纸作为自旋载体，可以在单分子磁共振领域开展一系列工作。a. 将标记了自旋信号的生物大分子结合在 DNA 折纸上，形成距离可控的单分子阵列，这将极大地方便基于 NV 色心的

单分子磁共振谱学研究。b. 在 DNA 折纸上设计自旋分子或单分子磁体的阵列，如 5×5 的二维矩阵，然后使用 NV 色心测量，这将在基于自旋的量子计算和量子模拟方面有很好的应用前景。Zhang 等^[26]设计的基于 DNA 折纸的纳米金刚石自旋阵列也是类似的思路。c. 结合 AFM-NV 色心扫描磁共振成像技术^[15, 27]，DNA 折纸技术可以成为单分子磁共振成像研究的有效工具。

未来，我们将继续就该项技术的这些发展方向进行研究。DNA 折纸作为一种非常适合用作自旋载体的生物纳米结构，可以在实验中规避 NV 测量中空间分辨率的限制，能够有效提高实验效率，促进 NV 单分子磁共振技术在生命科学领域的广泛应用并获得长远的发展。

参 考 文 献

- [1] Deniz A A, Mukhopadhyay S, Lemke E A. Single-molecule biophysics: at the interface of biology, physics and chemistry. *Journal of the Royal Society Interface*, 2008, **5**(18): 15-45
- [2] Sarkar S K, Bumb A, Mills M, *et al.* SnapShot: single-molecule fluorescence. *Cell*, 2013, **153**(6): 1408-1408. e1401
- [3] Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 1976, **260**(5554): 799-802
- [4] Seol Y, Neuman K C. SnapShot: force spectroscopy and single-molecule manipulation. *Cell*, 2013, **153**(5): 1168-1168. e1161
- [5] Neuman K C, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods*, 2008, **5**(6): 491-505

- [6] Wrachtrup J, Finkler A. Single spin magnetic resonance. *J Magn Reson*, 2016, **269**: 225-236
- [7] Kucsko G, Maurer P C, Yao N Y, *et al.* Nanometre-scale thermometry in a living cell. *Nature*, 2013, **500**(7460): 54-58
- [8] Le Sage D, Arai K, Glenn D R, *et al.* Optical magnetic imaging of living cells. *Nature*, 2013, **496**(7446): 486-489
- [9] Schirhagl R, Chang K, Loretz M, *et al.* Nitrogen-vacancy centers in diamond: nanoscale sensors for physics and biology. *Annu Rev Phys Chem*, 2014, **65**: 83-105
- [10] Shi F, Zhang Q, Wang P, *et al.* Protein imaging. Single-protein spin resonance spectroscopy under ambient conditions. *Science*, 2015, **347**(6226): 1135-1138
- [11] Glenn D R, Lee K, Park H, *et al.* Single-cell magnetic imaging using a quantum diamond microscope. *Nat Methods*, 2015, **12**(8): 736-738
- [12] Davis H C, Ramesh P, Bhatnagar A, *et al.* Mapping the microscale origins of magnetic resonance image contrast with subcellular diamond magnetometry. *Nature Communications*, 2018, **9**(1): 131
- [13] Shi F, Kong F, Zhao P, *et al.* Single-DNA electron spin resonance spectroscopy in aqueous solutions. *Nat Methods*, 2018, **15**(9): 697-699
- [14] Lovchinsky I, Sushkov A O, Urbach E, *et al.* Nuclear magnetic resonance detection and spectroscopy of single proteins using quantum logic. *Science*, 2016, **351**(6275): 836-841
- [15] Wang P, Chen S, Guo M, *et al.* Nanoscale magnetic imaging of ferritins in a single cell. *Sci Adv*, 2019, **5**(4): eaau8038
- [16] Hemmer P. Chemistry. Toward molecular-scale MRI. *Science*, 2013, **339**(6119): 529-530
- [17] Shi F, Wang P, Du J, *et al.* 基于室温单自旋磁共振技术的量子精密测量. *SCIENTIA SINICA Informationis*, 2014, **44**(3): 329-344
- [18] Rothmund P W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 2006, **440**(7082): 297-302
- [19] Voigt N V, Topping T, Rotaru A, *et al.* Single-molecule chemical reactions on DNA origami. *Nat Nanotechnol*, 2010, **5**(3): 200-203
- [20] Hemmig E A, Fitzgerald C, Maffeo C, *et al.* Optical voltage sensing using DNA origami. *Nano Lett*, 2018, **18**(3): 1962-1971
- [21] Thubagere A J, Li W, Johnson R F, *et al.* A cargo-sorting DNA robot. *Science*, 2017, **357**(6356): pii: eaan6558
- [22] Endo M, Yang Y, Sugiyama H. DNA origami technology for biomaterials applications. *Biomater Sci*, 2013, **1**(4): 347-360
- [23] Sumant A V, Grierson D S, Gerbi J E, *et al.* Surface chemistry and bonding configuration of ultrananocrystalline diamond surfaces and their effects on nanotribological properties. *Physical Review B*, 2007, **76**(23): 235429
- [24] Tikhomirov G, Petersen P, Qian L. Fractal assembly of micrometre-scale DNA origami arrays with arbitrary patterns. *Nature*, 2017, **552**(7683): 67-71
- [25] Kershner R J, Bozano L D, Micheel C M, *et al.* Placement and orientation of individual DNA shapes on lithographically patterned surfaces. *Nat Nanotechnol*, 2009, **4**(9): 557-561
- [26] Zhang T, Neumann A, Lindlau J, *et al.* DNA-based self-assembly of fluorescent nanodiamonds. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, **137**(31): 9776-9779
- [27] Maletinsky P, Hong S, Grinolds M S, *et al.* A robust scanning diamond sensor for nanoscale imaging with single nitrogen-vacancy centres. *Nat Nanotechnol*, 2012, **7**(5): 320-324

Preparation of DNA Origami for Ordered Immobilization of Single Molecules on Diamond Surface*

WEI Yi-Cheng^{1,2)}, YU Pei^{1,2)}, CHEN Ming^{1,2)}, SUN Zi-Ting^{1,2)}, ZENG Yan³⁾, LOU Ji-Zhong³⁾,
CHEN San-You^{1,2)**}, SHI Fa-Zhan^{1,2)**}, DU Jiang-Feng^{1,2)}

⁽¹⁾Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

²⁾CAS Key Laboratory of Microscale Magnetic Resonance and Department of Modern Physics,
University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

³⁾Key Laboratory of RNA Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract In the recent years, the microscopic magnetic resonance technology using nitrogen-vacancy (NV) centers in diamond as quantum sensors has been developed rapidly. The detection of magnetic resonance spectrum of a single biomolecule has been achieved, and it now steps to the study of single molecule's structure and function. Therefore, it is necessary to solve an important technical problem: how to disperse and fix biomolecules on diamond surface orderly. DNA self-assembly provides a possible way to solve this problem. In this paper, 60 nm square double-layer DNA origami was prepared as a kind of single-molecule carrier and then combined to the diamond surface. Firstly, we used the double layer structure to enhance the DNA origami's strength. Secondly, by adding hairpin structure to the edge of DNA origami, the agglomeration between DNA origami was reduced. Finally, the DNA origami was successfully assembled to the diamond surface. The atomic force microscope images showed that the structure was complete and the dispersion was uniform. This work built a foundation for the subsequent application of single-molecule magnetic resonance technology in the field of biophysics.

Key words diamond, DNA origami, single-molecule magnetic resonance, sample preparation

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0208

* This work was supported by grants from The National Key R&D Program of China (2016YFA0502400) and The National Natural Science Foundation of China (81788101, 31600685).

** Corresponding author.

Tel: 86-551-63600469

SHI Fa-Zhan. E-mail: fzshi@ustc.edu.cn

CHEN San-You. E-mail: sanyou@ustc.edu.cn

Received: September 5, 2019 Accepted: October 23, 2019