

基于 DNA/RNA 的逻辑门与逻辑运算

俞洋^①, 陆建华^①, 王东方^②, 裴昊^②, 樊春海^{②*}

① 上海科技管理干部学院电子信息系, 上海 201800;

② 中国科学院上海应用物理研究所物理生物学实验室, 上海 201800

* 联系人, E-mail: fchh@sinap.ac.cn

2012-10-22 收稿, 2012-11-27 接受

摘要 DNA 和 RNA 具有精确的分子识别能力以及强大的信号存储能力. 利用 DNA/RNA 分子的生物学特性来构建分子级别的逻辑门并实现逻辑运算是近年来计算机科学和分子生物学交叉产生的新兴领域, 引起了研究者的广泛关注. 本文介绍了利用 DNA/RNA 分子的酶活性、结构特性来构建逻辑门的方法, 探讨了将单一逻辑门整合成复杂的逻辑运算的途径. 并且对于 DNA/RNA 逻辑门在体外检测和体内诊疗等生物学中的应用进行了介绍, 提出了未来的发展方向.

关键词

逻辑门

DNA 计算

分子识别

自组装

生物计算机

逻辑门是构建计算机的基础. 现代电子计算机使用电气元件来实现逻辑门的操作. 电气元件的类型决定了计算机的性能, 从电子管到晶体管, 从分立元件到集成电路以致微处理器. 每一次改变都促使计算机发生飞跃性的发展. 现代硅基计算机采用二进制系统(1 代表肯定, 0 代表否定), 广泛使用布尔逻辑体系来实现逻辑运算. 实现这些运算的基本法则称之为逻辑门. 例如, 最简单的逻辑门是单个输入对应单个输出. 非门(NOT)将所有接收到的信号值反转, 而是门(YES)则不改变原来的信号值. PASS1 将所有输入信号以 1 输出, 而 PASS0 将所有输入信号以 0 输出. 此外, 二信号输入逻辑门允许有更多运算, 如 AND 门只有当两输入信号均为 1 时才输出 1. 这些简单的逻辑门(单输入, 多输入)可以集成连接起来, 构建出更为复杂的逻辑运算, 如半加器、半减器等(例如半加法器是由一个异或门和与门并联形成, 其中与门的输出构成半加法器的“进”位, 异或门的输出构成半加法器的“和”位, 这两种基本的逻辑门共享相同的输入). 这些广泛应用于硅基计算机逻辑运算概念也可以用生物分子来实现, 即使用功能性生物分子来实现逻辑门的操作. 在生物分子水平, 蛋白质接

收不同的化学输入信号, 并将产物分子输出, 有时蛋白自身的修饰可以看作一种输出. 实际上, 人体就是一台巧夺天工的超级计算机, 在体内分分秒秒进行着大量的逻辑运算, 从而控制生物的新陈代谢、生长、繁殖、应激、行为及思想. 从这个角度出发, 利用生物分子替代电子元件来构建功能强大的生物计算机有巨大的潜力. 目前, 人们已经使用各种各样的生物材料如核酸(DNA/RNA)、酶和其他小分子来构建基本逻辑门^[1-13].

电子计算机处理系统将电子信号转换成二进制信号, 并对每个信号建立起阈值和逻辑转换^[14]. 0 用于代表信号大小低于阈电位, 而 1 代表信号高于阈电位. 通过设计特定电路可以对输入信号(电压)进行操作, 从而实现逻辑转换, 这种特定电路的即为逻辑门. 例如, 如果一个电路对输入的电流信号不产生任何影响, 仅实现一个传递的作用. 输入信号高于阈电位(1), 输出信号也会高于阈电位(1); 同样输入信号低于阈电位的(0), 输出信号也会低于阈电位(0), 这样就是一个肯定逻辑转换. 在否定的逻辑转换中, 其对应的电路处理输入信号的方式相反. 现代微处理器就是将这些标准化的逻辑门电路集成在一起, 用于

引用格式: 俞洋, 陆建华, 王东方, 等. 基于 DNA/RNA 的逻辑门与逻辑运算. 科学通报, 2013, 58: 131-140

Yu Y, Lu J H, Wang D F, et al. DNA/RNA based logic gates and computing (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 131-140, doi: 10.1360/972012-1532

实现各种功能的运算. 现代电子计算机发展的一个瓶颈问题是关于逻辑电路的微型化^[15]. 电子线路的制造主要是通过大规模的自上而下的方式实现电路元件的微型化. 这种方式使工程师们不断地操纵更小尺度的物理元件, 但它受限于 0.1 μm 以下尺度的内在物理定律限制^[16]. 如果能够利用生物分子实现自下而上地构建纳米元件时, 在分子水平处理信息, 那么就将有望设计出比现代计算机更小更强大的分子计算机.

目前, 研究者已证明利用核酸分子(DNA 和 RNA)也可以替代电子元件用于构建逻辑门, 并用于解决复杂的计算问题. 核酸分子在分子计算上的潜力依赖于核酸分子本身可以高度并行性的碱基配对反应^[17]. 核苷以 0.35 nm 的间隔连续排列, 使得 DNA 具有巨大的信息储存密度(1 bit/nm³)^[18], 即 7 Gbits/ft² (1 ft=0.3048 m). DNA 的另一个重要性质是碱基互补组成的双链. 碱基 A 和 T, C 和 G 可以结合起来形成碱基对. 这一基本性质是构成核酸逻辑门以及 DNA 计算机的设计基础. 除此以外, 逻辑门的设计还可以依赖 DNA 分子的其他一些特性, 例如催化活性、链置换以及高级结构等等.

1 基于 DNA 分子的酶活性构建逻辑门

富含鸟嘌呤的核酸可以形成一种叫做 G 四聚体(G-quadruplex)的四重折叠结构, 一般可被单价阳离子如 K⁺和 Na⁺所稳定^[19]. 有些 K⁺依赖的 G 四聚体如 PW17 具有过氧化氢酶的性质, 可以在高铁血红素作为辅因子的情况下催化 H₂O₂ 对 ABTS 的氧化^[20]. 董绍俊课题组^[21]发现 DNA 酶 PW17 的活性可以被 K⁺

增强, 而被 Pb²⁺减弱, Pb²⁺可与 K⁺竞争结合 PW17, 使其释放出底物高铁血红素, 因而 PW17 失去酶活性. 也就是 PW17 可以用来调节它的过氧化氢酶的两种状态——有活性与无活性. 他们设计了一种基于阳离子 Pb²⁺和 K⁺驱动的 G 四聚体 DNA 酶构象变化调节其底物结合及释放的体系, 该体系可以实现 INHIBIT 逻辑门功能. 如图 1, 逻辑门以阳离子 K⁺和 Pb²⁺作为输入信号, 用 420 nm 处的吸收光强度作为输出信号. 在无阳离子存在的条件下(无输入信号), PW17 呈自由卷曲, 无酶活性. 当 K⁺加入时, 诱导其形成平行结构 G 四聚体, 结合高铁血红素, 具有过氧化氢酶活性, 可催化 H₂O₂ 氧化 ABTS, 生成的产物在 420 nm 处有紫外吸收峰(输出为 1). 而当 Pb²⁺加入时, 则会竞争性结合 PW17, 使其发生平行到反平行结构的改变, 这会导致其释放出高铁血红素, 失去酶活性, 因而在 420 nm 处没有吸收峰(输出为 0). 这种 K⁺-Pb²⁺调节的 PW17 逻辑门可以重复利用, 因此 PW17 的酶活性是可调的, 这区别于其他基于 DNA 酶或碱基互补类型的逻辑门.

核酸类酶(DNAzyme 或 RNAzyme), 基于 DNA 分子的严格的碱基互补配对原则, 可以设计出针对不同输入(寡聚核苷酸)产生逻辑响应的不同的结构, 因此这些核酸类酶可用来构建 DNA 逻辑门. 核酸类酶结合特定的寡核苷酸时会改变结构, 激活它的酶活性, 切割修饰荧光染料的底物. 很多研究者使用荧光染料是因为它更易检测, 而且可在很低的浓度进行检测. 荧光强度的大小可说明切割反应是否发生. 两种常用的 DNA 酶是 E6 和 8-17, 它们可以在底物链的任意位置切割. Stojanovic 和 MacDonald 曾用 E6

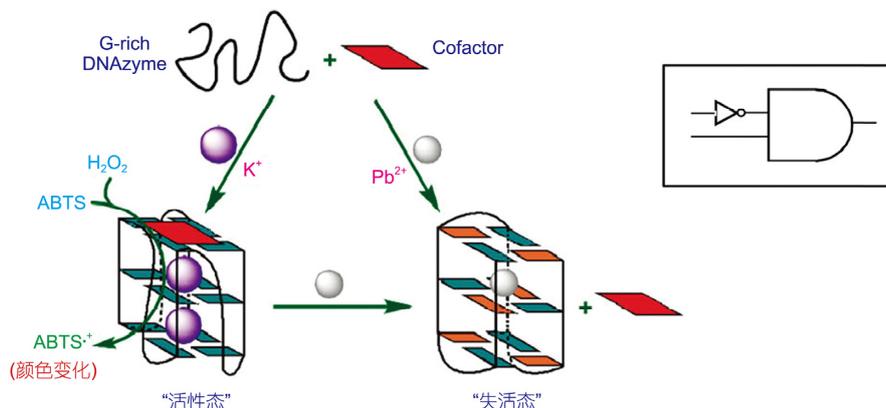


图 1 基于富含 G 的 DNA 酶 PW17 的 INHIBIT 逻辑门, K⁺和 Pb²⁺作为两输入信号吸光度作为输出信号. 右边为 INHIBIT 逻辑门符号^[21]

核酸类酶分别构建了 MAYA I^[22]和 MAYA II^[23]机器. Stojanovic 还曾用 8-17 设计过逻辑门^[24].

核酸类酶(E6 和 8-17)可以切割底物序列内的 rA 处磷脂键. 底物(S)的两端是分别在 5'端标记荧光素供体(F)与 3'端标记四甲基罗丹明受体(R), 正常时由于受到猝灭作用, 荧光素发出荧光的强度很低, 但当底物被切割时, 由于供体与受体分离, 荧光强度在 $\lambda=480\text{ nm}$ 处会提高 10 倍. 核酸类酶的一个特点是可以对其进行模块化设计, 也就是说核酸类酶的控制单元与酶活性单元可以结合起来. 在设计基于核酸类酶的 DNA 逻辑门过程中, 一个常用的方法是使用茎环结构, 它是一段末端包含茎和环结构的 DNA 片段, 当有 DNA 片段结合环结构时会控制整个结构的打开和关闭. 这一效应已用于构建很多逻辑门^[25]. 例如, 可以用一个茎环控制序列与酶活性单元结合起来, 它允许寡核苷酸片段控制酶的活性. 当寡核苷酸片段不存在时, 茎环序列是自身杂交的, 而当与茎环序列互补的寡核苷酸片段输入时, 它便会与茎环序列结合, 使茎环打开. 这种结构上的变化会激活酶的活性, 切割底物. 一般的核酸类酶的底物是 RNA 或者含有至少一个核糖碱基的 DNA, 这会在合成上造成很大的成本. Chen 等人^[26]使用一种核酸类酶, 可以切割 DNA 底物(Cu^{2+} 的 DNA 酶^[27]), 作为设计逻辑门的元件, 并由此设计出的输入信号, 输入信号全部由 DNA 组成.

2 基于 DNA 结构构建逻辑门

Willner 研究组^[28]利用 DNA 镊子结构设计了可重置的逻辑门. 这种逻辑门是基于 pH 诱导的 DNA 镊子开放和关闭结构变化. 当 pH 诱导激活两种并行

的镊子时, 可以进行“SET-RESET”逻辑运算. 首先, 他们利用 DNA 设计一种镊子, 它包括富含 C 的臂, 当与核酸交联片段结合时使其保持关闭状态. 在酸性条件(pH 5.2), 结构臂形成 i-motif 结构, 释放出核酸交联片段, 变成开放状态. 在中性条件(pH 7.2), C 四聚体结构解离, 与核酸交联片段重新结合, 回到关闭状态. 通过改变 pH 在 5.2 与 7.2 之间的变化, 镊子可以在开放与关闭之间互相调节, 在镊子末端上标记荧光素和猝灭剂, 其结构变化引起的能量共振转移作为输出信号. 基于这种设计, 他们用两种镊子来实现 SET-RESET 逻辑门运算. 如图 2, 在 pH=5.2 时, 镊子 A 被诱导形成 C 四聚体, 释放出核酸交联片段, 这种释放出来的核酸交联片段与镊子 B 结合, 这导致镊子 B 的关闭. 而在 pH=7.2 时, 镊子 A 的 C 四聚体解离, 核酸交联片段由 B 转移到 A, 两种镊子的状态分别逆转. pH 在 5.2 与 7.2 之间不断循环, 可实现两镊子状态之间的开关转换. 由于 pH 的改变其实是 H^+ , OH^- 浓度之间的相对变化, 因此, 以 H^+ , OH^- 为输入信号, 荧光强度为输出信号, 便实现了 SET-RESET 逻辑门运算. 刘冬生课题组^[29]还利用光控和 pH 变化, 基于富 C 结构的核苷酸链构建了一种简单的逻辑器件, 实现了 NAND 逻辑功能.

我们研制了一系列基于三维 DNA 纳米结构的新型“DNA 逻辑门”^[30]. 这些逻辑门不仅能够对不同的输入信号产生响应, 从而实现复杂的分子运算, 而且可以主动穿过细胞膜, 进入活细胞内实现生物分子成像(图 3). 特定的 DNA 序列可以自组装成结构规整的四面体结构, 在这些规整的 DNA 四面体纳米结构中整合进一些特定的 DNA 识别序列(如 i-motif, 核酸适配体等), 可以在输入特定信号(如 H^+ , ATP, Hg^{2+} 等

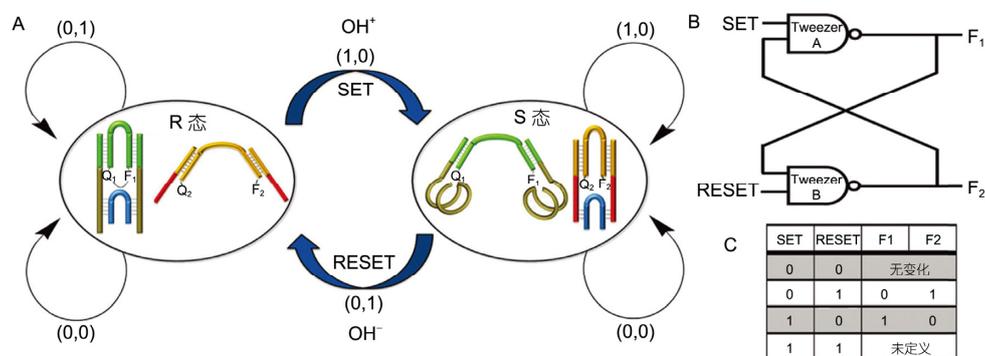


图 2 使用两种镊子实现 SET-RESET 逻辑运算(A)、SET-RESET 系统的逻辑门回路(B)及 SET-RESET 逻辑门真值表(C)^[28]

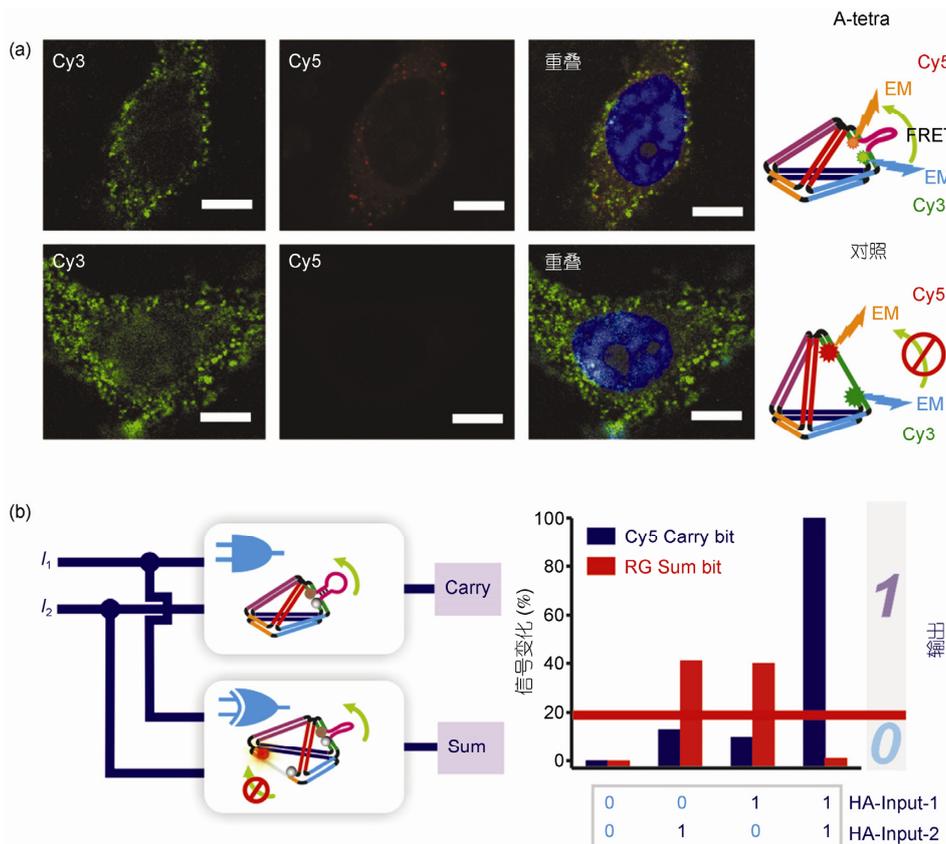


图3 A-tetra 对 ATP 分子响应的 DNA 四面体结构对细胞内 ATP 分子的响应(a)和基于三维 DNA 纳米结构的 DNA 逻辑门集成形成的半加法器(b)^[30]

分子和离子)时使 DNA 四面体结构的构型发生变化。在这种结构中的特定位置上修饰上能量转移荧光分子, 可以产生荧光的输出信号。基于这种设计, 不仅可以实现“YES”, “NO”等逻辑判断, 并且可以构建出基本的逻辑门(INH, XOR, AND, OR)。这些逻辑门可以集成在一起, 还可以实现更为复杂的分子运算(如半加法器)。此外, 研究表明这种三维 DNA 纳米结构具有高的细胞穿透性、生物相容性及稳定性^[31], 因此这种三维 DNA 结构的逻辑门可以进入到活细胞内, 对胞浆内的一些化学分子(如 ATP)产生特定的逻辑响应, 从而实现了活细胞内的分子成像。这种基于三维 DNA 纳米结构的逻辑门为实现智能载药系统提供新的可能。

3 基于 RNA 分子的逻辑门

RNA 在生物体内起着非常重要的作用, 早期 RNA 被用于 DNA 计算实验^[32], 而现在人们认识到 RNA 的信息储存功能与可以在体内合成使得 RNA 成为

构建体内计算机的理想材料^[33,34]。而且, 很多最近发现的与 RNA 有关的体内调节机制使得它成为逻辑回路中的功能最多样的元件。

涉及的 RNA 生物调节机制是多种的^[33,35], 如核酸调节子(ribo regulator)、核糖体开关(riboswitch), 小 RNA 干扰、反义序列和核酶等。自然界里的核糖体开关是定位在所调节的 mRNA 5'非转录区域的一小段 mRNA 转录物, 在基态里可局部形成稳定结构^[36,37]。它可促使控制的 mRNA 翻译蛋白质, 也可以阻止翻译。典型的核糖体开关包含两个功能结构: 核酸适配体结构和表达控制结构, 前者能够结合配体, 后者可调节基因表达。核糖体开关的构象可以被一些外来信号如温度、小分子或其他 RNA 分子改变^[38]。当与这些输入信号作用后, 核糖体开关就会变成激活态, 这种激活态会改变蛋白质的表达的状态, 如从 off 到 on, 或从 on 到 off。这种激活态是可逆的, 或者当变成激活的核酶时会自我切割。更为重要的是, 单个核糖体开关可被多个输入信号调控, 或

者多个核糖体开关可以调控同一个信使 RNA(mRNA). 这两种形式和他们的组合使得他们被用来设计更复杂的调节过程和逻辑回路^[39].

Breaker 研究组^[39]发现芽孢杆菌 *clausii* 中 *metE* 基因 mRNA 的表达是被其 5'端两个串联的核糖体开关调控的, 它们可分别结合 S-腺苷甲硫氨酸和辅酶 B12. 这种串联的核糖体开关结构是一种天然的 NOR 逻辑门. 原理是当至少一个输入信号存在时, 那么也至少有一个 riboswitch 会结合底物, 诱导自身构象变化, 阻止 mRNA 表达, 输出信号为 0. 只有当输入信号均不存在时, 输出蛋白才能正常表达. Smolke 等人^[40-42]深入研究了核糖体开关体内逻辑回路. 他们将报告基因 mRNA 与一些核糖体开关连接在一块, 这些核糖体开关可以响应一些小分子输入信号, 并由此设计出很多二信号输入逻辑门. 因为核糖体开关可以串联整合并且核糖体开关开和关可以与信号传导呈正或负相关, 这种框架可以接收更多的输入信号, 以达到体内计算的目的. 但是, 如何避免输入信号之间以及其他体内代谢物的干扰应该得到解决, 才能充分发挥出体内计算的功能.

另一种 RNA 调控机制是小 RNA 干扰. RNA 干扰一直是高等生物体内的重要的调节机制^[43]. 这种机制让细胞在 mRNA 水平降低基因表达水平. 指导 RNA 干扰的是一些长度大约 20 个碱基与调节基因 mRNA 互补的小 RNA 分子. 这些小 RNA 分子可以是小干扰 RNA(siRNA), 小发夹 RNA(shRNA)或微小 RNA (microRNA). 小干扰 RNA 是人工合成的 20 个碱基的 RNA 双链, 可以被外源注入细胞. 小发夹 RNA 是带有大约 20 个碱基长的茎状结构和 5~20 个碱基的环状结构. 他们可以外源注入细胞, 也可以体内表达. 微小 RNA 是 RNA 干扰中的自然调节成分. miRNA 是在细胞内转录产生, 最初源于一个包含发夹结构的 RNA 转录物, 经过切割后变成大约 20 个碱基的单链 RNA, 它被 RISC 蛋白复合物摄入, 用于降低靶基因的表达. 合成的 miRNA 基因也可以用于基因调节.

RNAi 是对互补核酸分子反应的小干扰 RNA. 靶分子存在与否决定了 siRNA 分子是否可抑制基因表达^[44]. 2007 年 Benenson 研究组^[45]使用 RNAi 机制设计了多个逻辑门. 他们将输出蛋白 Zs Yellow 的 mRNA 3'非编码区插入两种不同的 siRNA 靶序列, 使他们受控于两对 siRNA. 然后他们将内源输入信

号与 siRNA 分子建立抑制关系, 即输入信号存在时抑制 siRNA 分子行使功能. 这样只有当两种内源输入信号同时存在时才能完全抑制 siRNA 分子, 输出蛋白 Zs Yellow 的 3'端不被降解而能正常表达; 而只有一种输入信号或无信号时, siRNA 分子会通过 RISC 复合体将输出蛋白 mRNA 降解, 输出蛋白不能表达. 这种关系对应于 AND 逻辑门. 另外, Benenso 研究组^[46]设计出一种生物传感器, 将体内 mRNA 信号通过 RNA 单链交换转换成小干扰 RNA, 然后将这种传感器与 RNAi 计算单元偶联起来, 用于评估对 mRNA 浓度的二信号逻辑功能.

4 多种分子逻辑门的整合

逻辑门的整合对实现复杂的逻辑运算是非常必要的. 现代电子计算机的成功依赖于逻辑运算单元的高度集成, 这些电子元件能够很好地集成连接起来的一个重要前提条件是输入和输出信号的一致性(均为电子). 这些标准化的逻辑门有规律地连接起来形成多级回路, 可以协同处理数据输出最终的结果. 然而, 核酸逻辑门元件的整合却不太容易. 很多核酸逻辑门的输入信号与输出信号并不相同, 这样一个逻辑门的输出信号不能成为下一逻辑门的输入信号, 因此各个逻辑门之间不能连接起来构成回路. 这对以后研究如何构建大规模集成生物电路造成严重挑战^[47].

构建 DNA 逻辑门和多级回路需要建立在合适的基础上. 基于前面的讨论, 目前比较合适的主要有基于 DNA 酶的逻辑门和基于单链置换的逻辑门. 基于 DNA 酶的逻辑门可以接受小片段单链核酸输入信号, 根据布尔逻辑组合, DNA 酶会切割荧光修饰底物序列^[22-24,26,48-54]. 由于一个特定的逻辑门只需更改输入片段信号和 DNA 酶的互补区域, 这将有利于构建包含大量逻辑门的一级网络^[52,54]和基于逻辑回路的二级网络^[49,52]. 另外, 基于单链置换的 DNA 识别原理也可以用于构建可整合的 DNA 逻辑门^[55-57]. 在单链置换时, 全互补的单链结合双链的一个末端并通过分支迁移机制将另一条短的杂交链置换掉. 这种机制曾用于构建分子镊子, DNA walker 等分子机器^[54,55]. 这种原理在设计 DNA 逻辑门时很有用, 因为单链置换过程的输入信号与输出信号都是单链 DNA. 逻辑真值可以根据每种 DNA 单链的浓度分别代表 1 和 0.

前面已经提出使用 DNA 酶的逻辑门通过使用并行运算的方法实现了复杂逻辑运算^[24]. Winfree 课题组^[58]提出一种方法有望解决逻辑门之间的兼容性问题. 他们同样使用寡核苷酸作为输入和输出信号, 这样可保证设计的逻辑门能够级联放大形成多层逻辑回路, 为设计更复杂的 DNA 计算机打下基础. 每个逻辑门包含一个或多个逻辑门单链 DNA 和一个输出信号 DNA. 输出链可以成为下游逻辑门的输入信号, 以便把相邻的逻辑单元连接起来.

在 2011 年, Winfree 课题组在大规模分子电路计算方面取得了新的突破, 分别在 *Science* 和 *Nature* 杂志上发表论文. 基于级联放大的 DNA 链置换反应, 钱璐璐与 Winfree^[59]在试管内利用 DNA 分子构建出目前最为复杂的人工生化电路. 他们将现代硅基计算机中的概念应用到 DNA 分子计算中, 其中最复杂的一个涉及了 74 种不同的 DNA 分子, 可以计算一个小于 15 的整数的平方根. 此外, 他们还创造性地利用 112 种不同的 DNA 链设计组成 4 个相互联系的人工神经元以构造具有人工智能的神经网络^[60].

5 DNA/RNA 逻辑门的应用

简单的生物检测是有或无的判断, 复杂的医疗诊断多因素的逻辑判断, 这些简单抑或复杂的检测分析诊断实际上就是逻辑判断, 因此生物逻辑门或逻辑电路可以用于生物检测. 如果将待检测物浓度设定某一阈值, 用逻辑门判断输出真或假, 这样可用

逻辑门来检测离子和生物样品. 可喜的是, 在这方面已经有不少研究, 并取得了一定的进展^[61-66]. 另外, 逻辑门用于检测的优势在于它可以多重检测, 例如两位输入逻辑门 AND, OR 门可以同时检测两种物质, 而加法器则可以检测 3 种物质, DNA 逻辑门用于检测将有助于推动分析化学和生物传感器等领域的进一步发展.

Willner 等人^[62]设计了一种可以检测 Hg^{2+} 和 Ag^+ 的逻辑门. Hg^{2+} 和 Ag^+ 都是金属离子, 它们的废弃物会对环境造成严重污染, 并对人体产生严重的健康威胁, 因此快速而有效地检测这些金属离子是非常重要的. 人们发现 Hg^{2+} 可以与胸腺嘧啶碱基形成桥联, 而 Ag^+ 则可以与胞嘧啶桥联. 这些性质可以帮忙人们设计新的方法来检测 Hg^{2+} 与 Ag^+ . Willner 课题组使用了富含 T 或 C 修饰的量子点通过转移猝灭途径来检测 Hg^{2+} 和 Ag^+ . 如图 4, 他们将 Hg^{2+} 与 Ag^+ 作为输入信号, 而将 CdSe/ZnS QDs 的荧光信号作为检测的输出信号. 直径为 3.8 nm 的 CdSe/ZnS QDs ($\lambda_{em}=560$ nm, QD₅₆₀) 用富含胸腺嘧啶的核酸片段修饰, 直径为 5.8 nm 的 CdSe/ZnS QDs ($\lambda_{em}=620$ nm, QD₆₂₀) 用富含胞嘧啶的核酸片段修饰. 当有 Hg^{2+} 或 Ag^+ 存在时, 他们就会与相应的核酸片段结合成发夹结构, Hg^{2+} 或 Ag^+ 与 QDs 的距离会变得很近. 由于受到 Hg^{2+} 或 Ag^+ 的电子转移猝灭作用, QDs 的荧光强度会显著下降. 而且, 随着离子浓度的增加, QDs 的荧光下降是呈正相关的. 如果将上述各自修饰相应的核酸片

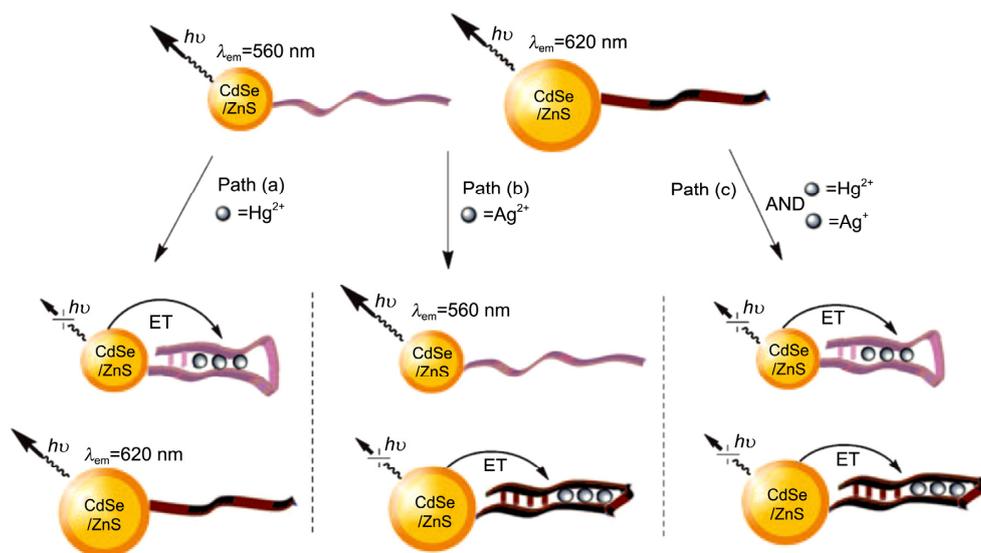


图 4 基于 Hg^{2+} 和 Ag^+ 对 QD 电子转移猝灭机制的 AND 逻辑门^[80]

段的两种不同直径的 CdSe/ZnS QDs 同时混合在一起, 就会形成一种 AND 逻辑门. 这里, 他们将 Hg^{2+} 与 Ag^+ 作为输入信号, 在 $\lambda=560\text{ nm}$ 或 $\lambda=620\text{ nm}$ 处的荧光猝灭作为 false 输出信号, 而在两波长处的同时猝灭作为 true 输出信号. 如图 4 所示, 当 Hg^{2+} 存在时, Hg^{2+} 会与 3.8 nm 的 CdSe/ZnS QDs 上修饰的核酸片段中的胸腺嘧啶形成桥联, 核酸片段也会形成发夹结构. 由于距离比较近, Hg^{2+} 与 QDs 之间的电子转移使直径为 3.8 nm 的 QDs 荧光激发受抑, 波长在 560 nm 处的荧光强度下降. 但由于 Ag^+ 不存在, 因此, 620 nm 处的荧光强度仍保持在原来水平, 输出信号为 0. 同样, 当只有 Ag^+ 存在时, 输出信号也为 0. 但当两离子同时存在时, 560 与 620 nm 处的荧光强度同时下降, 输出信号为 1. 假如将两种富含胸腺嘧啶与富含胞嘧啶的核酸片段同时修饰在两种不同直径的 CdSe/ZnS QDs 上, 就构成了 OR 逻辑门. 这时, 即使只有一种离子存在, 两种 CdSe/ZnS QDs 的荧光发射也会被同时抑制, 输出为 1.

逻辑门构建的生物传感器还可以与药物释放偶联起来, 将疾病标记物当作逻辑门的输入信号, 而药物则当作输出信号. 当疾病标记物存在时, 逻辑门会判断是否将药物释放出来, 则可以在适当的靶位点产生药效, 可以起到定向给药的作用. 这种给药方式是一种智能的药物释放方式. Kolpashchikov 和 Stojanovic^[49] 曾设计一种逻辑门用于控制药物释放. 这种逻辑门包括计算单元和药物释放单元, 可以通过荧光信号来判断是否存在疾病标记物并进行药物定位释放. Shapiro 研究组^[67] 则提出用 DNA 计算的方式选择性地控制释放基因药物来控制致病基因的表达水平. 他们设计的 DNA 计算包括 3 个部分, 一个是信号输入部分, 用于鉴定疾病标志物的水平; 中间的是计算部分, 用于判断是否有疾病发生; 第三部分是输出部分, 用于控制药物的释放. 这里用的药物是 ssDNA, 它是与致病基因互补的一小段单链 DNA. 通常, 一种疾病会伴随几种基因 mRNA 水平的变化, 例如, 在前列腺癌发生时会有 PPAP2B 和 GSTP1 基因是低表达的, 而 PIM1 与 HPN 基因是高表达的, 因

此, 在诊断疾病的时候要考察相关 mRNA 的表达高低. 计算的初始状态是肯定状态, 如果它在判定结束的时候仍是肯定的话就认为是肯定的, 否则则认为是否定的.

6 结论与展望

基于核酸的分子计算经历了不到 20 年的发展, 取得了丰硕的成果. DNA 计算作为一个新兴的研究领域, 它是通过 DNA 分子生物化学性质来实现逻辑运算功能的. 由于 DNA 计算机是纳米尺度的分子计算机, 在很小的体积内可以实现极大数量的 DNA 分子, 因此其拥有无与伦比的并行计算能力. 利用 DNA 分子替代电气元件构建逻辑电路已经展现出非同寻常的发展潜力. 即便如此, DNA 计算也是饱受争议的, 由于 DNA 计算机的可靠性、灵活性和可操作性等方面存在一些问题, 我们很难预期 DNA 计算机是否真的可以实现如现代硅基计算机的功能. 或许我们需要从另外一个角度来看, DNA 计算机并非作为电子计算机的竞争者或替代品出现, 它与电子计算机的功能可能是互补的. 例如, 体内逻辑门及计算机是现代计算机所无可比拟的^[68], 体内逻辑门可以参与代谢物分析、疾病诊断以及治疗.

DNA 计算领域的重大突破应该发生在利用可能性大规模并行处理, 高存储密度和自然现象固有的纳米结构来解决计算的问题. 真正将 DNA 计算应用到实际用途上, 这对目前的科学、工程和技术都是一个巨大的挑战. 体内或体外生化电路的编码和设计可以转化成使用化学和纳米材料的产业. 信息和算法我们可以认为是生物组织及过程的核心, 从存储和再现的遗传发育过程到神经系统进行复杂信息控制. 生物组织利用生化电路来控制分子化学反应, 这非常类似于一些人类发展的科技, 例如为处理器控制机电装置. 现代分子生物学已经从理论上证明了建造生化电路的可能性, 但目前实现可能的编程算法的生化电路仍处于起步研究阶段, 迫切需要研究者在思路进一步创新并且与产业界结合起来共同研发.

参考文献

- 1 Zhou J, Arugula M A, Halamek J, et al. Enzyme-based NAND and NOR logic gates with modular design. *J Phys Chem B*, 2009, 113: 16065-16070

- 2 Budyka M F. Molecular photonic logic gates. *High Energy Chem*, 2010, 44: 121–126
- 3 Privman V, Pedrosa V, Melnikov D, et al. Enzymatic AND-gate based on electrode-immobilized glucose-6-phosphate dehydrogenase: Towards digital biosensors and biochemical logic systems with low noise. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25: 695–701
- 4 Niazov T, Baron R, Katz E, et al. Concatenated logic gates using four coupled biocatalysts operating in series. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 17160–17163
- 5 Privman M, Tam T K, Pita M, et al. Switchable electrode controlled by enzyme logic network system: Approaching physiologically regulated bioelectronics. *J Am Chem Soc*, 2008, 131: 1314–1321
- 6 Mu L, Shi W, She G, et al. Fluorescent logic gates chemically attached to silicon nanowires. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 3469–3472
- 7 Amir L, Tam T K, Pita M, et al. Biofuel cell controlled by enzyme logic systems. *J Am Chem Soc*, 2008, 131: 826–832
- 8 Miyoshi D, Inoue M, Sugimoto N. DNA logic gates based on structural polymorphism of telomere DNA molecules responding to chemical input signals. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 7716–7719
- 9 Szaciłowski K, Macyk W, Stochel G. Light-driven OR and XOR programmable chemical logic gates. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 4550–4551
- 10 Baytekin H T, Akkaya E U. A molecular NAND gate based on Watson-Crick base pairing. *Org Lett*, 2000, 2: 1725–1727
- 11 Weizmann Y, Elnathan R, Lioubashevski O, et al. Endonuclease-based logic gates and sensors using magnetic force-amplified readout of DNA scission on cantilevers. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12666–12672
- 12 Desilva A P, Gunaratne H Q N, McCoy C P. A molecular photoionic and gate based on fluorescent signaling. *Nature*, 1993, 364: 42–44
- 13 Silvi S, Constable E, Housecroft C, et al. All-optical integrated logic operations based on chemical communication between molecular switches. *Chem–Eur J*, 2009, 15: 178–185
- 14 de Silva A P, McClenaghan N D. Molecular-scale logic gates. *Chem–Eur J*, 2004, 10: 574–586
- 15 Balzani V, Credi A, Venturi M. Molecular logic circuits. *ChemPhysChem*, 2003, 4: 49–59
- 16 Muller D A, Sorsch T, Moccio S, et al. The electronic structure at the atomic scale of ultrathin gate oxides. *Nature*, 1999, 399: 758–761
- 17 Ezziane Z. DNA computing: Applications and challenges. *Nanotechnology*, 2006, 17: R27
- 18 Chen J, Wang Y, Deaton R. Large scale genomic monitoring or profiling using a DNA-based memory and microarrays. 24th Army Science Conference, Orlando, FL, USA, 2004
- 19 Sen D, Gilbert W. A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA. *Nature*, 1990, 344: 410–414
- 20 Sen D, Geyer C R. DNA enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, 2: 680–687
- 21 Li T, Wang E K, Dong S J. Potassium-lead-switched G-quadruplexes: A new class of DNA logic gates. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 15082–15084
- 22 Stojanovic M N, Stefanovic D. A deoxyribozyme-based molecular automaton. *Nat Biotech*, 2003, 21: 1069–1074
- 23 Macdonald J, Li Y, Sutovic M, et al. Medium scale integration of molecular logic gates in an automaton. *Nano Lett*, 2006, 6: 2598–2603
- 24 Stojanovic M N, Mitchell T E, Stefanovic D. Deoxyribozyme-based logic gates. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 3555–3561
- 25 Elbaz J, Lioubashevski O, Wang F, et al. DNA computing circuits using libraries of DNAzyme subunits. *Nat Nano*, 2010, 5: 417–422
- 26 Chen X, Wang Y, Liu Q, et al. Construction of molecular logic gates with a DNA-cleaving deoxyribozyme. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 1759–1762
- 27 Carmi N, Shultz L A, Breaker R R. *In vitro* selection of self-cleaving DNAs. *Chem Biol*, 1996, 3: 1039–1046
- 28 Elbaz J, Wang Z G, Orbach R, et al. pH-Stimulated concurrent mechanical activation of two DNA “Tweezers”. A “Set-Reset” logic gate system. *Nano Lett*, 2009, 9: 4510–4514
- 29 Liu H J, Zhou Y C, Yang Y, et al. Photo-pH dually modulated fluorescence switch based on DNA spatial nanodevice. *J Phys Chem B*, 2008, 112: 6893–6896
- 30 Pei H, Liang L, Yao G, et al. Reconfigurable three-dimensional DNA nanostructures for the construction of intracellular logic sensors. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 124: 9154–9158
- 31 Li J, Pei H, Zhu B, et al. Self-assembled multivalent DNA nanostructures for noninvasive intracellular delivery of immunostimulatory CpG oligonucleotides. *ACS Nano*, 2011, 5: 8783–8789
- 32 Faulhammer D, Cukras A R, Lipton R J, et al. Molecular computation: RNA solutions to chess problems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 1385–1389
- 33 Isaacs F J, Dwyer D J, Collins J J. RNA synthetic biology. *Nat Biotech*, 2006, 24: 545–554
- 34 Kramer B P, Fischer C, Fussenegger M. BioLogic gates enable logical transcription control in mammalian cells. *Biotechnol Bioengin*, 2004, 87: 478–484
- 35 Bok J W, Chiang Y M, Szewczyk E, et al. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 462–464
- 36 Mandal M, Boese B, Barrick J E, et al. Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell*, 2003, 113: 577–586

- 37 Winkler W C, Breaker R R. Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu Rev Microbiol*, 2005, 59: 487–517
- 38 Isaacs F J, Dwyer D J, Ding C, et al. Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nat Biotech*, 2004, 22: 841–847
- 39 Sudarsan N, Hammond M C, Block K F, et al. Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions. *Science*, 2006, 314: 300–304
- 40 Bayer T S, Smolke C D. Programmable ligand-controlled riboregulators of eukaryotic gene expression. *Nat Biotech*, 2005, 23: 337–343
- 41 Win M N, Smolke C D. A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 14283–14288
- 42 Win M N, Smolke C D. Higher-order cellular information processing with synthetic RNA devices. *Science*, 2008, 322: 456–460
- 43 Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806–811
- 44 An C I, Trinh V B, Yokobayashi Y. Artificial control of gene expression in mammalian cells by modulating RNA interference through aptamer-small molecule interaction. *RNA*, 2006, 12: 710–716
- 45 Rinaudo K, Bleris L, Maddamsetti R, et al. A universal RNAi-based logic evaluator that operates in mammalian cells. *Nat Biotech*, 2007, 25: 795–801
- 46 Xie Z, Liu S J, Bleris L, et al. Logic integration of mRNA signals by an RNAi-based molecular computer. *Nucl Acid Res*, 2010, 38: 2692–2701
- 47 Szaciłowski K. Molecular logic gates based on pentacyanoferrate complexes: From simple gates to three-dimensional logic systems. *Chem–Eur J*, 2004, 10: 2520–2528
- 48 Stojanovic M N, Stefanovic D. Deoxyribozyme-based half-adder. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 6673–6676
- 49 Kolpashchikov D M, Stojanovic M N. Boolean control of aptamer binding states. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 11348–11351
- 50 Tabor J J, Ellington A D. Playing to win at DNA computation. *Nat Biotech*, 2003, 21: 1013–1015
- 51 Macdonald J, Stefanovic D, Stojanovic M N. Solution-phase molecular-scale computation with deoxyribozyme-based logic gates and fluorescent readouts. In: Didenko V V, ed. *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes*, Vol. 335. New York: Humana Press, 2006. 343–363
- 52 Penchovsky R, Breaker R R. Computational design and experimental validation of oligonucleotide-sensing allosteric ribozymes. *Nat Biotech*, 2005, 23: 1424–1433
- 53 Stojanovic M N, Semova S, Kolpashchikov D, et al. Deoxyribozyme-based ligase logic gates and their initial circuits. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 6914–6915
- 54 Lederman H, Macdonald J, Stefanovic D, et al. Deoxyribozyme-based three-input logic gates and construction of a molecular full adder. *Biochemistry*, 2006, 45: 1194–1199
- 55 Yurke B, Turberfield A J, Mills A P, et al. A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. *Nature*, 2000, 406: 605–608
- 56 Reynaldo L P, Vologodskii A V, Neri B P, et al. The kinetics of oligonucleotide replacements. *J Mol Biol*, 2000, 297: 511–520
- 57 Zhang C, Yang J, Xu J. Circular DNA logic gates with strand displacement. *Langmuir*, 2010, 26: 1416–1419
- 58 Seelig G, Soloveichik D, Zhang D Y, et al. Enzyme-free nucleic acid logic circuits. *Science*, 2006, 314: 1585–1588
- 59 Qian L L, Winfree E. Scaling up digital circuit computation with DNA strand displacement cascades. *Science*, 2011, 332: 1196–1201
- 60 Qian L, Winfree E, Bruck J. Neural network computation with DNA strand displacement cascades. *Nature*, 2011, 475: 368–372
- 61 Moshe M, Elbaz J, Willner I. Sensing of UO^{2+} and design of logic gates by the application of supramolecular constructs of ion-dependent DNazymes. *Nano Lett*, 2009, 9: 1196–1200
- 62 Freeman R, Finder T, Willner I. Multiplexed analysis of Hg^{2+} and Ag^+ ions by nucleic acid functionalized CdSe/ZnS quantum dots and their use for logic gate operations. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 7818–7821
- 63 Bi S, Yan Y, Hao S, et al. Colorimetric logic gates based on supramolecular DNazyme structures. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 4438–4442
- 64 Pistol C, Mao V, Thusu V, et al. Encoded multichromophore response for simultaneous label-free detection. *Small*, 2010, 6: 843–850
- 65 Kolpashchikov D M. A binary deoxyribozyme for nucleic acid analysis. *ChemBioChem*, 2007, 8: 2039–2042
- 66 Xia F, Zuo X, Yang R, et al. Label-free, dual-analyte electrochemical biosensors: A new class of molecular-electronic logic gates. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 8557–8559
- 67 Benenson Y, Gil B, Ben-Dor U, et al. An autonomous molecular computer for logical control of gene expression. *Nature*, 2004, 429: 423–429
- 68 Benenson Y. RNA-based computation in live cells. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20: 471–478

DNA/RNA based logic gates and computing

YU Yang¹, LU JianHua¹, WANG DongFang², PEI Hao² & FAN ChunHai²

¹Department of Electronics and Information Technology, Shanghai Institute of Science & Technology Management, Shanghai 201800, China;

²Laboratory of Physical Biology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Science, Shanghai 201800, China

DNA and RNA molecules possess precise recognition and powerful signal storage abilities. By exploiting their biological properties, it is possible to construct molecule-scale logic gates and realize logistic operations which, as an emerging multidisciplinary area between computer sciences and molecular biology, has intrigued great research attention. In this article, we summarize methods to construct logic gates by exploiting enzymatic and structural properties of DNA and RNA, and approaches to integrate logic gates into complex logistic operations. Finally, we introduce biomedical applications of DNA/RNA logic gates for *in-vitro* detection and *in-vivo* diagnosis and therapy.

logic gate, DNA computing, molecular recognition, self-assemble, bio-molecular computer

doi: 10.1360/972012-1532