

基于序列信息高度集成的长单链 DNA 自组装及制备

贾友礼^{1,2}, 顾宏周^{1,2*}

1. 复旦大学附属肿瘤医院, 上海 200032;

2. 复旦大学生物医学研究院, 上海 200032

* 联系人, E-mail: hongzhou.gu@fudan.edu.cn

2018-08-16 收稿, 2018-09-09 修回, 2018-09-13 接受, 2018-10-11 网络版发表

摘要 DNA折纸术(DNA origami)是DNA纳米自组装的一种主流方法, 通常1条DNA主链在成百上千条合成的DNA短链辅助下, 通过碱基互补配对原则折叠并锁定生成所设计的纳米结构. 单链DNA折纸术(single-stranded DNA origami, ssDNA origami)是传统DNA折纸术的一种进化和衍生, 它摒除了传统折纸术对众多短序列的需求, 通过高度集成序列信息至1条长单链DNA中, 实现了由1条DNA序列自组装成复杂可控的纳米结构. 由于体系中不存在过量的短DNA链杂质, 并且同样可以顺利移植成单链RNA折纸术, 单链DNA折纸术较传统DNA折纸术可能具备更好的生物和材料应用前景. 本文概括了长单链DNA自组装的研究进展, 总结了几种常用的长单链DNA制备的方法, 并展望了该技术的应用前景.

关键词 DNA 纳米自组装, 单链 DNA 折纸术, 长单链 DNA 制备, 噬菌体

自20世纪80年代由Seeman^[1,2]提出DNA纳米自组装的概念以来, 经过近40年的发展, DNA纳米技术已逐渐成为一门新兴的交叉学科. DNA纳米技术的快速发展离不开几个里程碑事件: 包括组装Holliday交叉结(immobile Holliday junction, HJ)^[2]——将DNA拓展为二维纳米材料, 组装二维^[3]和三维^[4]框架型DNA晶体——证明了DNA具备多层次组装的能力; 而二维^[5]和三维^[6]DNA折纸术的出现更是突破了由模块化的单元自组装成更大结构的传统策略^[3,4], 将DNA纳米自组装推向了更高的层次^[7].

在DNA折纸术中, 一条长单链DNA(通常为M13mp18噬菌体基因序列, 约包含7000个碱基)被设计并折叠成一定的路径穿梭于目标构型的内部, 形成一个骨架^[5]. 随后, 多达几百甚至于上千条合成的短链DNA序列, 通过预先设计的与骨架之间的碱基互补配对作用, 像订书钉一样将长链DNA骨架固定成设计的构型. 这种组装技术可制备粒径在100 nm

左右的各种各样的DNA纳米结构, 一系列围绕折纸术诞生的电脑辅助软件^[8-13]也大大简化了序列信息和结构的设计过程. 此外, DNA折纸术中去除了模块化组装中严格的化学计量限制, 采用过量摩尔比的短链DNA, 整个制备过程中不需要对组分链进行预纯化, 在降低工作量的同时也为DNA纳米结构的制备提供了极大的便利性.

DNA折纸术的发明为DNA纳米技术的普及和应用带来了一个跨越式的发展. 从人造的DNA仿生细胞膜纳米器件^[14,15]到DNA纳米框架介导的生物矿化^[16], 甚至于可集成环境响应型的高度智能化的DNA纳米机器人^[17,18], 基于DNA折纸术的DNA纳米技术已在生物物理、生物材料和生物医药等多个领域都展现出了巨大的潜力. 在DNA折纸术得到迅速发展的同时, 它的一些缺点也逐渐显现出来^[19]: 制备过程中所需要合成的成百上千条的DNA短链使得单个折纸结构的成本偏高; 所合成的DNA短链中若有

引用格式: 贾友礼, 顾宏周. 基于序列信息高度集成的长单链 DNA 自组装及制备. 科学通报, 2019, 64: 1008–1017

Jia Y L, Gu H Z. Programming and preparing long single-stranded DNA with highly integrated sequence information for the self-assembly of DNA nanostructures (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1008–1017, doi: 10.1360/N972018-00856

部分质量或者浓度不达标,虽然可能不会影响整个折纸构型,但在一定程度上可能会降低折纸构型局部的分辨率;另外,难以在保证产率的前提下却又很好地将完整的折纸结构与过量的DNA短链分离纯化出来.以上这些缺点都在一定程度上阻碍了DNA折纸术在生命科学和材料科学中的诸多应用和发展.

2017年,长单链DNA折纸术的出现让我们看到了突破传统折纸术的部分瓶颈的希望^[20].在这项新的设计技术里,组装DNA折纸结构不再需要大量的DNA短链辅助,所有的用于折叠和固定结构的序列全部被编辑整合到一条长的单链DNA里.经简单的变性-复性步骤,这条长链发生分子内自我折叠和碱基配对,组装成目的结构.由于不存在DNA短链的辅助,且所有序列信息都集成在一起,某个局部信息丢失的几率极低,长单链DNA折纸术可能在制备纯度更高、分辨率也更高的DNA纳米结构上比传统折纸术具备更多的优势.本文将概括单链DNA折纸术的发展历程,总结单链DNA的制备方法,并展望此新技术的发展和应用前景.

1 单链折叠纳米结构的回顾

众所周知,我们通常说的B-DNA是一种双螺旋

结构,呈一维线性态(图1(a)).在DNA纳米技术中,通过稳定的交互式的HJ结点,多个双链DNA可以被捆绑起来形成新的模块,其中的代表包括DX模块(double crossover)^[21]和PX模块(paranemic crossover)^[22](图1(a)).这些DNA模块的出现不仅将DNA从一维材料拓展成二维,也在纳米尺度上增强了DNA的刚性.在PX模块中,2个紧靠在一起的双螺旋DNA中同极性的DNA链之间所有可交互的部位均被HJ结点连接起来.与DX模块不一样的是,当模块中含有偶数个HJ结点时,PX可被看作2条内含部分螺旋结构的环状单链DNA通过相互之间的碱基互补配对作用堆积绑定生成^[22,23](图1(b));而当HJ结点为奇数个时,PX可进一步由1条单链DNA自我配对形成^[24](图1(c)).早在2007年,Yan课题组和Seeman课题组^[24]合作证明了可通过滚环复制扩增(rolling circle amplification, RCA)的方式在体外制备并放大由1条单链DNA自组装成的PX结构(图1(c)),随后他们再次证明这样的PX结构同样可在体内通过噬菌体的复制放大出来^[25].这些工作开启了由一条单链DNA构建组装复杂DNA纳米结构的先河.

当然,用一条单链DNA去组装纳米结构并不局限于PX结构.正四面体(Tetrahedron)^[26]和三棱锥结

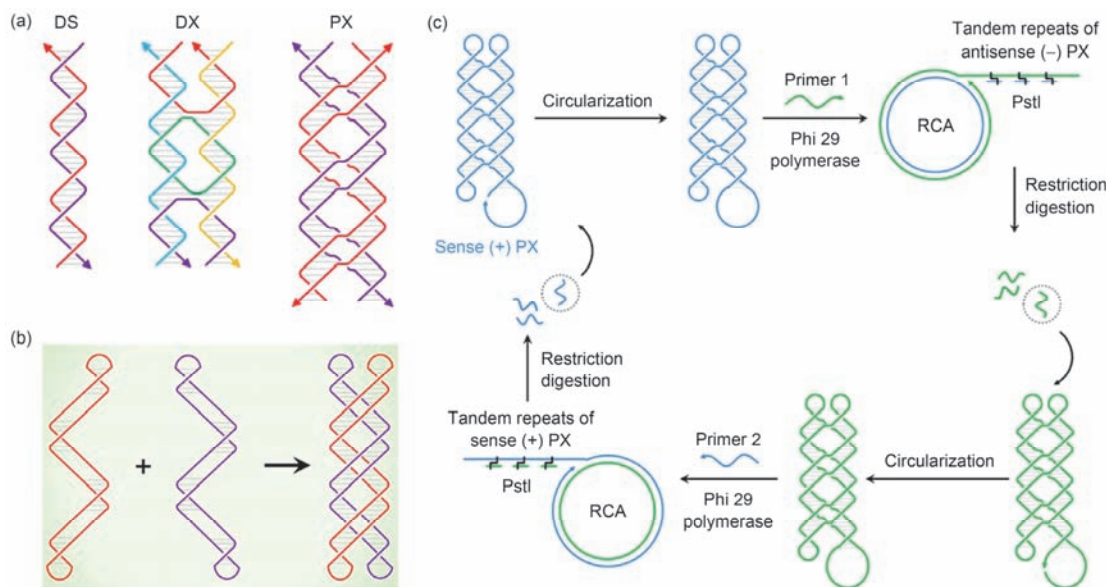


图1 (网络版彩色)DNA纳米自组装常用的模块及利用长链RCA制备PX. (a) 双链DS, DX, PX模块的对比; (b) 偶数个HJ连接的PX可由2条长单链组装; (c) 奇数个HJ连接的PX可由1条长链组装,并经RCA复制放大^[23]

Figure 1 (Color online) The common DNA tiles used in the assembly of DNA nanostructures and the preparation of PX tiles with RCA. (a) Comparison between duplex, DX, PX tiles. (b) The PX tiles with even number of the Holliday junction can be self-assembled by two long ssDNA. (c) The PX tiles with odd number of the Holliday junction can be self-assembled by one long ssDNA, which can be amplified by a RCA protocol^[23]

构(Triangular prism)^[27]框架先后由1条DNA链组装完成,其结构均得到了证实(图2).构成这2个框架的每个边几乎都是1个双螺旋DNA(Tetrahedron的一条边除外).由于单个DNA螺旋的刚性有限,所以可以想象这样的框架结构在做得很大很复杂之后难以再能维持较好的三维构型.因此用于折叠Tetrahedron的单链DNA长度仅为286个碱基,而triangular prism对应的单链DNA仅有198个碱基.相应的这2个结构的原子力或扫描隧道电子显微镜图像分辨率均不高.所以从这里可看出,这种利用一条单链DNA折成仅由单个DNA螺旋构成边框的方法可能只适用于组装尺寸较小的结构(粒径~10 nm),却不适用于更大更复杂结构的组装.

此外,通过控制一条单链DNA中的序列对称性和合理利用DNA bulge和T-junction,一维和二维的阵列状的DNA图样、三维的棱柱结构也可被组装出来^[28,29].同样地,构成阵列和棱柱结构的器件单元多为单个DNA螺旋,难以延伸到较大尺寸且复杂度较高的由一条链组装成的DNA纳米结构的制备.另外,Shih等人^[30]曾经报道利用一条长为1700碱基左右的

单链DNA折叠组装八面体(Octahedron)结构,它的每个边由DX或PX构成,然而这个结构仍然需要额外添加几条单链DNA辅助其组装,还没有实现真正意义上的完全由一条单链DNA的复杂结构组装.

2 单链DNA折纸术的突破

自2007年PX模块被证明可由单链DNA自组装以来^[24],有不少针对单链DNA纳米自组装的尝试^[26~29].然而,很长一段时间以来利用单链DNA自组装可获得的纳米结构基本停留在短单链(小于300个碱基)、简单、多孔的多面体结构阶段,完全无法跟同时期的DNA折纸术^[5]和单链模块术^[31](single-stranded tiling)可构造的复杂结构相媲美.这其中主要的原因在于当构造的结构复杂度提升时,势必要引入更多的交互式的结点去捆绑结构中的双螺旋以维持并稳定目标构型,而结点的增多会给单链DNA折叠带来拓扑学的难题:整条单链在自组装过程中可能会出现多处打结,从而诱发动力学陷阱干扰结构的组装^[20].2014年Andersen课题组^[32]借用RNA kissing loop尽可能多地取代交互式的结点在双螺旋之间建立连接关

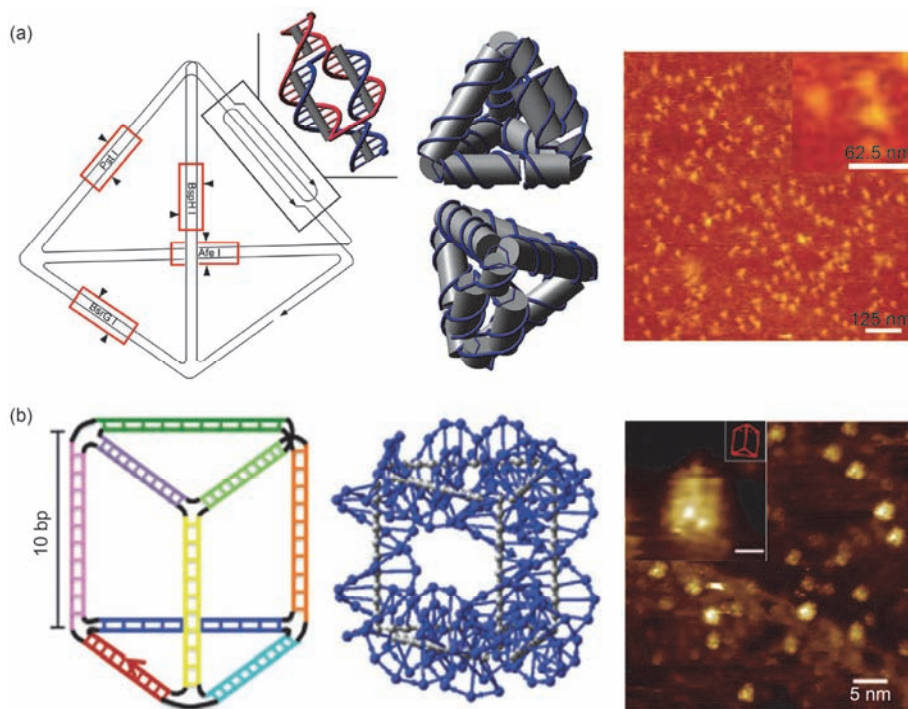


图2 (网络版彩色)由长单链DNA自组装的三维(3D)结构. (a) Tetrahedron结构示意图及原子力(AFM)图像^[26]; (b) Triangular prism结构示意图及扫描隧道电子显微镜(STM)图像^[27]

Figure 2 (Color online) The 3D objects assembled by one long ssDNA. (a) The design of a tetrahedron and its corresponding AFM image^[26]. (b) The design of a triangular prism and its corresponding STM image^[27]

系, 实现了利用单链RNA自组装较大的模块和多孔的二维阵列. 但在此报道中, 用于折叠的单链RNA只含600多个碱基, 其长度以及可组装形成的结构的复杂程度仍然有待提升. 而且kissing loop是RNA特有的一种相互作用, 这种设计方法难以移植至单链DNA的自组装中来.

在首个单链DNA自组装的PX结构问世10年后, 2017年Yan课题组和Yin课题组^[20]联合报道了可媲美传统DNA折纸术的长单链DNA和RNA折纸术, 他们采用最长可达10000个碱基的单链DNA折叠出一系

列用户自定义的构型(图3). 整个技术的策略是将长单链DNA设计成自身可形成多处双螺旋, 而螺旋之间的序列可通过平行的交叉结点(parallel crossover)建立绑定联系(图3(a)). 其中的核心是平行的交叉结点, 对于它的合理使用可确保由一条链折成的结构不会出现打结现象. 其实很早之前, 在PX模块里已经利用了平行的交叉结^[22,23], 但是Yan课题组和Yin课题组^[20]首次告诉我们如何将这些平行的交叉结点设计在一条长DNA链的相应位置以消除打结实现完美折叠. 对于平行的交叉结点的设计方案, 他们采用

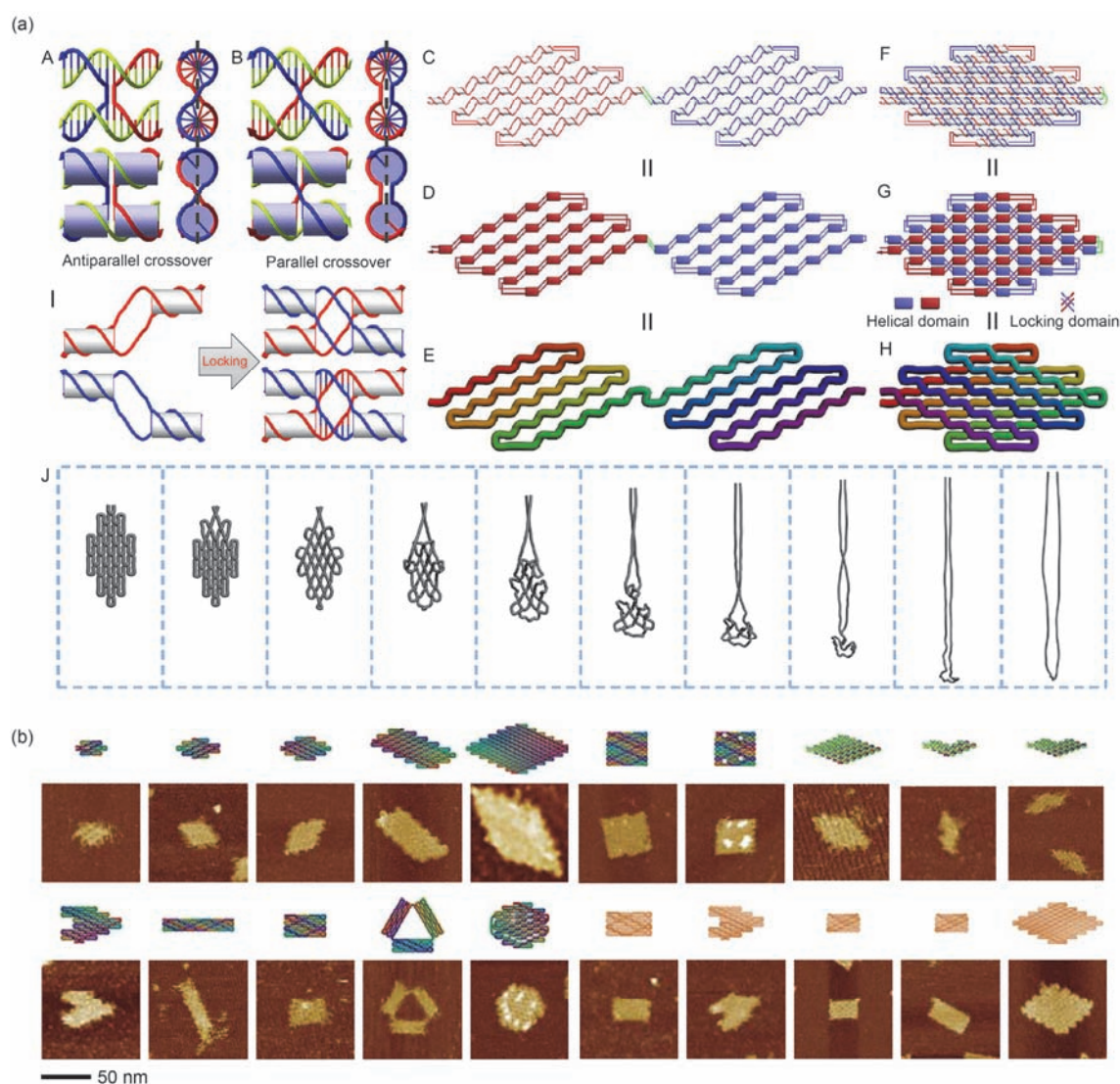


图3 (网络版彩色)长单链DNA折纸术. (a) 长单链DNA折纸示意图A~H和动态松弛模型J; (b) 折纸目标图案和原子力显微镜下观察到的图案^[20]

Figure 3 (Color online) The long ssDNA origami. (a) The schematic for the assembly of long ssDNA origami (A–H) and the dynamic relaxation model of an ssDNA origami (J). (b) The designed ssDNA origami shapes and their corresponding AFM images^[20]

动态松弛模型展示了长单链DNA中没有拓扑形态的结(图3(a)~(j)),从理论上阐释了方案的可行性.利用同样的设计原理,同时又根据RNA的螺旋周期与DNA的不同而对平行的交叉结点间的间距作出微调,各式各样的单链RNA折纸结构也可被组装出来.与此前的单链DNA或RNA折叠结构相比较,单链DNA或RNA折纸术可获得的结构的尺寸提升了几十倍、复杂程度也提升至几乎完全可由用户自定义的形态(图3(b)).在单链序列上预留一些可供外源的核酸杂交的位点或者预设计上一些发夹结构,单链DNA或RNA折纸术可像传统DNA折纸术一样实现对折出结构特定位点的标记(图3(b)).他们还开发了一套自动化的程序辅助用户从一个简单的二维图像开始设计如何用一条DNA链自组装该图样(<http://dna.kwonan.com/>).此外,单链DNA折纸结构可经由体外或体内的生物合成法制备,这对将来利用复杂的折纸结构在细胞内实现一定的操作或功能提供了一种新的选择.

3 长单链DNA的常用制备方法

纵观DNA纳米技术的发展历程,可以看到其飞速发展离不开DNA的合成.除去传统折纸术中的主链支架一般选择自然界存在的单链DNA(如噬菌体M13)外,其余的DNA链基本都是通过化学合成的方法得到的,可以说DNA的合成一定程度上决定了DNA纳米技术的发展.而现在随着长单链DNA折纸术的问世,可以想象对用户指定序列的长单链DNA的合成需求会进一步提升.但是受目前化学合成方法的限制,长单链DNA(>100个碱基)的合成难以保证产率、产量和满意的性价比(长双链DNA的合成方法有别于长单链,通过化学合成和PCR组装可较容易地获得上千个碱基对的长双链DNA),因此对于长单链DNA需要另寻其他的制备方法.借助于生物酶的体内或体外作用以及一些辅助变性的手段,目前常用的长单链DNA的制备方法主要有以下几种.

(i) 反转录法. 在生物体中(主要是真核生物),RNA反转录为cDNA是一步很重要的生命过程,而反转录后得到的cDNA就是单链的.参照此过程,我们在体外可先化学合成双链形态的目的序列,然后通过转录酶转录双链DNA获得相应的RNA,再利用反转录酶以RNA为模板反转录得到单链DNA^[33].这是一种经典的方法,但是由于整个过程需要用到两种酶且包含多个步骤,因此存在产率低以及成本高昂

的问题.

(ii) 酶降解法. 酶降解法也是一种经典的制备ssDNA的方法.自然界中存在很多可以降解DNA的酶类(DNase),比如DNA外切酶(Exodeoxyribonuclease),DNA外切酶通常沿着5'-3'或3'-5'方向从末端开始降解双链DNA^[34].如果能够有效控制DNA外切酶只作用于双链DNA中的一条链,那降解完成后即可获得单链DNA.通常在PCR获取双链DNA时,可在要保留的目的链对应的引物末端做上一定的化学修饰,阻碍Exo酶的起始识别作用,从而实现Exo酶消化掉互补链,留下目的单链DNA^[35,36].此外,还可将双链DNA经质粒表达成环形结构,利用切口酶(Nickase)将待降解的那条单链切开一个缺口,从而让Exo酶有机会沿着切口将其降解,产生环状的单链DNA^[37].酶降解法成本也比较高,并且由于某些特定的核酸序列(比如G-四链体等)可能会阻碍酶的活性,也存在降解不彻底导致的产率低下、产物不纯等问题.

(iii) 变性高效液相色谱(HPLC)法. 在通过PCR形成双链DNA时,如果在其中的一条引物末端标记上疏水性较强的基团如Biotin或6-FAM时,可造成在变性条件下(如高温或碱性环境)两条互补链在HPLC中的滞留时间不同,从而实现将双链DNA分离纯化成两条单链DNA^[38].但是这种方法对仪器的要求较高,损耗也较大,另外当DNA链较长时,分离效果会显著降低.

(iv) 磁珠生物素(Biotin)修饰法. 与HPLC方法类似,Biotin被修饰在PCR制备的双链DNA的互补链上,然后利用生物素-亲和素(Biotin-Avidin)的相互作用将DNA吸附到磁性珠子上,在强碱性的变性条件下,双链DNA的碱基互补配对被打开,未加Biotin修饰的单链DNA脱落到溶液中.分别收集磁珠和溶液,可获得两条单链DNA^[39,40].该方法的成本相对也较高,所获得的ssDNA难以保证不掺杂一定程度的dsDNA.

(v) 非对称PCR法. 在标准PCR程序中,上下游引物的用量一般是完全相同的,所以最终产物多为双链DNA.而对于非对称PCR,上下游的引物用量是不对等的,比如下游引物用量很少,上游引物用量正常或过量,这样再经历几轮放大之后,下游引物消耗完毕,相应的反义链在接下来的放大轮次中不再被扩增,而正义链还会继续以线性的方式增长,最终得到一部分双链DNA和正义单链DNA的混合产物^[41],再经简单的胶纯化将单链DNA分离出来.这

种方法简单有效,被很多实验室采用.但在大量制备较长的ssDNA时,通常需采用高保真聚合酶降低PCR过程中的序列突变,所以也存在成本较高以及产率可能较低的情况.

(vi) RCA法. RCA主要存在于环状DNA(如质粒)的复制过程中,它以环状DNA为模板,可复制扩增出几千至上万个碱基长度的含多个重复单元的长单链DNA,在经过限制性内切酶或具水解特性的脱氧核酶(Deoxyribozyme)的作用下,重复的单链DNA可被切割成目的单链DNA的单体. RCA法也已被应用到了DNA纳米自组装^[24,42]以及ssDNA ladder^[43]等等的制备中.但在制备较长的单链DNA时,有报道显示在RCA过程中,Phi29 DNA聚合酶容易发生跳跃,导致最终产物多为双链DNA,需加入单链DNA结合蛋白才能提升单链DNA的产率^[44],因此RCA法的成本和产率也值得商榷.

(vii) 噬菌体法. 噬菌体是针对细菌的一类病毒.很多噬菌体的基因组呈环状单链状态,如M13^[45],这也是目前传统DNA折纸术中用得最多的一条主单链DNA链.对于最常见的M13丝状噬菌体,最开始它的基因组是一个环状单链DNA,长6407个碱基,含DNA复制和噬菌体增殖所需的遗传信息.而其中最常用的M13mp系列是对野生型M13加以改造,插入了多克隆位点和LacZ基因,可容纳一定长度的外源DNA序列^[46]. M13 噬菌体颗粒是丝状的,只感染F⁺因子(含F质粒,能产生性菌毛)的大肠杆菌,感染宿主后通常不裂解宿主细胞,而是从感染的宿主细胞中分泌出噬菌体颗粒,宿主细胞仍能继续生长和分裂.因此可以从细菌的培养液中提取噬菌体颗粒,在剥除包裹蛋白后获得该噬菌体的单链DNA基因组.已报道的M13mp系列的噬菌体可以允许插入3000个左右的额外碱基,产生长度约为10000个碱基的单链DNA^[6]. 噬菌体法可用来低成本大量地制备长单链DNA^[47],它的出现极大地推动了传统折纸术的发展.然而,利用噬菌体法制备的长单链DNA的序列还是被噬菌体的基因组序列限制了,无法满足长单链DNA折纸术中对长单链DNA需全部自定义的需求.

(viii) 辅助噬菌体法. 虽然M13系列是一种简单方便地大量制备单链DNA的噬菌体方法,但是也存在一定的问题,比如插入的片段在噬菌体复制繁殖过程中容易丢失.针对这个问题,辅助噬菌体法被开发出来,其基本原理是构建一个含有M13复制起始

点(M13 ori)或者f1复制起始点(f1 ori)的质粒,转入到含有F'因子的宿主细胞中,再用一个有缺陷的辅助噬菌体去感染(如M13KO7)(图4). 辅助噬菌体的特征是只有辅助噬菌体本身时它正常复制繁殖,但是如果同时存在另外一个含有M13 ori或者f1 ori的质粒时,它会首先辅助该质粒形成单链DNA并包裹成噬菌粒,分泌出宿主细胞^[48]. 简单而言,在此方法中,含有M13 ori或f1 ori的质粒最终转化成单链DNA并可以被提取出来.对于质粒中的复制起始位点,若采用M13 ori,目前已报道的最短保守序列为510 bp^[49];而对于f1起始点,则只需要381 bp^[50]. 即,除了510或381个保守序列不能改动以外,通过该方法最终获得的单链DNA中的其他序列都可以被我们自定义.利用辅助噬菌体法,目前可制备的单链DNA长度可达到大约30000个碱基,其中超过98%的序列是可自定义的^[49]. 如果我们不需要那几百个保守序列,同样也可以采用限制性内切酶或者具水解特性的Deoxyribozyme切除^[51]. 由于辅助噬菌体法成本低、产量高、且可自定义的序列的比重高,是一种非常合适长单链DNA序列制备的方法.

4 展望

当前DNA纳米技术的发展已进入了快车道,DNA折纸术的出现加快了这一进程.2017年报道的长单链DNA折纸术^[20]以及最近出现的改良的长单链DNA的制备技术^[49,50]解决了传统折纸术成本、产量等多方面的问题,这都有望再次推动DNA纳米技术的发展.尽管目前的长单链DNA折纸术^[20]只被报道用于制备二维的纳米构型,但其完全具备向更复杂的三维构型发展的潜力.

在生物医学领域,传统DNA折纸术制备的纳米结构已被用作药物载体进行了一系列动物实验并取得了振奋人心的进展^[18].但是动物实验乃至于下一步的人体实验通常都需要“毫克-克”量级的DNA组装体用于测试.如果采用传统DNA折纸术制备DNA组装体,其成本主要由几百条合成的DNA辅助链决定.根据当前的DNA合成价格计算,制备“克”量级的传统DNA折纸结构大约需要十万-百万元的成本,这对于DNA纳米技术的临床应用是个极大的限制.此外,在用于细胞及动物实验之前,传统折纸术中的过量DNA辅助链需要进一步除去以避免细胞毒性,这个纯化步骤也会增加很多工作量和成本.与传统DNA

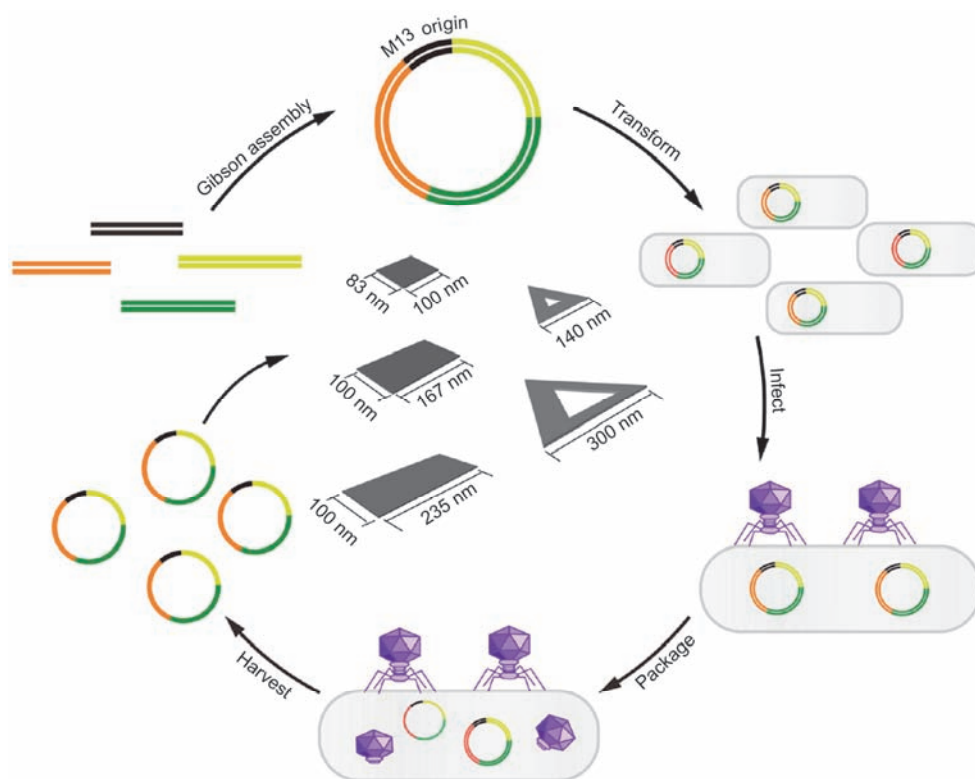


图4 (网络版彩色)辅助噬菌体法制备含M13复制起始点(ori)的ssDNA示意图^[49]

Figure 4 (Color online) The schematic depicting the preparation of ssDNA containing the M13 origin with the helper phage/phagemid system^[49]

折纸术相比,长单链DNA折纸术需要的所有DNA序列都集成在一条链里。当前的(辅助)噬菌体法可以结合发酵的手段低成本大量地获得目标长单链DNA^[47],有望将制备“克”量级的DNA折纸结构的成本控制在万元以下。并且,长单链DNA折纸术制备结构的过程中不存在辅助链的干扰,所得的结构无需进一步纯化,在操作上非常便利。因此,长单链DNA折纸术可能会进一步促进DNA纳米技术在生物医学领域特别是药物递送方面的临床前研究。

此外,在生物体内,功能性的大分子如蛋白质、

RNA等都可以由一条长链自组装成复杂的三维结构,进而发挥其生物学功能,而长单链DNA折纸术的出现使得DNA也具备了类似于蛋白质和RNA的一条链折叠能力。尽管目前的折叠操作步骤多在体外完成,而且组装体的复杂度仍然有限,但是长单链DNA折纸术的出现给我们设计、编程可在细胞内自组装并发挥一定功能的DNA纳米结构提供了一种可能,使得实现DNA纳米技术在细胞内的应用更近了一步。我们期待着长单链DNA折纸术的更多突破,也希望DNA纳米技术在生物医学领域早日得到临床应用。

参考文献

- 1 Seeman N C. Nucleic acid junctions and lattices. *J Theor Biol*, 1982, 99: 237–247
- 2 Kallenbach N R, Ma R I, Seeman N C. An immobile nucleic acid junction constructed from oligonucleotides. *Nature*, 1983, 305: 829–831
- 3 Winfree E, Liu F, Wenzler L A, et al. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature*, 1998, 394: 539–544
- 4 Zheng J, Birktoft J, Chen Y, et al. From molecular to macroscopic via the rational design of a self-assembled 3D DNA crystal. *Nature*, 2009, 461: 74–77
- 5 Rothmund P W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 2006, 440: 297–302
- 6 Douglas S M, Dietz H, Liedl T, et al. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature*, 2009, 459: 414–418

- 7 Seeman N C, Sleiman H F. DNA nanotechnology. *Nat Rev Mater*, 2017, 3: 17068
- 8 Seeman N C. De novo design of sequences for nucleic acid structural engineering. *J Biomol Struct Dyn*, 1990, 8: 573–581
- 9 Goodman R P. NANEV: A program employing evolutionary methods for the design of nucleic acid nanostructures. *Biotechniques*, 2005, 38: 548–550
- 10 Williams S, Lund K, Lin C, et al. Tiamat: A three-dimensional editing tool for complex DNA structures. In: *International Workshop on DNA-Based Computers*. Heidelberg: Springer, 2008. 90–101
- 11 Douglas S M, Marblestone A H, Teerapittayanon S, et al. Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: 5001–5006
- 12 Benson E, Mohammed A, Gardell J, et al. DNA rendering of polyhedral meshes at the nanoscale. *Nature*, 2015, 523: 441–444
- 13 Veneziano R, Ratanalert S, Zhang K, et al. Designer nanoscale DNA assemblies programmed from the top down. *Science*, 2016, 352: 1534–1534
- 14 Burns J R, Seifert A, Fertig N, et al. A biomimetic DNA-based channel for the ligand-controlled transport of charged molecular cargo across a biological membrane. *Nat Nanotechnol*, 2016, 11: 152–156
- 15 Langecker M, Arnaut V, Martin T G, et al. Synthetic lipid membrane channels formed by designed DNA nanostructures. *Science*, 2012, 338: 932–936
- 16 Liu X, Zhang F, Jing X, et al. Complex silica composite nanomaterials templated with DNA origami. *Nature*, 2018, 559: 593–598
- 17 Douglas S M, Bachelet I, Church G M. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science*, 2012, 335: 831–834
- 18 Li S, Jiang Q, Liu S, et al. A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 258
- 19 Pinheiro A V, Han D, Shih W M, et al. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6: 763–772
- 20 Han D, Qi X, Myhrvold C, et al. Single-stranded DNA and RNA origami. *Science*, 2017, 358: eaao2648
- 21 Fu T J, Seeman N C. DNA double-crossover molecules. *Biochemistry*, 1993, 32: 3211–3220
- 22 Zhang X, Yan H, Shen Z, et al. Paranemic cohesion of topologically-closed DNA molecules. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 12940–12941
- 23 Wang X, Chandrasekaran A R, Shen Z, et al. Paranemic crossover DNA: There and back again. *Chem Rev*, 2018, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00207
- 24 Lin C, Wang X, Liu Y, et al. Rolling circle enzymatic replication of a complex multi-crossover DNA nanostructure. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 14475–14481
- 25 Lin C, Rinker S, Wang X, et al. *In vivo* cloning of artificial DNA nanostructures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 17626–17631
- 26 Li Z, Wei B, Nangreave J, et al. A replicable tetrahedral nanostructure self-assembled from a single DNA strand. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 13093–13098
- 27 He X, Dong L, Wang W, et al. Folding single-stranded DNA to form the smallest 3D DNA triangular prism. *Chem Commun*, 2013, 49: 2906–2908
- 28 Tian C, Zhang C, Li X, et al. Approaching the limit: Can one DNA strand assemble into defined nanostructures? *Langmuir*, 2013, 30: 5859–5862
- 29 Li M, Zuo H, Yu J, et al. One DNA strand homo-polymerizes into defined nanostructures. *Nanoscale*, 2017, 9: 10601–10605
- 30 Shih W M, Quispe J D, Joyce G F. A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron. *Nature*, 2004, 427: 618–621
- 31 Wei B, Dai M, Yin P. Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles. *Nature*, 2012, 485: 623–626
- 32 Geary C, Rothmund P W, Andersen E S. A single-stranded architecture for cotranscriptional folding of RNA nanostructures. *Science*, 2014, 345: 799–804
- 33 Hughes T R, Mao M, Jones A R, et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 342–347
- 34 Higuchi R G, Ochman H. Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 5865–5865
- 35 Zhang H, Chao J, Pan D, et al. Folding super-sized DNA origami with scaffold strands from long-range PCR. *Chem Commun*, 2012, 48: 6405–6407
- 36 Zhang H, Chao J, Pan D, et al. DNA origami-based shape IDs for single-molecule nanomechanical genotyping. *Nat Commun*, 2017, 8: 14738
- 37 Erkelenz M, Bauer D M, Meyer R, et al. A facile method for preparation of tailored scaffolds for DNA-origami. *Small*, 2014, 10: 73–77
- 38 Dickman M, Hornby D P. Isolation of single-stranded DNA using denaturing DNA chromatography. *Anal Biochem*, 2000, 284: 164–167

- 39 Espelund M, Stacy R, Jakobsen K. A simple method for generating single-stranded DNA probes labeled to high activities. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6157–6158
- 40 Pound E, Ashton J R, Becerril H A, et al. Polymerase chain reaction based scaffold preparation for the production of thin, branched DNA origami nanostructures of arbitrary sizes. *Nano Lett*, 2009, 9: 4302–4305
- 41 Gyllenstein U B, Erlich H A. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 7652–7656
- 42 Ouyang X, Li J, Liu H, et al. Rolling circle amplification-based DNA origami nanostructures for intracellular delivery of immunostimulatory drugs. *Small*, 2013, 9: 3082–3087
- 43 Gu H, Breaker R. Production of single-stranded DNAs by self-cleavage of rolling-circle amplification products. *Biotechniques*, 2013, 54: 337–343
- 44 Ducani C, Bernardinelli G, Högberg B. Rolling circle replication requires single-stranded DNA binding protein to avoid termination and production of double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 10596–10604
- 45 Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985, 33: 103–119
- 46 Messing J, Gronenborn B, Müller-Hill B, et al. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 3642–3646
- 47 Kick B, Praetorius F, Dietz H, et al. Efficient production of single-stranded phage DNA as scaffolds for DNA origami. *Nano Lett*, 2015, 15: 4672–4676
- 48 Vieira J, Messing J. Production of single-stranded plasmid DNA. In: *Recombinant DNA Methodology*. New York: Academic Press, 1989. 225–233
- 49 Chen X, Wang Q, Peng J, et al. Self-assembly of large DNA origami with custom-designed scaffolds. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 24344–24348
- 50 Nafisi P M, Aksel T, Douglas S M. Construction of a novel phagemid to produce custom DNA origami scaffolds. *bioRxiv*, 2018, 309682
- 51 Praetorius F, Kick B, Behler K L, et al. Biotechnological mass production of DNA origami. *Nature*, 2017, 552: 84–87

Summary for “基于序列信息高度集成的长单链 DNA 自组装及制备”

Programming and preparing long single-stranded DNA with highly integrated sequence information for the self-assembly of DNA nanostructures

Youli Jia^{1,2} & Hongzhou Gu^{1,2*}

¹ Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200032, China;

² Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

* Corresponding author, E-mail: hongzhou.gu@fudan.edu.cn

As a popular assembly technique, DNA origami offered a simple way to fold long, single-stranded (ss) DNA molecules into arbitrary two-dimensional (2D) shapes. To design a desired shape, a 7-kilobase M13mp18 genomic DNA was raster filled into the shape as a scaffold, and over hundreds short oligonucleotide staple strands were carefully chosen and added in excessive molar ratios to hold the scaffold in place. The assembly of a desired 2D shape with a diameter of ~100 nm can be achieved in a simple annealing step in hours. Due to its convenience during preparation and the large addressable surface area of the assembled shapes, DNA origami has been rapidly explored as templates for many types of bio-material and biomedical applications. However, a few limitations hinder the further development of this assembly technique. One is about the relatively high cost: When it comes to large scale preparation (e.g., gram-level) for potential drug evaluation in animals, the requirement of large scale of hundreds of synthetic DNA strands usually brings about bills near to 0.1–1 Million Chinese Yuan. Another issue is the leftover of the excess of the staple strands: They are hardly to be completely removed from the desired DNA structures, which may cause unwanted side-effects during biomedical applications.

If a desired shape could be assembled with only one ssDNA in a high yield, the second issue would not exist anymore. As early as in 2007, the Yan's group reported that the DNA tile with odd number of the paranemic crossover could be assembled by one ssDNA. Later on, several groups found that the tetrahedron and prism-like scaffold objects could also be assembled with an ssDNA. However these DNA nanostructures created by a ssDNA (~hundred bases in length) were relatively small, with diameters <10 nm. The challenge to create large shapes with only one ssDNA is that in the one polymer folding pathway, the crossovers that bundle many helical domains to form the shapes would inevitably encounter the topological knotting issue, which set the shape formation into many kinetic traps.

About ten years later, recently the Yan and Yin's group developed the ssDNA origami technique as a derivative of the traditional DNA origami by integrating all sequences required by a desired shape into one long single strand. The key innovation is to use partially complemented double-stranded DNA and parallel crossover cohesion to construct a knot-free structure that can be folded smoothly from a single strand. The removal of the excess of staple strands yet still possessing a high yield (>90%) of the desired shapes and the adaptiveness to single-stranded RNA origami hint a promising future of this new technique in biomedical and biomaterial applications. Moreover, the recent development of single-stranded DNA preparation, for example, extraction of single-stranded genomic DNA with customized sequences up to 30000 bases from the helper phage/phagemid system, enabled the acquisition of gram-level of long single-stranded DNA in a cost-effective manner (~10 Thousand Chinese Yuan) and offered a solid foundation for large scale assembly of single-stranded DNA origami. The settlement of the two major issues in the traditional DNA origami should pave the way for applying DNA origami-based nanostructures in clinical tests.

In this paper, we summarized the research progress of DNA self-assembly with one long single strand and the current ways to prepare long single-stranded DNAs, and finished with our thoughts on the future of the new single-stranded DNA origami technique.

DNA self-assembly, single-strand DNA origami, long single strand DNA, phage

doi: 10.1360/N972018-00856