

華中科技大学

本科毕业设计[论文]

基于三维 DNA 自组装结构的纳米雕刻系统研究

院 系 人工智能与自动化学院

专业班级 自实 1901 班

姓 名 张皓然

学 号 U201916457

指导教师 潘林强

2023 年 4 月 30 日

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包括任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。本人完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

作者签名：张能独 2023年5月28日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保障、使用学位论文的规定，同意学校保留并向有关学位论文管理部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权省级优秀学士论文评选机构将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于 1、保密 ，在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 。

(请在以上相应方框内打“√”)

作者签名：张能独 2023年5月28日

导师签名：凌桂强 2023年5月28日

摘要

变构型DNA自组装纳米结构提供了一种纳米尺度下操控物质形态的强大工具，已被用于构建分子机器、微纳信息编码系统等。DNA剪纸通过重新配置DNA折纸结构中的脚手架链实现纳米结构形态重构，是变构型DNA自组装技术的重要分支。为了完成staple链的重新配置，传统的DNA剪纸需设计与staple链一一对应的侵入链，设计复杂度高，且难以配置三维DNA结构中的staple链。开发设计简单、适配三维DNA自组装结构的剪纸策略有待进一步研究。本学位论文研究了基于聚合酶链置换反应的DNA剪纸术，可用于降低DNA剪纸的设计难度，且适用于三维DNA纳米结构，主要工作和成果如下：

利用聚合酶链置换反应对现有的基于DNA链置换反应的DNA剪纸术进行了改进，设计了特定的DNA折纸剪纸结构，并通过软件仿真与分子实验证了结构的稳定性和可行性。使用caDNAno软件设计了三维双层圆柱的DNA折纸结构，利用CanDo和oxDNA软件对结构进行验证仿真，并进行实际产品的合成，对实验结果使用凝胶电泳和透射电镜两种技术手段进行了观察，验证了合成产物符合期望的纳米分子结构。为实现聚合酶DNA剪纸术，在折纸结构的设计过程中预留聚合酶引物结合位点，设计了双引物位点，设计实现了分级聚合酶DNA剪纸，并在实验中进行验证，得到单层圆柱和细口瓶两种结构的DNA剪纸产品，使用透射电镜对实验结果进行了观察，验证了聚合酶DNA剪纸术对于实现DNA折纸结构高效变构的可行性。

结合仿真实验与分子实验的结果，实现了用DNA折纸术构建稳定的三维纳米分子结构，利用聚合酶DNA剪纸术对于DNA折纸结构进行裁剪雕刻，验证了该技术的可靠性与高效性，该技术相较于传统DNA剪纸术，设计流程更加简单，反应环境要求较低，为未来大规模的纳米分子结构的搭建与变构带来可能，在生物医学，信息工程技术领域存在一定应用前景。

关键词：DNA 自组装结构；DNA 剪纸术；DNA 折纸术；聚合酶链置换反应

Abstract

Reconfigurable DNA self-assembled nanostructures provide a powerful tool for manipulating the structure at the nanoscale, and have been used to construct molecular machines, micro-nano information coding systems, etc. DNA kirigami reconfigures the scaffolding chains in the DNA origami structure to reconfigure the nanostructure morphology, which is an important branch of DNA self-assembly technology with variable configuration. In order to complete the reconfiguration of the staple chains, the traditional DNA kirigami needs to design the invading chains corresponding to the staple chains one by one, the design complexity is high, and it is difficult to configure the staple chains in the three-dimensional DNA structure. The development of kirigami strategies that are simple in design and adaptable to 3D DNA self-assembled structures awaits further study. The paper studies DNA kirigami based on polymerase chain displacement reaction, which can be used to reduce the design difficulty of DNA kirigami, and is suitable for three-dimensional DNA nanostructures. The main work and achievements are as follows:

Polymerase chain displacement reaction was used to improve the existing DNA kirigami based on DNA chain displacement reaction, and a specific DNA kirigami structure was designed. The stability and feasibility of the structure were verified through software simulation and molecular experiments. A three-dimensional double-layered cylindrical DNA origami structure was designed using the caDNAno software, and the structure was verified and simulated using the CanDo and oxDNA software. The synthesized product was observed using two techniques, gel electrophoresis and transmission electron microscopy, and the synthesized product met the expected nanostructure. In order to achieve polymerase DNA kirigami, primer binding sites for polymerase were reserved in the origami structure design process. Double primer binding sites were designed to achieve multiple polymerase DNA kirigami, which was verified in experiments, and single-layer cylindrical and narrow-mouthed bottle DNA kirigami products were obtained. Transmission electron microscopy was used to observe the

experimental results, verifying the feasibility of polymerase DNA kirigami for achieving efficient conformational changes in DNA origami structures.

Combining the results of simulation experiments and molecular experiments, stable three-dimensional nanostructures were constructed using DNA origami, and the reliability and efficiency of the polymerase DNA kirigami were verified. Compared with traditional DNA kirigami, this technology has a simpler design process and lower reaction environment requirements, making it possible to build and modify large-scale nanostructures in the future, and has certain application prospects in the fields of biomedical and information engineering technology.

Key Words: DNA self-assembly structure, DNA origami, DNA kirigami, Polymerase-triggered strand displacement reaction.

目 录

摘 要	I
Abstract	II
1 绪论	1
1.1 研究背景及意义	1
1.2 国内外研究现状及分析	3
1.2.1 传统 DNA 自组装结构	3
1.2.2 DNA 折纸术	4
1.2.3 DNA 折纸结构的变构	6
1.3 章节安排	9
2 聚合酶驱动纳米雕刻系统设计	10
2.1 DNA 折纸术	10
2.1.1 DNA 折纸术原理	10
2.1.2 利用软件进行 DNA 折纸术设计	12
2.2 DNA 剪纸术	14
2.2.1 基于 DNA 折纸结构模版设计剪纸的原理	14
2.2.2 聚合酶驱动 DNA 纳米结构雕刻系统设计	15
2.3 本章小结	19
3 纳米雕刻系统三维模版结构仿真	21
3.1 纳米雕刻系统三维模版结构的 CanDo 仿真	21
3.2 纳米雕刻系统三维模版结构的 oxDNA 仿真	22
3.3 本章小结	25
4 基于三维结构的纳米雕刻系统实验与结果分析	26
4.1 实验过程	26
4.1.1 DNA 样品保存	26
4.1.2 DNA 样品浓度测定	26
4.1.3 DNA 折纸制作	28
4.1.4 凝胶电泳制备	29

4.1.5 透射电镜样品制备.....	30
4.1.6 DNA 剪纸实验	31
4.2 实验结果.....	31
4.2.1 折纸结构.....	31
4.2.2 剪纸结构.....	34
4.3 本章小结.....	37
5 结论与展望	38
5.1 总结.....	38
5.2 展望.....	38
致谢	40
参考文献	41
附录 实验所用 DNA 序列.....	44

1 绪论

1.1 研究背景及意义

随着信息技术的快速发展，基于硅材料的信息处理技术逐渐迎来瓶颈，为了突破这一瓶颈，科研人员们尝试使用新材料和新技术取代硅基材料，设计新一代的计算设备和信息技术产品。DNA 分子作为重要的遗传物质的载体，实际上在工程应用领域存在极大的潜力。首先，DNA 碱基互补配对的原理可以用于编码信息，且相比传统二进制信息存储具有更强的信息密度和存储能力^[1]。其次，DNA 牢固的化学键可以确保基于 DNA 搭建的纳米结构足够稳定^[2]。目前，DNA 分子在信息存储领域^[1, 3-6]，生物计算领域^[7-10]，微纳米结构领域^[11-13]都有丰富的应用。

在信息存储领域，DNA 存储使用特定的碱基排序来存储信息。相较于传统的二进制信息存储，利用特定的 DNA 碱基排列来存储信息近似于四进制，相较于传统信息存储具备更大的信息密度。同时，DNA 存储的能耗极低，只需保持一定温度，DNA 便可长期储存^[14]。这种长期低能耗的信息存储方式是大批量数据备份的绝佳选择。如图 1-1，根据科学家的估算，仅使用 1kg DNA 便可对全球所有信息数据进行备份。

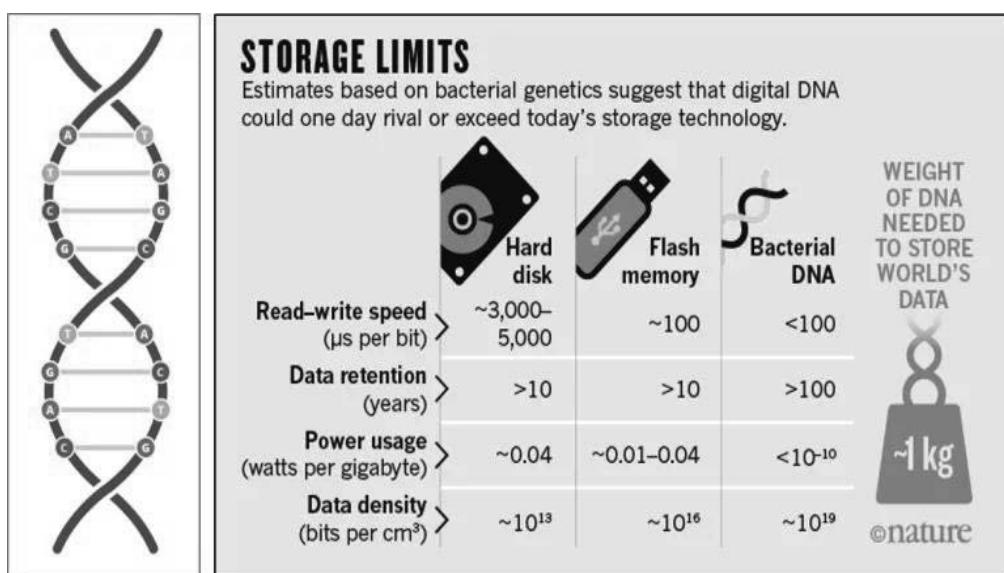


图 1-1 DNA 存储与传统数据存储手段的对比图^[7]

在生物计算领域, DNA 计算在未来将促进生物计算机的发展^[15, 16]。目前的计算机主要使用各种半导体元件搭建电路, 从而实现复杂的逻辑运算。为了应对设备算力需求的不断加大, 更精密, 尺度更小, 集成度更高的硅芯片的需求也越来越大。然而, 随着摩尔定律逐渐失效, 从工艺技术和物理规律的角度来讲, 硅芯片的微型化即将遇到瓶颈。科学家已经发现, DNA 分子同样可以搭建分子电路。基于碱基互补配对原理和 DNA 链置换反应, 可以设计 DNA 分子电路系统, 实现输入特定 DNA 分子, 则可输出指定 DNA 分子^[17]。用不同的 DNA 分子表示不同的信号, 便可构造基础的与门, 或门, 非门。在此基础上, 已有实验证实大规模的 DNA 分子逻辑门的累加可以实现级联的大规模 DNA 分子电路^[18]。相较于传统的半导体芯片和电路, DNA 分子电路的能耗更低, 同时可以在更小的微纳米尺度上搭建电路, 为更小尺度的芯片设计与生产提供了可能的解决方案。

在微纳米结构领域, 由于 DNA 碱基互补配对不需要人工控制, 所以 DNA 可以用于设计制造纳米级精密的自组装结构。DNA 自组装结构是指依靠 DNA 碱基互补配对的原理, 对 DNA 链的空间结构进行设计所得到的特殊 DNA 结构。传统的 DNA 自组装结构一般被称为“分子瓦”, 若干条 DNA 分子经设计后拼装在一起形成基本的瓦片单元, 且每个单元都留有粘性末端以供与其他 DNA 瓦片单元拼接组合^[3]。但这种结构的设计非常复杂, 同时设计结构的局限性较大。DNA 折纸术开创性的使用超长链 DNA(Scaffold strand)和短链 DNA(Staple strand)交互的方式, 为 DNA 自组装结构的设计和合成提供了新的更加完美的解决方案^[19]。这种设计方法的优点在于, 可以先利用长链 DNA 设计出我们最终目标的结构, 然后再使用大量的短链 DNA 对结构进行合理固定, 极大降低了大规模分子结构的设计难度, 为更大规模的纳米结构设计提供了有力的辅助。

传统的 DNA 折纸剪纸变构依赖 DNA 链置换反应。变构的灵活性和自由度虽然很高, 但是在变构时要预先设计合成所有变构的关键位置的 DNA 短链的互补链, 设计难度很大。同时反应条件也比较苛刻, 需要进行 2 次退火操作^[20]。这些问题都导致单纯依赖 DNA 链置换反应的折纸变构难以在大规模纳米结构的搭建中发挥作用。DNA 聚合酶是一种酶类蛋白质, 可以在 DNA 双链的螺旋上移动, 识别并添加配对的核苷酸, 使得新的 DNA 链与原有的 DNA 链互补, 被广泛用于 PCR 扩增, DNA 测序等技术。利用聚合酶链置换反应替代普通的 DNA 链置换反应,

可以降低 DNA 剪纸术的前期设计复杂度，并明显提高反应效率，降低反应环境要求^[21]。

本课题利用聚合酶链置换反应对传统的 DNA 折纸剪纸技术进行改良，降低了 DNA 剪纸变构的设计难度与反应要求，并验证了基于聚合酶链置换反应可以实现多级剪纸变构。

1.2 国内外研究现状及分析

DNA 自组装结构技术的发展可以分为三个阶段。第一阶段，使用特定的分子结构单元进行拼接堆叠；第二阶段，利用 DNA 折纸术构建更加灵活复杂的自组装分子结构；第三阶段，结合物理化学相关技术对 DNA 折纸结构进行整体以及局部的变构设计。前沿的 DNA 自组装结构已经可以实现对外界进行微小的做功，为未来生物纳米机器人的应用奠定了基础。本节将以这三个阶段的发展为顺序介绍 DNA 自组装结构技术领域国内外的研究现状。

1.2.1 传统 DNA 自组装结构

1982 年，Seeman 利用 DNA 单链之间互补配对的特性，设计了一系列特殊的二维和三维结构，称为 DNA 联结（DNA junction）^[13]，并在此基础上构建了一种分子瓦，这是第一次成功构建 DNA 分子瓦，为后续 DNA 自组装结构的发展打下了基础。该领域另一重要进展是 Winfree 等人在一平面上构建出一个二维 DNA 晶体单元^[3]，他们将 4 段特殊的单链 DNA 进行组合，拼接成刚性更强的 DNA 结构模块，称之为 DX (double-crossover) 模块。这种结构非常稳定，具有 4 个桥臂，且每个桥臂都留有黏性末端，从而便于将此模块扩展拼接，这一结构启发并推动了后续 DNA 自组装技术的发展。

Mirkin 等人利用 DNA 纳米棒和纳米粒子的自组装技术，实现了对各种形状的金属纳米颗粒的制备^[22]，该方法利用 DNA 序列互补设计和化学修饰等技术控制 DNA 纳米棒实现特定的结构和功能，实现了纳米材料的有序组装，这一研究成果为 DNA 自组装结构的发展和应用提供了新的思路和方法。2002 年 Yan 等人设计了一种新的 DNA 纳米结构^[23]，该结构基于 DNA 分子瓦，利用 DNA 链置换反应的原理可以实现纳米分子结构的变构，获得不同的稳定 DNA 纳米结构，这为 DNA 自组装结构变构重构技术的发展带来了启发。

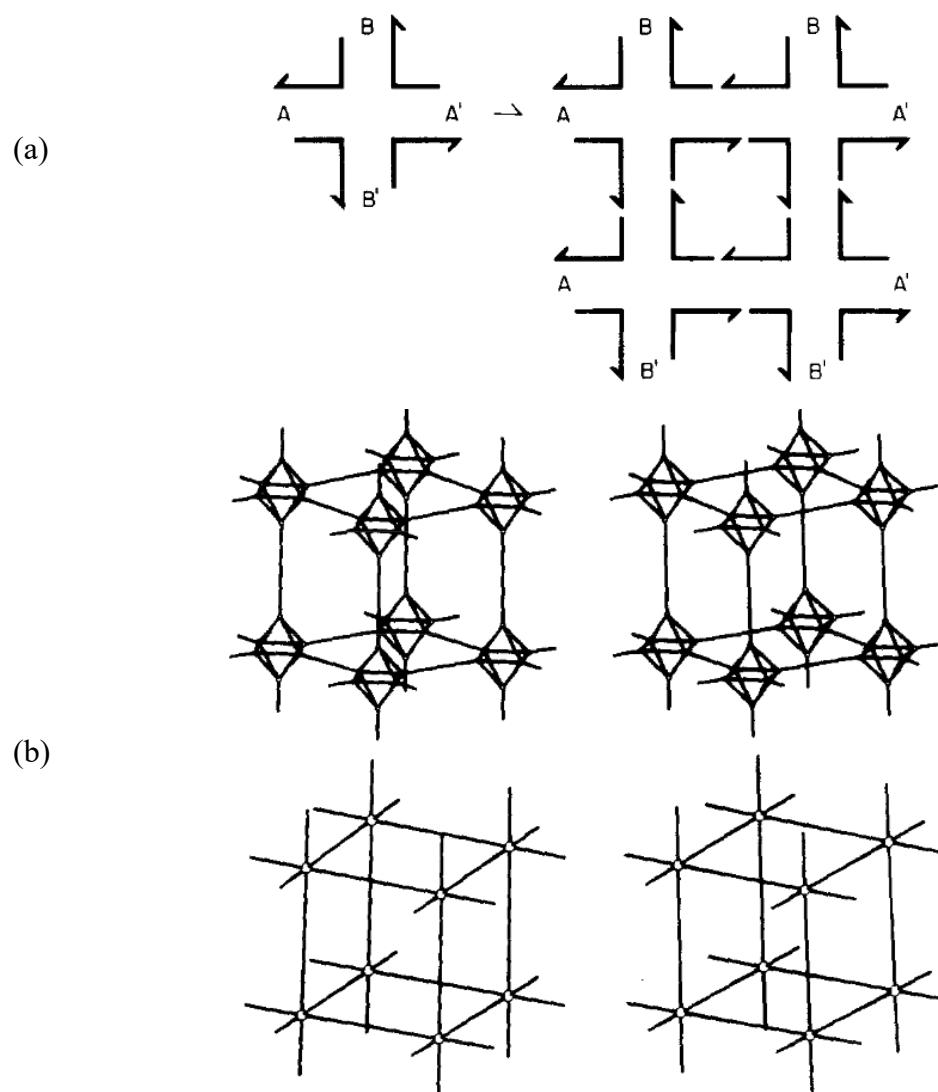


图 1-2 Seeman 等人设计的 DNA 联结^[13]。(a) 二维格式框架, 包含粘性末端。(b) 框架拼接获得三维网络结构。

1.2.2 DNA 折纸术

2006 年, Rothemund 提出 DNA 折纸术^[19], 对传统的 DNA 自组装技术进行了极大的改进, 促进了更大规模的 DNA 自组装结构的出现, 是该领域里程碑式的工作。Rothemund 绘制出包括五角星, 笑脸, 三角形等多种较为复杂的二维图案, 这些图案用以往传统的 DNA 自组装方法是几乎无法实现的。2006 年, 上海交通大学 Bio-X 中心首次用 DNA 折纸术设计合成了一幅纳米尺度的中国地图^[24], 是首个用 DNA 折纸术实现的非对称形状, 这论证了 DNA 折纸术可以为复杂的非对称结构

提供足够的结构稳固性。

随后, DNA 折纸术的应用扩展到了三维结构的领域。2009 年, Shih 等人设计验证了一个立体管状的 DNA 结构^[25]。从二维结构到三维结构的发展为 DNA 折纸术的应用提供了更多的可能。此后该课题组研发了一款专门用于 DNA 折纸设计的软件 CaDNAno^[26], 这极大简化了 DNA 折纸结构的难度, 越来越多复杂的 DNA 折纸结构被设计并验证^[27]。2013 年樊春海团队利用 DNA 折纸术设计了立体的纳米反应器, 并以两个单个酶分子作为模型进行测试, 结果发现 DNA 折纸术设计的纳米反应器中, 酶反应的速度和效率远远高于在溶液中自由反应^[28]。这表明 DNA 折纸术足以建立控制微纳级别的限定空间, 为 DNA 折纸术的应用提供了更多的可能。

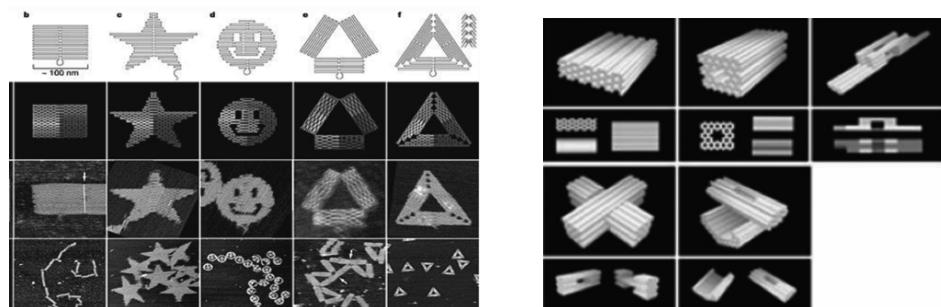


图 1-3 DNA 折纸结构^[19]。左图: 二维 DNA 折纸; 右图: 三维 DNA 折纸

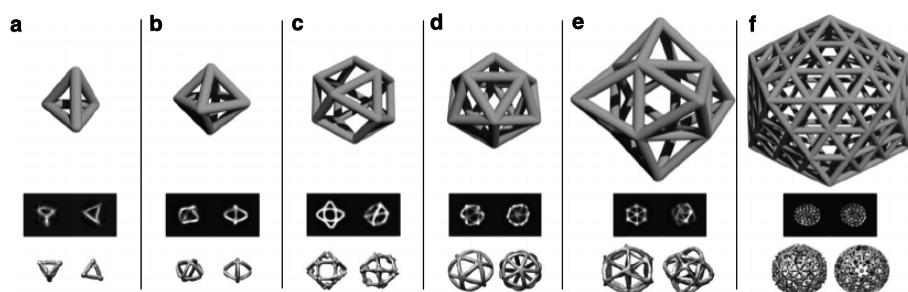


图 1-4 更多复杂的 DNA 折纸结构^[27]

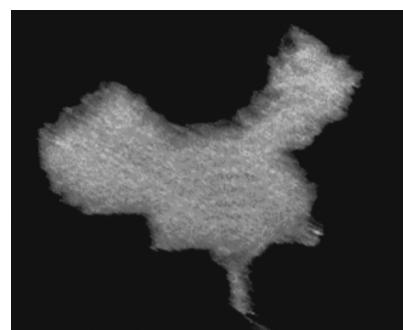


图 1-5 DNA 折纸结构设计合成中国地图^[24]

1.2.3 DNA 折纸结构的变构

可重构型 DNA 折纸指的是在预先设计好的折纸结构的技术上，可以靠生物，化学，物理作用，对该结构进行重构和调整，这一领域的研究在搭建纳米级机器人方面具有很重要的意义。

关于 DNA 自组装纳米结构的变构，在 DNA 折纸术发明之前已经有人研究^[22]。在 DNA 折纸术发明后，该领域的发展更加快速。2008 年，Andersen 等人尝试对 DNA 折纸结构进行创新，设计出了一种海豚的图案，且该平面结构海豚的尾巴可以进行一定程度的摆动^[29]，这是 DNA 折纸结构变构研究的萌芽，但实际上这一海豚形状的尾巴的摆动无法操控，这一研究论证了 DNA 折纸结构不仅可以实现非常稳定的“刚性”结构，同样也可以实现可变化的“柔性”结构。

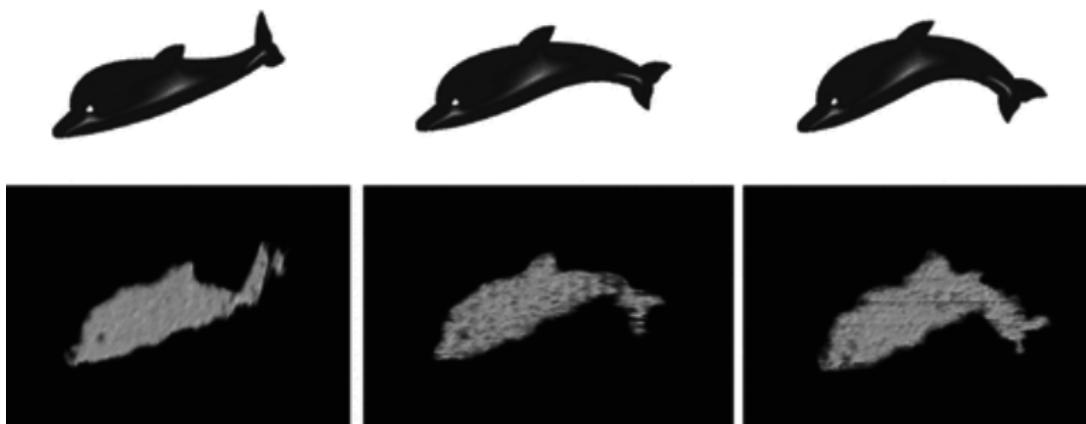


图 1-6 海豚图案的 DNA 折纸结构^[29]

2012 年，Douglas 等人设计了一种基于 DNA 折纸术的纳米机器人，该机器人可以通过 DNA 逻辑门控制分子载荷的运输和释放^[30]。2018 年，Li 等人利用 DNA 折纸术设计出一种 DNA 纳米机器人，利用 DNA 分子的互补配对原理和特殊的结构，可以实现自主识别和瞬时相应的 DNA 纳米机器人，在体内精准识别并消除癌细胞，这为 DNA 折纸技术在医疗领域的应用提供了思路和启发。

同年，慕尼黑工业大学 Hendrik Dietz 的团队使用 DNA 折纸术设计了分子机械臂，并成功用这个微纳米级别的机械臂推动了一个金颗粒^[31]。这一成果说明了 DNA 折纸术做设计的结构足以对外界产生影响，同时现有技术已经可以操控 DNA 纳米结构做简单的运动，这为未来复杂的 DNA 纳米机器人的设计带来了可能性，在生

物科研以及医疗技术发展等方面都有很重要的意义。2022年,该团队使用DNA折纸术设计出了分子级的马达,这个马达通过一种特殊的弹簧结构存储能量^[11]。以上两项科研成果均属于DNA折纸结构整体性的重构,即DNA折纸结构保持了整体性的不变,但是其姿态以及位置发生变化。

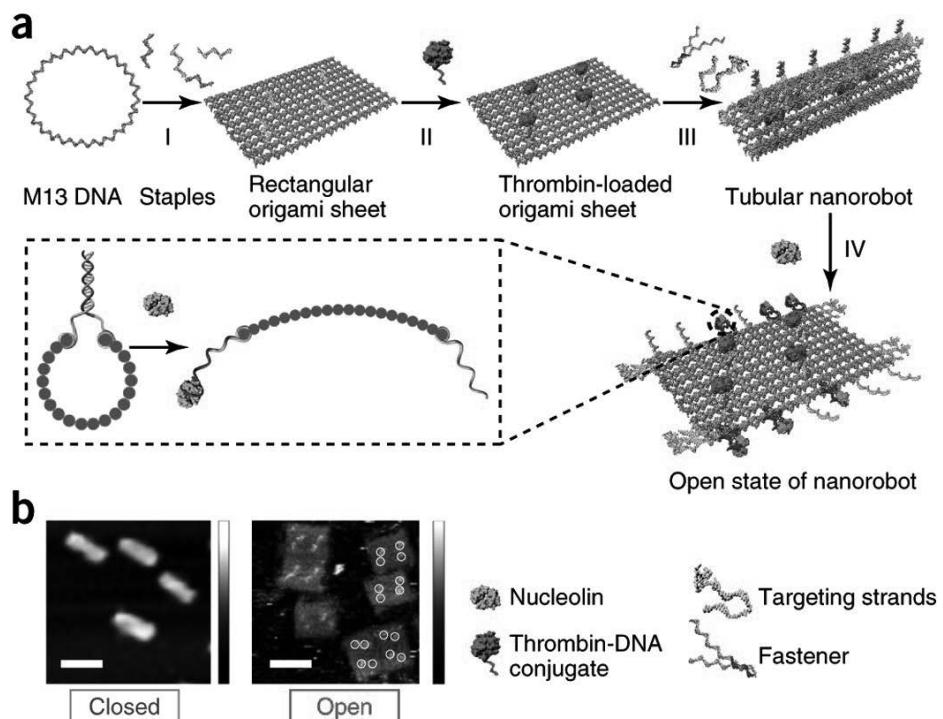


图 1-7 利用 DNA 折纸结构进行癌细胞检测^[32]



图 1-8 DNA 折纸结构设计合成机器臂的成果登上 Science 封面^[31]

上述重构技术主要关注 DNA 纳米结构整体的变化，例如 DNA 纳米结构作为机械臂的整体进行运动，而 DNA 折纸结构局部的重构同样具有重要的意义和研究价值。

DNA 折纸结构局部性的重构可以作为 DNA 折纸设计过程中的剪刀，帮助设计更复杂的 DNA 折纸结构。DNA 折纸结构局部性的重构指的是对原始结构进行修饰，这种修饰类似对结构的裁剪，被称为 DNA 剪纸术。2010 年，Han 的团队利用 DNA 折纸术成功搭建了莫比乌斯环带^[20]，同时在此基础上，利用 DNA 链置换反应，对莫比乌斯环带进行了裁剪重构，这一重构方法被称为 DNA 剪纸术。

Han 的团队首先提出了 DNA 剪纸术，并在实验中首先利用 DNA 剪纸术构建莫比乌斯环带，然后再利用这种 DNA 剪纸术对已有结构进行了修饰裁剪，得到了新的环带结构^[20]。该莫比乌斯环带使用单链 M13mp18 病毒 DNA 作为支架链，164 个短 DNA 寡核苷酸作为订书钉短链。如图 1-9 所示，其中横向深蓝色链代表较长的支架链，黑色代表普通的订书钉短链，橙色和绿色的短链是计划切除的订书钉短链。在链置换反应的作用下，使得橙色部分和绿色部分不再与长链相连接，得到图 1-9 中右图的效果，不再有订书钉短链负责将 6 号区域的长链与 5、7 区域的长链相衔接，从而实现 DNA 折纸结构的剪切。

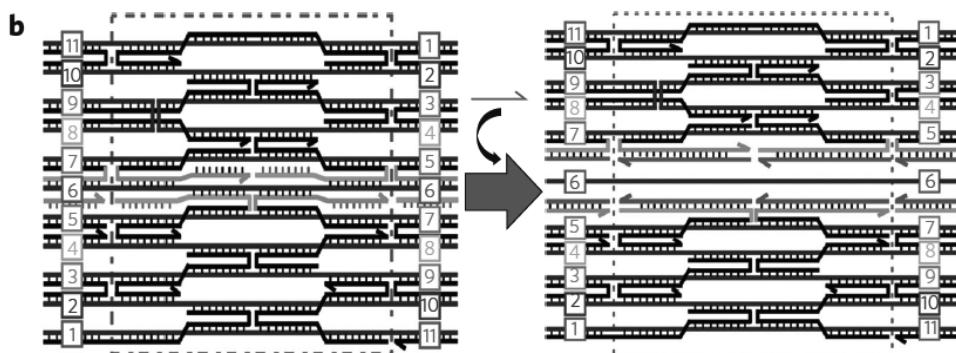


图 1-9 Han 提出的 DNA 剪纸术的示意图^[20]

然而，这种 DNA 剪纸术需要将需要裁剪部位的互补短链一一设计合成，带来较大的实验和成本负担，同时反应条件比较严格，需要经过两次退火。

综上分析，DNA 局部变构具有很重要的意义，但是仅依赖 DNA 链置换反应的 DNA 剪纸术存在和大的缺陷。本课题聚焦于 DNA 剪纸术的改进，将使用聚合酶链置换反应的方法，对三维 DNA 折纸结构进行局部变构，这可以简化 DNA 折纸

剪纸结构变构的设计，降低反应条件的要求，进一步验证并探索 DNA 折纸术和 DNA 剪纸术的技术应用与未来潜力。

1.3 章节安排

论文将分为五章阐述：

第一章：绪论。介绍 DNA 自组装结构以及其纳米雕刻系统的研究背景与意义，以及国内外的研究现状，并对全文结构进行安排。

第二章：对 DNA 折纸术以及剪纸术的原理进行介绍，介绍使用软件进行 DNA 折纸结构设计的流程，详细介绍 caDNAno 软件的使用，分析聚合酶剪纸术的设计细节和要求。

第三章：纳米雕刻系统三维模版结构仿真，详细介绍目标设计的雕刻系统三维模版，并介绍使用仿真软件对设计结果进行验证和展示。

第四章：基于三维结构的纳米雕刻系统实验与结果分析。利用实验对设计的 DNA 折纸与剪纸结构进行可行性验证，并观察分析实验结果。

第五章：总结。本章总结了毕业设计(论文)的主要工作并做出展望。

2 聚合酶驱动纳米雕刻系统设计

本章节将详细介绍聚合酶驱动纳米雕刻系统的设计过程。结构设计主要分为两步。第一步，设计出三维 DNA 折纸结构作为聚合酶驱动的剪切雕刻系统的模版；第二步，根据三维模版结构，布置剪切雕刻位点，综合调整模版结构，确保聚合酶驱动纳米雕刻系统的稳定性和可行性。具体来讲，将分为利用 DNA 折纸术设计三维模版，根据三维模版设计聚合酶驱动的 DNA 剪纸术结构，本章将遵循此顺序对技术原理和设计细节进行介绍。

2.1 DNA 折纸术

2.1.1 DNA 折纸术原理

DNA 折纸术利用 DNA 分子自组装形成二维或三维结构，它的原理基于 DNA 分子的天然特性，即核酸碱基之间的互补配对。这种互补配对使得两条单链的 DNA 可以通过氢键相互结合，形成一个双螺旋的 DNA 双链结构。

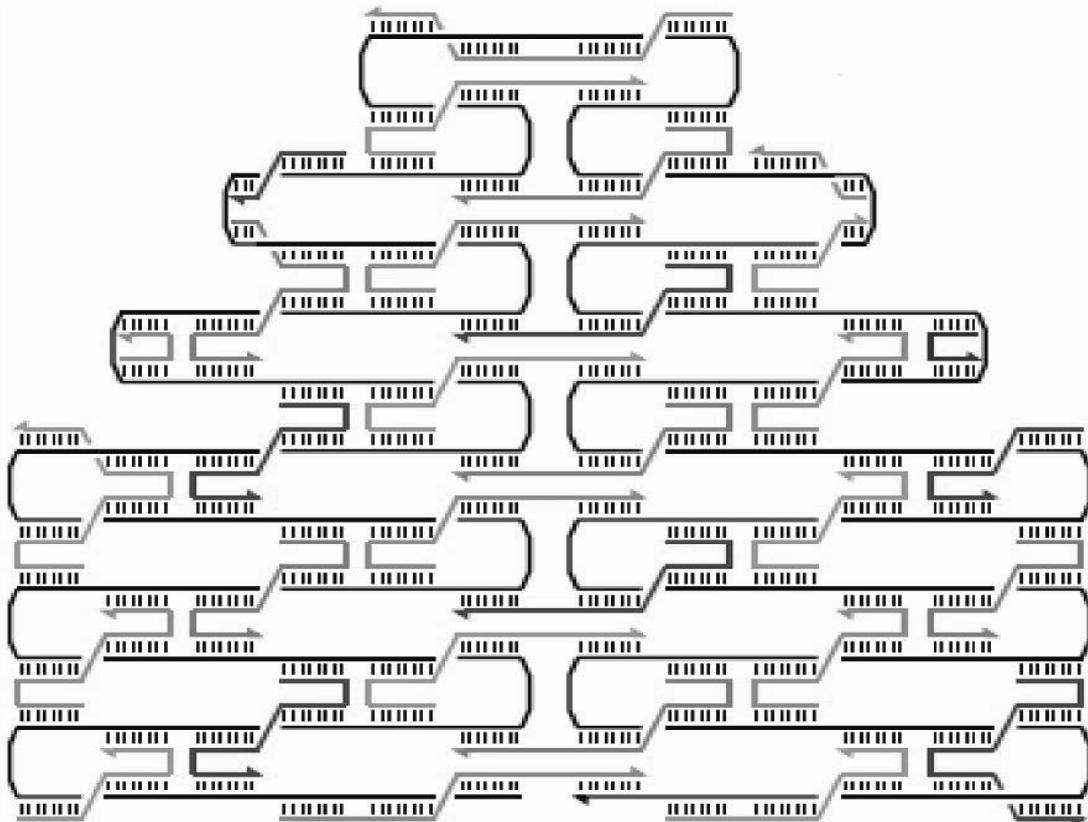


图 2-1 DNA 折纸术示意图

DNA 折纸术利用这种互补配对的特性，通过设计合适的 DNA 序列，使得单链 DNA 在特定的条件下能够自发地折叠成所需的结构。具体来说，DNA 折纸术通常采用一条长链的 DNA 作为“骨架”，在其上通过设计合适的短链 DNA（称为订书钉链）来形成所需的结构。这些订书钉链通过与骨架上的序列互补配对，将骨架上的单链 DNA “折叠”成所需的形状。

为了实现这种自组装，设计者需要首先选择一个适当长度的 DNA 单链作为骨架，并在其上标记出需要折叠的区域。接下来，设计者需要通过计算机程序或手工设计的方式，构建出一组订书钉链 DNA 序列。这些序列需要满足以下条件：与骨架上的序列互补配对时，能够形成所需的结构，并且在订书钉链与骨架上的配对后，不能与其他订书钉链相互配对。最后，将订书钉链与骨架混合在一起，经过适当的温度、溶液离子浓度等条件的控制，使它们自组装成所需形态。

DNA 折纸术主要包括两个重要结构：1条长链（支架链），多条短链（订书钉链）。如图 2-1 所示，黑色长链即为支架链，彩色短链即为订书钉链。在设计时，首先利用长链“织”出目标的形状，然后再用短链对形状结构进行固定。这种方法将 DNA 自组装结构的设计分为了两步，极大简化了每一步的难度，使大规模的自组装结构成为可能。

在设计中需要注意的是，DNA 分子是双螺旋结构，在外的碱基的位置随着 DNA 链的延伸也在旋转，每间隔 7 个核苷酸，碱基的位置旋转 270 度，故而每隔 21 个核苷酸，碱基将旋转 2 周回到原始位置。在设计订书钉链的位置时，要考虑到碱基旋转的相位，确保长链相邻部分之间的订书钉短链被置于碱基最为相近时的位置。

具体来讲，传统二维 DNA 折纸术的设计可以分为以下几步：第一步，根据期望的目标图形，搭建 DNA 折纸的平面模型；第二步，利用长链 DNA 反复对折填充第一步中涉及的 DNA 折纸平面模型；第三步，确定交叉位点，选择合适的位置，利用订书钉链将相邻的长链拼接；第四步，对整体结构进行完善和修改；第五步，提高结构的稳定性，主要指的是对订书钉链进行进一步的调整，约束订书钉链的长度，避免出现过长的订书钉链增加成本，避免出现过短的订书钉链导致结构不稳定。

三维 DNA 折纸结构的设计遵循类似的规则步骤。需要首先设计出目标期望的三维结构模型，然后选择合适的方式，将三维模型展开为二维模型。在获得二维模型后，遵循二维 DNA 折纸结构设计的原理进行结构设计，并为二维模型自组装为

三维纳米结构提供额外的订书钉链支撑。三维 DNA 折纸结构的搭建可分为蜂巢型和立方体型，蜂巢型设计得到的三维结构更加稳定，同时六边型的拼接原则与 DNA 碱基旋转的规则相匹配，更方便设计 DNA 三维立体纳米结构。

2.1.2 利用软件进行 DNA 折纸术设计

如上一小节所述，设计 DNA 折纸结构需要顾忌诸多因素。在利用长链设计目标结构时，折叠路径存在限制，为确保双螺旋结构的稳定性，一般需以螺旋周期为单位进行折叠。订书钉链的长度需要适中，过长会导致结构的合成成本增加，过短会导致结构的稳定性下降，结构的产率降低。订书钉链与骨架链的结合位点也需要考虑 DNA 分子的螺旋周期，确保在相邻两支长链此位置碱基距离最近处进行拼接。不同支长链实际是同一条链的空间叠放，不同支间存在间隙，该间隙会影响整体结构的稳定性，需要使用较长的订书钉链在间隙处进行加固。

虽然 DNA 折纸术已经极大简化了 DNA 自组装结构的设计难度，但为了设计出稳定的高产率的 DNA 折纸结构，有诸多准则和要求需要遵守，为结构的设计带来了挑战。目前已有较为成熟的软件可以辅助设计，caDNAno 软件由 Shawn Douglas 教授团队开发^[26]，可以辅助进行 DNA 折纸结构的设计。该软件的界面由两个部分组成，如图 2-2，左侧界面为 DNA 折纸结构的横截面设计图，右侧界面支持对每支 DNA 链进行设计。

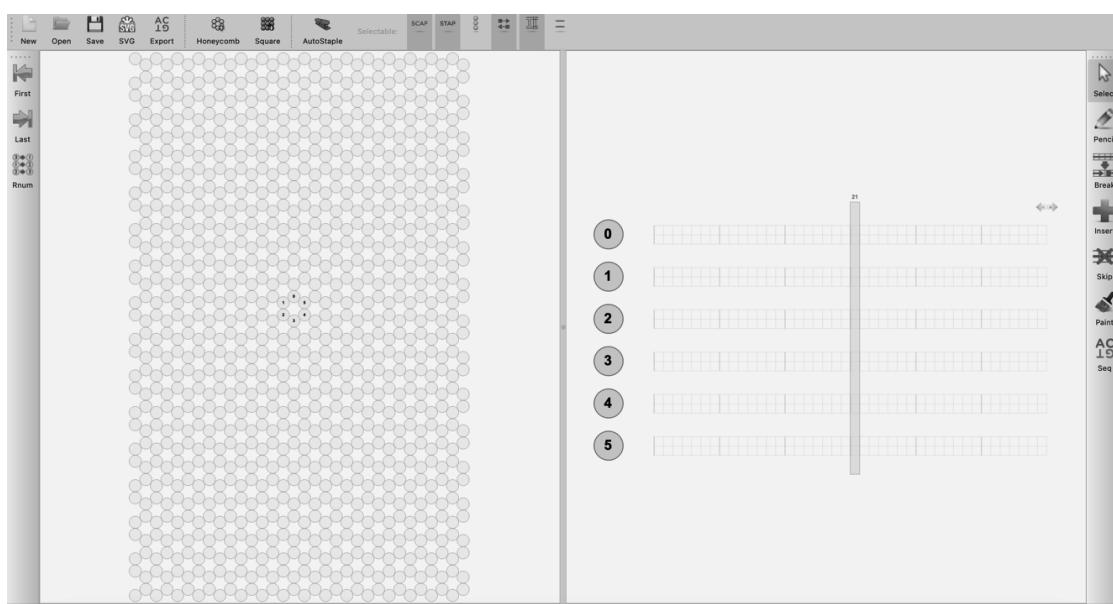


图 2-2 caDNAno 软件界面展示

在设计 DNA 折纸结构时，需要考虑 DNA 的螺旋结构，只有在特定位点将相

邻的 DNA 相连，才可以避免由于 DNA 螺旋导致连接位点的两个碱基距离过远，而导致所设计出的结构不稳定。DNA 每个螺距约为 10.5 个碱基，即每隔 10.5 个核苷酸，碱基的方向便会旋转 360 度。在实际设计过程中，将 2 个螺距，即 21 个碱基作为一个单位。对于蜂巢形的三维 DNA 折纸结构而言，将每 7 个碱基作为一个子单位，便可以确保不同分支在局部碱基距离最近时相连，确保结构的稳定性。

caDNAno 软件对于三维 DNA 折纸结构的设计可以分为三步。第一步，在左侧界面中确定目标期望的三维结构；第二步，利用长链对结构进行填充，并对长链结构进行调整；第三步，自动添加订书钉链，该步产生的订书钉链由算法自动生成，对于简单的 DNA 折纸结构可以较好的满足稳定性的要求，但是对于较为复杂的三维 DNA 折纸结构，该算法生成的订书钉链仍需要进行较多的人工调整，调整的原则遵循 DNA 设计的原则，控制订书钉链的长度，控制订书钉链的结合位置，确保订书钉链均匀连接长链的每一支，确保长链间隙处有较为稳定的订书钉链进行拼接。

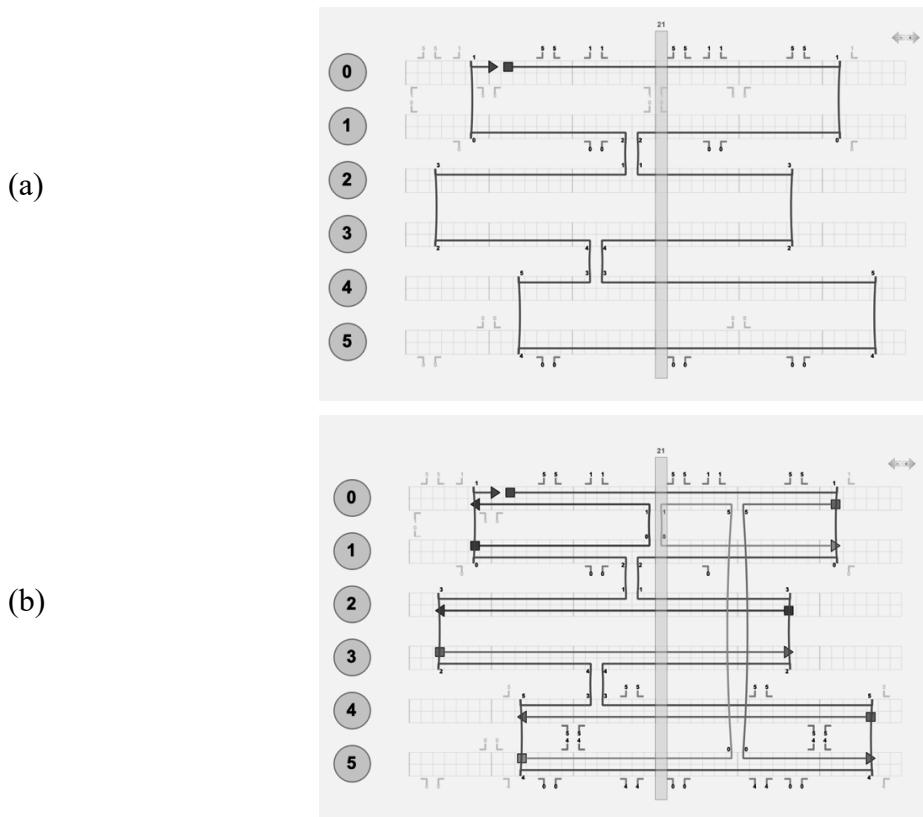


图 2-3 caDNAno 软件设计流程。(a) 选择合适的位置拼接长链。(b) 利用订书钉链对结构进行加固。

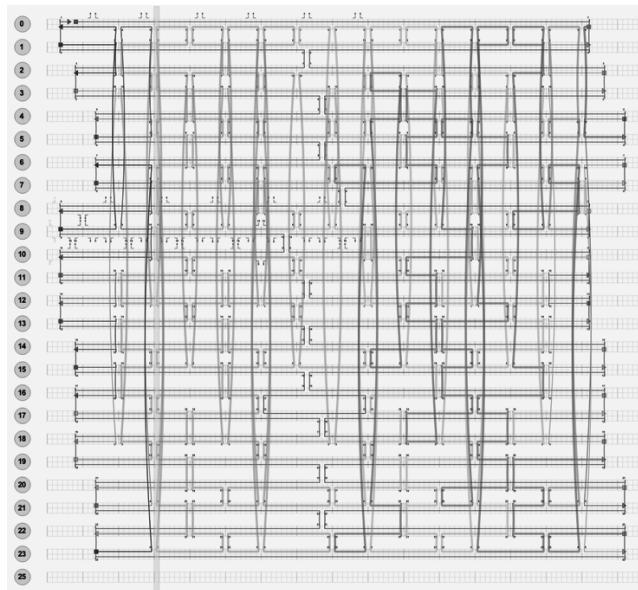


图 2-4 对于较为复杂的 DNA 折纸结构, caDNAno 软件算法自动生成的订书钉链的组合不再能够满足实际产品合成的需求, 需要进行人工调整, 控制订书钉链的长度, 利用订书钉链对长链间隙进行加固。

2.2 DNA 剪纸术

课题设计了三维双层圆柱 DNA 折纸结构作为聚合酶驱动 DNA 剪纸术雕刻系统的模版, 在获得三维模版设计后, 实现聚合酶驱动 DNA 剪纸术雕刻系统分为三步: 第一步, 设计期望剪切的模型结构; 第二步, 根据期望剪切的模型结构, 在模版上确定剪切雕刻位置, 并对订书钉链进行适当调整, 以确保剪纸产物具备足够的稳定性和适当的产率; 第三步, 对期望剪切位点对应的订书钉链添加聚合酶引物互补片段。

2.2.1 基于 DNA 折纸结构模版设计剪纸的原理

如图 2-5, 在设计 DNA 折纸结构时, 对预期将要裁剪位置的订书钉短链 DNA 添加一小段游离的单链, 并确保这段单链与聚合酶的引物短链互补。在剪切时, 向溶液中添加足量引物, 引物将会与预期剪切位置的游离单链相结合, 并使聚合酶由此开始合成新的对应链, 直至将原本结合在支架链上的订书钉短链拆除, 原先的订书钉短链将会与其完全互补的链相结合, 从而实现聚合酶驱动的 DNA 折纸结构的剪切雕刻系统。

需要注意的是, 为保证剪切的有效性, 在设计选择剪切位点时, 需要保证剪切

位点的游离短单链一致朝外，以便于聚合酶与其结合。

本课题在设计 DNA 折纸结构时，也要考虑到保留合适的位点以便 DNA 剪纸术引物的结合。在 caDNAno 软件中，可以便捷查看每一支 DNA 在特定位点时碱基的朝向，为确保外部引物可与 DNA 折纸结构顺利结合，需确保期望拆除的订书钉链 5'端朝外。

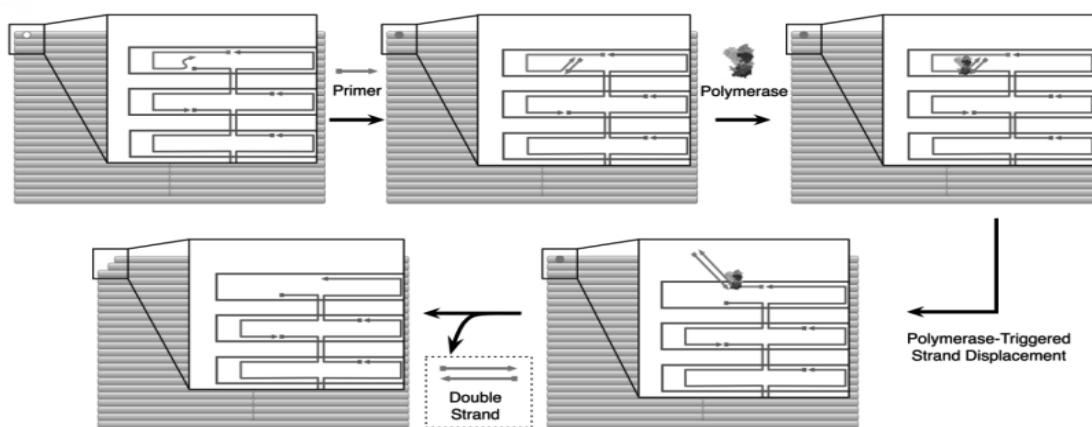


图 2-5 基于聚合酶链置换反应的 DNA 剪纸术示意图

2.2.2 聚合酶驱动 DNA 纳米结构雕刻系统设计

如上所述，聚合酶驱动的 DNA 纳米结构雕刻系统的设计可分为三步，本小节将逐步详细介绍该雕刻系统的设计过程。

第一步，根据三维 DNA 折纸结构模版，设计期望的剪切雕刻结构。本课题计划对三维 DNA 折纸结构模版进行两次剪切雕刻，在模版结构的基础上，划分合适的剪切雕刻区域。

由于 caDNAno 软件的设计界面仅提供 DNA 三维模版结构的二维展开模型，在划分区域时要结合模型的空间结构，划分合适的区域进行剪切。caDNAno 软件支持对不用区域的订书钉链进行不同颜色的划分，课题将整个三维 DNA 模版结构的订书钉链划分为三个区域，分别为：内层圆柱区（蓝色），外层圆柱 1 区（红色），外层圆柱 2 区（绿色），其中外层圆柱的两个区域都将进行聚合酶驱动的 DNA 剪纸雕刻，将其进行拆除，而内层圆柱将始终保留。

区域划分的结果如图 2-6，如图 2-6 所示，整个 DNA 折纸模版结构分为三个区域，其中 0-23 支所示的蓝色区域为内层圆柱，在实验过程中将始终保留，不进行剪切，24-53 支的每一支都被分为了红色和绿色的部分，将分别进行剪切。

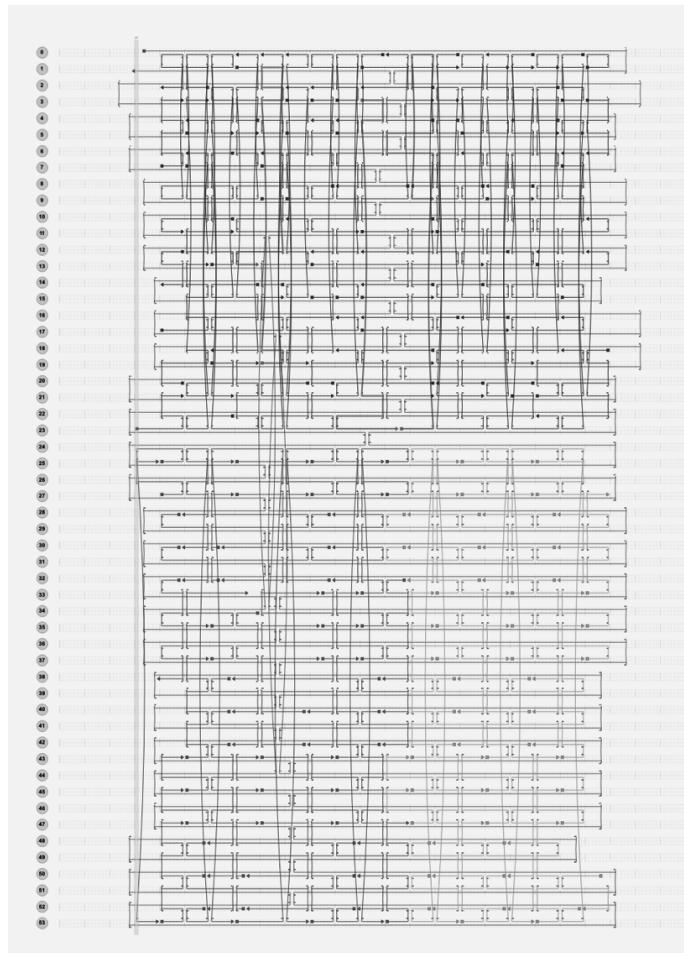


图 2-6 caDNAno 软件设计双层圆柱状 DNA 折纸结构的展开图与雕刻区域划分

第二步，根据期望的雕刻结构，确定剪切雕刻位置，并依此对三维 DNA 折纸模版的订书钉链进行调整，以确保结构的稳定性和可行性。虽然在三维 DNA 折纸模版的设计过程中，已经对订书钉链的位置和分布进行的人工手动的调整，以确保结构的稳定性，但是为了提高聚合酶 DNA 链置换反应的效率，必须依据一定的原则对模版订书钉链的位置进行修正。

聚合酶是一种大分子酶，其空间体积约为 250 立方纳米，考虑到 DNA 分子的螺旋结构，若聚合酶的引物位点经螺旋周期旋转至蜂巢结构的内部，则将对聚合酶与引物的结合带来极大的困难，同时也不利于新链的合成。由此原因，需要确保即刻拆除的订书钉链的 3' 端在螺旋结构中相对于三维 DNA 折纸结构模版朝外，这样才可以保证聚合酶有足够的空间与引物结合，催化聚合酶链置换反应。

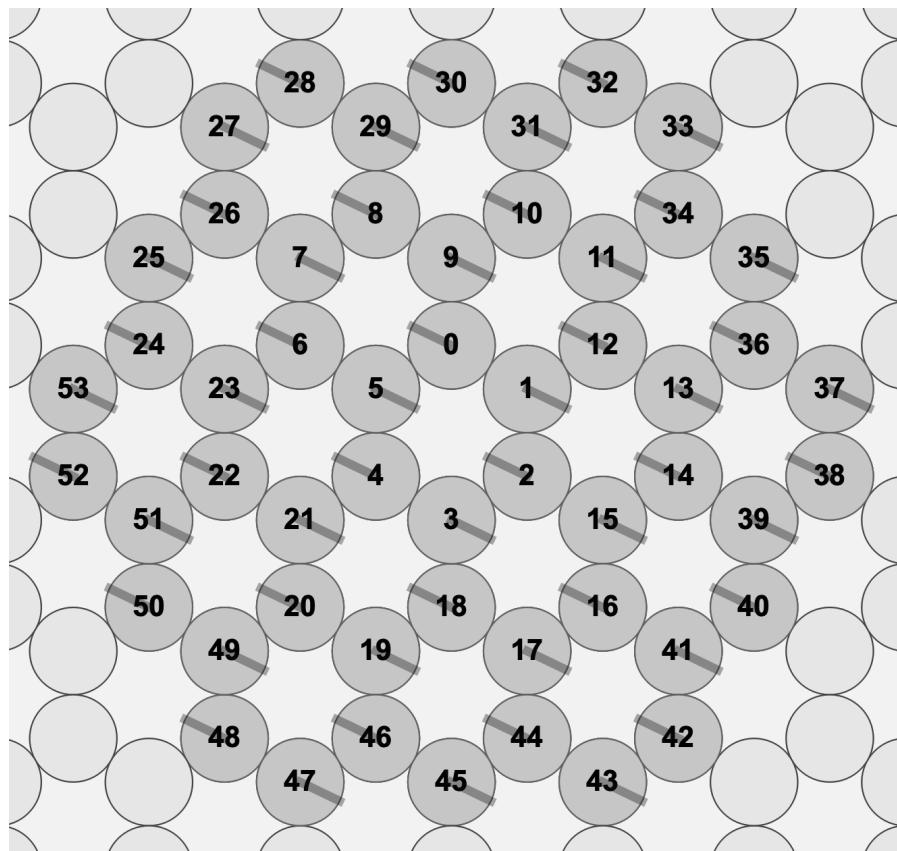


图 2-7 利用 caDNA 软件观察三维 DNA 折纸模版不同位置的螺旋状态

利用 caDNAno 软件，可以方便快捷地观察三维 DNA 折纸结构模版在不同位置的螺旋状态。如图 2-7 所示，每一支长链对应的圆柱截面都有一个蓝色的长条，这个长条代表的是此位置截面图中，该支长链螺旋的状况，以 25 号为例，该状态对应此处的订书钉链螺旋周期旋转至双层圆柱的外侧，若聚合酶可以在此处与引物结合，则可确保聚合酶有足够的空间进行催化聚合酶链置换反应。在这个位置的截面图中，例如 28, 30, 32 三支长链是不适合设计引物位点与聚合酶结合的，因为根据图中显示的螺旋周期位置，这三支长链处的订书钉链朝内，若在此添加引物互补片段，则可能导致引物互补片段朝三维双层圆柱的内侧，导致聚合酶没有足够的空间进行结合，从而阻碍聚合酶驱动的三维 DNA 纳米结构雕刻系统的实现。

图 2-7 截面图对应的二维展开图如图 2-8 所示。根据图 2-7 中分析得到的结论，此截面位置适合 25 号长链布置引物位点。如图 2-8 所示，图中央橘色竖条带对应图 2-7 的截面位置，为确保 25 号长链在此处可以添加引物互补片段，需要保证在此位置的订书钉链恰好处于 3' 端位置。

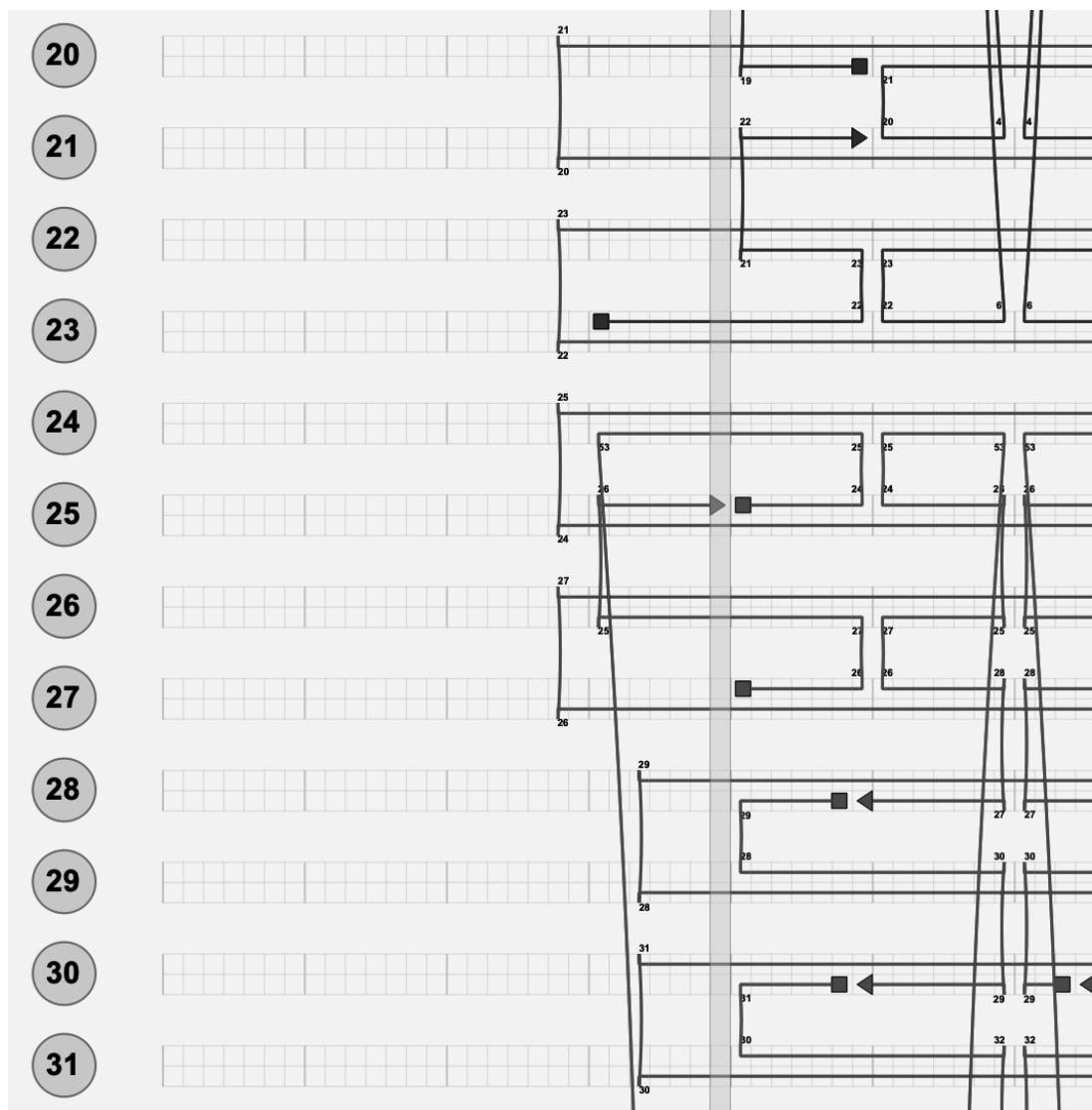


图 2-8 caDNAno 软件设计的三维模版在特殊位置的二维展开图

由于 DNA 聚合酶在结合引物后，沿引物的 5'端点朝向引物的 3'端点进行合成延伸新的 DNA 单链，所以要确保合适的剪切位点有订书钉链的 3'端点，从而在后续过程中在此处添加引物互补片段，就可以在添加对应引物后，使得聚合酶按照期望的方向移动合成新的 DNA 单链，最终与该条订书钉链完全结合，形成完整的稳定的 DNA 双链结构，即将这条 DNA 订书钉链从骨架链上进行了拆除，拆除后该部分不再有订书钉链加固结构，此处的骨架链不再有稳定的支撑，从而实现了聚合酶驱动的三维 DNA 模版纳米结构雕刻系统。

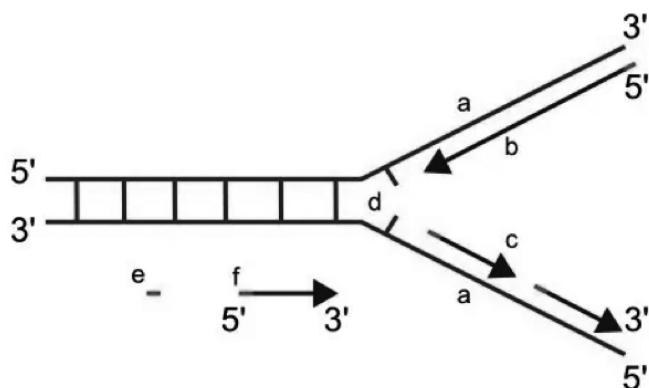


图 2-9 聚合酶原理示意图。图中 e 为引物，在聚合酶与引物结合后，将催化引物序列朝 3' 端方向延伸，即朝 f 所展示的方向延伸。

第三步，为剪切位点添加聚合酶引物互补片段。在确定最终的 DNA 折纸结构模版后，在期望拆除的订书钉链 3' 端额外添加聚合酶的引物互补序列，这样一来，在添加对应引物后，即可实现聚合酶链置换反应，实现三维 DNA 折纸结构模版的剪切雕刻。

表 2-1 聚合酶引物序列表

引物名称	碱基序列
P1	TTTCTACTATGTGCAGA
P2	TTTCAGACAGCAAGGTA

2.3 本章小结

DNA 折纸术虽然极大降低了设计大规模 DNA 自组装结构的复杂度，但是在布置订书钉链的过程中，仍旧有很多细节和要求需要被纳入考量，订书钉链的长度要进行适度的约束，长链的间隙需要利用特殊的订书钉链进行专门的加固，且间隙处的结构的稳定性相较于其他无间隙位置的稳定性略低，应该合理安排间隙的位置，确保结构的整体稳定性。

caDNAo 软件极大简化了 DNA 折纸结构的设计流程。在进行时，首先选择蜂巢结构或者立方体结构，其中蜂巢结构更适合设计构建三维 DNA 折纸结构，其设计得到的三维结构稳定性更高，空间中每一支长链的连接与 DNA 双链螺旋结构的周期相匹配。

在设计得到三维 DNA 折纸结构模版后，就可以进行聚合酶驱动的 DNA 折纸结构模版的纳米雕刻系统设计。需要对三维 DNA 折纸结构模版中订书钉链的位置进行调整，确保所有要雕刻拆除的 DNA 订书钉链的引物结合位点根据螺旋周期均朝向双层圆柱结构的外侧，从而便于聚合酶结合并催化雕刻过程。在确保订书钉链符合这一要求后，便可以为雕刻剪切位点添加引物互补片段，本课题使用了两种引物，对应两种聚合酶，可以实现对模版结构的两次剪切雕刻。

3 纳米雕刻系统三维模版结构仿真

本章使用 CanDo 和 oxDNA 两种软件对纳米雕刻系统三维模版的结构进行了软件仿真。CanDo 和 oxDNA 都是常见的 DNA 折纸结构仿真软件，在设计得到 DNA 折纸结构模版后，在进行实际分子实验前，利用计算机软件进行预先仿真可以验证结构的可行性与正确性，若结构存在错误，与期望得到的结构不相符，可以及时在 caDNAno 软件中进行修改并重新仿真验证。

3.1 纳米雕刻系统三维模版结构的 CanDo 仿真

CanDo 可以对 DNA 折纸结构进行粗粒度的分子动力学仿真，可以反映出结构局部稳定性的情况，可以直接使用 caDNAno 设计生成的 json 文件进行仿真。

在设计初期，可以使用 CanDo 进行粗粒度的分子动力学模拟，确定所设计的结构各部分都是足够稳定的。在大致敲定 DNA 设计方案后，再使用 oxDNA 进行细粒度的仿真，观察模型的三维结构是否理想，观察为 DNA 剪纸预留的位点是否暴露在结构的外侧。

根据上述原则，设计圆柱状双层 DNA 折纸结构，使用 caDNAno 软件辅助设计，可自动生成合适的订书钉链组合，再经过人工检查调整后，便可得到目标的 DNA 折纸结构。设计选用蜂巢结构，因为蜂巢结构相比立方结构每支的间距更大，使得整体体积更大，结构更加稳定，更加适合搭建立体 DNA 折纸结构。考虑到实验所用的骨架链为 M13 噬菌体的单链 DNA，所以要确保设计中的骨架链长度与该单链 DNA 一致，保持为 7249 个脱氧核糖核苷酸组成。

在完成结构设计后，使用 CanDo 软件进行仿真。CanDo 软件仿真结果如图 3-1 所示，该软件可以实现对 DNA 自组装结构的粗粒度仿真，可以直观的看到 DNA 自组装结构各区域的稳定性，图中红色区域代表较不稳定的区域，蓝色区域代表稳定的区域。由图 3-1 可以看出，结构整体稳定，其中内层圆柱的稳定性要明显高于外层圆柱，圆柱两端的稳定性要低于中心区域的稳定性。CanDo 软件同时可以生成一段 DNA 自组装结构受到外力影响时变化的视频，根据视频可以确定，在仿真中整体结构是足够稳定的。

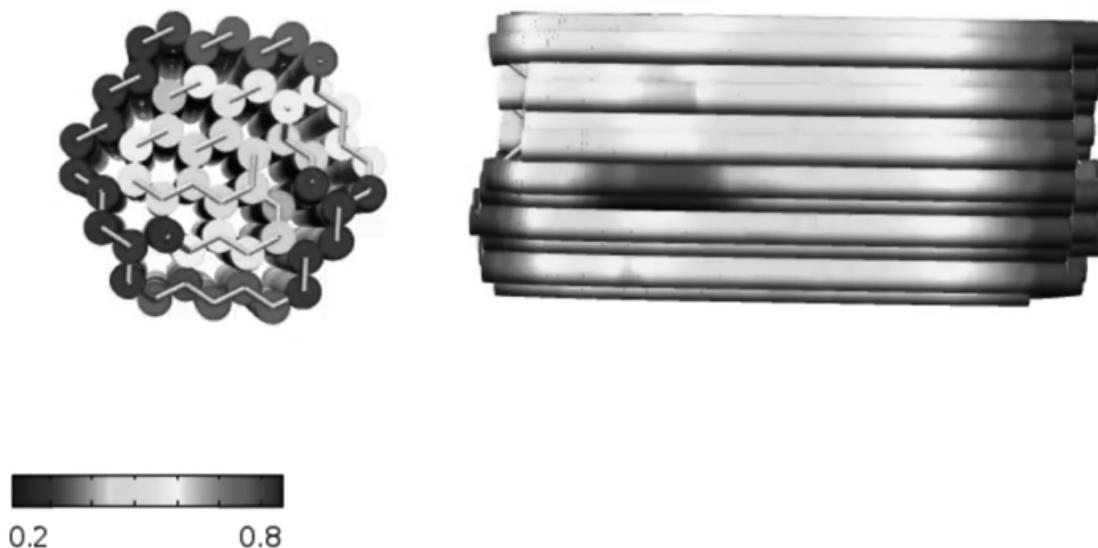


图 3-1 CanDo 软件对双层圆柱状 DNA 折纸结构的仿真

使用 CanDo 软件进行仿真的步骤如下：第一步，打开 CanDo 并登录账户，利用 caDNAno 软件提供的 json 结构设计文件进行仿真；第二步，上传 caDNAno 软件提供的 json 结构设计软件，配置仿真参数，包括双螺旋直径，螺旋周期，粗粒度/细粒度仿真等等；第三步，完成参数配置后，提交仿真实验，软件将自动进行仿真，得到类似图 3-1 所示的结构仿真结果。

CanDo 的使用非常方便，可用于进行 DNA 以及 RNA 的分子模拟仿真，可以进行二维以及三维结构的模拟。软件基于能量函数，使用蒙特卡罗模拟和分子动力学模拟方法来模拟 DNA 或者 RNA 分子的结构和构象变化，软件的算法考虑了分子内部的碱基对平面，二面角，非共价相互作用和静电能量等多种因素。

该软件仿真的精确度高，可编程性强，且易于使用，软件提供了非常友好的图形用户界面和丰富的可视化工具，能够确保用户直观的了解分子模拟的结果。该软件不仅可以应用于 DNA 折纸结构的模拟，在 RNA 分子结构和功能研究，RNA 药物设计等领域也有广泛的应用。

3.2 纳米雕刻系统三维模版结构的 oxDNA 仿真

本课题也使用了 oxDNA 软件进行分子仿真。CanDo 和 oxDNA 都是常见的 DNA 折纸结构仿真软件，CanDo 可以对 DNA 折纸结构进行粗粒度的分子动力学

仿真,可以反映出结构局部稳定性的情况,可以直接使用 caDNAno 设计生成的 json 文件进行仿真。oxDNA 的仿真则是精细到每一位核苷酸,不仅可以进行更精确的分子动力学分析,同时也非常方便的观察 DNA 的三维结构。虽然 oxDNA 的分子动力学仿真更加精确,但是却不显示局部稳定性的情况,且仿真时间较长。 oxDNA 需要先利用 tacoxDNA 软件将 caDNAno 生成的 json 文件转化为 oxDNA 文件,才可以进行仿真。

oxDNA 是一款用于模拟双链 DNA 的软件,可以预测 DNA 的结构、力学性质和动力学行为。该软件基于经典分子动力学方法,使用多体势能函数来描述 DNA 分子内部的相互作用,同时考虑了溶剂和离子的影响。oxDNA 使用时间步长算法来模拟 DNA 分子的运动轨迹,从而预测其力学和动力学性质。oxDNA 软件的精确性较高,能够准确地模拟 DNA 分子的结构和动力学行为,包括形态、振动、捆绑、弯曲和扭曲等多种力学特性。同时该软件扩展性较强,支持并行计算和大规模模拟,能够模拟复杂 DNA 分子的结构和动力学行为。oxDNA 的应用范围广泛,包括 DNA 结构和力学性质研究、DNA 折纸和自组装、DNA 纳米技术等领域。它被广泛应用于生物医学、纳米技术、生物材料等方面的研究和开发。

用 oxDNA 软件进行仿真,具体操作步骤如下:

第一步,用 tacoxDNA 软件将 caDNAno 软件设计的结构转化为 oxDNA 的格式,之后使用 oxDNA 软件进行仿真。该操作实际上为 DNA 折纸结构提供仿真模拟的初始坐标,拓扑信息,势能函数和模拟参数等信息,并将其保存为输入文件格式。

第二步,使用 oxDNA 的图形用户界面来运行模拟。在运行模拟之前,需要选择适当的模拟算法、时间步长、温度、压力等参数,并设定模拟的总时长和输出频率。

第三步,对仿真结果进行分析。oxDNA 提供了多种结果分析工具,可以对模拟结果进行可视化和统计分析。用户可以通过图形界面来展示和分析分子结构、动力学轨迹、力学特性等信息。

oxDNA 软件可以对 DNA 结构进行细粒度的仿真模拟,可以精确到每一个核苷酸的变化情况。如图 3-2 所示,为 oxDNA 软件对本课题设计的 DNA 折纸结构的仿真结果,这一细粒度的仿真结果可以在调整订书钉链从而配合 DNA 剪纸术时提

供参考。

oxDNA 软件同时也可以生成一段 DNA 自组装结构受到外力作用时的变化视频，可以辅助更精确的设计。

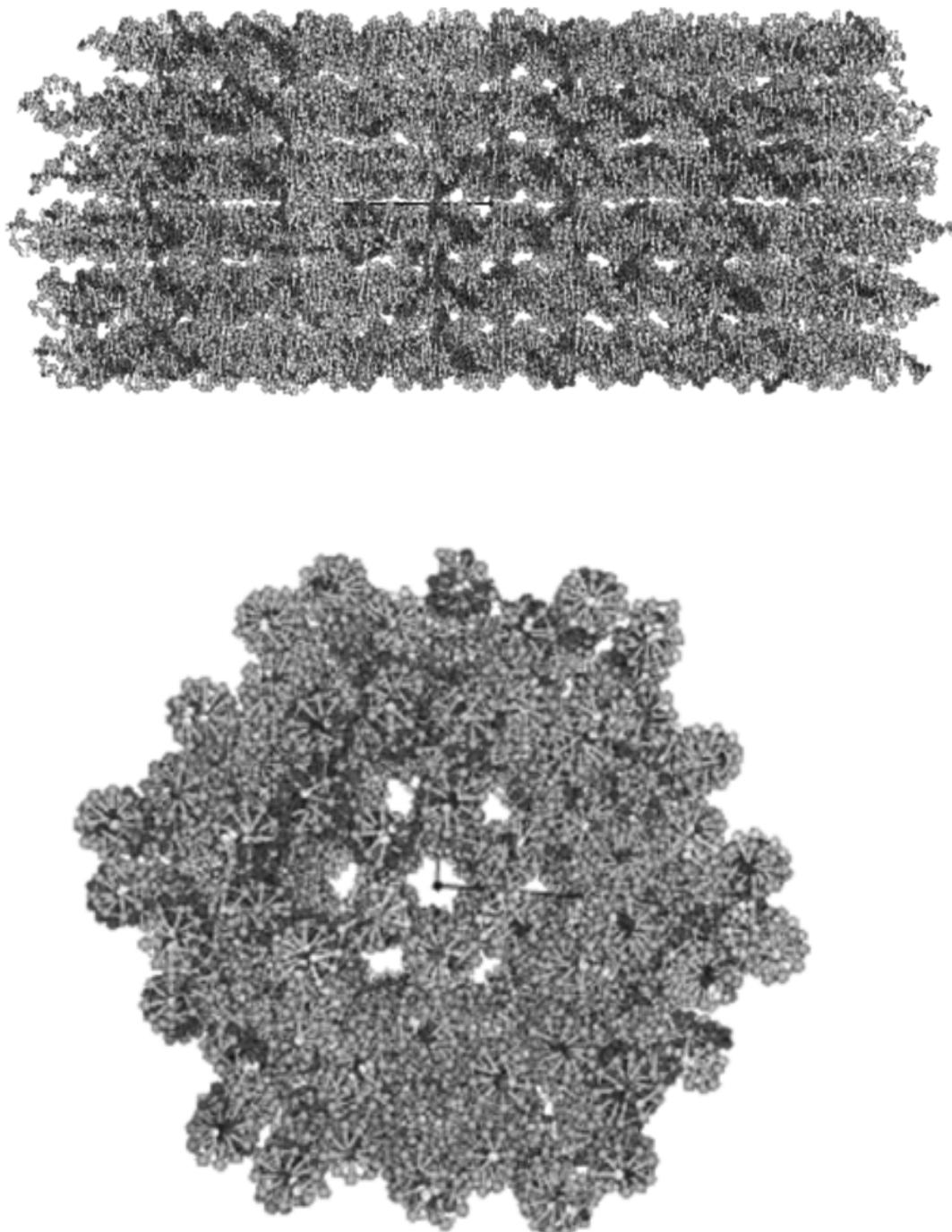


图 3-2 oxDNA 软件对双层圆柱状 DNA 折纸结构的仿真

3.3 本章小结

本章使用了 CanDo 软件和 oxDNA 软件对上一章中设计得到的三维 DNA 折纸结构模版进行了仿真模拟，确认了结构设计的正确性。

CanDo 是一个基于连续模型的 DNA 力场软件，可以对 DNA 分子的力学性质进行建模和模拟，可以用于预测和设计 DNA 折纸结构等。该软件具有较高的计算效率和可扩展性，可以支持多种并行计算和大规模模拟。然而，CanDo 使用的是连续模型，对于分子的精细结构和动态特性描述不够准确。而且，该软件对于复杂 DNA 结构的建模和模拟有一定的限制，无法涵盖所有 DNA 结构类型和动力学过程。

oxDNA 是一个基于颗粒模型的 DNA 分子动力学软件，可以对 DNA 分子的局部结构和动态行为进行建模和模拟。该软件在描述 DNA 分子的细节和动态特性方面具有很高的精度和准确性，可以用于研究 DNA 纳米技术、DNA 材料科学等领域。但是 oxDNA 的计算效率相对较低，模拟规模和计算时间受到一定限制。

4 基于三维结构的纳米雕刻系统实验与结果分析

传统的 DNA 折纸结构局部重构一般使用 DNA 链置换反应来实现目标 DNA 链的拆解与替换，这种方法被称为 DNA 剪纸术。但是基于 DNA 链置换反应的 DNA 剪纸术设计非常复杂，反应条件非常苛刻，这些问题都限制了 DNA 剪纸术在生物纳米机器人等领域的应用发展。聚合酶链置换反应可以取代普通的 DNA 链置换反应，以更加简单高效的方式实现三维结构的纳米雕刻系统。本章介绍了三维 DNA 折纸结构模版合成实验，以及针对 DNA 折纸结构模版实施纳米雕刻实验，使用了凝胶电泳，透射电镜两种技术手段观察实验结果，验证了所设计模版结构的稳定性，以及该基于三维结构的纳米雕刻系统的可行性。

4.1 实验过程

4.1.1 DNA 样品保存

订购得到的 DNA 样品储存在 EP 管中，每个 EP 管都标有固定的编号。为确保 DNA 活性，需将 DNA 放置在-21 摄氏度的冰柜中存储，在进行实验时提前从冰柜中取出，静置等待溶液融化，待溶液融化后使用涡旋振荡仪确保溶液混合均匀，再使用微型离心机进行适当离心，确保 EP 管管壁没有残留溶液液滴。这一系列操作可以确保每次实验取出的 DNA 溶液均匀溶解，且管壁无残留液滴，避免在取液时沾染，对后续实验各成分的比例造成影响，同时也节约样品，避免样品收到污染。

4.1.2 DNA 样品浓度测定

根据前期设计，总共订购合成 173 条 DNA 链，对应 173 管溶液。在进行 DNA 折纸制作前，首先需要对每管溶液进行浓度测定，以确保在混合时每种 DNA 都保持合适的浓度。

紫外分光光度计是一种用于测量物质对紫外光的吸收能力的仪器。它通过测量样品溶液在特定波长范围内的吸光度来计算物质的浓度。这个仪器的工作原理基于贝尔-朗伯定律，即吸光度与物质的摩尔吸光系数、物质的浓度和光程的乘积成正比关系。在紫外分光光度计中，使用可见光和紫外光源，这种仪器能够在 200-800nm 的波长范围内测量吸光度。

在测定 DNA 溶液浓度时，常用的波长为 260nm。DNA 分子中含有大量的含氮

碱基，如腺嘌呤和鸟嘌呤，这些碱基在 260nm 处有最大的吸收峰。因此，可以利用紫外分光光度计测定 DNA 溶液的浓度。DNA 的摩尔吸光系数是已知的，因此只需测量 DNA 溶液的吸光度，并应用贝尔-朗伯定律计算 DNA 的浓度。

具体测量步骤如下：

第一步，准备标准曲线：准备一系列已知浓度的 DNA 溶液。使用紫外分光光度计在 260nm 处测量它们的吸光度，并将吸光度与浓度关系制成标准曲线。

第二步，取样：取一定量的待测 DNA 溶液，通常为 1-5 μ L。

第三步，测量吸光度：将待测 DNA 溶液放入紫外分光光度计的比色皿中，并在 260nm 处测量其吸光度。

第四步，计算浓度：使用标准曲线中的吸光度和浓度关系，计算待测 DNA 溶液的浓度。

需要注意的是，在测定 DNA 溶液浓度时，需要保证样品中没有杂质，如蛋白质或其他核酸。这可以通过在 280nm 处测量吸光度来检测。如果在 280nm 处的吸光度较高，则说明样品中可能存在蛋白质或其他核酸，需要进行进一步的处理或纯化。在实际操作中，为了减小误差，通常要进行多次测量，取平均值计算浓度。

紫外分光光度计是一种非常有用的分析工具，可以在很短时间内精确地测量 DNA 溶液的浓度。除了测定 DNA 溶液的浓度外，紫外分光光度计还可以用于测定其他生物分子，如蛋白质、核酸、酶等的浓度和纯度。

在实际应用中，需要同时测定 DNA 的浓度和纯度。因为一些污染物可以影响 DNA 在 260nm 处的吸光度，因此只测量 DNA 的吸光度可能会导致测量结果出现误差。为了评估 DNA 样品的纯度，可以同时测量在 280nm 处的吸光度。如果在 280nm 处的吸光度较高，说明样品中可能存在蛋白质等杂质，需要进行进一步的处理或纯化。此外，还可以通过比较 260nm 和 280nm 处的吸光度比值 (A_{260}/A_{280}) 来评估 DNA 的纯度，一般认为纯度较高的 DNA 样品其 A_{260}/A_{280} 值应该在 1.8 左右。

使用紫外分光光度计进行溶液浓度测量。该仪器可以对透明溶液的吸光值进行检测，不同成分对于不同频谱的光的吸收能力不同，从而得到目标样品中 DNA 的浓度。在测定前，首先使用纯净水对仪器进行标零，之后依次取 1 μ L 溶液放置于基座，进行测定，每测定完一管溶液后，使用无菌纸擦拭，再进行下一组测定。DNA

的最大吸收峰为 260nm，仪器提供的 OD260 值即反应 DNA 溶液中 DNA 分子的浓度。

在测定时需要注意观察 OD260 与 OD280 的比值，OD260 反应 DNA 浓度，OD280 反应蛋白质浓度，观察 OD260/OD280 的值，较纯的 DNA 溶液此项比值应该在 1.8-2.0 之间，若测量计算结果不在此范围内，需重新测量避免误差。

4.1.3 DNA 折纸制作

在测定所有 DNA 溶液的浓度后，即可进行 DNA 折纸结构的制作。为确保 DNA 结构的稳定性，需要在制作过程中添加 TAE 缓冲液（含镁离子）。

将所有订书钉链按照相同物质的量进行混合，获得订书钉链混合液。再将 M13 噬菌体单链与订书钉链按照 1:10 的比例混合添加到 TAE 缓冲液中。之后加水稀释，确保溶液体积为 100 μ L。

将混合液放入 PCR 仪器中进行退火操作。首先在 80 摄氏度保持 80 分钟，随后逐渐降低温度直至室温（15 摄氏度），总共保持 36 小时。

在退火结束后，把样品从 PCR 仪器中取出，需要对溶液进行提纯。使用 100k 超速离心管提纯得到的 DNA 折纸结构。进行 4 次超速离心，每次持续 4 分 30 秒，离心转速为 11000rpm。之后再进行 1 次回收离心，持续 1 分 30 秒，对应 1500rcf。

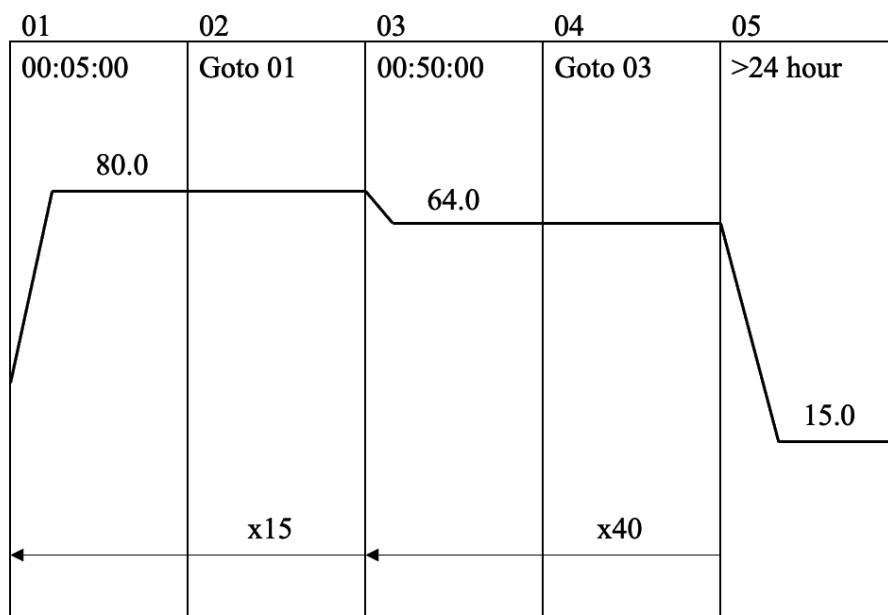


图 4-1 退火过程图

4.1.4 凝胶电泳制备

凝胶电泳 (Gel electrophoresis) 是一种实验技术，广泛应用于生物科学、生物化学和分子生物学等领域。它主要用于分离和分析不同大小和电荷的生物大分子（如蛋白质和核酸）。凝胶电泳的原理是利用电场使带有电荷的生物大分子在凝胶矩阵中按照大小和电荷迁移。凝胶的孔隙结构对大分子起到筛选作用，使得大分子迁移速度相对较慢，而小分子迁移速度较快。

关于凝胶电泳实验的具体操作流程如下：

第一步，准备凝胶：首先要选择合适的凝胶材料。常见的凝胶材料有聚丙烯酰胺凝胶（用于蛋白质电泳，即 SDS-PAGE）和琼脂糖凝胶（用于核酸电泳，如 DNA 和 RNA）。凝胶的孔隙大小和浓度可根据需要分析的生物大分子大小进行调节，本实验使用琼脂糖凝胶。

第二步，制备样品，将待分析的生物大分子样品进行适当处理，如蛋白质样品需要与 SDS 样品缓冲液混合，煮沸后使其变性，核酸样品需要与染料混合，以便在电泳过程中观察。

第三步，装载样品，将准备好的样品加载到凝胶的样品槽中。一般使用微量移液器或专用的样品加载器进行操作。

第四步，运行电泳，将装好样品的凝胶置于电泳槽中，并加入电泳缓冲液，使凝胶完全浸没。连接电源，调节适当的电压和电流，使带有电荷的生物大分子在电场作用下沿凝胶迁移。

第五步，染色与显影：电泳结束后，将凝胶取出，进行染色。对于蛋白质电泳，常用的染料有考马斯亮蓝 (Coomassie Blue) 或银染；对于核酸电泳，常用的染料有乙酰橙 (Ethidium bromide, EtBr) 或 GelRed 等。染色后进行显影，可以通过紫外光或特定波长的可见光观察到分子条带。

第六步，分析结果，根据生物大分子在凝胶上的迁移距离，可以分析其相对大小和电荷。通常，我们会在凝胶上加载一个分子量标准 (Molecular Weight Marker)，这是一组预先分离好的具有已知大小的生物大分子。通过比较样品中生物大分子的迁移距离与分子量标准的迁移距离，可以估算出样品中生物大分子的大小。

为初步验证实验结果，制备琼脂糖凝胶进行凝胶电泳实验。将 0.5g 琼脂糖颗粒与 62.5mL 制胶液混合，制胶液为 1xTAE 与 11mM 的镁离子溶液混合，在锥形瓶

中将所有成分混合，加热 2 分钟，观察胶体中是否有气泡，若有气泡，则适当震荡确保气泡排出。若胶体溶液有颗粒物溶解不充分，则再次加热重复以上步骤。

随后，将凝胶液倒入模具中冷却大约 1 小时。在凝胶彻底冷却后，将模具放在电泳槽中，将样品与甘油混合以确保样品可以沉入孔洞，设置电压 60V，电流 82mA，将装置放置于冰柜中避免温度升高。

本实验设计 5 组样品，分别为：1. 分子量标准 ($10\mu\text{L}$)，2. M13 噬菌体链 ($6\mu\text{L}+2\mu\text{L}$ 甘油)，3. PCR 直接获得的实验结果 ($35\mu\text{L}+5\mu\text{L}$ 甘油)，4. PCR 产物经过提纯处理后的结果 ($25\mu\text{L}+5\mu\text{L}$ 甘油)，5. 3 号泳道的备份。

凝胶电泳运行时，不同分子量的分子受到电极的力不同，从而产生不同位置的条带。

4.1.5 透射电镜样品制备

透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscope, 简称 TEM) 是一种利用高速电子束穿透样品并与其相互作用的显微镜。TEM 可以用于观察细胞结构、组织切片、纳米材料等，具有极高的分辨率，可以达到原子级别。TEM 的工作原理与光学显微镜相似，但使用的是电子束而非光线。电子束由电子枪产生，经过凝聚磁镜聚焦后穿透样品。样品中部分区域对电子束的穿透率不同，形成图像的明暗对比。透射电子束经过物镜磁镜聚焦，最终在荧光屏或电子探测器上形成放大的影像。

要利用 TEM 观察 DNA 自组装结构，首先需要准备适当浓度的 DNA 样品，然后将样品涂布在特制的电镜网格上。通常会在观察之前对样品进行负染处理，以提高图像对比度，本实验分别提供了正染和负染的实验结果图像，可以分析比较两种染色的效果差别。

在染色后会出现正染以及负染的情况，正染法是利用重金属染料与生物样品中的特定部位结合，使这些部位对电子束的散射增强，从而在 TEM 图像中呈现出较高的对比度。正染通常用于标记特定的生物大分子或细胞结构。负染法是将重金属染料吸附在生物样品周围而非结构内部。由于背景区域的散射能力较强，样品在图像中呈现出较低的对比度，形成“暗”影像。负染可以增强生物样品的对比度，使其在 TEM 中更容易观察，尤其适用于分辨率较低、本身对比度较差的样品。

在制备样品前，使用等离子清洗仪器对铜网进行清洗，具体步骤如下：将铜网放在玻璃板表面，一并推入等离子清洗机中，关闭盖口，进行抽真空操作，大约需

要 2 分钟。之后使用等离子照射清洗 30 秒，最后恢复气压，取出铜网放置在滤纸上。

用镊子夹住滤纸和铜网，取 $2\mu\text{L}$ 样品滴加在铜网上，确保样品在铜网上保持至少 1 分 30 秒。然后染色，取 $2\mu\text{L}$ 醋酸双氧铀一同滴于铜网，保持 1 分钟。

4.1.6 DNA 剪纸实验

在制备获得 DNA 双层圆柱状结构后，下一步即为使用 DNA 聚合酶剪纸术进行结构的修剪拆除。实验配置 11 组含等量折纸结构的溶液（每组为 $2\mu\text{L}$ M13 噬菌体 DNA 链溶液， $15\mu\text{L}$ 订书钉链混合液， $10\mu\text{L}$ 的 $10\times\text{TAE}$ 溶液，补充 $73\mu\text{L}$ 纯净水）。对于 1-5 组（记为 Z1）计划添加 P2 引物，对于 6-11 组（记为 Z2）计划添加 P1 和 P2 引物。则预期实验结果为 1-5 组仅拆除一半的外层圆柱环，6-11 组外层圆柱环被完全拆除。

P1 引物对应的拆除区域含有 55 条订书钉链，P2 引物对应的拆除区域含有 46 条订书钉链，经计算确定为确保区域完全拆除，P1 对应加入 825pmol （配置为 $2.5\mu\text{L}$ 的溶液），P2 对应加入 690pmol （配置为 $2\mu\text{L}$ 的溶液）。

配置溶液，对 Z1 组，添加 $17\mu\text{L}$ 折纸结构溶液， $0.5\mu\text{L}$ 的 dNTP 溶液， $4\mu\text{L}$ 剪纸引物溶液（P2），补 $1\mu\text{L}$ 纯净水和 $2.5\mu\text{L}$ 缓冲液。对 Z2 组，添加 $15\mu\text{L}$ 折纸结构溶液， $1.2\mu\text{L}$ 的 dNTP 溶液， $4\mu\text{L}$ 剪纸引物溶液（P1，P2）， $2.3\mu\text{L}$ 纯净水和 $2.5\mu\text{L}$ 缓冲液。在配置完成后，利用紫外分光光度计测量 Z1 和 Z2 的浓度，根据浓度添加对应量的 P1，P2 聚合酶。之后将样品放入 PCR 仪器中退火，在 35-25 摄氏度的环境下位置 10 分钟，然后在 24 摄氏度的环境下维持 2 小时，该退火操作相比普通 DNA 链置换反应显著简化了实验流程和反应环境要求。

在获得剪纸术结构后，与获得 DNA 折纸结构后的操作类似，进行超速离心提纯，并在提纯后制备透射电镜样品用以观测结果。

4.2 实验结果

4.2.1 折纸结构

为验证所设计结构的可行性，分别使用琼脂糖凝胶电泳和透射电镜观察得到的实验结果。在实验中，设置了五组样品：1. 分子量标准，2. M13 噬菌体 DNA 单链，3. PCR 直接结果（无提纯），4. 超速离心结果，5. 第 3 组的备份。

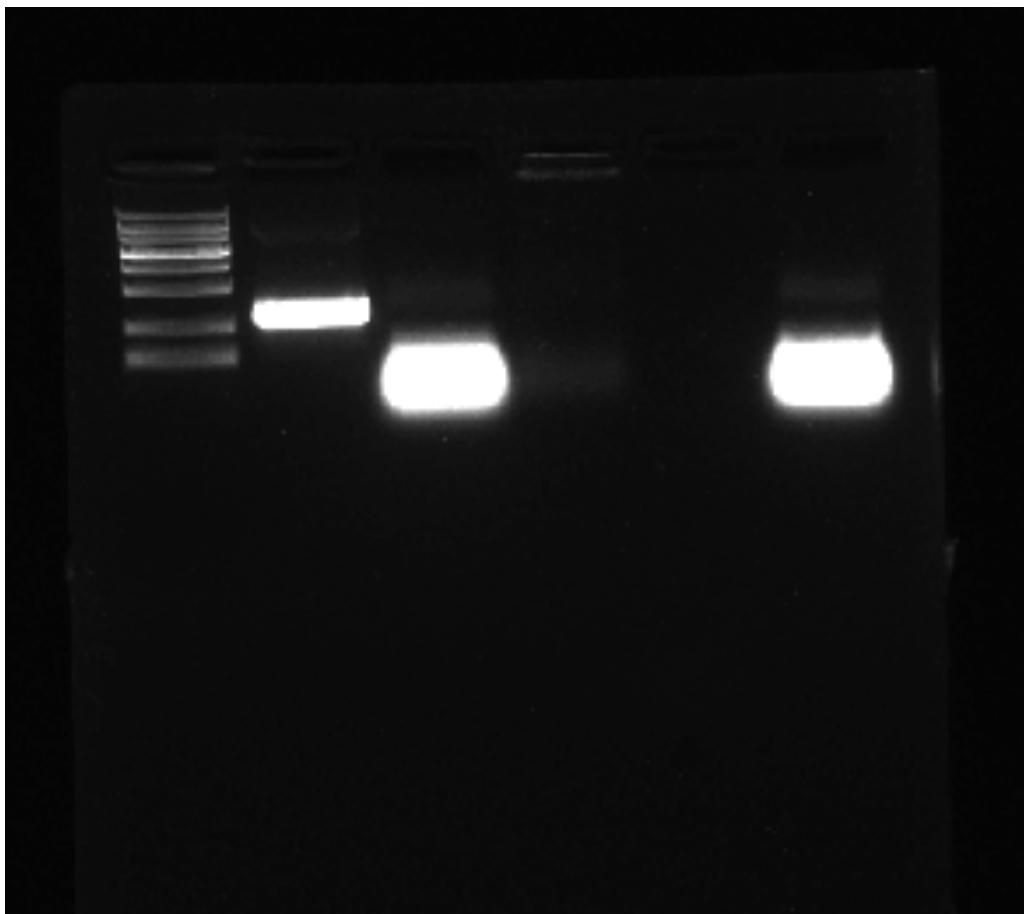


图 4-2 琼脂糖凝胶电泳实验结果

凝胶电泳的结果如图 4-2 所示。左侧第一组为分子量标准，用于确定待检测的 DNA 分子结构的大小范围，其电泳结果近似阶梯状。第二组结果为 M13 噬菌体 DNA 单链，其电泳结果呈现一条比较窄的条带，大约位于分子量标准第 6, 7 个条带之间，说明其分子大小较小。第三组结果为 PCR 产物直接进行凝胶电泳，观察到在远端出现较宽的条带，说明该 PCR 产物中存在较大的 DNA 分子，对应分子量较大的 DNA 折纸产物。同时在与第二个泳道条带平行的位置也可观察到微弱的条带，说明溶液中存在部分 M13 噬菌体 DNA 单链没有完全结合。第四组结果为 PCR 产物超速离心提纯后的电泳结果，观察到在与第三条泳道的亮带平行的位置存在亮度较低的条带，同时在泳道起点处同样存在一条极窄的条带。这种现象出现的原因可能是：在超速离心的过程中 DNA 折纸结构受外力影响结合为大分子耦合物质，在电泳中难以受到电场力的作用而无法运动。第五条泳道空置，第六条泳道为第三组的备份，其条带情况与第三组基本一致。

凝胶电泳可以便捷的对 DNA 进行分离以及实验观察，但在数据结果分析时也

要注意一些细节，例如需要确定分子量标准，分离时间，凝胶浓度等因素，以保证数据的准确性。根据凝胶电泳结果可以判断，DNA 订书钉链与 M13 噬菌体单链 DNA 混合后产生了分子量更大的分子，为进一步分析合成结构的形态，需要使用透射电镜进行观察。

DNA 折纸结构的透射电镜结果如图 4-3 所示，在透射电镜中可以观察到许多圆柱形的结构，证明实验顺利合成了目标设计的双层圆柱状 DNA 折纸结构。

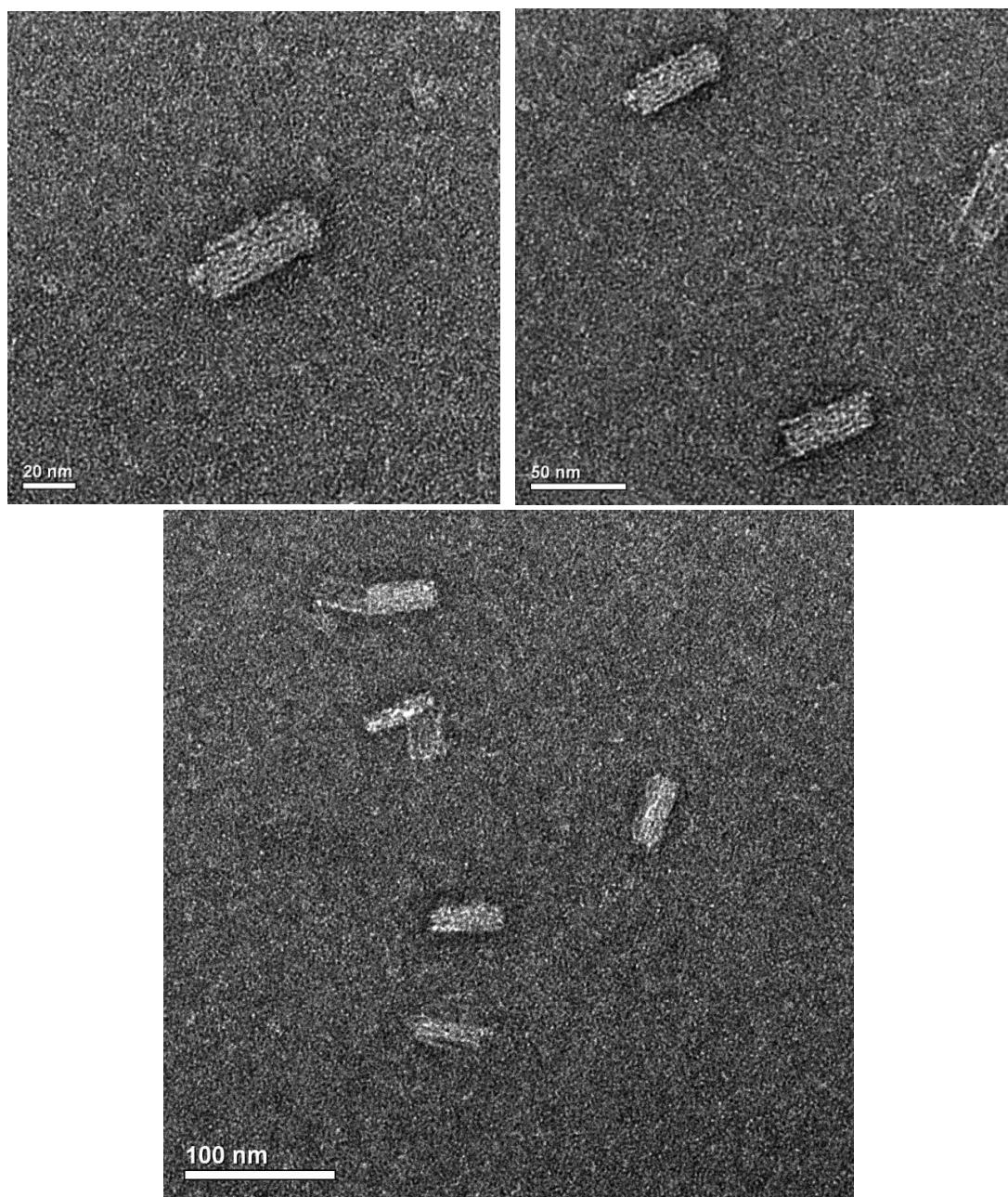


图 4-3 透射电镜观察到的双层圆柱状 DNA 折纸结构

由图 4-3 可以发现，部分 DNA 折纸结构的内层与外层并未按照预想的方式组装，如图 4-3 下图，存在部分结构内层外翻的现象，形成了一种新的结构，这种外翻恰体现了目标结构是两层的特点。

产生这一外翻现象的主要原因是：为了配合 DNA 剪纸术，在设计 DNA 折纸结构的过程中内层与外层之间订书钉链较少。根据所设计的 DNA 剪纸模版（双层圆柱的三维 DNA 折纸结构），DNA 剪纸术实验将对外层圆柱进行局部雕刻剥离，以及对外层圆柱进行整体雕刻剥离。DNA 剪纸术对三维 DNA 折纸结构的雕刻作用的原理是利用聚合酶链置换反应，促使原本用于固定外层 DNA 长链结构的短链订书钉链与新合成的完全互补的短链相结合，从而导致外层圆柱 DNA 折纸结构不太稳定，进而实现雕刻剥离的效果。如果对内外层圆柱之间的结构使用过多的 DNA 订书钉链进行加固，虽然可以保证合成的 DNA 折纸结构的稳定性和产率得到提高，但是也会导致在剪纸雕刻实验进行后，内层圆柱结构的稳定性收到较大的影响。本课题只对结构的可行性进行讨论和验证，产率并不在本课题的讨论范围之内。

4.2.2 剪纸结构

本课题使用透射电镜观察了聚合酶 DNA 剪纸术的结果。实验分为两组，分别为只添加 P2 聚合酶和对应引物，和同时添加 P1, P2 聚合酶和引物。对于第一组的实验结果，DNA 折纸结构的外层圆柱面应该被剪切一半，得到近似细口瓶的结构（内层圆柱完整，外层圆柱仅保留一半）。对于第二组的实验结果，DNA 折纸结构的外层圆柱应该被完全剥去，只保留内层较细长的圆柱结构。结果如图 4-5，图 4-6 所示。

如图 4-5 所示，样品可以观察到细口瓶的结构，可以观察到内层圆柱与一半外层圆柱的结构。在局部剪切后，结构的稳定性受到影响。图 4-5 左下一例效果较理想，可以明显观察到细口瓶的结构。中间一例同样可以观察到细口瓶的结构，但是内层圆柱和外层剩余圆柱有相互脱离的趋势。右下一例内层圆柱与外层剩余圆柱外翻。图 4-4 和图 4-5 分别为负染和正染的区域，负染代表环境染色，正染代表分子染色，在铜网上不同区域以及样品的不同部分对电子束的散射率不同，进而导致正负染情况不同，正负染色不影响对结果的观察。

同时需要特别讨论的是，如图 4-5 所示，部分细口瓶结构内外层出现了分离的情况，如中间一例，细口瓶外层结构（即剪切后剩余的一半外层圆柱结构）与细口

瓶内层结构(即原始的内层圆柱结构)发生了脱离。

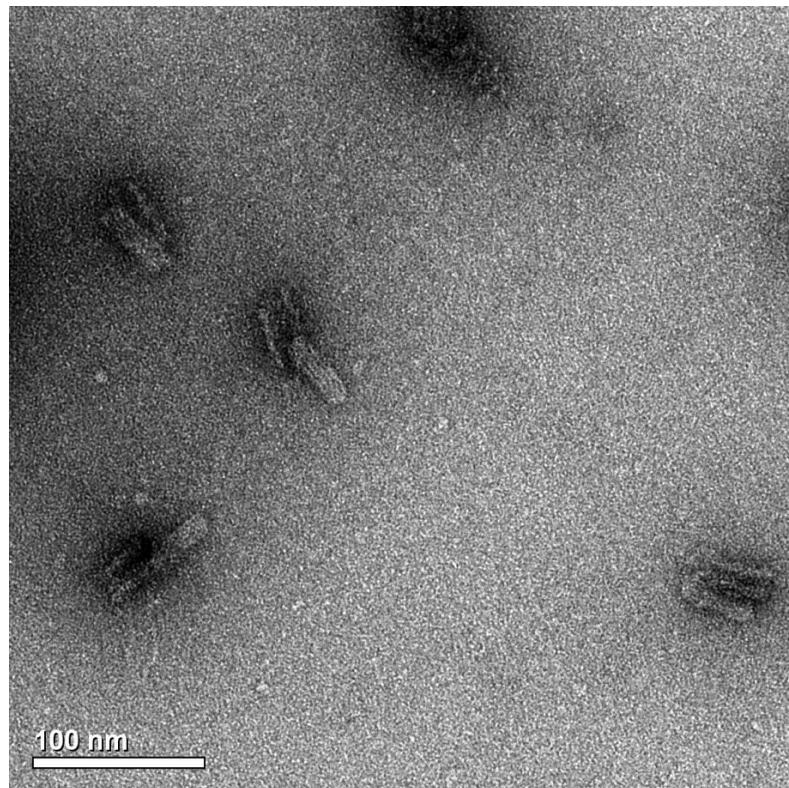


图 4-5 透射电镜观察第一组剪纸结构的结果

产生这一现象可能的原因有：第一，在设计 DNA 三维折纸模版的过程中，所设计的结构强度不够，在 DNA 剪纸雕刻系统的实验过程中，由于模版结构稳定性和强度不够，部分产物内外层发生脱离。由于目标剪纸设计需要实现仅针对模版外层结构的剪切雕刻，所以在 DNA 三维折纸模版设计的过程中，绝大多数的 DNA 订书钉链都只负责同层长链结构之间的固定，即内层的 DNA 订书钉链只连接两支相邻的内层圆柱长链，不连接同样距离较近的外层圆柱长链，只使用少量 DNA 订书钉链将内层 DNA 结构与外层 DNA 结构相连接。这样设计的动机是，由于该模版的外层 DNA 结构将会被拆除，意味着对应的 DNA 订书钉链都会被置换拆除，如果每一支长链都利用一定量的 DNA 订书钉链将其与相邻的内层/外层 DNA 长链相连，那么在拆除订书钉链后，会导致内层保留的细圆柱 DNA 结构的稳定性明显下降，不利于提高聚合酶驱动的纳米剪切雕刻系统的产物的稳定性和强度。

另一个可能的原因是，在超速离心的过程中，DNA 剪切雕刻系统的产物的结构受到超速离心的影响。这一现象表明，本课题设计的结构虽已经具备一定的结构强度和稳定性，但是无法确保所有的产物分子都可以剪切雕刻实现目标期望的结

构，在产物产率等方面还存在改良的空间。

针对这方面的产物改良可以从以下三个方面着手：第一，对 DNA 三维模版结构的设计进行改良调整，增强结构的稳定性，这样可以确保模版结构在经过剪切雕刻后仍能保持预想的形态。第二，对 DNA 剪纸引物和对应订书钉链的位置进行调整，降低 DNA 剪纸雕刻实验对于结构整体稳定性的影响。第三，对实验其他流程中可能对 DNA 最终产物结构造成影响的步骤流程操作进行优化，例如超速离心时间，PCR 仪中退火温度和时间等等。

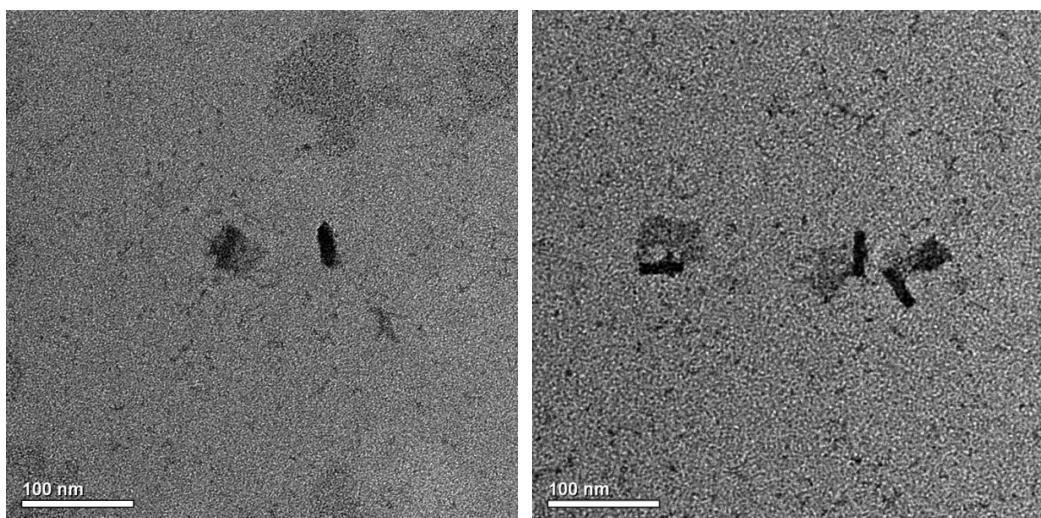


图 4-6 透射电镜观察第二组剪纸结构的结果

如图 4-6 所示，样品可以观察到细条窄圆柱的结构。图 4-6 上图一例效果较为理想，为完整剥离的内层圆柱 DNA 自组装结构。图 4-6 下图中三例也可以明显观察到完整的内层圆柱结构，同时可以观察到部分样例与外层圆柱并未完全剥离，左侧以及右侧两例较为明显，分析这种现象是因为所设计的 DNA 结构分子量较大，存在部分较长的订书钉链，聚合酶链置换反应所需的时间更长，退火时间不足导致部分样品的聚合酶 DNA 链置换反应未完全进行，进而导致部分样品出现如图 4-6 右侧的现象。

两组实验结果均可观察到效果理想的目标剪纸结构，进而印证了聚合酶 DNA 剪纸术的有效性和可靠性，使用聚合酶可以在环境条件更低的情况下进行速度较快的剪纸变构，在未来构建大规模 DNA 自组装结构中存在应用潜力。

4.3 本章小结

本章详细介绍了各个实验原理，实验操作流程，以及对实验结果进行了分析。实验主要分为两部分，第一部分是三维 DNA 折纸模版的合成，该部分的工作主要为合成期望的 DNA 折纸结构，在完成结构合成后利用凝胶电泳和透射电镜两种手段验证了实验结构的正确性。

第二部分是 DNA 剪纸，即将第一步合成得到的 DNA 折纸结构作为剪纸雕刻的模版，对其利用聚合酶链置换反应进行处理，利用聚合酶链置换反应替代传统的链置换反应显著提高了反应效率，降低了设计难度，降低了反应环境的条件要求。

在完成实验后，利用透射电镜观察实验结果，验证得到了两种剪切雕刻产物，从而验证了该基于三维结构的纳米雕刻系统的可行性。

5 总结与展望

5.1 总结

本文介绍了 DNA 折纸术和剪纸术在构建微纳米结构领域的应用，以 DNA 折纸术和聚合酶 DNA 剪纸术为手段，实现了特定 DNA 自组装结构以及对应裁剪雕刻系统的设计，以及实验验证。

本文首先介绍了该领域的相关技术及国内外研究现状，介绍了 DNA 折纸术的原理，以及目前 DNA 折纸术变构的两个研究发展方向和其对应原理（可重构型 DNA 折纸和 DNA 剪纸）。此外，也介绍了该领域常用的三种设计与仿真模拟的软件：caDNAno, CanDo, oxDNA。

之后，本文详细阐述了在 DNA 折纸结构设计中的具体步骤以及需要注意的设计细节，并展示了最终设计的结果。同时，本文对 DNA 折纸结构如何适配聚合酶剪纸术进行了讨论，为了确保 DNA 剪纸术的质量与效率，需要对订书钉链的位置进行特殊的选择。

在实验部分，本文详细阐述了实验每一步的过程，合成获得了期望的 DNA 折纸结构，并对 DNA 折纸结构进行了聚合酶 DNA 剪纸术的处理，得到了两种不同的剪纸结果，印证了聚合酶 DNA 剪纸术的可靠性。分别使用凝胶电泳和透射电镜对实验结果进行观察，可以观察到期望的 DNA 自组装结构，同时对实验结果中出现的特殊现象进行了讨论与说明。

本文从 DNA 折纸结构的设计出发，在设计时同时考虑了聚合酶剪纸术的结合位点，并用实验验证了所设计的 DNA 折纸结构和两种特殊的 DNA 剪纸结构，对于常见 DNA 折纸结构的稳定性，以及聚合酶 DNA 剪纸术的效果，速度及其未来应用潜力都提供了一定的参考与启示。

5.1 展望

后摩尔时代，利用 DNA 取代现有硅基材料器件具有显著的应用前景。DNA 折纸术的出现为大规模的 DNA 自组装结构的搭建带来了可能，而想要将这一技术实际应用落地，就需要确保 DNA 折纸术不仅仅只是用 DNA 设计出精巧的图案，而需要让设计得到的 DNA 纳米结构有能力与外界交互，也就是已有 DNA 纳米结构

的变构技术。

发展研究基于 DNA 折纸术和聚合酶驱动的 DNA 剪纸术，可以设计构建三维 DNA 自组装结构的纳米雕刻系统，聚合酶链置换反应取代普通 DNA 链置换反应，可以使得反应的进行更加高效，推动未来应用场景更加多元的 DNA 自组装结构的雕刻与变构系统的发展。

随着 DNA 折纸与 DNA 剪纸技术的进一步发展和完善，我们有理由相信，DNA 折纸与 DNA 剪纸技术将为生物科学、纳米科学、材料科学等领域的发展带来突破。

致谢

本文在导师潘林强教授的指导下完成。感谢潘林强教授在选题，时间规划，设备提供，以及论文修改指导等环节的帮助，同时也感谢潘林强教授在申请季帮助我提交推荐信。感谢潘老师提供的优渥的实验条件，包括完备的实验仪器，充足的实验材料等，保证了本题目实验部分的顺利进行。在完成该毕设题目的过程中，我有机会接触了解生物实验，这不仅拓展了我的视野，相信对我未来跨学科领域的学习研究也将有很大的帮助。

感谢学校与学院的培养，学校为本科生提供了优质教学环境，学院在教授知识的同时，也雕刻我的品质。四年喻园，这里激励着我走向更远的地方。祝愿华中科技大学，以及人工智能与自动化学院在未来越来越好。

感谢本科期间我所认识的所有老师与同学，人是社会关系的总和，没有你们的帮助，就不会有今天的我，祝愿所有人事业顺利，家庭美满。感谢校园里的每一棵树与每一只小动物，谢谢你们环绕在我身边，见证我的成长。也要感谢我四年上过的每一门课，无论分高分低，都敲打或武装着我。

感谢我的父母，对我精神与物质上的支持让我走到了今天。我尤其感谢我的母亲，对我为人处事的方式有很大的影响。希望他们在未来身体健康，事业顺利！

作为毕业论文，本文可视为本科四年求学之路的一个句号，短短万字，希望读者可以从字里行间识得我是怎般一个少年。唯一遗憾的是，旅途的故事无缘一一分享，但愿最后的句号写得足够有力。

参考文献

- [1] Church G M, Gao Y, Kosuri S. Next-generation digital information storage in DNA. *science*, 2012, 337(6102): 1628-1628
- [2] Nieuwland C, Hamlin T A, Fonseca Guerra C, et al. B-DNA structure and stability: The role of nucleotide composition and order. *ChemistryOpen*, 2022, 11(2): e202100231
- [3] Winfree E, Liu F, Wenzler L A, et al. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature*, 1998, 394(6693): 539-544
- [4] Goldman N, Bertone P, Chen S, et al. Towards practical, high-capacity, low-maintenance information storage in synthesized DNA. *Nature*, 2013, 494(7435): 77-80
- [5] Erlich Y, Zielinski D. DNA fountain enables a robust and efficient storage architecture. *science*, 2017, 355(6328): 950-954
- [6] Organick L, Ang S D, Chen Y-J, et al. Random access in large-scale DNA data storage. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(3): 242-248
- [7] Reif J H, LaBean T H, Pirrung M, et al. *Experimental construction of very large scale DNA databases with associative search capability*. in *DNA Computing: 7th International Workshop on DNA-Based Computers, DNA7 Tampa, FL, USA, June 10–13, 2001 Revised Papers 7*. 2002. Springer.
- [8] Adleman L M. Molecular computation of solutions to combinatorial problems. *science*, 1994, 266(5187): 1021-1024
- [9] Qian L, Winfree E. Scaling up digital circuit computation with DNA strand displacement cascades. *science*, 2011, 332(6034): 1196-1201
- [10] Zhang D Y, Seelig G. Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions. *Nature chemistry*, 2011, 3(2): 103-113
- [11] Pumm A-K, Engelen W, Kopperger E, et al. A DNA origami rotary ratchet motor. *Nature*, 2022, 607(7919): 492-498
- [12] Han D, Pal S, Nangreave J, et al. DNA origami with complex curvatures in three-

- dimensional space. science, 2011, 332(6027): 342-346
- [13] Seeman N C. Nucleic acid junctions and lattices. Journal of Theoretical Biology, 1982, 99(2): 237-247
- [14] Kim S, Soltis D E, Soltis P S, et al. DNA sequences from miocene fossils: An ndhf sequence of magnolia latahensis (magnoliaceae) and an rbcl sequence of persea pseudocarolinensis (lauraceae). Am J Bot, 2004, 91(4): 615-620
- [15] Chen Y-J, Groves B, Muscat R A, et al. DNA nanotechnology from the test tube to the cell. Nature nanotechnology, 2015, 10(9): 748-760
- [16] Zhang D Y, Turberfield A J, Yurke B, et al. Engineering entropy-driven reactions and networks catalyzed by DNA. science, 2007, 318(5853): 1121-1125
- [17] Liu Q, Wang L, Frutos A G, et al. DNA computing on surfaces. Nature, 2000, 403(6766): 175-179
- [18] Xiong X, Zhu T, et al. Molecular convolutional neural networks with DNA regulatory circuits. Nature Machine Intelligence, 2022, 4(7): 625-635
- [19] Rothemund P W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. Nature, 2006, 440(7082): 297-302
- [20] Han D, Pal S, Liu Y, et al. Folding and cutting DNA into reconfigurable topological nanostructures. Nature nanotechnology, 2010, 5(10): 712-717
- [21] Chen K, Xu F, Hu Y, et al. DNA kirigami driven by polymerase-triggered strand displacement. Small, 2022, 18(24): 2201478
- [22] Mirkin C A, Letsinger R L, Mucic R C, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. Nature, 1996, 382(6592): 607-609
- [23] Yan H, Zhang X, Shen Z, et al. A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology. Nature, 2002, 415(6867): 62-65
- [24] Qian L, Wang Y, Zhang Z, et al. Analogic china map constructed by DNA. Chinese Science Bulletin, 2006, 51: 2973-2976
- [25] Douglas S M, Dietz H, Liedl T, et al. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. Nature, 2009, 459(7245): 414-418

- [26] Douglas S M, Marblestone A H, Teerapittayanon S, et al. Rapid prototyping of 3d DNA-origami shapes with cadnano. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(15): 5001-5006
- [27] Wang W, Chen S, An B, et al. Complex wireframe DNA nanostructures from simple building blocks. *Nature Communications*, 2019, 10: 1067-1067
- [28] Fu Y, Zeng D, Chao J, et al. Single-step rapid assembly of DNA origami nanostructures for addressable nanoscale bioreactors. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(2): 696-702
- [29] Andersen E S, Dong M, Nielsen M M, et al. DNA origami design of dolphin-shaped structures with flexible tails. *ACS Nano*, 2008, 2(6): 1213-1218
- [30] Douglas S M, Bachelet I, Church G M. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *science*, 2012, 335(6070): 831-834
- [31] Kopperger E, List J, Madhira S, et al. A self-assembled nanoscale robotic arm controlled by electric fields. *science*, 2018, 359(6373): 296-301
- [32] Li S, Jiang Q, Liu S, et al. A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger in vivo. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(3): 258-264

附录 实验所用 DNA 序列

附表 1 双层圆柱 DNA 折纸结构的碱基序列

序号	序列	长度
Red-1	TCATTTCTGCGAACGAGTTACCCAAATTCAAGACAGCAAGGTA	45
Red-2	CCACCCAGGATTAATTCTGACCAGTAACTCATTAAGAACCGACCA GAGCTTCAGACAGCAAGGTA	66
Red-3	ACGCGAGAAAATGCCCTCAAACCTTTCAAATATAACAAAGATT CAGACAGCAAGGTA	59
Red-4	AGAAGGAAACCGAGCATAGCGATAGCTTAGATTAAAGTTACCTT TCAGACAGCAAGGTA	59
Red-5	CAAGAGATCAGAACGGGATAGAAATGAAAACAGTTTCTTAAAC AACAAATTTCAGACAGCAAGGTA	66
Red-6	ACGTTATAACTCGTTACATTAGATTATTGAGGGTTGGCACCT TGCTTTTCAGACAGCAAGGTA	66
Red-7	CTTACCCGAACAAGACGCTGAGGTCTGGGTTATCGCAAGTTT AGTTTTTCAGACAGCAAGGTA	66
Red-8	CGAAGGCTGCTCCATGTTACTAGGAACTTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-9	AATCCAATAACTATATGTAATTATCATTTCAGACAGCAAGGTA	45
Red-10	CGTTGAAATACCGACCGTAGATAAAATGCGTGATAAATAAGGTT CAGACAGCAAGGTA	59
Red-11	TACAATTGATTAGTTGCTATTGCCGATTCAGACAGCAAGGTA	45
Red-12	TGAAAACAGGGAAGCGCATTAGTCAGAGTTTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-13	TACCGTTAACATGAAAGTATTGACTCCTTTCAGACAGCAAGGTA	45
Red-14	TCAGAGCCACTTATTAGACCACCCTCATTTCACGCCACCCTTC AGACAGCAAGGTA	59
Red-15	CCATCGCGACTTTTCATGAGGCCACTATTCAGACAGCAAGGTA	45
Red-16	AGAACTGAATCAATGATTGAGGCAAGGCAGAATCACACCGGACC ACCCTTCAGACAGCAAGGTA	66
Red-17	TCACCAGGCGACATTCAACCAGAAAATTTTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-18	GGTAATAATTGAGTTAACGCATAGCTATTCAGACAGCAAGGTA	45
Red-19	TGGTCAAAGGTTATCTAAAAGCACTAATTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-20	AATAAGAAACCTCAGCCTCGATTGTTAACCAATCCATT CAGACAGCAAGGTA	59
Red-21	AGTGAAACCAACTCGCGACCACCAACCGACTAAACCACGCACCT TCGAGTTTCAGACAGCAAGGTA	66
Red-22	GTTAGTCAAGCCCAATAGGACAGAACCGTTTCAGACAGCAAGGT A	45

附表 1 双层圆柱 DNA 折纸结构的碱基序列(续)

序号	序列	长度
Red-23	CATATTAATTGCCAGTTACAACCCAGCTTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-24	CAACTAGAGGATTAGAAGTACAAACAATTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-25	ATTGCTCAGAACCTTGAAAAGAAACGCTTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-26	CATATGACGGAATTCCCTTCTTTGAAGCAAACAAAACGACATA AATATTCAGACAGCAAGGT A	66
Red-27	AAATCATAGAAGAGTCAATAGAGTAAGCTTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-28	AGTTCAGTCCAACAGGTCAAGGACCTTATTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-29	AATAAAATAATTACTAGAAATTCTTACCTTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-30	CGAGAAACACCAGAAATTGGTCAACTCATAACGGAATCCCTT AAACTTCAGACAGCAAGGT A	65
Red-31	AGATAGCGAACGCCCCACAAGTGAGCGCATAAAATAGCAGCAA ACAGCTTCAGACAGCAAGGT A	66
Red-32	TGAGTAACAGCTGAAAGAGTTATTTGAAGCCTAAAAGTTTT CAGACAGCAAGGT A	59
Red-33	CATATAGCCGGAACGAGGCAGTTACCCATATCAGACGGTCAATTAA CAGACAGCAAGGT A	59
Red-34	AATAATAGTTACCACAAAAGATGAAACAGCACCGCGAACCGA GCCGCTTCAGACAGCAAGGT A	66
Red-35	TTCATTCCAAAAGGAATTACTTAGGAATTTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-36	AGTATATCAACAGACCAGCACAGAGGTGCAAATGAGCATCAAAT CAACATTCAGACAGCAAGGT A	66
Red-37	GCACAATAATAAGAGCAAGCAAAGAGCGCAAACAATGAAATATT TCAGACAGCAAGGT A	59
Red-38	TCAGTATATACCGAACGAAACCTAGGGCTTAATTGAGAATTTCAG ACAGCAAGGT A	56
Red-39	CATAAATCGAACCGAGACCGGATAAGAGGTTTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-40	ACCACAGCTTGAGATGGTTGCCCTGATTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-41	CACCCTCAAGCCAGAACGGAACTGAATTTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-42	AATGACAGCTTGATACCGATCTAAAAACCAGTTGCGCCGACTTT CAGACAGCAAGGT A	59
Red-43	ACCAACGCTAGTCTAGCGAACGAGCGTCTTCAGAACATTTTT CAGACAGCAAGGT A	59
Red-44	TAATGAAGTTCCATTAAACCAACAGCCTGGGTAAAATACGTTT CAGACAGCAAGGT A	59

附表 1 双层圆柱 DNA 折纸结构的碱基序列 (续)

序号	序列	长度
Red-45	AAAAAGCCTGTTAGTATCGTAGTAACGAATATGCGTTATACTTT CAGACAGCAAGGTA	59
Red-46	GTGAATTCAAGCGGAGTGAGATTCCAGACTTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-47	GAACCTCGCTGAGAGGCCAGCAGAGGCAGGGTTTCAGACAGCAAGGT A	45
Red-48	CGAACTGTAAGGCTAATTCATTGAGATGAGGCATGAATCGTGA ATGACTTCAGACAGCAAGGTA	66
Red-49	CAAAGACGGGAGAATTAACATAGCCATCGTAACACACCCTGAATT TCAGACAGCAAGGTA	59
Red-50	AATTCCTAAATTAAATGGTTAAATAAGTTTCAGACAGCAAGGTA	45
Red-51	CACCACTAACAGTAGCGACCGGAAACGTTTCAGACAGCAAGGTA A	45
Red-52	ATGGGATTTAGGTATCTTGCTAAACAACTTCTTTCTGTTTC AGACAGCAAGGTA	59
Red-53	TTCGACTAACATTAAATCAATTATCCTGAGCCTATTATCCGTCAA AAATTCAGACAGCAAGGTA	66
Red-54	ACCTTTTAAGAGTATTAGACCTCCGGCTAGGTTAGAGACTTT CAGACAGCAAGGTA	59
Red-55	ATTAAAATAACACCGTGCCACAAATATCTCAATATCTTCAGACA GCAAGGTA	53
Green-1	CCATTAGGAGGGAAGGTAAAGTTATTTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-2	GAGTGTAAACAGTTAATGCCCGTACCAAGTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-3	TATATTACAGAGGCTTGAGTAAACGTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-4	CAGAGCCAAACAAATAAACGCGTCATTCTACTATGTGCAGA	45
Green-5	GGTTGATCCCGGAAACAACGCCACAGACACGTTGAAAAAAAGC CGCTTTCTACTATGTGCAGA	66
Green-6	GCGGATATACTCAGGTTCGTAGCGTAAATTGCCCTTAAGAG GCTTTCTACTATGTGCAGA	66
Green-7	AAAACGGCTCATTATACCAAGCAAGAACCTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-8	AGCCGCCACAGGAGGTTGAGGTAAGTTTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-9	CAAACGTAAGAAAAAGGTGGAATTAGATCGGCATAGCCCCC ACCAGTTCTACTATGTGCAGA	66
Green-10	GAGGGATAAAAACAAAATACGTTAATTCTACTATGTGCAG A	45
Green-11	CACCAACCGCAGTTCAATTGCTGAATATCGCACTATTAAA ATGTTCTACTATGTGCAGA	66
Green-12	AAGGAGAATAATAATTTCAGCCCTTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-13	ATAGTCACCAGTACAAACTTAGGTGTATTCTACTATGTGCAGA	45
Green-14	GTTTATGGAACAACTAAAGGCGATCTAATTCTACTATGTGCAGA	45

附表 1 双层圆柱 DNA 折纸结构的碱基序列 (续)

序号	序列	长度
Green-15	TGAGCCATTGGAATTATCACCGTCAGGTGGCAATTCTACTATG TGCAGA	51
Green-16	AAATCAGGAAATTATTCAATTGCAAAGATTCTACTATGTGCAGA	45
Green-17	AAAACACATTGTATCATCGCGTACATTCTACTATGTGCAGA	45
Green-18	ACATGGCTTCGGAACCTATTGGATTAGTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-19	CAAAATAGTTGCCTTAGCCACCATTATTCTACTATGTGCAGA	45
Green-20	CATCAGACTTAATCATTGTGCTCATTCTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-21	CGTTTGTAGCGCGTTTCAGCCAGCATTCTACTATGTGCAGA	45
Green-22	GTACCGTTGCTCACTGCCTATTGATATATTCAACCACCCTCAT AATTCTACTATGTGCAGA	66
Green-23	ACTGCGAGTAAGAGAACACGAAAGATTTCTACTATGTGCAG A	45
Green-24	AGGACAGCAAAGCTGAATTACACAGGTATATCATATGGATAGCA GGTCTTCTACTATGTGCAGA	66
Green-25	ACGTAAATGAACGCTGATAACAAAAGAAACGGCTGGTCGCTTG TATCGTTCTACTATGTGCAGA	66
Green-26	GACCAGGTCTTACAGAACTGAACTAACGACGACGGTAATAGAT AGTCATTCTACTATGTGCAGA	66
Green-27	AGCTTAAATATAACAGTTGATTAAGACTTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-28	TTACCCTGTTAATTGAGCGGCTTAGTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-29	GCAGGGAGGAACGAGGGTAGCATACACTTTCTACTATGTGCAG A	45
Green-30	CCTTATTGGAATAATATTGACCCAGTAGGTCAAGACCCATCTTCA GAGCTTCTACTATGTGCAGA	66
Green-31	CGGGGTTCCACCCCTACCCATGGTCGTCTATAGAACAGCTTGTAA CCGATTCTACTATGTGCAGA	66
Green-32	TGTCACGCATGATTCCAATTGCGGATTCAAAGCAAAATCGC CAATTCTACTATGTGCAGA	66
Green-33	GACCTTCATCTGATCAGGACAAATCTAGCGAGAAAAGAAGTG CATCATTCTACTATGTGCAGA	66
Green-34	AGTTTACCGTAACACTGAGAGGTTATTCTACTATGTGCAGA	45
Green-35	CAGCGATGCAAACAAAGTACGCTGGCTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-36	TAACGGGTGAGTAACAGTGCCTCGAGAGTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-37	GCTGTAGGGTGTCTGGAGTTATGTTACTATGTGCAGA	45
Green-38	CGCCACCGACGATTGGCCTGGATACAGTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-39	TTAGACACCCTCGTTACCAAGAACAACTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-40	TCACCGAGTGCCCGTATAACTGGTAACAGGTCAAGAACCACTT ATTAGTTCTACTATGTGCAGA	66
Green-41	TTGCGGGTCAGCAGCAGAACAGATGACCCCTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-42	ATTATTCTTATGCGATTACCAAAATCATTCTACTATGTGCAGA	45

附表 1 双层圆柱 DNA 折纸结构的碱基序列 (续)

序号	序列	长度
Green-43	AAAGAGGATTGTGTCGAAATCTTGAAAGTTCTACTATGTGCAGA	45
Green-44	CATATAAGAAAATAAAGTACCTCAACAAGGAAGCAGCGGATT	66
	TGCCATTTCTACTATGTGCAGA	
Green-45	GAAGCAACCGAAAGACTCAAATATAATTTCCTACTATGTGCAGA	45
Green-46	GGATATCGCATAGAACGGAGTCATCTCAGCATCGTAAAGGGC	66
	TCCAATTCTACTATGTGCAGA	
Blue-1	TGCGCGTTGCTTGGCGAATAACAAAATTAAATTATTGCTTCGCA	49
	AATT	
Blue-2	ACCAATCTTATCAACAATAGAAAGTACCTGGGGTTAAAGA	42
Blue-3	AGGCGGTCTTAATGGCATAAACCGCAGCTGAAAAGCTATATTAC	49
	CGAGC	
Blue-4	ACCGCCTGAGTTGCCGGCGATGGGATA	28
Blue-5	CGCCAGACCACATCACTGTAAATCGTCGCTCAAGAATATTCA	42
Blue-6	CGACGACATGTTCAATCATTC	21
Blue-7	AACCACCGATTATCGAACAAAGAAACCACCGCGCC	35
Blue-8	CGTATAATGTAGCGCATCAATACTTGCAGGGAGGCATCAGATAAT	49
	CGAGA	
Blue-9	TTTATTCTAATTGAAACAAGAAAAATAACATTCAAGCTTATCC	49
	CATC	
Blue-10	TCAAAAGGCCTGAGAATCGGTTGTACCACTCAGAAGTGAGCAG	49
	TGTAA	
Blue-11	CAGAACGTAATTCTCCATCACGTCAAAGGGATT	35
Blue-12	AGGGTTATACCTTTACATCGTGAATACTCCTCGT	35
Blue-13	GGCGTTTAGCGAAGGTATTCAATTAAACTTCCTTGCTAATG	42
Blue-14	GTAGCAAGTGAGTGAATAACCCATTAAACAAATCGAACAGGA	49
	ACCTA	
Blue-15	TGAGTAGTTGATTAGAGGCCGTAGAACATGGCGCT	35
Blue-16	TCATCGTAGTGTACTCATAGAACATCATT	28
Blue-17	GCGATTAATTCAAGGCCCGAGGGTCCACGCTGATTAGAAAAGAT	49
	CGTAA	
Blue-18	AAGAACTCAATCGTCTGAAAACATTGGAACCGTCGCCACTCG	49
	AGAAA	
Blue-19	TAACTCACACCGAAGGCCGTTTGAGAGATCTAGAGCAA	42
Blue-20	CAATTCTATTGAAAATATATTACTTCT	28
Blue-21	AGACAAATACCAGTCTGACGCCAAACTATCGGCCTAACCGTTAG	49
	ACAGG	
Blue-22	CAGATGAATATACAGCGCAGAACGAGCAAACGGTAACGTGGA	42
Blue-23	ACAGTACATAAATCTTACCTTATTGCTT	28
Blue-24	CCACACACGCTACCAGCTGCACCATAAACGCCGGAGAGGG	42
Blue-25	CGGATTCAAGATGGCGCATCGGATCGCAACTGTTG	35

附表 1 双层圆柱 DNA 折纸结构的碱基序列(续)

序号	序列	长度
Blue-26	ATTCAACCGGAATTGAGCGTTCTAGCTGATGTCAACCCGGTT	42
Blue-27	TTAACGTTTGCACGTAAAACATTCT	28
Blue-28	GCACTAAATTGAGAGGCCCGGAACCCT	28
Blue-29	ACTTTGAAATTAGAACCTCAAATCATTATGGGCAACAGCT GGTT	49
Blue-30	ACACCCGAAAGGGACCGTAAAAATAAGATAGGCAG	35
Blue-31	AACTAGCATAAATTATATGATAGGATAACGGGAGA	35
Blue-32	CCAAATCGGGAAACGCACTCTAGAAGGCTTATCCCCTCCGAT AATCC	49
Blue-33	GAAGTGTACAAGAGGGCCAACCCCTCTGACCTGATGTAATTGA ATATA	49
Blue-34	TATGACCTGTAATTAGCAAATGCGTTGACATACGAAGAATA	42
Blue-35	TTTCCAGTCCGCCGTAAATGGGAAACCT	28
Blue-36	TCACCAAGAGATTGTCAAGAGAACATCGATGTAGCTATGAGACAGCT CATAT	49
Blue-37	CAGTAATAGAACATCGTGGCACAAAACATCGACAAACGCCAACAAA GCGTA	49
Blue-38	GAAAAAACACATTCTTCCACTACGAGGTGGCCCCCG	35
Blue-39	AAATCAAAGCCGGACGTAATCAATAACCTGTTAGGTGGCAT	42
Blue-40	TAAGTCCACGAGCATGTAGAAACAAAGCAATTAGA	35
Blue-41	GGATGTGCTTGCATGCCTGCATCGAATTAGCATAA	35
Blue-42	AGGCATTTCGTAATTGACCGAGCCAGT	28
Blue-43	TGTTTGAGAAATCGAGCCTGGCCCGGGT	28
Blue-44	AAAAGGGGCTCATGAATATCCAGAACAAAGTCTGTATCCTGACT ATGGT	49
Blue-45	TTTGACCATTGTGAAATTGTGAGGATCAGTTATCCGCTTGAGTGT AAGCGCC	52
Blue-46	ATAGGGTCACAATTTCCTGTAGATACATTTCGCAGTAGTAGAAA GAAT	49
Blue-47	GTTTGGATTATACCAACCGAGTAAAGTATTACCGAACAG	42
Blue-48	CCATATCGGCAATTGTCACGCGCTTGACAAGTTGACAAAAGGT AAAGCGCCTGT	56
Blue-49	TGCCCGCGCAAGGCCATTAACATCCAATAAGAACAAAAATCA TACAG	49
Blue-50	AACGGTACCCAAATAAAATTCAAAAATAATTGCAACCCGTTG CCCCA	49
Blue-51	AGCCGTTCAATAGCAAGCAAATTGCGAGATGATAAAATTAA	42
Blue-52	AATAATCGGCTGTCCAAGTACGCCGGCGTGGCAAGCGTGCTTCA AGTTA	49

附表 1 双层圆柱 DNA 折纸结构的碱基序列(续)

序号	序列	长度
Blue-53	CGGGGAGTTCTTAAAATCCTGTGAGCGCATCTGCCAGTTCGA CAGT	49
Blue-54	CGCTTCTGGTGCCGGATAGAAAGAGAAACCAGGCATGTTCCA	42
Blue-55	CCGCGCTCTACAGGACCTGAGTGATGAAACAAACAATTAAATTAA TAGATTAG	53
Blue-56	ATTAAAGGGCGAACACAGATTCATTTGAATGGCTAATGCGC	42
Blue-57	GTCTGGCCGTTAATATTTGTAACAGGATGAGACGAATCGGCCAT TAAT	49
Blue-58	GCAAAATCGATGGATCGGCCTCAGGAATAACCGTGAGTAAC	42
Blue-59	GGTCACGCCGGCACATTGCCAGTTGGAAAACGACGCCAGTA GCTGT	49
Blue-60	GGAGAAATTCTGAATAATGGATGATTGTAGGGCGC	35
Blue-61	CTGCGCACTCCAGCCAGCTTTGGTGTCCGTGGACGCCAT	42
Blue-62	GGTCGACAGCTGGCGAAAGGGGGAAAGGGCCCTATGCAGGCG	42
Blue-63	AACGTGGACGTGAAGTCCAGAGAACTGATAGCCCT	35
Blue-64	TGCTGGTCAAATACCTACATTACACGACCTCCAAC	35
Blue-65	AGGGTTTCCCATTGCCAGCCAGTCACGACGTTGTTAACGCC	42
Blue-66	ATTAAGCCAATTCTACTAATAATGGTCATGGTCATGCCAAGCTG CAAG	49
Blue-67	CCAGAAGATCATCAAGAAATAGTAGATTTCAGGTTCAATTGCG CGTA	49
Blue-68	ATAAGCATTGTAAACTCCTGTAGCCAGCATTAAA	35
Blue-69	AGCCTTATATTGCAAGAATTCAACGCA	28
Blue-70	GTTAAATTTAACCAATAGGAGAACAAAGCAAGC	35
Blue-71	AATAAAGAAAACATATTAAATGCAATGGTGAGA	35
Blue-72	CGCATTAAATTTGATAATGCCCTCGCTGC	35