**基于六边形折纸单体的可编程的二维图形组装**

**实验目的**

利用六边形折纸单体实现二维图形组装。其中，通过利用不同的连接方式实现直线与曲线组装的异步性。通过替换相应的staple以改变六边形折纸单体的种类，实现可编程性。

**实验总述**

* 使用相同结构设计的六边形单体，通过使用较长的延伸段代替相应的六边形边上的staple，以实现不同的连接方式（图a、b）。
* 以锚链连接或胶水链连接的方式，实现“短直线”与“长直线”（图c）。
* 类似地，通过使用较长的延伸段代替相应的六边形边上的staple，得到“改变方向的六边形” （图c）。
* 直线的“端点六边形”与“改变方向的六边形”通过Hoogsteen相互作用连接。通过调节体系的pH值，使得“直线”与“改变方向的六边形”异步组装，从而减少六边形单体的多方向生长的错误。
* 基于六边形单体，通过“直线”与“改变方向的六边形”的组装，实现复杂的平面二维图形。（图d）

图：

1. 根据参考文献[1]，可以将箭头所示的staple替换成不同的延伸段。
2. 根据参考文献[2]，staple的替换方式如图b所示，以实现六边形之间的不同的连接方式。六边形之间的不同连接方式如图c所示。
3. 六边形之间的不同连接方式。左面板：利用锚链连接的方式实现“六边形短直线”。中间面板：利用胶水链连接的方式实现“六边形长直线”。右面板：利用ssDNA与发夹结构的Hoogsteen相互作用连接方式实现“改变方向的六边形”。
4. 预计组装而成的平面二维图形。左面板：使用“短直线”与“改变方向的六边形”。右面板：使用“长直线”与“改变方向的六边形”。

**实验思路**

1. 首先，验证六边形折纸单体之间的Hoogsteen相互作用与连接效率。
2. 其次，验证长度为1的短直线（单个六边形）与“改变方向的六边形”的连接，其中只有一种为60°的“改变方向的六边形”。
3. 然后，验证长度为1的短直线、长度为2的短直线与“改变方向的六边形”的连接，其中只有一种为60°的“改变方向的六边形”。
4. 接着，验证长度为2的短直线与“改变方向的六边形”的连接，其中有两种分别为60°、120° 的“改变方向的六边形”。
5. 然后，实现基于短直线的二维线框图案的组装。
6. 进一步的，使用六边形短直线组成不同长度的长直线时，需要多个长度为1的短直线、长度为2的短直线以及角度为180°的“改变方向的六边形”，为了减少体系中的分子组件，对实现可控长度的六边形直线进行讨论。
7. 然后，基于可控长度的六边形长直线，实现二维线框图案的组装。
8. 进一步的，由于前文所实现的二维图案均为线框图案，于是设计“具有分支角度的六边形”，实现基于短直线、长直线的具有内部图案的平面二维图案。

**实验一**

实验目的：验证六边形折纸单体之间的Hoogsteen相互作用与连接效率，期望的结果如下（图e）

**所需材料**

* M13mp18
* 相应的staple
* Buffer 1：1X TAE，含12.5mM Mg2+
* Buffer 2：1X TAE，含125mM Mg2+

所需六边形

六边形1、六边形2，原六边形单体的序列，需要替换的staple

**实验步骤：**

**合成两种六边形，替换相应的staple以使六边形折纸单体具有实现Hoogsteen相互作用的ssDNA与发夹结构。**

1. **溶解干粉并封装staple**
2. **沉降：**离心60s，让运输过程中飘散的干粉沉降到管底。离心后轻轻取出
3. **溶解：**加入对应Buffer 1溶解（按试管壁上要求）
4. **混匀：**使用桌面震荡仪震荡数秒，离心
5. **封装staple：**对于两个六边形中的每一个，将所有staple链各取2 uL，混合在1500 uL小试管内，得到2管混合母液，震荡离心
6. **做staple配置液：**将上述2管混合母液分别加Buffer 1稀释10倍，震荡离心，制成staple配置液。
7. **做scaffold配置液：**将M13mp18稀释至期望目标浓度
8. **计算浓度**

通过IMPLEN超微量分光光度计Nanophotometer测量对应的staple配置液与m13配置液的吸光度（ng/uL）:

1. 加入buffer进行空白测试
2. 加入buffer + M13进行3次测量，取中间值（ng/uL）
3. 加入buffer + staple进行3次测量，取中间值（ng/uL）
4. 将测量的ng/uL转换为nMol/L
5. **计算反应体系并加样**

Cstaple配Vstaple配 = Cstaple终V终

Cscaffold配Vscaffold配 = Cscaffold终V终

V终 = 30 uL

Cstaple终 = 25 nMol/L

Cscaffold终 = 2.5 nMol/L

Cstaple配、Cscaffold配 由步骤2得出

1. 计算体系：根据n=cv，M13 : staple = 1：10，计算 V配。
2. 加样：取 100 uL PCR管，按计算取样混合，加入 1/10 Vscaffold配 的Buffer 2补充Mg2+，在混合溶液的体积接近30 uL的时候，使用Buffer 1进行填充，补充到30 uL。
3. 混匀：混合震荡离心。
4. **退火形成折纸结构**
5. 文本

   描述已自动生成通过PCR进行直线退火，PCR程序[1]：
6. **纯化**
7. **通过原子力显微镜进行结构的观察**

简而言之，将10 μl 新鲜样品移液到透明云母表面，并保持5分钟不受干扰，以使折纸完全附着在云母表面。接下来，在压电台上放置带有钢圆盘的云母结构进行扫描。

**Hoogsteen相互作用，并观察结果**

1. Hoogsteen相互作用的步骤
2. 原子力显微镜的使用

**实验二**

实验目的：验证长度为1的短直线（单个六边形）与“改变方向的六边形”的连接，其中只有一种为60°的“改变方向的六边形”

实验步骤：

1. 合成两种六边形，分别为：长度为1的六边形短直线、 60°的“改变方向的六边形”
2. Hoogsteen相互作用，并观察结果

**实验三**

实验目的：验证长度为1的短直线、长度为2的短直线与“改变方向的六边形”的连接，其中只有一种为60°的“改变方向的六边形”

实验步骤：

1. 合成长度为2的六边形短直线，观察其连接情况
2. 六边形单体的制备
3. 加入两种六边形单体，室温放置过夜
4. AFM成像
5. 合成连接两种短直线的相应的多种60°“改变方向的六边形”
6. 要看边的staple链的方向，才能确定是多少种“改变方向的六边形”
7. 需要多种Hoogsteen相互作用序列
8. 混合长度为1的短直线、长度为2的短直线的单体与“改变方向的六边形”，Hoogsteen相互作用，并观察结果

**实验四**

实验目的：验证长度为2的短直线与“改变方向的六边形”的连接，其中有两种分别为60°、120° 的“改变方向的六边形

实验步骤：

1. 合成分别为60°、120°的两种“改变方向的六边形”

（1）这个实验也是同样的，需要确定staple的方向，确定有多少种六边形，保守3种

1. 混合长度为2的短直线的单体，60°、120°的两种“改变方向的六边形”， Hoogsteen相互作用，并观察结果

**实验五**

实验目的：实现基于短直线的二维线框图案的组装

实验步骤：

1. 设计与合成相应的多种六边形（不同连接角度的长度为1、长度为2的六边形，多种角度的“改变方向的六边形”）
2. 混合，Hoogsteen相互作用，并观察结果

**实验六**

实验目的：实现可控长度的六边形直线

实验步骤：

1. 找到一种线性折纸
2. 设计相应的信号传递序列，设计多种与门、六边形的延伸段
3. 使用链置换的方法，验证各种长度的六边形直线（2、3、4、5、6、8、10），观察

这个实验有个问题：信号的传递效率，如何放大信号

**实验七**

实验目的：基于可控长度的六边形长直线，实现二维线框图案的组装

实验步骤：

1. 合成多种角度的“改变方向的六边形”
2. 混合，Hoogsteen相互作用，并观察结果

**实验八**

实验目的：实现基于短直线、长直线的具有内部图案的平面二维图案。

实验步骤：

1. 设计“具有分支角度的六边形”
2. 混合，Hoogsteen相互作用，并观察结果

**实验九**

噱头

参考文献

[1] Programmable and scalable assembly of a flexible hexagonal DNA origami

[2] Harnessing a paper-folding mechanism for reconfigurable DNA origami

附注