

DNA 计算机原理、进展及难点(V): DNA 分子的固定技术

许 进¹⁾ 李 菲^{1),2)}

¹⁾(北京大学信息科学技术学院高可信软件技术教育部重点实验室 北京 100871)

²⁾(空军装备研究院 北京 100085)

摘 要 在 DNA 计算机的研制中, DNA 分子的固定是首先需要处理的一个最为基本的技术问题. 事实上, DNA 分子的固定技术不仅是生物计算的一个基本技术, 而且是整个基因工程、生物芯片、甚至某些疾病诊疗的基础, 基于此, 文中将对 DNA 分子的固定技术给予较为系统的研讨, 包括基本原理、具体方法等. 文中引入了“DNA 分子固定系统”的结构体系, 并对该结构体系中载体子系统、固定剂子系统、标记子系统这 3 个主要子系统进行了详细的论述.

关键词 DNA 计算机; DNA 固定技术; 固定系统; 固定剂; 载体; 分子标记; 磁珠分离技术; Acrydite™ 技术

中图法分类号 TP391 **DOI 号**: 10.3724/SP.J.1016.2009.02283

DNA Computer Principle, Advances and Difficulties (V): Immobilization Technology of DNA Molecule

XU Jin¹⁾ LI Fei^{1),2)}

¹⁾(Key Laboratory of High Confidence Software Technologies of Ministry of Education,
School of Electronics Engineering and Computer Science, Peking University, Beijing 100871)

²⁾(Equipment Academy of Air Force, Beijing 100085)

Abstract In the research of DNA computer, immobilization of DNA molecule is an essential technology at first. Actually, immobilization of DNA molecule is not only a basic tool of biological computation, but also the foundation of the whole Genetic Engineering and bio-chip, even some disease treatment. In this paper, immobilization technology of DNA molecule, including its basic principle and factual methods is discussed in detail. The architecture of bio-molecular immobilization system is presented. The authors mainly introduce its three subsystems—substrate system, fixer system and molecular marker system.

Keywords DNA computation; immobilization of DNA molecular; immobilization system; fixer; substrate; molecular marker; magnetic bead purification; Acrydite™ technology

1 引 言

从目前的研究现状来看, DNA 计算研究中主要

存在三个难点, 第一个是解空间指数爆炸问题, 即随着问题规模的增大所需要的 DNA 量呈指数增长; 第二个难点是编码问题. 对于规模较大的 DNA 计算而言, 作为代表问题“数据”的 DNA 分子的编码

涉及到诸如解链温度 T_m 的一致性、特异性杂交的准确性、与 DNA 计算中各种生化操作的适应性等各种不同约束条件的限制. 因而, DNA 序列的编码问题是一个很困难的数学问题. 许多学者认为这个问题是 NP-完全问题^[1-3]; 第三个难点是解的检测问题. 检测问题几乎“充满”了 DNA 计算的始终. 其中如何给出快速准确的检测技术以及如何利用现有的 IT 技术进行解的检测是 DNA 计算机研究中的重点^[4]. 从目前的研究现状来看, DNA 传感器技术可能是 DNA 计算机检测中一个很有希望的工具. 而 DNA 分子的固定技术则是 DNA 传感器中的一项关键技术. 另外, DNA 分子的固定技术在医疗、生物芯片以及基因工程等众多领域均为基础性的技术.

作为 DNA 计算中的“数据”——DNA 分子, 若在计算过程中只在溶液中进行杂交反应, 而不受其它载体的约束, 则我们把这种 DNA 分子称为无载体的 DNA 分子. 若 DNA 分子被固定在某物体上, 则把该物体称为 DNA 分子的载体. 在 DNA 计算中, 通常这些载体有诸如磁珠、凝胶、金属、玻璃等. 而如何将 DNA 分子固定在这些载体上, 即 DNA 分子的固定问题, 不仅是 DNA 计算中的一个基本问题, 也是研制 DNA 计算机必须解决的问题. 本文拟重点对 DNA 分子的固定技术展开研讨.

实际上, DNA 分子的固定技术不仅是研制 DNA 计算机的基本技术, 而且是 DNA 计算模型研究中的常用技术^[5]. 如 1994 年 Adleman 所建立的求解有向 Hamilton 路问题的 DNA 计算模型中就使用了将 DNA 分子固定在磁珠上的技术^[6], 该研究组在 2002 年的 DNA 计算模型中使用了将 DNA 分子固定在聚丙烯酰胺凝胶上的固定技术^[7]. 文献^[8]中所建立的枚举型图顶点着色 DNA 计算模型中也使用了磁珠固定 DNA 分子的技术等. 文献^[9]所建立的 DNA 计算模型中, 将 DNA 分子固定在玻璃上.

追其历史, 生物分子固定技术的研究始于 20 世纪 60 年代, 美国学者 Clark 首先采用了固定化酶方法制作酶电极^[10], 其后, 关于这方面的研究发展迅速^[11-12]. 目前 DNA 探针的固定方法主要有共价键合法、原位合成法、吸附法、自组装膜法、生物素-亲和素方法、AcryditeTM 技术等.

这里还要提及的是, 我国在 DNA 固定技术及应用方面的研究也取得了可喜的成果, 如姚守拙院士^[13]、张先恩教授^[14]等人的工作. 另外, 刘盛辉等^[15]将石墨电极表面硅烷化导入氨基, 然后用碳二

亚胺(EDC)作偶联活化剂, 在电极表面固定单链 DNA. 郑赛晶等^[16]采用微孔穴充石蜡石墨电极固载 ssDNA. 黄海珍等^[17]对 DNA 探针的固定方法作了详细评述. 有关这方面一些详细的介绍参见文献^[18].

2 DNA 分子的固定系统

本节引入了“DNA 分子固定系统”的结构体系, 以便于更能系统地刻画 DNA 分子的固定技术.

所谓“DNA 分子固定系统”, 是由载体子系统、对象子系统、固定剂子系统和标记子系统 4 个子系统构成. 可将其定性描述为

固定系统 = (载体子系统, 对象子系统,
固定剂子系统, 标记子系统),

如图 1 所示.

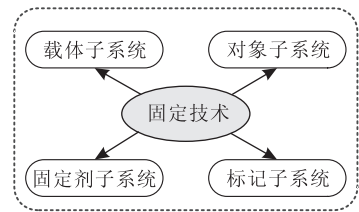


图 1 固定系统结构示意图

根据 DNA 计算模型的不同, 可能用到的 DNA 载体也会不同. 载体也称为支持物, 是指作为固定相的材料^[19]. 常用的载体有诸如磁珠、凝胶、量子点以及金箔等, 如图 2 所示.

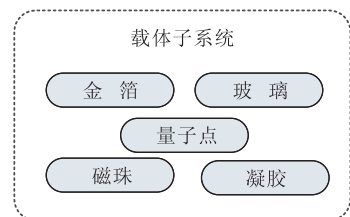


图 2 载体子系统

在 DNA 计算中, 固定的对象主要是 DNA 分子. 当然, 在 RNA 计算中的固定对象主要是 RNA 分子, 而在整个基因工程中的固定对象则是蛋白质、RNA 与 DNA 为主体的生物大分子等, 如图 3 所示.

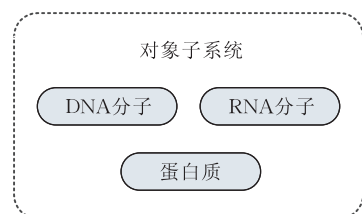


图 3 生物计算中的对象子系统

所谓固定剂,是指将固定对象固定在特定载体上所需要的介质,多数采用的是偶联,如共价键的偶联,离子键、氢键、磁力等各种引力的吸附,另外还可采用生物素-亲和素技术、分子自组装膜等,如图 4 所示。

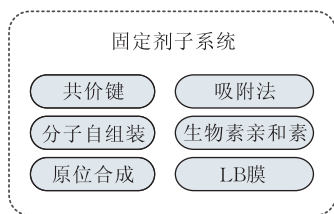


图 4 固定剂子系统

固定 DNA 分子或其它生物大分子的主要目的是用于检测。因此,被固定的 DNA 分子常常需要进行标记。标记 DNA 分子通常采用诸如荧光标记、放射性和非放射性核素标记等方法,如图 5 所示。

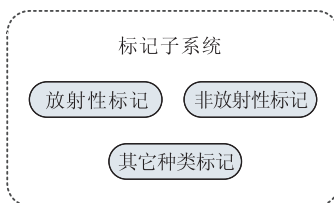


图 5 标记子系统

从下节开始,我们将围绕着固定系统中相应的子系统进行讨论。

3 载体子系统及其在 DNA 计算中的应用

本节将主要介绍 DNA 计算中常用的 3 种载体:①基于试管型 DNA 计算中常用的磁珠;②基于凝胶电泳技术的载体——Acrydite;③关于表面计算中的玻璃或者金箔等作为载体的处理。

3.1 磁珠技术

在 DNA 计算中,经常需要将双链 DNA 序列中的一条固定起来,通过加热,让互补的另一条参与杂交反应。若在试管里进行杂交反应,则通常将一条 DNA 链固定在磁珠上。我们把将一条 DNA 链固定在磁珠上的技术称为磁珠固定分离技术,简称为磁珠技术。这里将主要介绍磁珠技术的机理,特别针对其在 DNA 计算中应用的原理给予详细介绍。

一般磁珠固定分离技术的基本方法是:通过抗原对偶联在磁珠表面的抗体或亲和配体的特异性识别,在外加磁场的作用下,达到分离、检测、纯化样品的目的^[20]。磁珠分离方法主要有两类:一类是所谓

的免疫-磁珠分离(Immuno-Magnetic Beads, IMB),其方法是在磁珠表面包被特异性单克隆体,主要用于分离细菌和病毒^[21-22];另一类是所谓的探针-磁珠分离(Probes-Magnetic Beads, PMB),具体操作是在磁珠表面包被亲和素,通过亲和素与生物素之间的特异性反应,将探针标记在磁珠表面。这种方法主要应用于捕捉核酸和 PCR 扩增^[23-24]以及用于捕捉扩增产物,进行特异性分析^[25]等。

采用磁珠作为 DNA 分子载体有 3 大优势^[26]:①亲水性磁性粒子能够比较稳定地悬浮在水溶液中,并可在外加磁场作用下定位于某一部位,其表面可固定各种功能分子如酶、抗体、DNA,甚至细胞等,因此在分子生物学、免疫测定、细胞分离与分类、基础医学、临床诊断、临床治疗等方面具有良好的应用前景;②作为 DNA 分子的固定化载体,磁珠有利于固定化 DNA 分子从反应体系中分离和回收,还可以利用外部磁场控制磁性材料固定 DNA 分子的运动和方向;③磁珠作为 DNA 分子的固定载体还具有以下优点:固定的 DNA 分子可重复使用,降低成本;适合大规模连续化操作;将 DNA 分子固定在磁性粒子表面后, DNA 分子的化学活性不受到任何影响。

由于在 DNA 计算中主要采用 PMB(探针-磁珠分离)方法,故在本文中只详细介绍这种方法。下面,我们将从磁珠的结构、材料与原理以及操作使用方法等几个方面来给予介绍。

(1) 磁珠结构

磁珠由载体微球和配基结合而成,一般直径为 $0.26\mu\text{m}\sim 3.00\mu\text{m}$ 。理想的磁珠为均匀的球形,具有超顺磁性及保护性壳,其结构如图 6 所示,其中磁性材料主要有 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_4$ 、 $\text{Me-Fe}_2\text{O}_4$ ($\text{Me} = \text{Co}, \text{Mn}, \text{Ni}$)、 Fe_3O_4 、 $\text{Ni}, \text{Co}, \text{Fe}, \text{Fe-Co}$ 和 Ni-Fe 合金等,目前被研究最多且应用最广泛的是铁及其氧化物($\text{Fe}, \text{Fe}_2\text{O}_4$ 和 Fe_3O_4 等)^[27]。高分子材料主要有聚乙烯亚胺、聚乙烯醇、多糖(纤维素、琼脂糖、葡聚糖、壳聚糖等)和牛血清白蛋白等。磁珠表面常带有化学功能的基团,如 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 和 $-\text{CONO}_2$ 等,使得磁珠载体几乎可以偶联任何具有生物活性的蛋白^[28-29];配基必须具有生物专一性的特点,而且载体微球与配基结合后不影响或改变配基原有的生物学特性,保证微球的特殊识别功能,还可以在功能配基上配有亲和素。在单链 DNA 分子 5'-端加入与亲和素相配的生物素^[30-31]。

(2) 磁珠固定分离技术在 DNA 计算中应用原理及具体使用方法

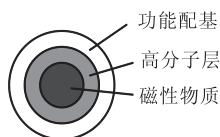


图 6 磁珠的基本结构示意图

磁珠技术是 DNA 计算中经常用到的一种分离技术,分离用的磁珠表面需要大量的羟基、羧基、巯基、氨基,通过洗液与 DNA 结合,在磁场的作用下从溶液中分离出 DNA,再用一种洗液使 DNA 从磁珠表面分离出来,最后通过磁场把废的磁珠分离出来,得到纯的 DNA 溶液.通常用亲和素-生物素方法进行磁珠固定分离.

磁珠技术在 DNA 计算中应用的基本原理是:利用生物素-亲和素法将计算问题中的探针 DNA 分子固定到磁珠上,探针 DNA 分子与待测溶液中的靶分子进行杂交反应后,再用磁力架将带有双链 DNA 的磁珠分离出来,其示意图如图 7 所示.具体操作步骤如下^[32]:

第 1 步.在磁性粒子表面共价结合链霉素亲和素,使得磁性粒子能够吸附有生物素的核苷酸探针,达到快速、有效分离靶分子的目的;

第 2 步.取库链 DNA 于试管中,加入生物素修饰的靶分子,进行反应,然后加入磁珠中,反应后弃去上清;

第 3 步.用 SSC 洗磁珠,弃去上清.再加入 SSC 后用磁力架快速分离,将上清转移至新的试管中;

第 4 步.根据计算需要,可以多次重复第 3 步,由此可以得到分离出来的靶 DNA 分子.

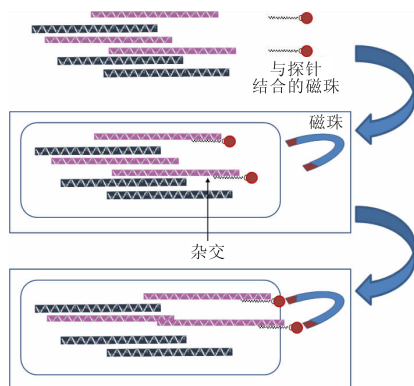


图 7 磁珠在 DNA 计算中的应用原理示意图

3.2 凝胶载体

上一节我们给出了作为载体磁珠的结构与性质,并讨论了磁珠在 DNA 计算中的作用.在这一小节里,将给出在 DNA 计算中,另外的主要载体——凝胶的结构与性质.凝胶主要应用于电泳之中,而电泳分离技术则是 DNA 计算中的一个最为基本的环节.聚丙烯酰胺凝胶电泳是以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的电泳方法.在这种支持介质上可根据被

分离物质分子大小和分子电荷多少来分离.

(1) 聚丙烯酰胺凝胶

聚丙烯酰胺(Polyacrylamide)简称 PAM,由丙烯酰胺单体聚合而成,是一种水溶性线型高分子物质^[33].

聚丙烯酰胺凝胶的作用原理如下^[34-35]:

① 絮凝作用原理. PAM 用于絮凝时,与被絮凝物种类表面性质,特别是动电位、粘度、浊度及悬浮液的 PH 值有关.颗粒表面的动电位是颗粒阻聚的原因,加入表面电荷相反的 PAM,能使动电位降低而凝聚.

② 吸附架桥. PAM 分子链固定在不同的颗粒表面上,各颗粒之间形成聚合物的桥,使颗粒形成聚集体而沉降.

③ 表面吸附. PAM 分子上的极性基团颗粒的各种吸附.

④ 增强作用. PAM 分子链与分散相通过种种机械、物理、化学等作用,将分散相牵连在一起,形成网状,从而起增强作用.

丙烯酰胺称单体,甲叉双丙烯酰胺称交联剂,在水溶液中,单体和交联剂通过自由基引发的聚合反应形成凝胶.在聚丙烯酰胺凝胶形成的反应过程中,需要有催化剂参加,催化剂包括引发剂和加速剂两部分^[36].引发剂在凝胶形成中提供始自由基,使丙烯酰胺成为自由基,发动聚合反应,加速剂则可加快引发剂放自由基的速度.常用的引发剂和加速剂的配伍如表 1 所示.

表 1 聚合反应催化剂配伍

引发剂	加速剂
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	TEMED
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	DMAPN
核黄素	TEMED

其中 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 是过硫酸铵;TEMED 是 N,N,N',N'-四甲基乙二胺;DMAPN 是 β -二甲基氨基丙晴;用过硫酸铵引发的反应称化学聚合反应;用核黄素引发,需要强光照射反应液,称光聚合反应.聚丙烯酰胺聚合反应可受下列因素影响^[37]:

- ① 大气中氧能淬灭自由基,使聚合反应终止,所以在聚合过程中要使反应液与空气隔绝;
- ② 某些材料如有机玻璃,能抑制聚合反应;
- ③ 某些化学药物可以减慢反应速度,如赤血盐;
- ④ 温度高聚合快,温度低聚合慢.

以上几点在制备凝胶时必须加以注意.凝胶的筛孔、机械强度及透明度等很大程度上由凝胶的浓度和交联决定.每 100ml 凝胶溶液中含有单体和交

联剂的总克数称凝胶浓度,常用 T% 表达;凝胶溶液中交联剂占单体和交联体总量的百分数称为交联度,常用 C% 表示。

聚丙烯酰胺凝胶电泳可分为连续的和连续的两类,前者指整个电泳系统中所用缓冲液、pH 值和凝胶网孔都是相同的,后者是指在电泳系统中采用了两种或两种以上的缓冲液、pH 值和孔径,不连续电泳能使稀的样品在电泳过程中浓缩成层,从而提高分辨能力。

单体丙烯酰胺的分子为 $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$;交联剂 N,N-甲叉双丙烯酰胺的分子结构为 $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$ 。乙烯基 $\text{CH}_2 = \text{CH}$ 一个接一个的聚合作用从而形成丙烯酰胺链的交联,构成了如下三维空间凝胶网络图,如图 8 所示。

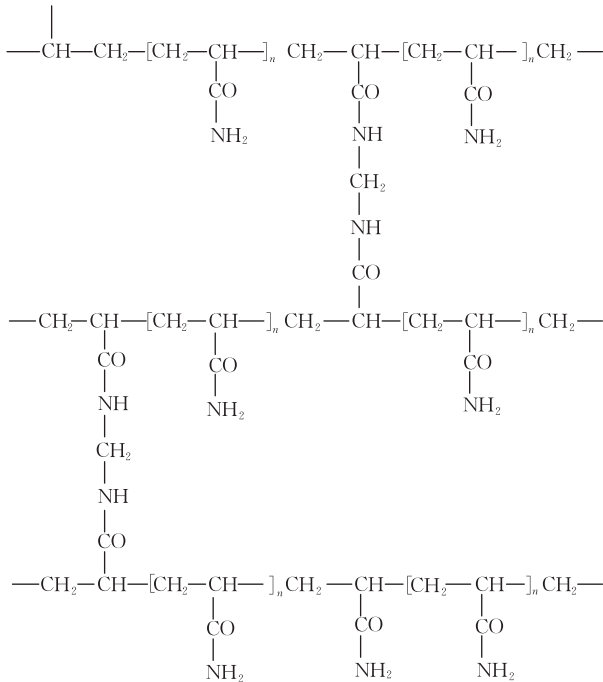


图 8 聚丙烯酰胺凝胶结构

(2) Acrydite™ 技术

为了较详细地讨论 Acrydite™ 技术以及下面叙述方便,我们在此先给出聚合 DNA 分子的基本单元——核苷酸的分子结构,如图 9 所示。

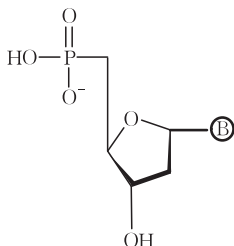


图 9 核苷酸结构

其中 B 为核苷酸所携带的碱基,为鸟嘌呤、腺嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶其中一种。

Acrydite™ 是一种可连接寡核苷酸作为 5' 端修饰的基于丙烯酸亚磷酰胺的化学物质,Acrydite 的分子式是 $\text{C}_{19} \text{H}_{36} \text{N}_3 \text{O}_3 \text{P}$ 。分子量为 385.48。经 Acrydite 修饰的寡核苷酸能与硫醇修饰的表面发生共价反应或能够合并进入聚丙烯酰胺凝胶。它也可以使高分子通过丙烯酸共价结合到表面支持物,经 Acrydite 修饰的高分子可以通过丙烯酸单体聚合,还能与巯基或硅烷表面反应^[38-39]。

这一技术由 Kenney^[40] 于 1998 年首次提出,目前较大规模的 DNA 计算,20 个变量的 3-SAT 问题也是由此固定技术实现的^[7]。该方法在 DNA 计算中的原理是:利用常规的 DNA 合成技术,将酰胺分子引入到寡聚核苷酸的 5' 端,结合有酰胺分子的寡聚核苷酸探针可以和酰胺溶液混合,从而形成含有探针的凝胶层,而凝胶分离时则使用标准的方法^[41]。这种技术应用于 DNA 计算中,可以使一些问题得到很好的改善。Acrydite 修饰的 DNA 分子与聚丙烯酰胺凝胶相连如图 10 所示。

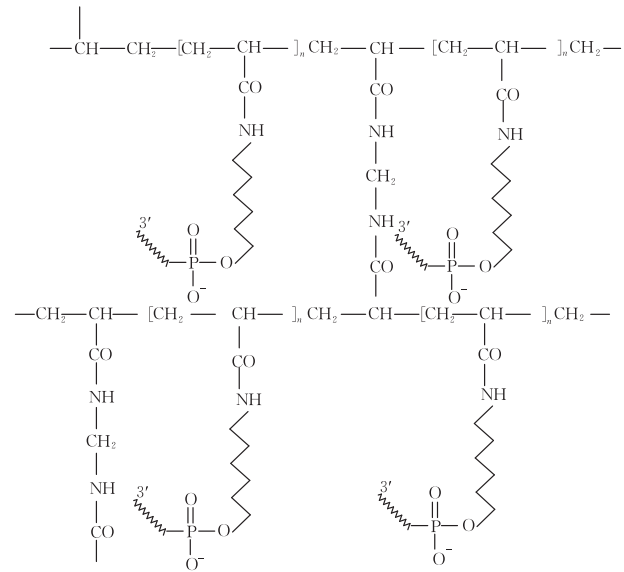


图 10 Acrydite 修饰 DNA 与聚丙烯酰胺联结

采用 Acrydite 技术固定 DNA 分子时,其优点有如下几个方面:

① Acrydite 修饰物的连接比耦合更加稳定。在多种不同温度及 PH 值的水溶液条件下,Acrydite 修饰的核苷酸都比较稳定;

② Acrydite 修饰物可以在固相表面形成共价键。Acrydite 修饰物与固相表面连接可以形成高稳定性的 C-C 键或硫醚键,在标准的分子生物学规则中,这些键在通常情况下是十分稳定的;

③结合效率高. Acrydite 连接 DNA 分子的效率通常高达 90% 以上;

④用途广泛. Acrydite 修饰的 DNA 分子可以固定在玻璃、凝胶聚合物或层析介质上:

(i) 用于微阵列的玻璃显微镜幻灯片. 巯基和丙烯酰胺的连接具有稳定的化学性质, 可以使 Acrydite 修饰的 DNA 分子固定在玻璃显微镜幻灯片上从而形成微阵列;

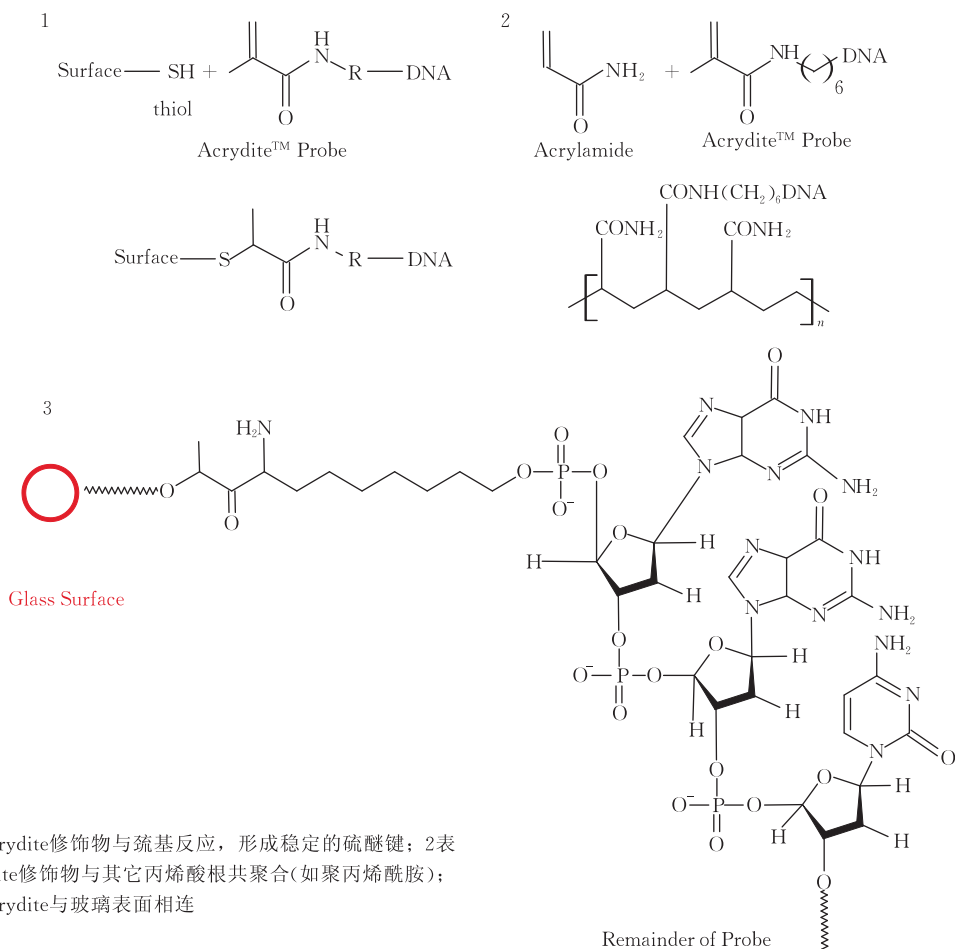
(ii) 当 Acrydite 修饰物与另一种单体如丙烯酰胺共聚合时, 产物为一附着 DNA 的交联凝胶, DNA 在聚合物中的浓度决定于加入 DNA 的浓度和 Acrydite 修饰物相对于聚合物单体的比率. 此类交联凝胶可以应用于电泳捕获阵列;

(iii) 当 Acrydite 修饰物与固定表面覆盖着丙

烯基的另一种单体相聚合时(如塑料表面覆盖丙烯酸硅烷), Acrydite 修饰物会与此单体在固定表面形成一层凝胶层, Acrydite 的浓度和凝胶层的性能可以在一定范围内有所调整, 使得表面具有特殊功能, 如疏水性;

(iv) 当 Acrydite 修饰物与另一种单体如丙烯酰胺共聚合(不使用交联剂)时, 产物是带有 DNA 分子的线性聚合体, 线性聚合体具有广泛应用, 例如, 线性聚合体和一些丙烯酰胺衍生物形成的物质在室温下是可溶解的, 但是在高于 45°C 时会凝结和沉淀, 这种由室温决定溶解度的性质可以广泛应用于多种分离过程.

图 11 为 AcryditeTM 技术与巯基表面、凝胶和玻璃相连的原理图^[42].



1表示Acrydite修饰物与巯基反应, 形成稳定的硫醚键; 2表示Acrydite修饰物与其它丙烯酸根共聚合(如聚丙烯酰胺); 3表示Acrydite与玻璃表面相连

图 11

Acrydite 将 DNA 与凝胶交联的操作通常采用目前分子生物实验室广泛使用的标准凝胶聚合技术^[43], 过程中不需要高活性的化学交联剂. Acrydite 连接 DNA 可以达到表面密度为 200fmol 可杂交的探针/mm². 这个密度相比利用其他连接方法要有利

得多.

通过升高凝胶温度或在缓冲溶液中加入变性剂, 还可以测试单核苷酸的多态性, 这种方法同样适用于测试 PCR 样品扩增中的变异. 另外, Acrydite 凝胶技术还可以广泛应用于其它研究领域, 例如基

因表达分析和核酸从样品中的提取纯化。

3.3 玻片或其他载体

在 DNA 计算研究中,表面计算中固定 DNA 分子的支持物最多的是玻璃和金片,其中玻片是研究和应用最多的 DNA 分子固定支持物,因为它具有如下几个优点^[44-45]:

(a) 价格低廉,且所固定的 DNA 样品可以共价结合在预处理后的玻片表面上;

(b) 玻片是一种刚硬的介质,耐高温,可以经受高离子强度溶液的清洗;

(c) 玻片是一种非孔性材料,杂交体积可以减至最小,从而加快了探针与目标 DNA 之间杂交和退火的过程;

(d) 玻片荧光信号本底低,背影干扰小;

(e) 可使用双荧光甚至多荧光检测系统,在一个反应中同时对两个以上的样品进行并行处理。

由于玻片是平面结构,上样量小,使得检测的灵敏度低,因此可以对玻片的表面进行改性,通过各种化学反应在表面引入各种官能团(氨基、醛基、羧基、环氧基、巯基等),使 DNA 与玻片表面的官能团共

价结合,从而稳定地固定于玻片表面.在 DNA 计算中,通常采用的玻片预处理方法有如下两种:

(1) 氨基硅烷化预处理

先将玻片硅羟基化,再用 3-氨丙基三乙氧基硅烷化,这样可以使得玻片表面带上氨基的官能团,此官能团可以与多种偶联剂作用,来固定末端修饰的 DNA 分子。

利用戊二醛分子作为偶联剂时,戊二醛分子两端的醛基可以与玻片上的氨基及 DNA 连接起来^[46],该反应条件温和,操作简便,可在 4~40℃ 及 pH6.0~8.0 条件下进行。

若利用二异硫氰酸酯作为偶联剂时,2 个异硫氰酸酯基分别与玻片上的氨基和 NH₂(CH₂)₆—修饰的 DNA 的氨基发生偶联反应,从而将 DNA 分子固定.可能残存未反应的异硫氰酸酯需要进行封闭,减少非特异性吸附,连接后的结构如图 12 所示^[47]。

在水溶性碳二亚胺 EDC 的存在下,末端带有羧基的 DNA 分子可以通过酰胺键与玻片上的氨基偶联,连接过程如图 13 所示^[48]。

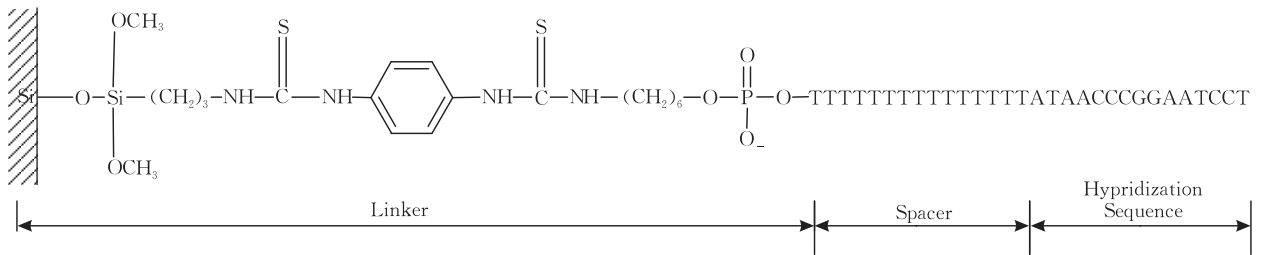


图 12 通过二异硫氰酸酯将 DNA 固定在玻片上示意

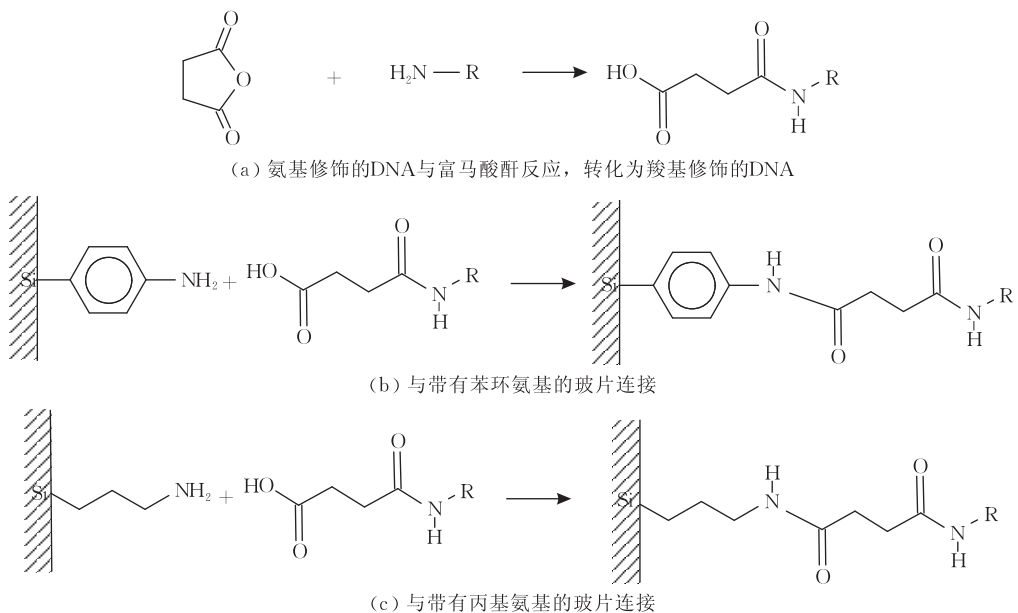


图 13 羧基修饰的 DNA 分子与玻片联结

酰胺键可以在温和的条件下定量形成,并且生成稳定的产物,其中两个步骤——在玻片上引入氨基和在氨基修饰的 DNA 上引入羧基都很容易实现,预处理完后的偶联反应过程一步完成,不需要引入手臂分子,也不需要中间分离和提纯,是一种方便、有效的固定 DNA 分子的方法^[49]。

(2) 环氧乙烷基预处理

在玻片表面还经常引入化学活性很强的环氧乙烷基团,它与羟基、氨基和巯基之间都可产生较为稳定的化学键,所以可以用于固定末端带有羟基、氨基和巯基修饰的 DNA 分子。

在玻片表面引入末端环氧基团最常用的方法是用 3-缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷(COPS)和硅羟基化的玻片进行硅烷化反应,使玻片表面产生末端环氧乙烷基团,可以与带有羟基、氨基、巯基的 DNA 分子偶联,如图 14 是带有巯基的 DNA 分子通过环氧基团固定在硅羟基化的玻片上^[50]。

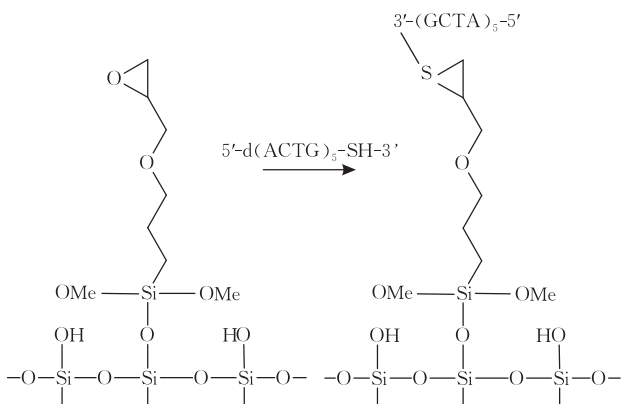


图 14 带有环氧乙烷基团的玻片与巯基修饰的 DNA 分子偶联

还有一种方法在玻片表面引入末端环氧基团^[51]:先将玻片引入羟基或氨基等基团,再与二环氧乙烷化合物反应.二环氧乙烷化合物通常都含有一长链亲水手臂分子,在其末端带有反应活性的环氧乙烷基,环氧乙烷基和玻片表面的氨基或羟基之间反应结合成较稳定的化学键,而另一端保留了可以和带有羟基、氨基、巯基的 DNA 分子反应的环氧乙烷基团.这种方法可以使玻片表面与固定的 DNA 之间带上不同长度的长链手臂分子.但是反应过程中的高交联和损伤会使环氧乙烷活性基团减少,进而减少了 DNA 的固定化密度.所以偶联时高浓度的羟基、氨基、巯基修饰的 DNA 参与反应,才能保证 DNA 的固定化效率。

(3) DNA 分子在金片上的固定

金片是指通过真空蒸发到硅片或玻片表面的一层金膜,金膜可以与巯基产生强烈的作用,通过

Au—S 键将 DNA 固定.比较成熟的在金片上固定 DNA 分子的方法是将 DNA 的 3' 端或 5' 端用 $\text{HS}(\text{CH}_2)_6$ 修饰,然后在 Au 表面自组装^[52],如图 15 所示。

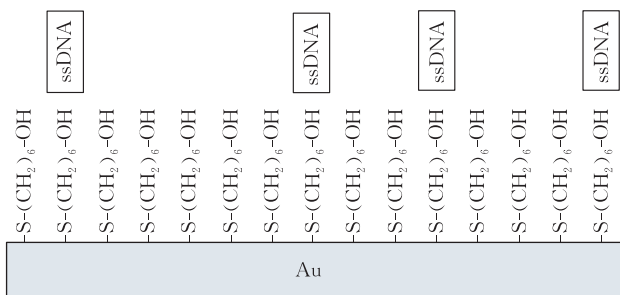


图 15 金表面的自组装膜

此种方法通过调节巯基修饰的 DNA 在金片表面的自组装时间可以控制 DNA 的固定化密度,并且在适当的固定密度下,探针对于目标 DNA 分子有着很高的杂交效率.在固定 DNA 以后,还需要用烷基硫醇对金片表面进行封闭以减少非特异性吸附,因为金表面对 DNA 能够产生非特异性吸附。

在自组装过程中,还可以加入聚赖氨酸间接固定 DNA 分子,能够起到两个作用:①可以封闭金表面,减少 DNA 分子的非特异性吸附;②在利用 SPR 测定 DNA 杂交时,可以增加金表面有机物分子的质量。

4 固定剂子系统

将 DNA 分子固定在某载体上,类似将一张“画”挂在一个“墙壁”上. DNA 分子相当于“画”,而“墙壁”则相当于载体.就好像画不可能直接挂在墙壁上一样, DNA 分子也不可能直接与相应的载体结合.根据墙壁的不同,挂画的方式也不同,可能用钉子的方法,也可能用胶水或浆糊等粘贴的方法等。

对于将 DNA 分子固定在一个载体上也有类似的方法.根据载体的不同而确定不同的方法.目前 DNA 计算中所采用的载体主要是磁珠、凝胶、玻璃或金属表面等.一般而言 DNA 分子的固定技术主要有如下 6 种类型,这 6 种类型相当于“钉子或者胶水与浆糊”等的功能.它们分别是:共价固定法、生物素-亲和素反应系统、吸附法、原位合成法、有序自组装技术和 LB 膜技术.下面将分别给予简要介绍。

4.1 共价固定方法

共价结合法,也称为共价固定法,是通过双官能试剂的功能团或偶联活化剂,使生物活性分子与不

容性载体表面上的反应基团发生化学反应形成共价键(如酰胺键、酯键、醚键等)的一种固定化方法,是应用最多的固定方法之一.这种固定方法的优势是结合牢固、得到的修饰层稳定,DNA 分子以一端固定,结构灵活,易进行分子杂交,载体不易被生物降解以及使用寿命长等;该固定技术的不足是操作步骤较多,若利用酶活化载体时,酶活性易被降解,且制备具有高活性的固定化酶比较困难.

共价结合一般分为两步进行^[53]:

(1)首先活化载体,引入活性键合基团,将不容性载体表面进行修饰,使其带上各种固定所需要的活性基团,如羟基、氨基等,以便和探针 DNA 结合;

(2)通过双官能试剂或偶联活化剂使载体与探针 DNA 结合.常用活化试剂有氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)、环氧丙基三甲基硅烷(GOPS)等.常用双官能试剂有戊二醛(GA)、对硝基苯氯甲酸酯(NPC)、二溴乙烯等.

共价键合法的载体有无机载体和有机载体两种,一般主要采用有机载体,很少用无机载体^[54].

共价键合法是固定探针比较理想的方法,在制备 DNA 电化学生物传感器中得到广泛应用.通常是通过共价键将探针固定到电极上,根据不同的电极表面,可以采用不同的共价键合方法.对于金电极,主要是利用金与硫形成金 2 硫键,还可以利用巯基标记的探针将其固定到金电极.这里要强调的是:缓冲溶液、固定温度、固定时间、链的长短等因素对探针的有效固定均有影响.

4.2 生物素-亲和素固定法

生物素-亲和素系统(Biotin-Avidin System, BAS),是 20 世纪 70 年代后期应用于免疫学并得到迅速发展的一种新型生物反应放大系统.由于它具有生物素与亲和素之间的高度亲和力及多级放大效应,并与荧光素、酶、同位素等免疫标记技术有机结合,使各种示踪免疫分析的特异性和灵敏度进一步提高;生物素分子又易于活化,与核酸分子偶联率高而不影响核酸分子的生物活性,所以 BAS 已经广泛应用于生物医学实验研究的各个领域,既可用于微量抗原、抗体及受体的定量、定性检测研究中,亦可制成亲和介质用于各类反应体系中反应物的分离、纯化.另外 BAS 也在生物传感器研究中起到了重要的作用^[55],主要是关于 BAS 的固定化问题以及应用 BAS 固定生物物质的问题的研究. BAS 的固定化有多种形式:亲和素可以直接不可逆吸附到 Au、Ag 等电极表面上形成亲和素单分子层;生物素也

可以吸附在电极表面形成生物素分子的固定层,从而来固定 BAS 体系.

生物素(biotin)是动、植物体内广泛分布的一种小分子生长因子,又名辅酶 R 或维生素 H.生物素的分子式为 $C_{10}H_{16}O_3N_2S$,其分子量为 244.31.生物素又叫维生素 H.生物素分子有两个环状结构,其中 I 环为咪唑酮环,是与亲和素结合的主要部位;II 环为噻吩环,C2 上有一戊酸侧链,其末端羧基是结合抗体和其他生物大分子的唯一结构,经化学修饰后,生物素可成为带有多种活性基团的衍生物——活化生物素^[25].

自然界中至少存在有两种生物素,一种是 α -生物素(存在于蛋黄中),另一种是 β -生物素(存在于肝脏中).它们的基本化学结构相同,都是噻吩环与尿素相结合而成的环化合物.不同的是, α -生物素带有异戊酸侧链, β -生物素有戊酸侧链,其结构如图 16 所示^[56].生物素难溶于水,易溶于二甲基甲酰胺(DMF).

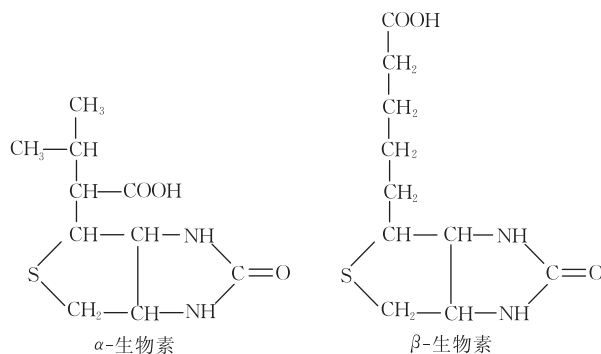


图 16 两个类型的生物素分子结构

生物素固定连接 DNA 时,需要将 DNA 分子氨基化,然后才能与生物素分子结合,连接后的分子(β 生物素-DNA 分子)如图 17 所示.

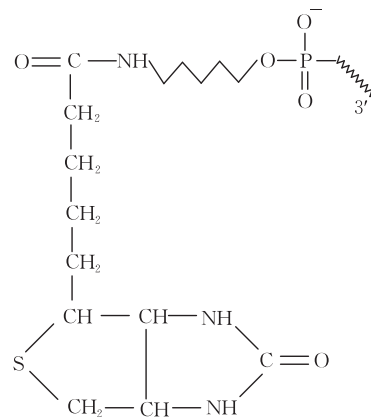


图 17 β 生物素连接 DNA 分子

亲和素亦称抗生物素蛋白、卵白素或亲和素,是

从卵白蛋白中提取的一种碱性糖蛋白, 等电点(pI)为 10~10.5, 含糖约 10%, 分子量为 68kDa. 纯品为白色粉末, 易溶于水, 在 pH9~13 的溶液中性质保持稳定, 耐热并耐受多种蛋白水解酶的作用, 80℃加热 2min, 仍保持活性, 特别是和生物素结合后十分稳定. 但对强光和 Fe^{2+} 比较敏感. 亲和素由 4 个相同的亚基组成, 能结合 4 个分子的生物素. 亲和素与生物素之间的亲和力极强, 比抗原与抗体的亲和力至少高 1 万倍, 因此二者能快速结合, 而且反应不受外界干扰, 具有高度特异性和稳定性^[57].

亲和素主要包括卵白亲和素、链亲和素、卵黄亲和素及类亲和素等. 后两种因其特异性亲和力低, 研究不多, 前两种目前已深入研究并得到广泛应用.

亲和素与生物素的结合, 虽不属免疫反应, 但特

异性强, 亲和力大, 两者一经结合就极为稳定. 由于 1 个亲和素分子有 4 个生物素分子的结合位置, 可以连接更多的生物素化的分子, 形成一种类似晶格的复合体. 因此把亲和素和生物素与 ELISA 偶联起来, 就可大大提高 ELISA 的敏感度.

在固定 DNA 探针时, 一般是将亲和素共价偶联或通过静电作用吸附到支持物上, 随后将生物素连接的 DNA 通过生物素与亲和素之间的专一性亲和作用而固定. 用共价偶联的方法固定亲和素比直接吸附亲和素有更好的稳定性及重现性. 以 Au 电极为例, 可以将电极氨基化和羧基化, 再连接亲和素, 利用亲和作用固定连有生物素的 DNA 分子, 固定过程如图 18 所示.

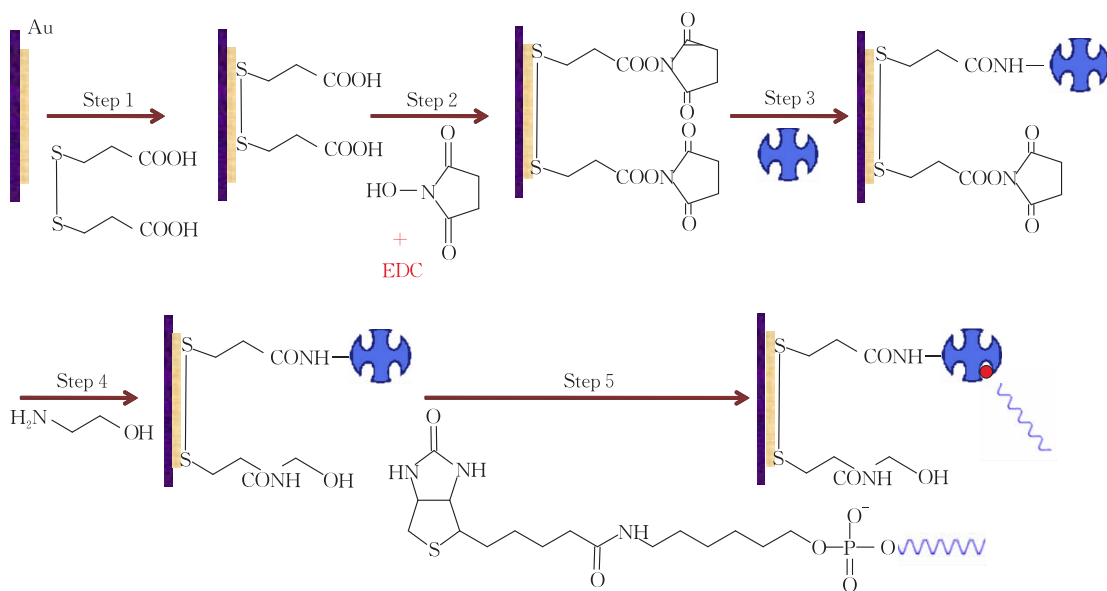


图 18 亲和法固定 DNA 分子

基于生物素-亲和素反应系统固定 DNA 分子的方法凭借简便、温和、高效的特点, 在 DNA 固定技术领域越来越受到重视.

4.3 吸附法

所谓吸附法是通过非共价键作用将探针 DNA 分子直接或恒电位吸附到载体(多为电极)表面, 或由探针 DNA 片段中的磷酸根负离子与载体表面带正电荷的修饰层通过静电作用而固定. 吸附法主要分为物理吸附、化学吸附和恒电位吸附三种, 其中物理吸附包括静电吸附、范德华力吸附; 化学吸附包括氢键吸附、离子键吸附.

(1) 物理吸附. Pang^[58] 等将 ssDNA 或 dsDNA 溶液直接滴至新抛光的玻碳电极表面, 涂匀, 在空气中自然晾干, 无菌二次水冲洗, 充分浸泡, 即得到几

乎为单分子层的 DNA 修饰电极. 此外, 还可以利用这一原理将单链 DNA 固定在石墨电极、金电极及汞电极表面, 制成 DNA 修饰电极.

(2) 恒电位吸附. Wang^[59] 等利用恒电位富集方法将 DNA 探针修饰到碳糊电极上, 他们先将电极在 +1.7V 下活化 1min, 然后将电极浸入含有 DNA 的电解质溶液中在 +0.5V 富集 2min 即可固定探针 DNA 分子. 此种固定方法简单、快捷, 但探针 DNA 分子的再生较为困难.

(3) 化学吸附. 分别利用带正电荷的聚吡咯、阳离子聚合物壳聚糖将单链 DNA 固定在电极上, 可以大大提高探针 DNA 的固定效率^[60-61].

吸附法固定 DNA, 操作步骤简单, 固定化速度快, 但是在高盐浓度的溶液中很容易解脱, 因此不宜

在高盐浓度的条件下使用^[62]. 吸附法固定 DNA 大多数是通过 DNA 片段与支持物上的多个作用点完成的,甚至 DNA 片段可能平躺于支持物表面,因而 DNA 固定化密度可能较小. 由于多个作用点固定 DNA 使 DNA 片段的运动自由度减小,这极大地影响了 DNA 与互补 DNA 的杂交效率.

在电化学传感器中,可以对洁净的电极进行活化,在电极表面产生一层亲水性界面,通过此界面将探针吸附固定于其上^[63]. 还有将生物素吸附到电极上,通过生物素亲和素的亲和作用将探针固定到电极表面. 然而,这种装置不能严格清洗,因为它不是共价键合,在杂交过程中可能脱附,而且 DNA 结构会发生扭曲,使固定的 DNA 无法进行杂交,导致杂交效率很低. 因此吸附法没有成为 DNA 电化学传感器制备的主要方法.

4.4 原位合成法

1989 年 Koch^[64] 等发明了一种新的 DNA 分析技术称原位 DNA 合成技术 (Primed in situ labeling), 简称 PRINS. 其基本原理是变性的染色体与未标记的 DNA 探针发生原位特异性配对, 然后以该 DNA 探针作引物, 再利用 DNA 聚合酶大片断将引物原位延伸, 同时在反应混合液中加入标记的脱氧核糖核苷三磷酸, 这样就可以对新合成的 DNA 进行同步标记, 可以直接检测出引物原位延伸的位置. 这一技术步骤简便、快速, 且不需克隆 DNA 作探针, 因而成为 DNA 固定技术中的重要手段. 这项技术的优点具体有以下几方面^[65]:

- (1) 可以使用高浓度的探针以缩短反应时间;
- (2) 使用大量的探针时不会导致背景污染, 因为未杂交的探针没有被标记;
- (3) 信号的强度不受引物大小的影响, 寡核苷酸引物和较长的克隆探针一样可以检测出染色体上的微小变异;

(4) 孵育时间短, 可以较好地保存染色体和其他细胞结构.

光化学引导下的原位 DNA 合成技术是在载体上原位合成 DNA 探针序列. 合成时将传统的以亚磷酸胺为基础的 DNA 合成技术加以修饰, 亚磷酸胺 5 末端改为光不稳定的保护基团, 在透光位点紫外光照射下, 发生光化学作用可以除去保护基团, 通过合成连接子贴附于载体上, 再用 A、T、C、G 4 种核苷液冲洗, 发生化学偶合形成 DNA 探针. 此种方法已用于 DNA 芯片研究^[66].

4.5 自组装技术(Self-Assembly, SA)

分子自组装是生命系统中最本质的内容之一. 大量复杂的、具有生物学功能的超分子系统(蛋白质、核酸、生物膜、脂质体等)正是通过分子自组装形成的^[67]. 此外, 分子自组装也是分子合成中的重要手段之一, 是构成具有某种功能的材料(液晶、多层膜、单层膜、功能性表面等)的有力工具. 由于这些材料具有新奇的光、电、催化等功能和特性, 在分子器件、分子调控等方面有潜在的应用价值, 因而分子自组装体系的设计与研究引起了研究者极大的兴趣, 近年来受到了广泛的重视^[68-69].

有序自组装法就是基于分子的自组(分子间化学键)作用, 在固体表面自然形成高度有序的单分子层的方法. 分子自组装的本质是分子与分子在一定条件下依赖非共价键分子间作用力(氢键、范德华力、静电力、疏水作用力、 $\pi-\pi$ 堆积作用、阳离子- π 吸附作用等)自发连接成结构稳定的分子聚集体的过程. 在 DNA 固定技术中, 一般是利用一端带巯基的 DNA 片段, 在金电极表面上形成自组装单分子膜来固定核酸分子.

制作 DNA 分子自组装膜的过程如图 19 所示. 分子自组装的基底材料可以是硅、石英、云母、玻璃等, 为防止贵金属(Au、Ag、Pd 等)膜从基底上脱落,

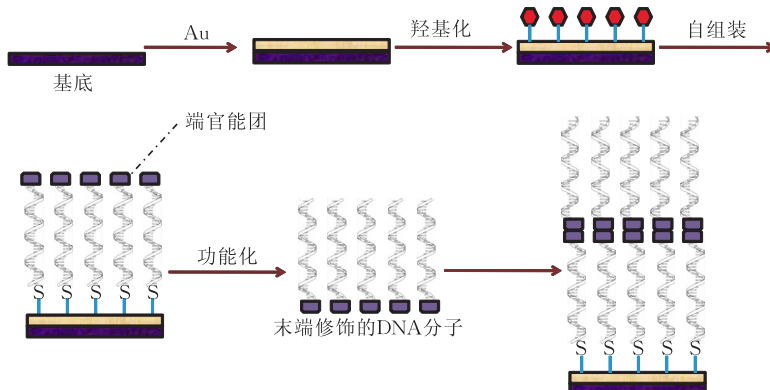


图 19 在 Au 膜表面自组装 DNA 分子膜

通常先在基底上形成一层 cr 膜(膜厚几个 nm)作为过渡层或粘接层,然后再在其上制备 Au、Ag 等膜.制备贵金属膜的方法有真空蒸镀、溅射等,膜厚一般为 50~200nm.有机硫化合物自组装到金膜表面,形成 SAMs. 活泼官能团—X(—X=—OH, —COOH, —NH₂)可以将 DNA 分子耦联到修饰化的金膜表面,形成稳定的 DNA 分子敏感膜.

目前,在生物、化学传感器的研究中,具有识别功能,特别是具有分子识别功能的敏感膜或敏感材料是决定传感器质量的重要因素^[70],将大大提高传感器的灵敏度和选择性.分子自组装技术可以得到结构有序的、机械强度和稳定性好的敏感膜;可实现具有分子实现功能的敏感膜;通过偶联层可实现敏感膜的固定化;同时由分子自组装技术形成的敏感膜对化学环境、热、外压和时间稳定性高,因此利用

分子自组装技术固定 DNA 分子已成为 DNA 传感器的研究热点,也成为利用 DNA 传感器进行 DNA 计算中解的检测的一项关键技术.

4.6 LB 膜技术

在生物信息处理研究中,用于活体测定的微型仪器的直径通常在微米级,所以生物膜的制作及应用于微米生物传感器引起了学者的广泛关注.Langmuir Blogett 膜的基本原理^[14]是许多生物分子(如脂质分子和一些蛋白质分子)在洁净的水表面展开后能形成水不溶性液态单分子膜,小心压缩表面积使液态膜逐渐过渡到成为一个分子厚度的拟固态膜,称为 LB 膜.经仔细安排,可完整移至固体介质表面,并按需要实现分子层的可控累积,实现对膜厚的精确控制,典型 LB 膜的沉积方式如图 20 所示.

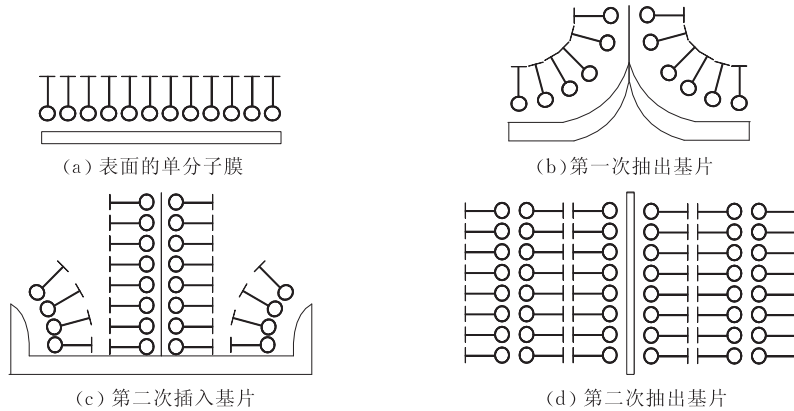


图 20 典型 LB 膜的沉积方式(参照 Joyce-Loebl 公司 LB 膜仪产品说明绘制)

LB 膜实验对液体的纯度、pH 和温度都有着极高的要求,液相通常是纯水,操作压力通过压力传感器和计算机反馈系统调整.

利用 LB 膜技术固定 DNA 分子主要有两个优点:一是分子膜可以制得很薄(数纳米),厚度和层数可以精确控制;二是可以获得高密度的分子膜,由此可能协调响应速度和响应活性这对矛盾.

5 分子标记技术

在遗传试验与育种实践中,如果发现了新的基因,就需要对基因进行标记.遗传标记主要有 4 种类型^[71]:形态标记(morphological marker)、细胞标记(cytological markers)、生化标记(Biochemical marker)和分子标记(molecular marker).早在 1923 年,Sax 等^[72]就提出利用微效基因与主基因的紧密连锁,对微效基因进行选择的设计.但由于形态标记

数目有限,而且许多标记是不利性状,因而难以广泛应用.细胞标记主要依靠染色体核型和带型,数目有限.近年来,分子生物学的发展为植物遗传标记提供了一种基于 DNA 变异的新技术手段,即分子标记技术^[73].与其它标记方法相比,分子标记具有无比的优越性.它直接以 DNA 形式出现,在植物体的各个组织、各发育时期均可检测到,不受季节、环境的限制,不存在表达与否的问题;数量极多,遍及整个基因组;多态性高,利用大量引物、探针可完成覆盖基因组的分析;表现为中性,即不影响目标性状的表达,与不良性状无必然的联系;许多标记为共显性,能够鉴别出纯合的基因型与杂合的基因型,提供完整的遗传信息^[74].在 DNA 计算机的研制中,探针 DNA 分子的标记是一项常用技术,这项技术经过十几年的发展,目前已有十多种标记方法,主要分为两大类.

5.1 基于 Southern 杂交的分子标记

这类标记利用限制性内切酶酶切不同生物体的

DNA 分子,然后用特异探针进行 Southern 杂交,通过放射性自显影或非同位素显色技术揭示 DNA 的多态性,主要有以下两种:

(1) 限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism)

限制性片段长度多态性,简称 RFLP,是出现最早、应用最广泛的 DNA 标记技术之一^[75]. RFLP 标记非常稳定,它是一种共显性标记,在分离群体中可区分纯合体与杂合体,提供标记位点完整的遗传信息,检测变异的原理如图 21 所示. 多种农作物的 RFLP 分子遗传图谱(如图 22)已经建成,但其分析所需 DNA 量较大,步骤较多,周期长,制备探针及检测中要用到放射性同位素,尽管可用非放射性同位素标记方法代替,但成本高、成功率低,且实验检测步骤较多,依然影响其使用、推广.

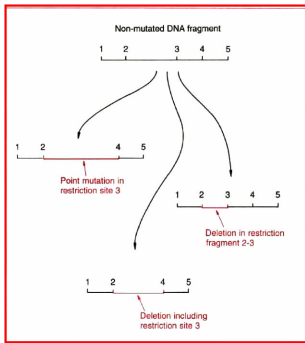


图 21 RFLP 检测变异的原理

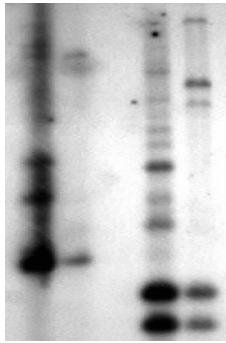


图 22 RFLP 图谱

随机扩增片段长度多态性 DNA,简称 RAPD 技术,是由 Williams 等^[77]发展起来的一项新的遗传标记技术. RAPD 以 PCR 为基础而又不同于经典的 PCR,一般采用 10 个核苷酸的 DNA 序列为引物,扩增时退火温度降至 35℃ 左右. 与其它标记相比, RAPD 具有以下优点^[78-79]: ① 不依赖于种属的特异性和基因组的结构,合成的一套引物可用于不同生物基因组的分析. ② 操作简单,可实现自动化,短期内可利用大量引物完成覆盖基因组的分析; ③ 不需制备探针、杂交等程序,成本较低; ④ DNA 用量少 (10ngDNA 即可完成一次分析),允许快速、简单地分离基因组 DNA. 已在遗传图谱构建、种质资源分析、基因标记等方面得到了广泛的应用,如图 24 所示. RAPD 是一种显性标记,分离群体中纯合体和杂合体通过后代才能区别,并且由于该技术采用的是随机引物扩增,扩增结果的稳定性较差,这在一定程度上限制了其发展.

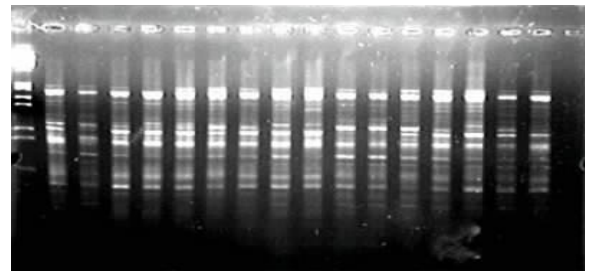


图 24 RAPD 图谱

(2) 小卫星 DNA (Minisatellite DNA)

小卫星 DNA (Minisatellite DNA) 又称数目可变串联重复序列 (Variable Number of Tandem Repeat, VNTR), 是一种重复 DNA 小序列,为十到上百个核苷酸,拷贝数 10~10000 不等. 多态性由于重复单位之间的不平衡交换,从而产生不同等位基因,可通过杂交检测出,原理如图 23 所示. 其缺点是多态性分布集中,合成探针困难,应用并不广泛^[76].

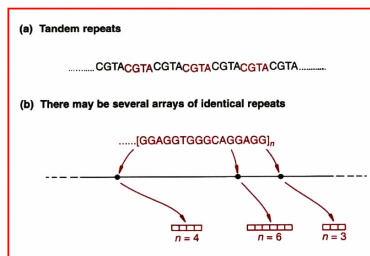


图 23 小卫星 DNA 检测变异原理

(2) 特异性扩增子多态性 (Specific Amplification Polymorphism, SAP)

RFLP 技术成本高,实验步骤多,周期长; RAPD 标记稳定性较差,不利于育种中应用. 在用 RFLP 和 RAPD 分析找到多态性 DNA 片段以后,将它们转化为特异性扩增子多态性 (Specific Amplification Polymorphism, SAP) 或称序标位 (Sequence Tagged Sites, STS) 可以解决这些缺点^[80]. 主要包括以下两种:

① 酶切扩增多态性序列 (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, CAP). 将 RFLP 探针的两端测序,合成 22-mer 引物进行 PCR 扩增,扩增产物往往无多态性,需用内切酶酶解产物,产生多态性;

② 序列特异性扩增区 (Sequence-Characterized Amplified Region, SCAR) 和位点特异相关引物 (Allele-Specific Associated Primers, ASAP) 对 RAPD、AFLP 片段两端测序,根据 DNA 序列,合成 24-mer 双引物进行 PCR 扩增^[81]. SCAR、SCAP 可降低成本,操作简便,稳定性强,对仪器要求低,易于

5.2 基于 PCR 技术的分子标记

(1) 随机扩增片段长度多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)

实现自动化分析,适合于大样本的快速分析。

(3) 简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR)

简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR) 或称微卫星 DNA (Microsatellite Repeat)、简单串联重复序列 (Short Tandem Repeat Polymorphism, STRP)。在真核生物中,存在许多 2~5bp 简单重复序列,称为“微卫星 DNA”。其两端的序列高度保守,可设计双引物进行 PCR 扩增,揭示其多态性^[82]。

(4) 扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP), 又称选择性限制片段扩增 (Selective Restriction Fragment Amplification)。先将 DNA 用内切酶酶解,然后接上接头,根据接头的序列和酶切位点设计引物,然后进行特异性 PCR 扩增^[83]。扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,可产生数量丰富的带型标记,分辨率高,是一种十分理想和高效的遗传标记。图 25 为 AFLP 的银染检测结果。

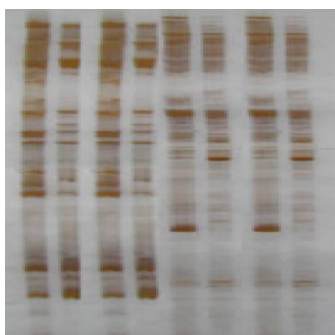


图 25 AFLP 的银染检测结果

6 结 论

本文主要介绍了 DNA 计算中的一项关键技术——DNA 分子的固定技术及其在 DNA 计算中的应用,文中引入了 DNA 分子固定系统的概念,全面阐述了 DNA 分子的固定技术。可以看出,在 DNA 计算问题中,探针 DNA 分子固定的稳定性是影响与靶 DNA 分子杂交效率的重要因素,确保在杂交、洗涤和分析的过程中不发生与支持物表面的分离,能够极大地提高解的检测的灵敏度。尤其对反复使用的支持物表面,其使用寿命将受到 DNA 漏失的影响。随着 DNA 固定技术的不断发展,高密度和高效率固定化将成为目标,使其在 DNA 计算

中的应用日趋成熟,进一步提高 DNA 计算的有效性和检测的灵敏度。

参 考 文 献

- [1] Xu Jin, Wang Shu-Dong, Pan Lin-Qiang. DNA Computing: A New Computing Pattern. Beijing: Tsinghua University Press, 2004 (in Chinese)
(许进, 王淑栋, 潘林强. DNA 计算: 一种新的计算模式. 北京: 清华大学出版社, 2004)
- [2] Liu Xi-Kui. The study on coding and some optimization models of DNA computing and genetic algorithms. Department of Control Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 2003 (in Chinese)
(刘西奎. DNA 编码优化与遗传算法应用研究. 华中科技大学控制科学与工程系, 武汉, 2003)
- [3] Zhang Kai, Pan Linqiang, Xu Jin. A global heuristically search algorithm for DNA encoding, pre-proceedings of BIC-TA 2006 (Masami Hagiya, ed.), Wuhan, China, September 2006: 20-29
- [4] Fang Gang. The research on DNA computing based on triple-stranded DNA structure and piezoelectric genosensor [Ph. D. dissertation]. Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 2006: 2-9 (in Chinese)
(方刚. 基于三链核酸与压电基因传感器 DNA 计算研究与探索. 华中科技大学, 武汉, 2006: 2-9)
- [5] Xu Jin, Tan Gang-Jun. DNA computer principle, advances and difficulties (IV): On the models of DNA computer. Chinese Journal of Computers, 2007, 30(6): 881-893 (in Chinese)
(许进, 谭钢军. DNA 计算机: 原理、进展及难点 (IV): 论 DNA 计算模型. 计算机学报, 2007, 30(6): 881-893)
- [6] Adleman L. Molecular computation of solution to combinatorial problems. Science, 1994, 66(11): 1021-1024
- [7] Braich Ravinderjit S, Chelyapov Nickolas, Johnson Cliff et al. Solution of a 20-variable 3-SAT problem on a DNA computer. Science, 2002, 296(19): 499-502
- [8] Liu Y C, Xu J, Pan L Q et al. DNA solution of a graph coloring problem. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 2002, 42(3): 524-528
- [9] Liu Qinghua, Wang Liman, Frutos Anthony G et al. DNA computing on surfaces. Nature, 2000, 403(13): 175-179
- [10] Clark L C Jr, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Annals of the New York Academy of Sciences, 1962, 10(102): 29-45
- [11] Updike S J, Hicks G P. The enzyme electrode. Nature, 1967, 214(5092): 986-988
- [12] Guilbault G G. Analytical uses of immobilized enzymes. 1972
- [13] Yao Shou-Zhou. Chemical and Biological Sensors. Beijing: Chemical Industry Press, 2006 (in Chinese)
(姚守拙. 化学与生物传感器. 北京: 化学工业出版社, 2006)

- [14] Zhang Xian-En. *Biological Sensors*. Beijing: Chemical Industry Press, 2006; 51-52(in Chinese)
(张先恩. 生物传感器. 北京: 化学工业出版社, 2006; 51-52)
- [15] Liu Sheng-Hui, He Ping-Gang. Immobilization of single stranded deoxyribonucleic acid onto graphite electrodes. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1999, 27(2): 130-134 (in Chinese)
(刘盛辉, 何平刚. 单链脱氧核糖核酸在石墨电极表面固定化的研究. 分析化学, 1999, 27(2): 130-134)
- [16] Zheng Sai-Jing, Lin Xiang-Qin. A new method for surface modification of paraffin impregnated graphite electrode for DNA immobilization and hybridization. *Acta Chimica Sinica*, 2002, 60(10): 1828-1833(in Chinese)
(郑赛晶, 林祥钦. 石墨电极固载 DNA 的一种新修饰方式. 化学学报, 2002, 60(10): 1828-1833)
- [17] Huang Hai-Zhen, Yang Xiu-Rong. Progress in deoxyribonucleic acid electroanalysis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2002, 30(4): 491-497(in Chinese)
(黄海珍, 杨秀荣. 脱氧核糖核酸电分析化学研究进展. 分析化学, 2002, 30(4): 491-497)
- [18] Jiang Zhong-Hua, Zhang Jin-Hui. *The Application of Biomolecules Immobilization*. Beijing: Chemical Industry Press, 1998(in Chinese)
(蒋中华, 张津辉. 生物分子固定化技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 1998)
- [19] Xu Jin, Zhang She-Min, Fan Yue-Ke, Guo Yang-An. DNA computer principle, advances and difficulties (III): The structure and character of "Data" in DNA computing. *Chinese Journal of Computers*, 2007, 30(6): 869-880(in Chinese)
(许进, 张社民, 范月科, 郭养安. DNA 计算机原理、进展及难点(III): 分子生物计算中的数据结构与特性. 计算机学报, 2007, 30(6): 869-880)
- [20] Mallinson J C. *The foundations of Magnetic Recording*. Academic Berkeley, 1987
- [21] Sambrook J, Russell D W. Huang Pei-Tang translated. *Molecular Cloning*. 3rd Edition. Beijing: Science Press, 2002(in Chinese)
(萨姆布鲁 J, 拉塞尔 D W 著, 黄培堂译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002)
- [22] Han F C, Luo J, Guo H F et al. Reusable immunomagnetic beads in an enzyme immunoassay. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23(8): 1041-1045
- [23] Liu Xiang-Rong, Liu Wei-Bin, Xu Jin. DNA sticker algorithm for vertex-coloring problems of graph. *Systems Engineering and Electronics*, 2005, 27(3): 568-572(in Chinese)
(刘向荣, 刘文斌, 许进. 图顶点着色问题的 DNA 粘帖算法. 系统工程与电子技术, 2005, 27(3): 568-572)
- [24] Sebastien Dubus, Jean Francois Gravel et al. PCR-free DNA detection using a magnetic bead-supported polymeric transducer and microelectromagnetic traps. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(13): 4457-4464
- [25] Wu Nai-Hu. *Principles of Gene Engineering*. 2nd Edition. Beijing: Science Press, 2002(in Chinese)
(吴乃虎. 基因工程原理. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002)
- [26] Muller-Schulte D, Fussl F, Lueken H et al. In *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*. New York and London: Plenum Press, 1997; 516-519
- [27] Zhou Zhi-Gang. *Ferrite Magnetism Materials*. Beijing: Science Press, 1981; 22-24(in Chinese)
(周志刚. 铁氧体磁性材料. 北京: 科学出版社, 1981; 22-24)
- [28] Ramadan Qasem, Samper Victor, Poenar Daniel, Yu Chen. Magnetic-based microfluidic platform for biomolecular separation. *Biomedical Microdevices*, 2006, 8(2): 151-158
- [29] De Palma Randy, Gunter Reekmans, Liu Chengxun et al. Magnetic bead sensing platform for the detection of proteins. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(22): 8669-8677
- [30] Palecek Emil, Fojta Miroslav. Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing. Elsevier, 2007, 74(3): 276-290
- [31] Berti Francesca, Laschi Serena, Rossier Joel S et al. Microfluidic-based electrochemical genosensor coupled to magnetic beads for hybridization detection. Elsevier, 2009, 77(3): 971-978
- [32] Xu Jin, Qiang Xiao-Li, Fang Gang, Zhou Kang. A DNA computing model for the graph coloring problem. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(4): 480-487(in Chinese)
(许进, 强小利, 方刚, 周康. 一种图顶点着色 DNA 计算机模型. 科学通报, 2006, 51(4): 480-487)
- [33] Lu Sheng-Dong. *Current Protocols for Molecular Biology*. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999(in Chinese)
(卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999)
- [34] Arakawa Hidetoshi, Nakashiro Shuji, Maeda Masako et al. Analysis of single-strand polymorphism by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1996, 722: 359-368
- [35] Righetti Pier Giorgio, Gelfi Cecilia. Capillary electrophoresis of DNA for molecular diagnostics. *Electrophoresis*, 1997, 18(10): 1709-1714
- [36] Mitchelson Keith R, Cheng Jing, Kricka Larry J. The use of capillary electrophoreses for point-mutation screening. *Tibtech*, 1997, 15(11): 448-458
- [37] Peterson A W, Wolf L K, Georgiadis R M. Hybridization of mismatched or partially matched DNA at surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(49): 14601-14607
- [38] Braich R S, Johnson C, Rothemund P W K et al. Solution of a satisfiability problem on a gel-based DNA computer//Lecture Notes in Computer Science 2054. Springer, 2001: 27-42
- [39] Lin D C, Yurke B, Langrana N A. Mechanical properties of a reversible, DNA-crosslinked polyacrylamide hydrogel. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2004, 126(1): 104-111

- [40] Kenney M, Ray S, Boles T. Mutation typing using Acrydite™ modified oligonucleotide probes. *BioTechniques*, 1998, 25(3): 516-521
- [41] Khrapko R, Lysov Y, Khorlin A. A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix. *DNA Sequence. Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 1991, 1(6): 375-388
- [42] Devor Eric J, Behlke Mark A. Strategies for attaching oligonucleotides to solid supports. *Integrated DNA Technologies*, 2005: 1-24
- [43] Rehman F N, Audeh M, Abrams E S et al. Immobilization of acrylamide-modified oligonucleotides by co-polymerization. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(2): 649-655
- [44] Baum E B. DNA sequences useful for computation//Proceedings of the 2nd DIMACS Workshop on DNA Based Computers, 2000, 19: 54-73
- [45] Southem E, Mir K, Shchepinov M. Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics*, 1999, 21(Supplement): 5-9
- [46] Cheung V G, Morley M, Aguilar F et al. Making and reading microarrays. *Nature Genetics*, 1999, 21(Supplement): 15-19
- [47] Larson L, Hougaard D M. One approach to immobilize DNA by activation with glutaraldehyde. *Histochemistry*, 1994, 101(5): 325-331
- [48] Guo A, Cuilfoyle R A, Wang R et al. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(24): 5456-5465
- [49] Joos B, Kuster H, Cone R. Covalent attachment of hybridizable oligonucleotides to glass supports. *Analytical Biochemistry*, 1997, 247(1): 96-101
- [50] Chrisey L A, Lee C U, O'ferrall C E. Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(15): 3031-3039
- [51] Henke L, Piuanno P A E, McClure A C et al. Covalent immobilization of single-stranded DNA onto optical fibers using various linkers. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 344(3): 201-213
- [52] Herne T M, Tarlov M J. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119(38): 8916-8920
- [53] Kamisetty Nagendra Kumar, Pack Seung Pil, Nonogawa Mitsuru et al. Stabilization of immobilized linkers and DNA probes for DNA microarray fabrication by end-capping of the remaining unreacted silanol on the glass. *Journal of Biotechnology*, 2009, 140(3-4): 242-245
- [54] Zhao Xiao-Dong, Nampalli S, Serino A H et al. Immobilization of oligodeoxyribonucleotides with multiple anchors to microchips. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(4): 4955-4959
- [55] Dupont-Filliard A, Billon M, Livache T, Guillerez S. Biotin/avidin system for the generation of fully renewable DNA sensor based on biotinylated polypyrrole film. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 515(2): 271-277
- [56] Wilchek M, Bayer E A. Introduction to avidin-biotin technology. *Methods Enzymol*, 1990, 184: 5-13
- [57] Diamandis E P, Christopoulos T K. The biotin-avidin system: Principles and applications in biotechnology. *Clinical Chemistry*, 1991, 37(4): 625-636
- [58] Pang D W, Zhang M, Wang Z L et al. Modification of glassy carbon and gold electrodes with DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1996, 403(1): 183-188
- [59] Wang J, Palecek E, Nielsen P E et al. Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118(33): 7667-7670
- [60] Li Z, Wang H D, Dong S J et al. Electrochemical investigation of DNA adsorbed on conducting polymer modified electrode. *Analytical Sciences*, 1997, 13(Supplement): 305-310
- [61] Xu C, Cai H, Hegg et al. Electrochemical detection of sequence-specific DNA using a DNA probe labeled with aminoferrocene and chitosan modified electrode immobilized with ssDNA. *Analyst*, 2001, 126(1): 62-65
- [62] Deaton R, Franceschetti D R, Garzon M, Rose J A, Murphy R C, Stevens Jr S E. Information transfer through hybridization reactions in DNA based computing//Proceedings of the 2nd Annual Conference, 1997: 463-471
- [63] Cosnier S, Galland B, Gondran C, Le Pellec A. Electrogeneration of biotinylated functionalized polypyrroles for the simple immobilization of enzymes. *Electroanalysis*, 1998, 10(12): 808-813
- [64] Koch Jorn E, Kolvraa Steen, Petersen Kirsten B, Niels Gregeren et al. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma*, 1989, 98(4): 259-265
- [65] Garbassi F, Morra M, Occhiello E. Polymer surface from physics to technology, Wiley, Chichester, 1994: 108-116
- [66] Fodor S P A. DNA sequencing massively parallel genomics. *Science*, 1997, 277: 393-395
- [67] Taton Kristin S, Guire Patrick E. Photoreactive self-assembling polyethers for biomedical coatings. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 24(2): 123
- [68] Guidelli Rolando, Becucci Lucia, Dolfi Andrea et al. Some bioelectrochemical applications of self-assembled films on mercury. *Solid State Ionics*, 2002, 150(1-2): 13
- [69] Wang Hai-Qiao, Wen Fang-Dai, Li Xiao-Yu. Self-assembly technique and its application in fabricating PLED devices. *Chinese Polymer Bulletin*, 2006, 4: 35-41(in Chinese)
(王海侨, 文芳岱, 李效玉. 分子自组装技术及其在发光器件制备上的应用. *高分子通报*, 2006, 4: 35-41)
- [70] Fang Cheng, Zhou Xin-Yao. The development of self-assembled monolayer and its application as sensor. *Journal of Analytical Science*, 2003, 19(1): 81-85(in Chinese)
(方程, 周性尧. 自组装膜研究进展及其在传感器技术中的应用. *分析科学学报*, 2003, 19(1): 81-85)
- [71] Xu Jin, Zhang Lei. DNA computer principle, advances and difficulties (I): Biological computing system and its applications to graph theory. *Chinese Journal of Computers*, 2003, 26(1): 1-11(in Chinese)

(许进, 张雷. DNA 计算机原理、进展及难点(D): 生物计算系统及其在图论中的应用. 计算机学报, 2003, 26(1): 1-11)

- [72] Sax Karl. The association of size difference with seed-coat pattern and pigmentation in *phaseolus vulgaris*. *Genetics*, 1923, 8(6): 552-560
- [73] Corander J, Marttinen P. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Molecular Ecology*, 2006, 11(6): 354-357
- [74] Schlotterer Christian. The evolution of molecular markers — Just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 2004, 5(1): 63-69
- [75] Rossi Pierre, Gillet Francois, Rohrbach Emmanuelle et al. Statistical assessment of the variability of the T-RFLP analysis applied to complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 10(22): 135-144
- [76] Barros P, Blanco M G, Boan F et al. Evolution of a complex minisatellite DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, 49(2): 488-494
- [77] Wallam J G K, Kubelik A R, Livak K J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6531-6535
- [78] Cooke David E L, Forster John W, Jenkins Peter D et al. Analysis of intraspecific and interspecific variation in the

genus *alternaria* by the use of RAPD-PCR. *Annals of Applied Biology*, 2008, 132(2): 197-209

- [79] Oakey H J, Ellis J T, Gibson L F. Differentiation of *Aeromonas* genospecies using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 80(4): 402-410
- [80] Williams John G K, Kubelik Anne R, Livak Kenneth J et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6531-6535
- [81] Xu Jin, Huang Bu-Yi. DNA computer principle, advances and difficulties(II): Setting up the database of DNA computer by the synthesis of DNA molecules. *Chinese Journal of Computers*, 2005, 28(10): 1583-1591(in Chinese)
(许进, 黄布毅. DNA 计算机: 原理、进展及难点(II): 计算机“数据库”的形成——DNA 分子的合成问题. 计算机学报, 2005, 28(10): 1583-1591)
- [82] Song Q J, Shi J R, Singh S et al. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 110(3): 550-560
- [83] Vuylsteke Marnik, Peleman Johan D, Michiel J T et al. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nature Protocols*, 2007, 2: 1399-1413



XU Jin, born in 1959, professor, Ph. D. supervisor. His research interests include DNA computing and DNA computer, neural networks, genetic algorithms, graph theory etc.

LI Fei, born in 1983, Ph. D.. Her research interests include DNA computer and detection technology of DNA sensor etc.

Background

Immobilization of DNA molecule is to immobilize DNA molecules on the substrates. It is often used to detect and analyze DNA molecule, purification or gene sequencing. In the process of DNA computing, DNA molecules are often needed to be immobilized on the surface of tube, gel, glass or other substrates in order to be detected accurately. With the development of bio-sensor recently, more and more DNA computing methods based on DNA sensor are presented, and immobilization of DNA molecule is also an essential technology of DNA sensor. In addition, immobilization of DNA molecule is not only a basic tool of biological computation, but also the foundation of the whole Genetic Engineering and bio-chip, even some disease treatment.

This research is supported by National Natural Science Foundation of China (60910002, 60974112, 60971085,

30970969), the National High Technology Research and Development Program (863 Program) (2009AA012413), Ph. D. Programs Foundation of Ministry of Education of China (20070001020), and Postdoctoral Science Foundation of China (No. 20080440257). The projects mainly focus on DNA computer models for processing graphical messages, including encoding DNA sequences, synthesizing DNA molecules, setting up the model, detecting solutions, etc. The research group has been working on many aspects of DNA computing since 1996. They have published a monograph and more than 100 papers on DNA computing. In this paper, immobilization technology of DNA molecule and its application are introduced in detail, this technology is an important factor which affects the efficiency and accuracy of DNA computing.