

# DNA 计算中荧光技术的应用及其发展

张 成 杨 静 王淑栋

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

**摘 要** DNA 计算作为前沿科学研究的重点和热点,已经从简单发展为复杂,从理论转化为应用.在这一过程中,反应速度快、变化灵敏的荧光标记技术发挥了重要的作用.文中围绕 DNA 计算和荧光标记技术两个方面进行说明.一方面,对近年来 DNA 计算中荧光技术的应用进行了总结:(1)荧光标记的表面计算;(2)与某些酶切技术相结合的荧光检测;(3)与 DNA 链置换相结合的荧光技术;(4)与基因沉默技术相结合的荧光 DNA 逻辑门;(5)与 DNA 自组装立体结构相结合的荧光技术;(6)与 DNA 变构相结合的荧光技术.另一方面,介绍了几种近年来发展起来的新型荧光技术:(1)荧光信号识别放大技术;(2)与磁珠技术相结合的荧光技术;(3)与 PH 值变化相结合的 DNA 荧光技术;(4)与 miRNAs 检测相结合的荧光技术.在今后的研究中,只有将这两者紧密结合,才能发挥 DNA 计算天然的优势.

**关键词** DNA 计算;荧光标记技术;纳米技术;DNA 分子;杂交

**中图法分类号** TP301 **DOI 号**: 10.3724/SP.J.1016.2009.02300

## Development and Application of Fluorescence Technology in DNA Computing

ZHANG Cheng YANG Jing WANG Shu-Dong

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

**Abstract** DNA computing, as a focus of scientific fields, has developed from simple to complex, from theory to application. In this course, the fluorescence, which can be handled easily and has a sensitive respond, plays an important role. This paper pays more attentions to DNA computing and fluorescence. On one hand, major applications of fluorescence in DNA computing are summed up. There are several aspects: (1) surface computing labeled by fluorescence. (2) The fluorescence detecting combined with enzyme cutting. (3) The fluorescence technology used in DNA hybridization and releasing. (4) The fluorescence logical gate based on RNAi. At first, the expression of fluorescence proteins is controlled by RNAi. (5) The fluorescence technology used in DNA self-assembly. (6) The fluorescence technology based on DNA transforming. On the other hand, several novel methods of fluorescence are introduced as following: (1) Signal amplification of fluorescence molecular beacons. (2) The fluorescence technology associated with magnetic beads. (3) The fluorescence technology changing with PH. (4) Detecting miRNAs with fluorescence technology. Only combine these two aspects into whole, most of the advantages of DNA computing can be taken used entirely.

**Keywords** DNA computing; fluorescence labeling; nanotechnology; DNA molecule; hybridization

# 1 引言

DNA 由于其具有的特性,在大自然的进化中,被选择为稳定的遗传物质.在细胞中,DNA 精细地编码并控制着整个细胞的新陈代谢.另一方面,DNA 分子容易构成二级甚至三级结构.因此,DNA 作为计算工具有着得天独厚的优势<sup>[1-2]</sup>.近年来,DNA 计算领域发展迅速,尤其在 DNA 分子自组装、DNA 纳米装置等方面<sup>[3]</sup>.然而伴随着 DNA 计算解决问题的规模增大和形式多样化、求解过程中 DNA 分子数量急剧增加以及 DNA 分子结构复杂性的加大、求解过程中实验过程繁琐且存在误差,使得 DNA 计算中解的标记和检测变得更加困难<sup>[4]</sup>.为了解决这一难题,荧光技术在 DNA 计算中逐渐得到了广泛的应用.荧光是指某些物质受到某种波长的光激发后,其原子中的电子被激发到较高能级产生的发射光.荧光物质分子都具有刚性结构和共平面的  $\pi$ - $\pi$  共轭体系.在激发态时,这种结构具有稳定性,可以持续数秒钟,从而有利于能量的转移<sup>[5]</sup>.DNA 荧光技术在生物学领域中已经有很多应用,如近年来发展起来的 DNA 荧光标记、real-time 检测技术、分子信标技术等.荧光标记 DNA 简单便捷,可以实时检测,而且灵敏度非常高,这些特点都使得其在 DNA 计算中具有广泛的应用前景.

目前,结合荧光技术的 DNA 计算已经成为前沿研究热点.荧光技术在 DNA 计算中的应用主要有如下几类:(1) 荧光标记的表面计算:通过 DNA 固定化和杂交技术,在固相表面通过荧光标记进行计算.(2) 与某些酶切技术相结合的荧光检测:利用特定酶与 DNA 分子的特性,通过检测酶切后荧光量进行计算.(3) 与 DNA 链置换相结合的荧光技术:巧妙利用 DNA 分子的三链甚至多链结构,通过

加入引发链,来释放另一 DNA 链.(4) 与基因沉默技术相结合的荧光 DNA 逻辑门:利用 RNAi 技术控制表达荧光蛋白,从而构建了多重逻辑门.(5) 与 DNA 自组装立体结构相结合的荧光技术:在 DNA 自组装结构的基础上,结合了荧光标记技术.(6) 与 DNA 变构相结合的荧光技术:通过 DNA 分子的不同状态,构建了可控的荧光纳米装置.

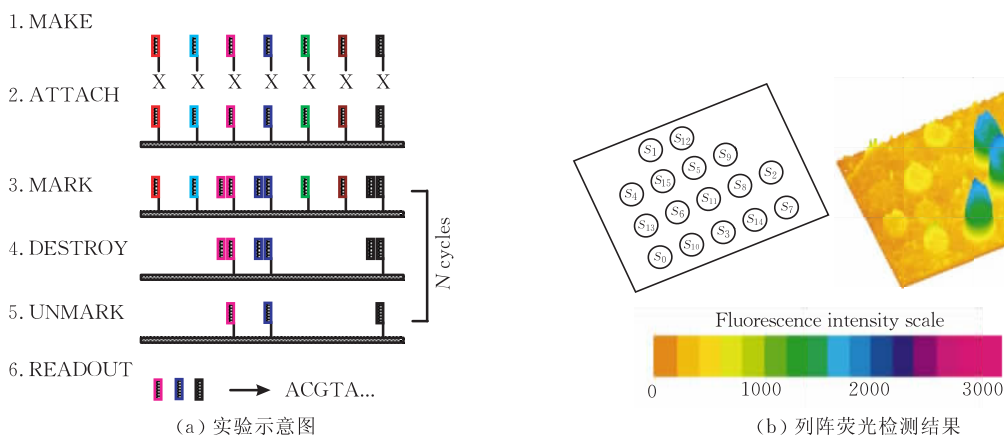
近年来,荧光技术不仅应用于生物学本身,而且在 DNA 计算、信息学等诸多领域具有很大的应用潜力.下面有几种近年来发展起来的新型荧光技术:(1) 荧光信号识别放大技术.(2) 与磁珠技术相结合的荧光技术.(3) 与 PH 值变化相结合的 DNA 荧光技术.(4) 与 miRNAs 检测相结合的荧光技术.相信随着 DNA 计算和荧光技术的发展,这两者必将紧密结合,使得 DNA 计算的种类和方法更加多样和成熟.

## 2 DNA 计算中荧光技术的应用

### 2.1 荧光标记的表面计算

DNA 表面计算其基本原理是:通过 DNA 固定化和杂交技术,将代表所有可能存在解的不同 DNA 序列固定在固相表面,然后通过多次的杂交以及降解过程来筛选正解.通过荧光标记可以检测每次和最终计算的结果.2002 年,Adleman 组使用杂交池完成了一个 20 个变量的 3 可满足性问题<sup>[6]</sup>.2004 年 Su 等在 2000 年 Liu<sup>[7]</sup>的工作基础上,设计了一种通用型的 DNA 表面计算模型<sup>[8]</sup>.同年,Schmidt 等利用单分子杂交荧光标记技术 4 个变量的可满足性问题<sup>[9]</sup>.

下面以 2000 年,Liu 等发表在《Nature》上的 DNA 表面计算经典实验为例,说明其解决 SAT 问题的过程<sup>[7]</sup>.由于该问题共有 16 种可能性,故将代



表着不同可能解的 DNA 片段固定在固相表面. 在每一次的杂交筛选过程中, 加入与固定 DNA 链特异性互补的 DNA. 那么, 被杂交的固定 DNA 链变为双链, 而未互补的单链 DNA 则被核酸外切酶 I 降解. 通过数次操作, 存在于固相表面的 DNA 链就是每次经杂交而保留下来的 DNA 链, 也就是代表正解的 DNA 链. 该实验中, 荧光技术主要应用在解检测的过程中: 使用一条生物素标记的引物和另一条荧光标记的引物, 以固相表面所有可能解的 DNA 片段为模版, 进行 PCR. 利用磁珠将 PCR 双链产物吸附, 再分离双链, 分离出荧光标记的 ssDNA. 将这些 ssDNA 与经过多次杂交筛选的固相杂交, 只有那些存留在固相表面的 DNA 链可以杂交上, 于是特定的位置就可以检测到较高荧光强度.

## 2.2 与某些酶切技术相结合的荧光检测

利用酶与 DNA 分子的特性, 通过检测酶切后荧光量进行计算. 其实就是利用某些酶与 DNA 分子空间结构的相互作用, 再结合荧光技术来共同实现的. 这种方法具有灵敏度高、反应速度快等特点. 其最大的优点就是巧妙地将酶的生物特性与计算问题相结合, 极大地丰富了 DNA 计算的手段.

2001 年, Wang 等在上述表面计算实验的基础上对解的检测又进行了新的改进, 即将酶切和荧光技术相结合<sup>[10]</sup>. 通过上述核酸外切酶的方法, 利用新技术完成单链 DNA 的解的检测. 其基本思想如下: 左侧 DNA 探针的 3' 端至少和右侧杂交的 DNA 探针有一个碱基的重合, 并使得右侧探针有 5' 端呈单链状态. 此时右侧探针由两部分组成: 一部分是和目标序列形成双链的; 另一部分则是由非互补的 5' 端 DNA 链组成 (见图 2(a)). 此时该非互补的 5' 端 DNA 臂会覆盖在上游寡核苷酸链上, 与左侧探针至少有一个重合的碱基. 恰恰在这重合的位置, 可以形成酶切位点. 因此, 非互补的 5' 端 DNA 臂可以被切割而释放.

利用这一原理, 结合荧光技术, 如图所示, 将荧光基标记在非互补 DNA 链的 5' 端, 而将荧光淬灭基标记在重合的酶切位点 3' 端方向 (见图 2(b)). 这样, 只要酶切位点被酶切, 标记有荧光基的非互补的 5' 端 DNA 链就会被释放, 从而与荧光淬灭基分离, 使得荧光释放量大大提高. 这种方法可以有效检测目的片段是否存在. 文中还将 PCR 方法检测目的片段与这种荧光检测法进行了对比, 发现该方法比 PCR 检测具有更高的灵敏度.

Stojanovic 等 2003 年研制了一种名为 MAYA

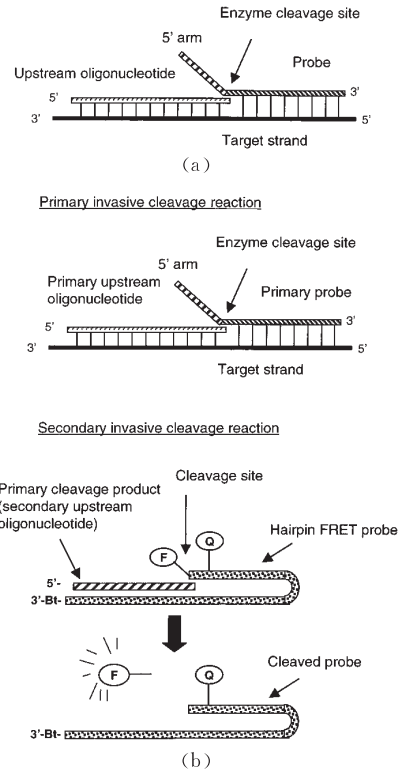


图 2 实验原理示意图

的游戏. 这是一种利用特殊的 DNA 酶 E6 (一种依赖于 DNA 的 RNA 酶) 构建起来的逻辑门<sup>[11]</sup>. 这种酶识别的 DNA 底物要求具有特殊结构 (如图 3(a) 所示). 只有当上部寡核苷酸探针与 E6 的支架区互补, 上部寡核苷酸才能被切断释放. 将寡核苷酸两端分别标记荧光淬灭基 (如罗丹明) 和荧光基, 只有寡核苷酸探针被切断释放, 荧光基才能有效激活并释放荧光. 这是 MAYA 游戏进行逻辑判断的主要检测手段. 构建有效的空间位阻是实现这个检测手段的关键. 当寡核苷酸探针的结合使绿色标记的位阻消失的时候, 加速酶切反应; 当寡核苷酸探针的结合使红色标记的位阻消失的时候, 降低酶切反应.

基于以上原理, 构建出以下几种逻辑门: YES 型、NOT 型、AND 型和 AND-AND-NOT 型. YES 型逻辑门 (图 3(b) 所示), 当  $i_1$  寡核苷酸加入时, 消除原来  $i_1$  环状结构, 从而标记的荧光探针可以与之结合, 并且被切除释放. 其判断过程为加入  $i_1$ , 荧光输出. NOT 型逻辑门 (图 3(c) 所示), 当加入  $i_6$  时, 环状结构打开, 荧光结合的寡核苷酸探针无法结合在互补区域, 于是无荧光输出. 其判断过程为加入  $i_6$ , 荧光输出停止. AND 型逻辑门 (图 3(d) 所示) 实际上是将两个 YES 型逻辑门组装在一起. 也就是说, 只有当  $i_1$  和  $i_6$  都被加入时, 才能有荧光输出. AND-AND-NOT 型逻辑门 (图 3(e)) 是更为复杂的

组合体. 必须同时加入  $i_1$  和  $i_3$ , 才能输出荧光. 然而, 只要有  $i_6$  存在, 就不会输出荧光. 文中解决的问题是在  $3 \times 3$  的棋盘完成 3 个棋子同线相连. 考察

所有的逻辑情况后, 将所有可能的逻辑门都提前置于棋盘的网格中. 再将代表棋子的寡核苷酸分别放入, 然后观察荧光输出情况进行判断.

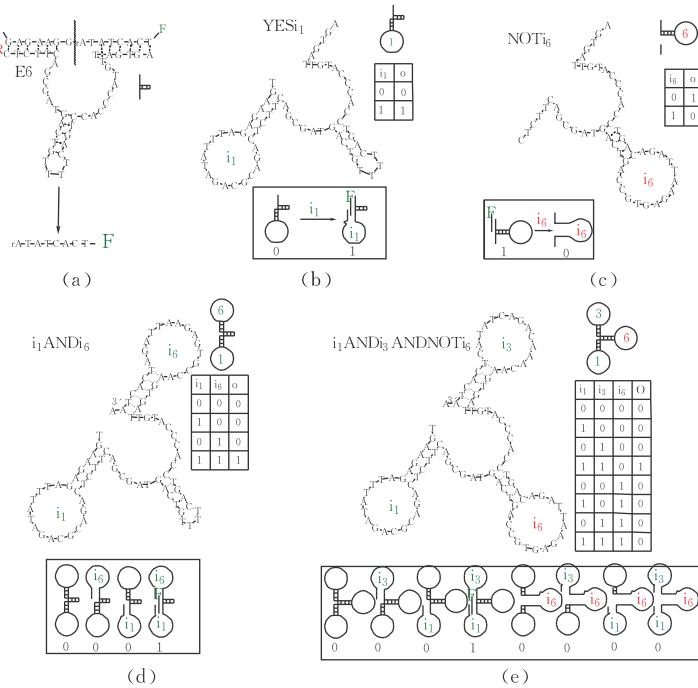


图 3 几种逻辑门的构成示意图

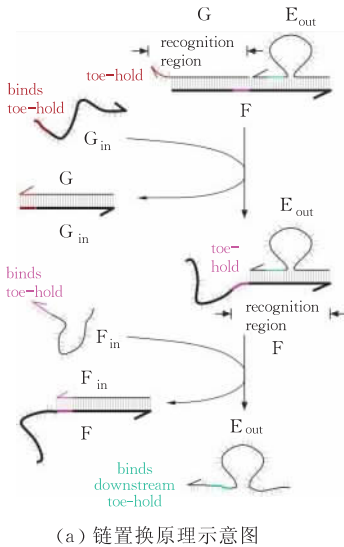
### 2.3 与 DNA 链置换相结合的荧光技术

该技术多用来构建 DNA 逻辑门. 其巧妙利用 DNA 分子的粘贴, 通过加入引发链, 来释放另一 DNA 链. 在逻辑计算中, 这种技术具有循环性、自引发性、反馈性、灵敏性和准确性等特点. 近年来在《Science》等高水平科研杂志上都发表了大量系列工作, 而且在生物检测领域具有广泛的实际应用前景. 2000 年, Yurke 构建了一种 DNA 链置换机器, 在置换过程中可以实现闭合式运动<sup>[12]</sup>. 2003 年, Turber field 等构建了一种基于 DNA 链置换的纳米机器<sup>[13]</sup>. Shin 等利用可反复的 DNA 链置换, 构建了可以反复读取和输入的三状态存储器<sup>[14]</sup>. 2006 年, Seelig 等对 DNA 链相互粘贴、置换的几种模式进行了实验<sup>[15]</sup>. 2006 年, Green 等用茎环结构实现了 DNA 链的粘贴互换<sup>[16]</sup>. 2007 年, Zhang 等实现了 DNA 链置换的循环进行<sup>[17]</sup>. 2007 年, Venkataraman 等实现了通过 DNA 链自粘贴来完成多段 DNA 聚合延伸<sup>[18]</sup>. 下面介绍两个具有代表性的工作.

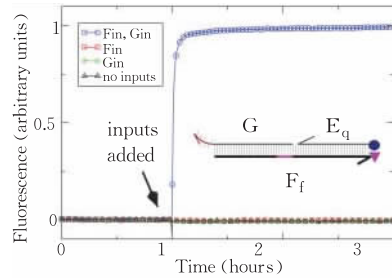
2006 年, Seelig 等报道了一种没有酶参与的 DNA 逻辑门<sup>[19]</sup>. 其基本原理如图 4(a)所示, 即先构建好由寡核苷酸链  $G$ 、 $E_{out}$ 、 $F$  共同杂交组成的 DNA 互补结构, 再加入  $G_{in}$  寡核苷酸链. 此时, 由于  $G_{in}$  一侧末端和  $G$  的一侧单链末端互补, 从而使逻辑门中

的  $G$  寡核苷酸链被释放, 与  $G_{in}$  形成互补双链. 此时的互补结构中, 只剩下了寡核苷酸链  $E_{out}$  和  $F$ . 然后再加入  $F_{in}$  寡核苷酸链,  $F_{in}$  的一侧末端与  $F$  中间有互补序列, 加之  $E_{out}$  本身形成的是单链环状的不稳定结构, 于是,  $F$  和  $F_{in}$  结合成双链.  $E_{out}$  寡核苷酸链被释放. 文中使用了荧光标记对  $E_{out}$  的释放情况进行了检测(如图 4(b)所示).  $E_q$  末端标记有荧光基, 而  $F_t$  末端标记有荧光淬灭基. 当其互补结构存在时, 荧光恰被淬灭, 从而无法检测. 但是, 当  $E_q$  和  $F_t$  分离时, 荧光就被释放出来, 从而表明 DNA 链的分离情况. 上述由  $G$ 、 $E_{out}$ 、 $F$  的 DNA 互补结构就可以构成与门. 也就是说, 只有同时加入  $G_{in}$  和  $F_{in}$ , 才能诱发释放出荧光. 值得注意的是, 文章并不只是提出这种 DNA 计算逻辑门, 而是将其应用到生物基因检测中. 在鼠脑总 RNA 中, 成功地检测了数个基因的表达情况.

2008 年, Yin 等对这种 DNA 自粘贴、链置换进行了更为精细的研究<sup>[20]</sup>. 其主要原理是利用 DNA 茎环结构的链置换. 如图 5(a)所示, 茎环结构 A 是由  $at$ 、 $a$ 、 $b$ 、 $bt$ 、 $ct$ 、 $c$  等 DNA 序列构成的, 在茎环结构末端有未互补的单链 DNA 区域. 如果加入与末端单链 DNA 互补的序列, 整个茎环结构就会打开(图中的  $at$  与  $at^*$  可以互补, 其它同理). 因此, 当体



(a) 链置换原理示意图



(b) 荧光标记原理示意图

图 4

系中只加入 A、B 这两种茎环结构时,相互之间无任何影响。但是,当体系中加入寡核苷酸链 I 后,就触发了整个循环。I 先和 A 末端互补,使得 A 的茎环结构打开。此时, A 的 Bt 区域与 B 的 Bt\* 相互作用,使得 B 的茎环打开。当 B 完全打开后, B 的 a\* 区域会与 I 竞争 A 的 a 区域形成互补结构。被置换掉的 I 就可以重新激发新的循环。

在上述基础之上, Yin 等设计了多种复杂结构的实验:直线型、回路型、支架型、自动位移型(见图 5(b))。直线型指 I 与 A、B、C 组件是逐级触发,形成串联关系。回路型指参与的激发物在循环结束后又被释放,从而再次作用于系统。并且构建了多个循环相互镶嵌的复杂体系。支架型指在整个触发过程中,不仅是线性的作用方向,而且是向二维平面的扩展。自动位移型则是用链置换实现了特定 DNA 序列的位移。在这些实验中,荧光技术发挥了重要的作用。其中主要是将荧光基标记在茎环的一端,另一端则标记有荧光淬灭基。只有茎环结构打开,才能够检测到相应的荧光。根据标记不同的荧光,可以了解整个循环的反应速度和反应程度。尤其是在自动位移型实验中,通过检测荧光,可以得知特定 DNA 序列在特定时间移动的位置。

#### 2.4 与基因沉默技术相结合的荧光 DNA 逻辑门

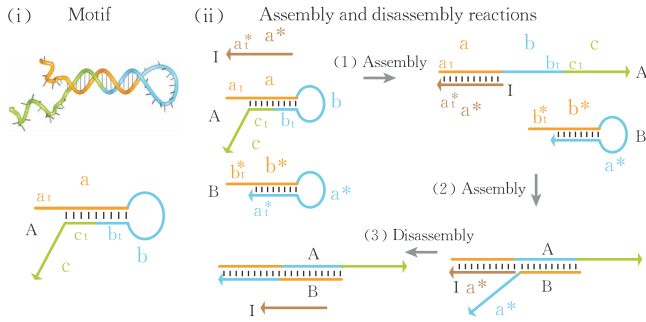
2007 年, Rinaudo 等创造性地使用活体细胞,利用 RNAi 技术,通过控制特异基因的表达,构建多重逻辑门。这种技术将 DNA 计算和基因表达、疾病诊疗有机地结合在一起,为 DNA 计算的应用指出了另一方向<sup>[21]</sup>。

RNAi 技术是近年来发展起来的特异性沉默基

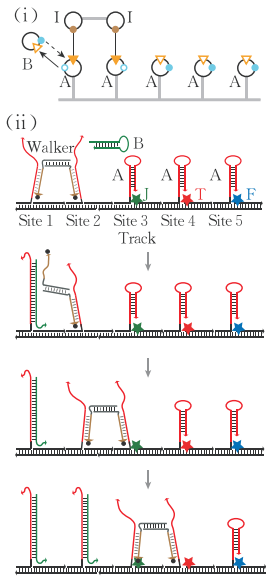
因技术,其基本原理就是将想敲除的基因序列或者部分序列构建到特定载体中,经过转录,形成部分序列的反义 RNA(还可以通过直接加入特异的反义短寡核苷酸进行基因敲除)。这些 RNA 很快就可以被酶解为小片段,并与相关的蛋白质形成复合体。于是,这种复合体就可以根据 RNA 来识别特定的 mRNA,从转录水平消除特定基因。

Rinaudo 等利用载体序列的线形串联排列以及基因表达的调控原理(非翻译区 UTR 对下游基因转录的影响),构建了多个逻辑门模型。(1)或门,如图 6(a(i))所示, mRNA1 和 mRNA2 分别与荧光蛋白基因串联。这两个 mRNA 只要有一个正常转录表达,就会有荧光蛋白输出。因此,形成了“或”的关系。(2)与门,如图 6(a(ii))所示, Target A、Target B 序列是串联分布。假设有 A、B 两种内源物分别抑制 siRNA-A 和 siRNA-B 对 Target A、B 的影响。那么只有同时加入 A、B 时,才能完全抑制 RNAi 作用,也就是说,此时荧光蛋白才能正常表达。因此 A 和 B 形成“与”的关系。(3)非门,如图 6(a(iii))所示,假设内源物 A 对 siRNA-NOT(A)有激活作用。当加入 A 后,将会抑制 Target-NOT(A)的表达,此时直接导致荧光蛋白产物的减少。将这些简单的逻辑门组合起来,就可以实现复杂的逻辑运算,如(A AND C AND E)OR(NOT(A) AND B),见图 6(a(iv))。首先确定 A、B、C、E 与各个 siRNA 之间的关系,如:加入 A 抑制 siRNA-A,促进 siRNA-NOT(A)。当 A、B、C、E 共同作用时,就可以根据基因排列的线性关系自动进行逻辑判断。

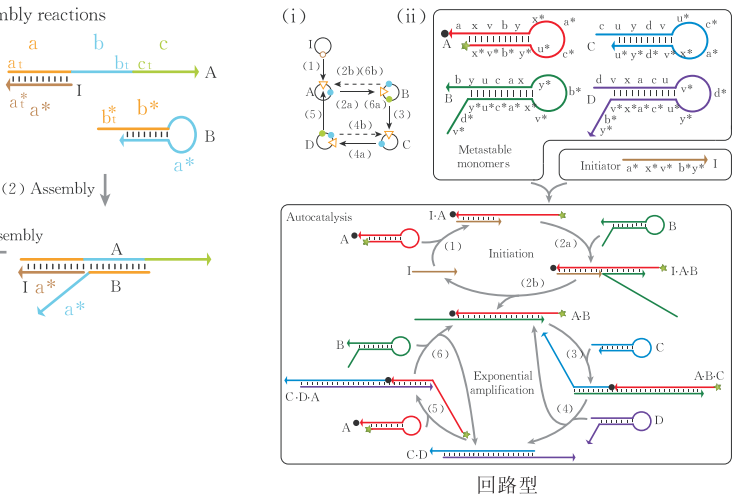
在上述一步完成的 RNAi 逻辑门的基础上,



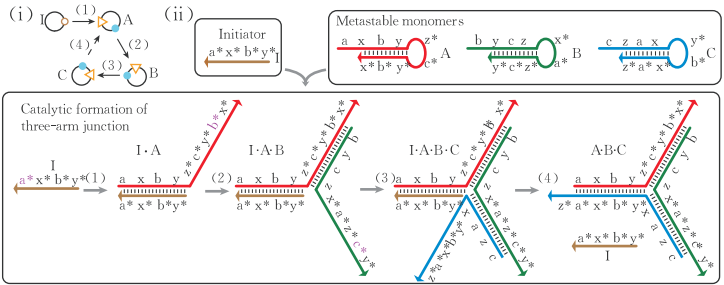
(a) 茎环结构DNA置换原理



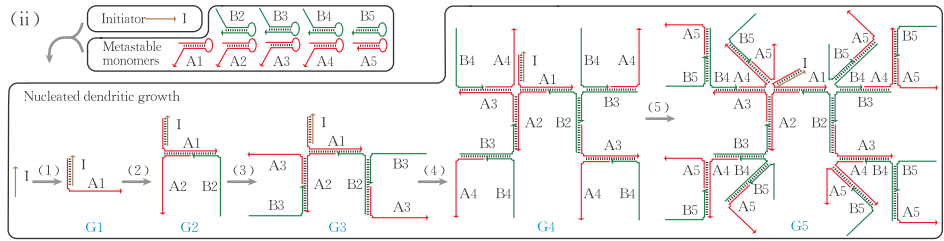
自动位移型



回路型



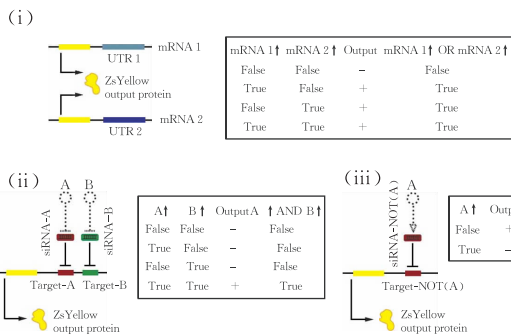
直线型



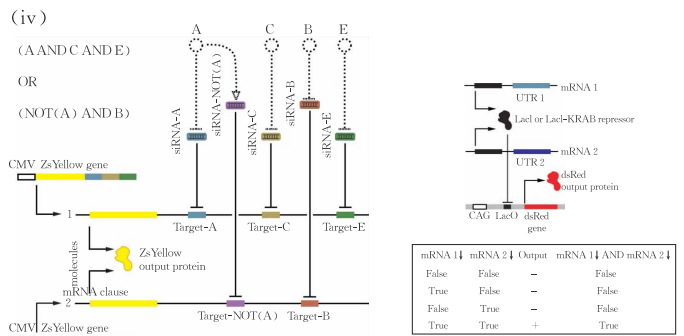
支架型

(b) 几种复杂类型: 直线型、回路型、支架型、自动位移型

图 5



(a) RNAi逻辑门示意图



(b) 二层逻辑门示意图

图 6

还构建了二层逻辑门, 所谓一步完成是指加入的 siRNA 直接发生作用, 降低荧光基因的表达, 而二层逻辑门是指首先调控一级蛋白质产物, 再由一级蛋白质来调控二级荧光蛋白基因的表达, 如图 6(b) 所示, 构建了 AND 运算逻辑门. mRNA1 和 mR-

NA2 的表达都下降才能最大限度地减少 Lac I 抑制子的表达, 从而减小 Lac I 抑制子对荧光蛋白的表达抑制. 这种多层逻辑门与细胞内的蛋白、基因调控极为相似, 因此在疾病诊疗方面有着广阔的应用前景.

## 2.5 与 DNA 自组装立体结构相结合的荧光技术

DNA 自组装是近期发展迅速的领域,也是具有应用前景的领域.其涉及编码、杂交、空间结构设计等多个方面.从自组装结构上分,自组装可分为一维线段结构、二维平面结构和三维立体结构.在 DNA 自组装结构的基础上,结合荧光标记技术,发展了很多精巧的 DNA 三维结构,如 2008 年 Goodman 等构建的四面体,其边还可以产生荧光标记的可伸缩茎环<sup>[22]</sup>.这些三维结构不仅仅包含有图像、结构信息,而且还能随着结构的变化应用于纳米技术、药物载体、DNA 计算等方面.

2008 年 Weizmann 等的工作是将 DNA 自组装和荧光技术紧密结合的一个例子<sup>[23]</sup>.首先,利用 DNA 分子互补,将两环相接触部分的 DNA 序列设计为互补,杂交后再经连接酶连接,就形成了稳定的环链结构.通过 AFM 电镜检测,也能够看到环链结构的存在.另外,将一个环状寡核苷酸固定在有金包被的 AFM 电镜感应头上,而与其有互补序列的寡

核苷酸则被固定在镀有金的玻璃板上.当杂交并且被连接后,其感应力较未被连接有了显著提高,侧面说明环套结构的存在.在此基础上,还设计了将 DNA 环分别固定在两个金微粒(1.4nm)上,然后利用内切酶进行切割分离的实验.实验结果证明,这些操作都可以在环套结构上成功实现.

除了上述电镜检测外,Weizmann 等还利用荧光技术进行了一系列实验.首先,如图 7(a(i))所示,将四甲基罗丹明标记在短寡核苷酸上,通过杂交,形成环套和多个短寡核苷酸复合物.在电镜下,可以观察到柱状荧光条带.然后,使用四甲基罗丹明标记的凝血酶,当凝血酶结合在环套的侧面时,利用 AFM 电镜就可以观察到荧光条状 DNA,并伴有多节膨大结构.同时,还对环套结构进行了类似的双荧光探针杂交,结果发现产生了荧光共振能量转移.因为只有当两个荧光基和淬灭基的距离小于 5nm 时,才会出现能量转移,因此,也说明环套结构是有序排列存在的.

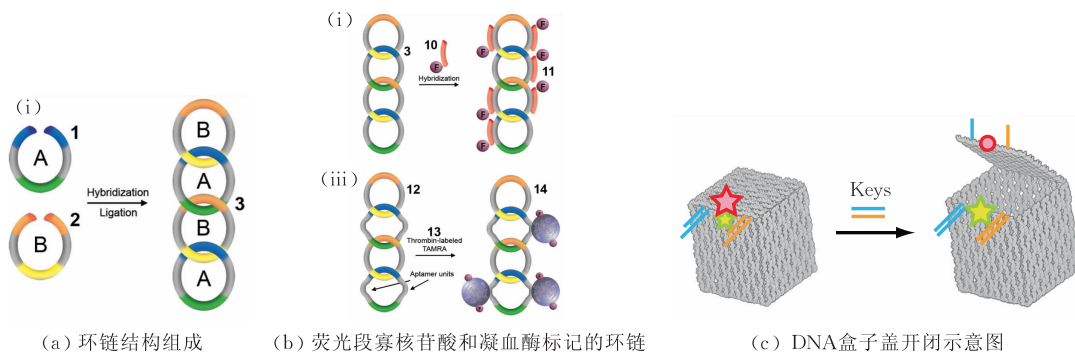


图 7

2009 年 Andersen 等巧妙地将 DNA 荧光技术应用在检测纳米装置开启和闭合<sup>[24]</sup>.为了检测 DNA 分子纳米盒子的盖子的开闭,分别在盖子和盒体上标记了 Cy3 和 Cy5 荧光染料(见图 7(c)).当加入“钥匙”DNA 链时,盒子盖打开,两个荧光分子分开.此时,Cy3 的荧光信号增加,而 Cy5 荧光信号下降.在该实验中,利用荧光信号增减可以有效地检测 DNA 纳米装置的空间变化.

## 2.6 与 DNA 变构相结合的荧光技术

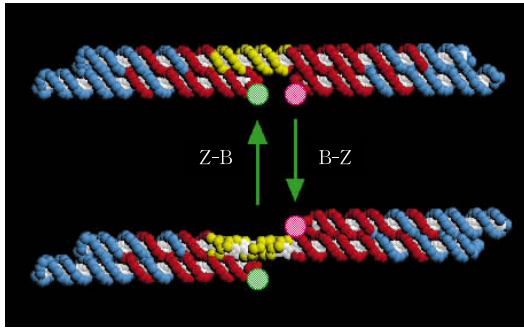
通过 DNA 分子的不同状态,构建可控的荧光纳米装置.随着 DNA 分子的变构,其荧光强度也随之变化.因此,通过检测荧光强度就可以知道 DNA 分子的构象变化.

1999 年, Mao 等构建了一种基于 DNA 分子变构的纳米装置<sup>[25]</sup>.其应用的原理就是 B、Z 型 DNA 的相互转换. B-DNA 就是我们所熟悉的右手螺旋

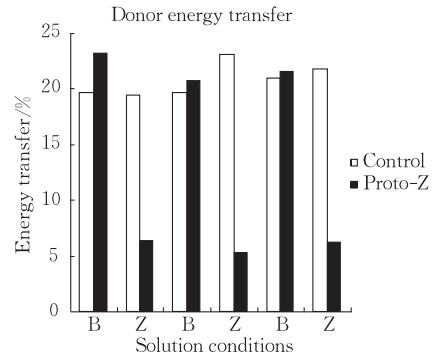
结构.但是,对于含有多个 GC 的重复序列,当离子浓度发生变化时,就会伸展为左旋结构.如图 8(a)所示的 DNA 复合结构是由三条链组成的.其中,蓝色的两条链相同.在每个连接的转折处都由 4 相连的 T 组成.在这个复合结构的中部,也就是黄色标记的序列,其中含有多个 GC 的重复序列.当改变离子浓度时,该区域就会伸展成为左旋结构.将荧光发射基和接收基固定在如下所示位置(圆点).只有当复合结构是 B-DNA 时,才能通过能量转移激发出荧光.当其为 Z-DNA 时,由于两个基团距离加大,从而无法实现能量转移.图 8(b)为 B、Z 型 DNA 转换时其能量转移的变化.

## 3 近期荧光技术的新发展

荧光技术发展速度很快,在 DNA 计算、信息



(a) DNA复合结构变构示意图



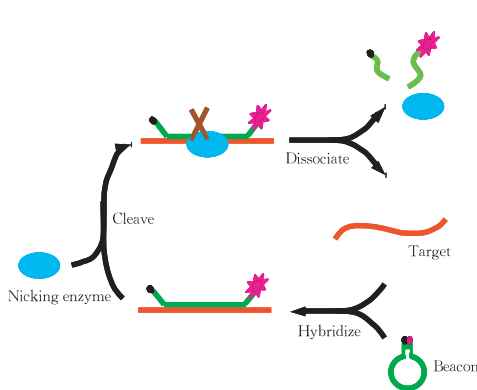
(b) DNA转换时其能量转移

图 8

学、物理学等诸多领域具有很大的应用潜力。下面介绍几种近年来发展起来的新型荧光技术, 希望能为 DNA 计算提供新的思路。(1) 荧光分子信标信号放大技术; (2) 与磁珠技术相结合的荧光技术; (3) 与 PH 值变化相结合的 DNA 荧光技术; (4) 与 miRNAs 检测相结合的荧光技术。

### 3.1 荧光分子信标信号放大技术

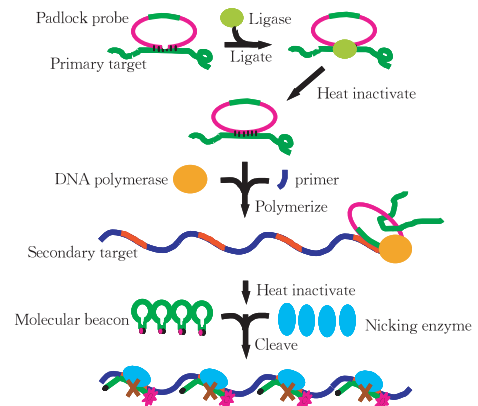
分子信标技术是目前较为成熟的技术, 尤其是在检测方面有着重要的应用。但是当检测物很少时, 分子信标产生的荧光就不足以被检测, 甚至发生错误信号。2008 年, Geiss 等报道了一种基因表达的多色荧光分析系统<sup>[26]</sup>。其中使用了固定化、探针捕捉、多色荧光标记等多种技术。2005 年, Lewis 等设计了能同时激发多种荧光的方法, 使得 DNA 检测速



(a) 荧光信号积累原理

度以及准确度都大大提高<sup>[27]</sup>。

2008 年, Li 等提高了荧光分子信标的信号强度<sup>[28]</sup>。其原理(如图 9(a)所示)就是先通过普通的分子信标杂交过程, 待分子杂交产生荧光信号后, 此时加入特异的缺刻 DNA 酶, 即将因杂交而展开的分子信标切断, 并释放。从而, 再进行新一轮分子信标杂交释放, 荧光信号就会积累增多。在此基础上, 还建立了一种加强型荧光分子信标信号放大技术(如图 9(b)所示)。首先, 与目标片断互补的单链 DNA 杂交, 再使用连接酶进行连接成环。随后, 利用 DNA 聚合酶  $\Phi 29$  以环状 DNA 为模板, 加入单引物进行 PCR。在随后扩增的线性模板上, 就含有多处目标片断。此时, 再进行上述的荧光分子信标信号放大, 就可以大大提高信号强度。



(b) 加强型荧光分子信标信号放大原理

图 9

### 3.2 与磁珠技术相结合的 DNA 检测荧光技术

磁珠技术, 使得 DNA 分子的捕捉和释放变为可能。通过 DNA 特异性杂交, 可以特异性地获取 DNA 分子。

2005 年, Xu 等就将磁珠技术与荧光技术相结合, 建立新型的 DNA 检测系统<sup>[29]</sup>。首先, 将标记生物素的 DNA1 与磁珠相结合。通过目标 DNA3, 可

以使 DNA1、2、3 相互杂交, 形成复合体。在 DNA3 上标记有荧光集团。通过磁珠分离, 将捕获的 DNA2 和目标 DNA3 洗脱。由于 DNA 分子本省带有负电荷, 于是可以与带有正电荷的水溶性聚乙烯(被标记有特殊基团)吸附。此时就会产生能量转移, 从而产生荧光, 并被检测(如图 10 所示)。

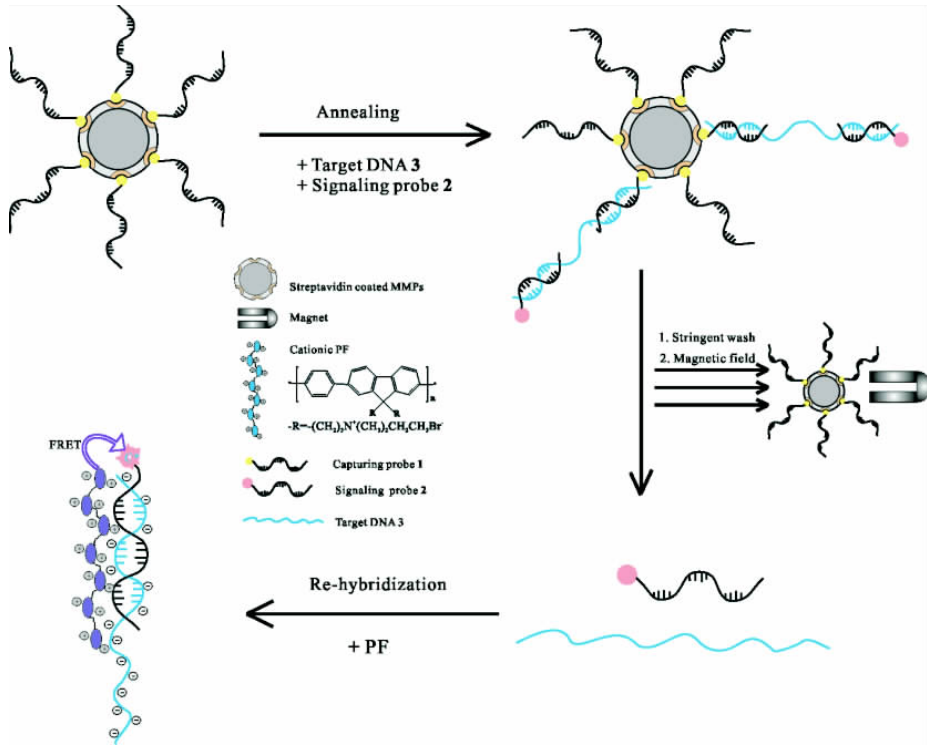


图 10 与磁珠技术相结合的 DNA 检测荧光技术原理

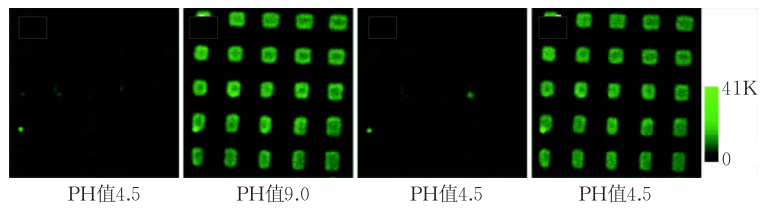
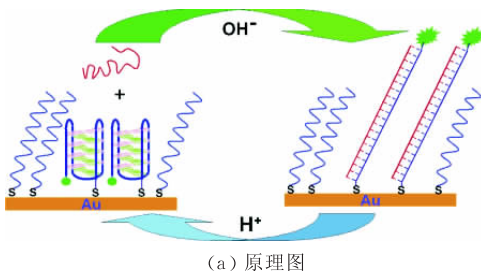
### 3.3 与 PH 值变化相结合的 DNA 荧光技术

DNA 的构象会随着 PH 值的变化而改变. 利用这一特性, 2005 年, Liu 等构建了一种随 PH 值变化的 DNA 荧光装置<sup>[30]</sup>. 整个装置是由 DNA 寡核苷酸阵列构成的. 在每个寡核苷酸的 5' 端标记有一-SH, 随后是由-CCCC-4 个胞嘧啶组成的 DNA 序列, 在 3' 端标记有若丹明绿色荧光基团. 每个 DNA 寡核苷酸被固定在金表面. 当 PH 值较低时 (4~9 之间), 有些胞嘧啶会发生质子化, 从而与其他胞嘧啶产生分子间非经典配对. 此时, 寡核苷酸链就会形成蜷缩状结构, 而不会与互补链杂交 (如图 11(a) 所示). 在这种状态下, 荧光基团非常靠近金表面 (约 1nm), 此时就不能被激发光激发. 随着 PH 值的增大, 胞嘧啶质子化程度降低, 其分子间非经典配对也随之降低. 若加入互补链, 在金表面, 展开的寡核苷酸会与互补链杂交, 使得寡核苷酸 3' 端

的荧光基团远离金表面 (约 8nm). 当有激发光激发时, 就会产生绿色荧光, 实验还证实这种荧光的变化是可逆的. 通过控制 PH 值, 可以有效地进行荧光变化.

### 3.4 与 miRNAs 检测相结合的荧光技术

miRNAs 在真核生物的调控中发挥着重要的作用. 但是 miRNAs 的含量很低, 检测起来比较困难. 结合 DNA 寡核苷酸微阵列技术、荧光技术、酶切、酶联技术, 2004 年 Nelson 等发明了一种称为 RAKE 的检测 miRNAs 的方法<sup>[31]</sup>. 首先建立寡核苷酸微阵列. 每个寡核苷酸由三部分组成: 支架序列、数个胸腺嘧啶、特异性 miRNAs 的互补序列. 将寡核苷酸链 5' 端共价连在芯片玻璃表面. 其次, 当 miRNAs 特异性杂交在寡核苷酸上时, 用核酸外切酶 I 处理, 将没有特异性杂交上 miRNAs 的寡核苷酸链降解. 此时保留下来的寡核苷酸上都杂交有



miRNAs. 与此同时,使用 DNA 聚合酶 Klenow,以 miRNAs 为引物,以保留下来的寡核苷酸链为模板,再加入共价连接有生物素的 dATP 进行扩增. 最后,加入共价连接有荧光基团的链霉霉素,使其与连接有生物素的 DNA 链结合. 通过激发荧光,保留下来的并被扩增了的寡核苷酸区域就会发出荧光. 其荧光量的多少,还能显示该 miRNAs 量的多少.

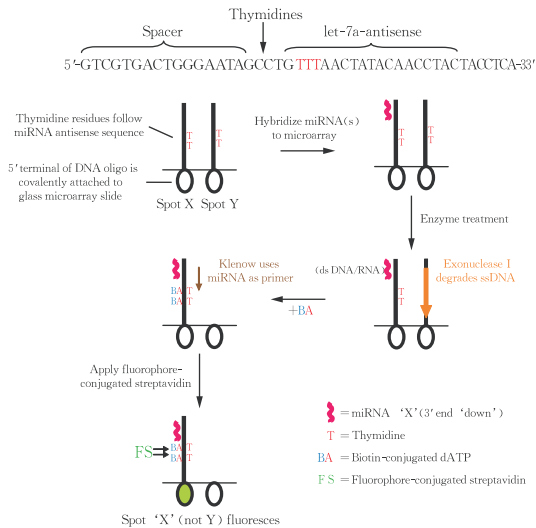


图 12 RAKE 原理示意图

## 4 展 望

在生物技术高速发展的今天,DNA 计算的研究也是日新月异. 近年来,在高水平科学研究刊物上,发表了大量 DNA 计算方面的研究成果. DNA 计算一直是世界科研领域的研究重点和热点. DNA 计算发展至今,已经从开始的实验阶段逐渐转入实用阶段;从单一型技术逐渐发展为多元化技术;从简单的结构逐渐扩增为复杂结构. 荧光技术作为一种生物技术,其发展较早,且应用广泛. 因其体积小,便于标记,反应速度快,变化灵敏,所以在核酸标记和检测方面有着得天独厚的优势.

对于 DNA 计算这种精细化、量化、复杂化的发展,荧光技术的种种特性都可以满足并适用于 DNA 计算的发展. 比如近两年,关于 DNA 链置换荧光技术的研究,这种链置换过程都属于单分子间的变化,如果使用常规生物实验手段根本无法实现. 而荧光技术的单个分子标记、荧光激发和湮灭性质及其实时超高灵敏性检测都表明其在 DNA 计算中的天然优势. 因此,荧光技术的进步必然推动 DNA 计算的发展. 同时,荧光技术在 DNA 计算的应用也拓宽了其自身应用领域. 这种跨学科、跨领域的融合

贯通是推动整个科学前进的原动力. 一方面,应该关注荧光技术与其他生物技术(如基因芯片技术、磁珠技术等)最新的发展和联系;另一方面,必须深刻地认识和了解计算科学所亟需解决的重要问题. 只有充分的将两个方面有机地结合,通过提出创造性想法,才能将 DNA 计算转变为实用、稳定的计算手段;才能发挥 DNA 计算天然的优势.

## 参 考 文 献

- [1] 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)
- [2] Yan Hao. Nucleic acid nanotechnology. Science, 2004, 306: 2048-2049
- [3] Bath Jonathan, Turberfield Andrew J. DNA nanomachines. Nature Nanotechnology, 2007, 2: 275-284
- [4] Xu Jin, Tan Gang-Jun, Fan Yue-Ke, Guo Yang-An. 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, 范月科, 郭养安. DNA 计算机原理、进展及难点(IV): 论 DNA 计算机模型. 计算机学报, 2007, 30(6): 881-893)
- [5] Huang Xiao-Feng, Zhang Yuan-Qiang, Zhang Ying-Qi. Fluorescence Probe Technology. Beijing: People's Military Medical Science, 2004(in Chinese)  
(黄晓峰, 张远强, 张英起. 荧光探针技术. 北京: 人民军医出版社, 2004)
- [6] Braich Ravinderjit S, Chelyapov Nickolas, Johnson Cliff. Solution of a 20-variable 3-SAT problem on a DNA computer. Science, 2002, 296: 499-502
- [7] Liu Qinghua, Wang Liman, Frutos Anthony G. DNA computing on surfaces. Nature, 2000, 403: 175-179
- [8] Su Xingping, Smith Lloyd M. Demonstration of a universal surface DNA computer. Nucleic Acids Research, 2004, 32(10): 3115-3123
- [9] Schmidt Kristiane A, Henkel Christiaan V, Rozenberg Grzegorz. DNA computing using single-molecule hybridization detection. Nucleic Acids Research, 2004, 32(17): 4962-4968
- [10] Wang Liman, Hall Jeff G, Lu Manchun. A DNA computing readout operation based on structure-specific cleavage. Nature Biotechnology, 2001, 19: 1053-1059
- [11] Stojanovic Millian N, Stefanovic Darko. A deoxyribozyme-based molecular automaton. Nature Biotechnology, 2003, 21: 1069-1074

- [12] Yurke Bernard, Turberfield Andrew J, Mills Jr Allen P. A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. *Nature*, 2000, 406: 605-608
- [13] Turberfield A J, Mitchell J C. DNA fuel for free-running nanomachines. *Physical Review Letters*, 2003, 90 (11): 118802-1-118802-4
- [14] Shin Jong-Shik, Pierce Niles A. Rewritable memory by controllable nanopatterning of DNA. *Nano Letters*, 2004, 4(5): 905-909
- [15] Seelig Georg, Yurke Bernard, Winfree Erik. Catalyzed relaxation of a metastable DNA Fuel. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128: 12211-12220
- [16] Green Simon J, Lubrich Daniel, Turberfield Andrew J. DNA hairpins fuel for autonomous DNA devices. *Biophysical Journal*, 2006, 91: 2966-2975
- [17] Zhang David Yu, Turberfield Andrew J, Yurke Bernard. Engineering entropy-driven reactions and networks catalyzed by DNA. *Science*, 2007, 318: 1121-1125
- [18] Venkataraman Suvir, Dirks Robert M, Rothmund Paulw K. An autonomous polymerization motor powered by DNA hybridization. *Nature Nanotechnology*, 2007, 2: 490-494
- [19] Seelig Georg, Soloveichik David, Zhang David Yu, Winfree Erik. Enzyme-free nucleic acid logic circuits. *Science*, 2006, 314: 1585-1588
- [20] Yin Peng, Choi Harry M T, Calvert Colby R. Programming biomolecular self-assembly pathways. *Nature*, 2008, 451: 318-322
- [21] Rinaudo Keller, Bleris Leonidas, Maddamsetti Rohan. A universal RNAi-based logic evaluator that operates in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(7): 795-801
- [22] Goodman Russell P, Heilemann Mike, Doose Soren. Reconfigurable, braced, three-dimensional DNA nanostructures. *Nature Biotechnology*, 2008, 3: 93-96
- [23] Weizmann Yossi, Braunschweig Adam B, Wilner Ofer I. A polycatenated DNA scaffold for the one-step assembly of hierarchical nanostructures. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2008, 105(14): 5289-5294
- [24] Andersen Ebbe S, Dong Mingdong, Nielsen Morten M, Jahn Kasper, Subramani Ramesh et al. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, 2009, 459: 73-77
- [25] Mao Cheng-De, Sun Wei-Qiong, Shen Zhi-Yong. A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA. *Nature*, 1999, 397(14): 144-146
- [26] Geiss Gary K, Bumgarner Roger E, Birditt Brian. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(3): 317-325
- [27] Lewis Ernest K, Haaland Wade C, Nguyen Freddy. Color-blind fluorescence detection for four-color DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2005, 102 (15): 5346-5351
- [28] Li Jianwei Jeffery, Chu Yizhuo, Lee Benjamin Yi-Hung. Enzymatic signal amplification of molecular beacons for sensitive DNA detection. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(6): 36
- [29] Xu Hui, Wu Haiping, Huang Fei. Magnetically assisted DNA assays high selectivity using conjugated polymers for amplified fluorescent transduction. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(9): 83
- [30] Liu Dongsheng, Bruckbauer Andreas, Abell Chris. A reversible pH-driven DNA nanoswitch array. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128: 2067-2071
- [31] Nelson Peter T, Baldwin Don A, Searce L Marie. Microarray-based high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nature Methods*, 2004, 1(2): 155-161



**ZHANG Cheng**, born in 1980, Ph. D. candidate. His research interests include DNA computer and DNA nanotechnology.

**YANG Jing**, born in 1982, Ph. D. candidate. Her research interests include DNA computer and DNA nanotechnology.

**WANG Shu-Dong**, born in 1972, professor. Her research interests include DNA computing model and combination optimize.

## Background

This research is supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 60533010, 30670540, 60874036, and 60503002), the National High Technology Research and Development Program (863 Program) (Grant No. 2006AA01Z104), the Ph. D. Programs Foundation of the Ministry of Education of China (Grant No. 20070001020), and the Postdoctoral Science Foundation of China (Grant No. 20060400344). DNA computing is a new research focus relating to computer science, engineering, biology, chemistry and mathematics. This paper introduces the applications of fluorescence in DNA computing.

DNA computing asks more accurate quality, rational steps and complicated component. Fluorescence technology can meet these requirements. As a new research focus, recently more papers about DNA computing are published in high level research journals, like science and nature. Using fluorescence, it is easier to label single molecule and detect signals. Therefore, fluorescence technology will promote the development of DNA computing. Meanwhile, fluorescence technology also enlarges its applications. Such knowledge fusion is the elementary promote in science.

# 绿色计算的重定义与若干探讨

郭 兵<sup>1)</sup> 沈 艳<sup>2)</sup> 邵子立<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>(四川大学计算机学院 成都 610065)

<sup>2)</sup>(电子科技大学机械电子工程学院 成都 610054)

<sup>3)</sup>(香港理工大学计算机系 香港)

**摘 要** 计算机系统的环境可分为人文环境和自然环境两个部分. 随着全球计算机系统大量而广泛的使用, 对环境日益产生了一些负面影响. 绿色计算(green computing)是一种以环境为中心的计算模式, 通过努力消除计算机系统的环境不友好方面, 使得计算机系统、人、社会与自然环境更加和谐, 实现节能、环保和节约的目标. 通过与绿色化学的比较研究, 作者采取了一种更加统一和抽象的方式定义绿色计算的概念, 并探讨了其主要研究内容, 从而明确了绿色计算的界限和范围, 理顺了相关领域的研究任务和关系. 然后, 提出了绿色计算的一些基本思路和一般性方法, 为下一步研究各种条件下绿色计算的具体模型、方法与工具打下了必要的基础.

**关键词** 绿色计算; 感功计算; 可持续计算; 环境相关计算

**中图法分类号** TP393 **DOI 号**: 10.3724/SP.J.1016.2009.02311

## The Redefinition and Some Discussion of Green Computing

GUO Bing<sup>1)</sup> SHEN Yan<sup>2)</sup> SHAO Zi-Li<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>(School of Computer Science & Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065)

<sup>2)</sup>(School of Mechatronics Engineering, University of Electronic Science & Technology of China, Chengdu 610054)

<sup>3)</sup>(Department of Computing, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong)

**Abstract** The environment of computer systems can be divided into two parts, humanities environment and natural environment. Along with a large number of computer systems have been widely used around the world, they gradually produce some negative effects to environment. As a kind of computing mode centered on the environment, by eliminating the environment-unfriendly aspects of computer systems, Green Computing can enable computer systems, people, society and natural environment in better harmony, and reach the goals of energy-saving, environment-protection and cost-saving. Compared with the research of Green Chemistry, the authors use a more universal and abstract way to redefine Green Computing, and discuss its main research contents, so that the limitation and scope of Green Computing can be ascertained, and the research tasks and relation between the related research fields can be clarified. Then, some basic ideas and general methods of Green Computing are proposed, which are an important fundament to explore some specific models, methods and tools of Green Computing under the various kinds of conditions in the next step.

**Keywords** green computing; power-aware computing; sustainable computing; environment-aware computing

收稿日期: 2008-11-13; 最终修改稿收到日期: 2009-11-10. 本课题得到国家“八六三”高技术研究发展计划项目基金(2008AA01Z105)资助. 郭 兵, 男, 1970 年生, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究领域为嵌入式实时系统、SoC 和中间件. E-mail: guobing@sohu.com; guobing@scu.edu.cn. 沈 艳, 女, 1973 年生, 博士, 副教授, 主要研究方向为分布式测量系统、嵌入式系统开发、无线传感器网络和机器人. 邵子立, 男, 1972 年生, 博士, 副教授, 主要研究方向为嵌入式系统、软/硬件协同设计和编译器.