

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02104271.3

[43] 公开日 2002 年 11 月 13 日

[11] 公开号 CN 1379113A

[22] 申请日 2002.3.4 [21] 申请号 02104271.3
 [71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所
 地址 130022 吉林省长春市人民大街 159 号
 [72] 发明人 吴爱国 李 壮 周化岚
 郑建萍 汪尔康

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 0 页

[54] 发明名称 可控脱氧核糖核酸网络的制作方法

[57] 摘要

本发明属于可控脱氧核糖核酸网络的制作方法。该方法选用硅烷化试剂、聚赖氨酸、金属纳米粒子或带有 -CH=CH₂ 基团的高分子聚合物作为末端固定剂,对末端固定剂在基底上进行处理,形成不等边长直角或等边长直角线框。然后将处理后的基底浸入稀释的 DNA 样品溶液当中或将稀释的 DNA 溶液滴加在基底上,使 DNA 吸附在基底上。最后采用分子梳、动力分子梳或水平动力分子梳的方法梳理吸附在基底上的 DNA 分子,梳理 DNA 分子时, DNA 分子链被拉直,由于各种分子梳的方法梳理 DNA 是不可逆的,因而沿一个方向梳理后,调换 90°,对再次吸附的 DNA 在基底进行梳理,从而形成 DNA 可控的网络。

ISSN 1008-4274

1. 一种可控脱氧核糖核酸网络的制作方法,选用硅烷化试剂、聚赖氨酸、金属纳米粒子或带有 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 基团的高分子聚合物作为末端固定剂,其特征在于对末端固定剂在基底上进行处理形成不等边长直角或等边长直角线框,形成的途径有三种;第一种,利用电子束刻蚀的方法;第二种,采用纳米笔技术将高分子溶液逐点滴加在基底上形成可控间距的纳米点,这些点同样组成不等边长直角或等边长直角线框;第三种,将基底表面自组装一层硫醇化合物,然后采用纳米笔技术将各种金属纳米粒子, Au、Ag、Pt、Pd 滴加在基底上,形成可控间距的纳米点,这些点组成不等边长直角或等边长直角线框;将采用末端固定剂处理后的基底浸入 DNA 样品溶液当中,或将 DNA 溶液滴加在基底上使 DNA 分子吸附在基底上;采用分子梳、动力分子梳或水平动力分子梳的方法梳理,将 DNA 链梳直,然后调换 90° , 再次进行梳理,形成可控的 DNA 网络。

可控脱氧核糖核酸网络的制作方法

技术领域：本发明属于可控脱氧核糖核酸网络的制作方法。

背景技术：随着基因工程和分子生物学的不断发展，脱氧核糖核酸(DNA)已成为一种非常重要和非常有前途的基因功能生物大分子。随着纳米技术的兴起，DNA 成为生物科学中的最重要材料。由于其特定功能，DNA 已用于制备导电材料或 DNA 膜以及 DNA 网络等方面的研究。虽然 DNA 网络在生物医学、工程和环境科学等领域有广泛的用途；但是，目前构建 DNA 网络的方法主要有两种。第一种是美国纽约州立大学的 N.C. Seeman 教授基于分子生物学方法发展起来的分子设计方法。他们采用连接酶和限制性内切酶连接与消化 DNA 等分子生物学的方法对 DNA 链进行加工、切割，构筑了许多 DNA 分子组成的纳米 DNA 网络。这种自下而上构建纳米 DNA 网络的方法虽然对原料的要求少，对结构的控制也较为准确，但是构建网络的过程太复杂，反应的条件要求十分严格，而且费时，不利于大规模的构建工作。第二种方法是 2000 年日本应用物理杂志三十九卷第四期和 2001 年日本分析科学杂志第十七卷第五期报道的云母基底上的大范围网络制备方法。这种制备方法虽然能够在大范围内制备出 DNA 网络，但原理上无法控制 DNA 网络网孔的大小，均一性不太好。基于以上原因，我们提出一种制备可控 DNA 网络的新方法，可以大规模精确地控制 DNA 网孔的大小。

发明内容：

本发明的目的是提供一种可控脱氧核糖核酸网络的制作方法,该方法选用硅烷化试剂、聚赖氨酸、金属纳米粒子或带有 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 基团的高分子聚合物作为末端固定剂,对末端固定剂在基底上进行处理,形成不等边长直角或等边长直角线框。然后将处理后的基底浸入稀释的 DNA 样品溶液当中或将稀释的 DNA 溶液滴加在基底上,使 DNA 吸附在基底上。最后采用分子梳、动力分子梳或水平动力分子梳的方法梳理吸附在基底上的 DNA 分子,梳理 DNA 分子时, DNA 分子链被拉直,由于各种分子梳的方法梳理 DNA 是不可逆的,因而沿一个方向梳理后,调换 90° ,对再次吸附的 DNA 在基底进行梳理,从而形成 DNA 可控的网络。

本发明选用硅烷化试剂、聚赖氨酸、金属纳米粒子或带有 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 基团的高分子聚合物作为末端固定剂,对末端固定剂在基底上进行处理形成不等边长直角或等边长直角线框,形成的途径有三种;第一种,利用电子束刻蚀的方法;第二种,采用纳米笔技术将高分子溶液逐点滴加在基底上形成可控间距的纳米点,这些点同样组成不等边长直角或等边长直角线框;第三种,将基底表面自组装一层硫醇化合物,然后采用纳米笔技术将各种金属纳米粒子, Au、Ag、Pt、Pd 等滴加在基底上,形成可控间距的纳米点,这些点组成不等边长直角或等边长直角线框;将采用末端固定剂处理后的基底浸入 DNA 样品溶液当中,或将 DNA 溶液滴加在基底上使 DNA 分子吸附在基底上;采用分子梳、动力分子梳或水平动力分子梳的方法梳理,将 DNA 链梳直,然后调换 90° ,再次进行梳理,形成可控的 DNA 网络。

本发明所构建的 DNA 网络的范围是可控的,网络的尺寸大小可以根据 DNA 的长度来进行选择,而且即可以单独形成小范围的网络,也可以将各个

小范围的网络连接起来形成大片范围的 DNA 网络；形成的网络可供检测的手段较多，常见的有：荧光显微镜、原子力显微镜、扫描隧道显微镜等；形成网络可供操作的 DNA 链种类多，理论上各种长度的 DNA 均可以；形成网络可供选择的固定 DNA 末端固定剂种类较多，常见的有：硅烷化试剂、各种带有-CH=CH₂基的高分子聚合物、聚赖氨酸或金属纳米粒子。

具体实施方式如下：

实施例 1：云母基底+聚苯乙烯+DNA (pBR322/pstI) 4361bp

首先利用纳米笔的方法，将聚苯乙烯溶液写到云母基底上形成边长为 1.5 μm 等边长直角线框。然后将写有边框的基底浸入浓度为 8ng/μl 的 DNA 样品 pBR322/pstI, 4361 bp, 溶液当中 3 分钟。取出基底后采用分子梳的方法梳理 DNA 分子，再次将基底浸入该 DNA 溶液中 3 分钟，调换 90° 采用水平动力分子梳的方法进行梳理，冲洗掉非特异吸附的 DNA 分子，形成边长为 1.5 μm 的 DNA 网络。

实施例 2：云母基底+聚苯乙烯+DNA (λ-DNA) 48502bp

利用电子束刻蚀的方法，将聚苯乙烯刻蚀到云母基底上形成边长为 16.5 μm 等边长的直角线框。然后将刻有边框的基底浸入浓度为 3ng/μl 的 λ-DNA, 48502 bp, 样品溶液当中 5 分钟。采用动力分子梳的方法取出基底梳理 DNA 分子，再次将基底浸入该 DNA 溶液中 8 分钟，调换 90° 采用水平动力分子梳的方法进行梳理，冲洗掉非特异吸附的 DNA 分子，形成边长为 16.5 μm 的方形 DNA 网络。

实施例 3：云母基底+聚苯乙烯+DNA (BAC 线性 200kb)

利用电子束刻蚀的方法，将聚苯乙烯刻蚀到云母基底上形成边长为 68 μm

等边长的直角线框。然后将刻有边框的基底浸入浓度为 $1\text{ng}/\mu\text{l}$ 的细菌人工染色体 DNA, 200 kbp, 样品溶液当中 3 分钟。其余实施例 1, 形成边长为 $68\mu\text{m}$ 的方形 DNA 网络。

实施例 4: 玻璃硅烷化+DNA (pBR322/pstI)

首先利用电子束刻蚀的方法, 将聚异丙烯刻蚀到硅烷化的玻璃基底上形成边长为 $1.5\mu\text{m}$ 直角线框。然后将刻有边框的基底浸入 $6\text{ng}/\mu\text{l}$ 的 DNA 样品 pBR322/pstI 溶液当中 5 分钟。其余同实施例 2, 形成边长为 $1.5\mu\text{m}$ 的方形 DNA 网络。

实施例 5: 硅片+聚苯乙烯+DNA

首先利用电子束刻蚀的方法, 将聚苯乙烯刻蚀到硅基底上形成边长为 $16.5\mu\text{m}$ 的直角线框。然后将 $3\text{ng}/\mu\text{l}$ 的 λ -DNA 样品溶液滴加在刻蚀后的硅基底上使 DNA 分子在硅基底上吸附 2 分钟。其余同实施例 1, 形成边长为 $16.5\mu\text{m}$ 的方形 DNA 网络。

实施例 6: 金+硫醇 (八硫醇) +DNA (200bp 寡聚核苷酸)

首先利用纳米笔的方法, 将直径为 2nm 的钨纳米溶胶溶液写到用正八烷基硫醇修饰的云母基底上形成边长为 $0.07\mu\text{m}$ 直角线框。然后将写有边框的基底浸入浓度为 $12\text{ng}/\mu\text{l}$ 的长度为 200 bp 的末端硫醇化的寡聚 DNA 样品溶液当中 4 分钟, 其余同实施例 2, 形成边长为 $0.07\mu\text{m}$ 的 DNA 网络。

实施例 7: HOPG+硫醇 (十八烷基硫醇) +DNA (300bp)

首先利用纳米笔的方法, 将直径为 5nm 的铂纳米溶胶溶液写到用正十八烷基硫醇修饰的 HOPG 基底上形成边长为 $0.1\mu\text{m}$ 直角线框。然后将浓度为 $12\text{ng}/\mu\text{l}$ 长度为 300 bp 的末端硫醇化的寡聚 DNA 样品溶液滴加在 HOPG 基底上吸

附 4 分钟。其余同实施例 1,形成边长为 $0.1\ \mu\text{m}$ 的 DNA 网络。

实施例 8: HOPG+硫醇+DNA (1500bp)

首先利用纳米笔的方法,将直径为 1.5nm 的银纳米溶胶溶液写到用正十二烷基硫醇修饰的 HOPG 基底上形成边长为 $0.5\ \mu\text{m}$ 直角线框。然后将浓度为 $10\text{ng}/\mu\text{l}$ 长度为 $1500\ \text{bp}$ 的末端硫醇化的寡聚 DNA 样品溶液滴加在 HOPG 基底上吸附 3 分钟。其余同实施例 2,形成边长为 $0.5\ \mu\text{m}$ 的 DNA 网络。

实施例 9: Teflon+硫醇+DNA (3kb)

首先利用纳米笔的方法,将直径为 $20\ \text{nm}$ 的金纳米溶胶溶液写到用正十六烷基硫醇修饰的 Teflon 基底上,形成边长为 $1.1\ \mu\text{m}$ 直角线框。然后将写有边框的基底浸入浓度为 $5\text{ng}/\mu\text{l}$ 的长度为 $3000\ \text{bp}$ 的末端硫醇化的寡聚 DNA 样品溶液当中 2 分钟。其余同实施例 2,形成边长为 $1.1\ \mu\text{m}$ 的 DNA 网络。

实施例 10: 云母+硅烷化试剂+ pBR322/pstI+Au 纳米粒子 20nm

首先利用纳米笔技术,将 $20\ \text{nm}$ 的金纳米粒子写到经过二氯二甲基硅烷硅烷化的云母基底上形成边长为 $1.5\ \mu\text{m}$ 直角线框。然后将刻有边框的基底浸入浓度为 $3\ \text{ng}/\mu\text{l}$ 的 DNA 样品 pBR322/pstI 溶液当中 5 分钟,其余同实施例 2,形成边长为 $1.5\ \mu\text{m}$ 的 DNA 网络。

实施例 11: 云母+聚赖氨酸+ λ -DNA+Au 纳米粒子 50nm

首先利用纳米笔技术,将 $50\ \text{nm}$ 的金纳米粒子写到经过聚赖氨酸修饰的云母基底上形成边长为 $1.5\ \mu\text{m} \times 16.5\ \mu\text{m}$ 直角线框。然后将刻有边框的基底浸入浓度为 $3\ \text{ng}/\mu\text{l}$ 的 λ -DNA 样品溶液当中 5 分钟,其余同实施例 1,形成边长为 $1.5\ \mu\text{m} \times 16.5\ \mu\text{m}$ 的 DNA 网络。