高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

一维DNA纳米材料自组装效率的可视化测量

刘雨庆[1,2,3], 程　杰[1,2,3], 王　越[4], 焦　凯[3], 诸　颖[3], 李　江[3], 郭琳洁[3]

(1. 中国科学院上海应用物理研究所同步辐射前沿应用教研室, 上海 201800;
2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 上海大学理学院, 材料生物学研究所, 上海 200444;
4. 上海交通大学化学化工学院, 上海 200240)

摘要　一维DNA纳米材料在诸多领域具有广泛的应用前景, 但其自组装效率的定量表征仍面临挑战. 本文以六螺旋束(six-helix bundle, 6HB) DNA纤维为模型体系, 基于已有的图像分析方法, 针对高长径比一维纤维易交叉缠绕、难以进行单颗粒识别与计数的问题进行整合与参数化处理, 建立了一套基于原子力显微镜(AFM)图像分析的自组装效率可视化测量方法. 该方法以面积覆盖率和轮廓长度密度为量化指标, 实现了对一维DNA纤维网络结构的定量表征. 利用该方法考察了缓冲液pH(5~11)和Mg^{2+}浓度(6.25~87.5 mmol/L)对6HB DNA纤维组装行为的影响. 结果表明, 6HB DNA纤维的有效组装存在明确的条件窗口: pH在6~8范围内有利于高产率形成长纤维, 其中pH=8时自组装效率达到峰值(面积覆盖率约36%, 轮廓长度密度约8 μm/μm^2). 当pH偏离该范围时, 连续的一维网络逐渐转变为碎片化或无序聚集结构, 两项参数接近背景水平. 同时, 纤维自组装对Mg^{2+}浓度表现出明显的阈值响应特征, 浓度高于25 mmol/L时进入快速增长区, 在50 mmol/L以上时形成稳定的长纤维产物(面积覆盖率> 20%, 轮廓长度密度> 4 μm/μm^2). 这些测量结果通过可视化和定量分析, 验证了DNA纳米结构自组装对pH值和离子强度等环境条件的高度依赖性. 该研究框架有望为一维DNA纳米材料的设计、制备与应用提供有力的定量分析工具.

关键词　六螺旋束DNA纤维; 原子力显微镜图像分析; 自组装效率

中图分类号　O614　　**文献标志码**　A　　doi: 10.7503/cjcu20260103

Visualized Measurement of Self-assembly Efficiency in One-dimensional DNA Nanomaterials

LIU Yuqing[1,2,3], CHENG Jie[1,2,3], WANG Yue[4], JIAO Kai[3],
ZHU Ying[3], LI Jiang[3], GUO Linjie[3*]

(*1. Division of Frontier Applications of Synchrotron Radiation, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai* 201800, *China*;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, *China*;
3. Institute of Materiobiology, College of Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, *China*;
4. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, *China*)

Abstract　One-dimensional(1D) DNA nanomaterials exhibit broad potential for applications across multiple fields. However, quantitative evaluation of their self-assembly efficiency remains challenging. In this work, six-helix bundle (6HB) DNA fibers were employed as a model system. Building upon existing image analysis methods, we developed

收稿日期: 2026-03-13. 网络首发日期: 2025-04-22.
联系人简介: 郭琳洁, 女, 博士, 副研究员, 主要从事DNA纳米材料设计及功能化方面的研究. E-mail: guolinjie@shu.edu.cn
基金项目: 国家重点研发计划项目(批准号: 2023YFC3404200)和国家自然科学基金(批准号: 22325406, 22525605, 32301185)资助.
Supported by the National Key Research and Development Program of China(No.2023YFB3208200) and the National Natural Science Foundation of China(Nos.22325406, 22525605, 32301185)

an integrated and parameterized approach to overcome the challenges of single-particle identification and counting in high-aspect-ratio, entangled 1D fibers, and established an AFM image-based method for visualizing and quantifying self-assembly efficiency. In this method, the area coverage ratio and contour length density extracted from AFM images were used as quantitative parameters to characterize 1D DNA fiber networks. Using this method, the effects of buffer pH(5—11) and Mg^{2+} concentration(6.25—87.5 mmol/L) on the assembly behavior of 6HB DNA fibers were investigated. The results show that efficient assembly of 6HB DNA fibers occurs within a well-defined window of conditions. Continuous long fibers are preferentially formed in the pH range of 6—8, with the highest assembly efficiency at pH=8, where the area coverage ratio reaches *ca.* 36%, and the contour length density is *ca.* 8 μm/μm^2. When the pH value deviates from this range, the continuous 1D network gradually transforms into fragmented or disordered aggregates, and both parameters decrease to background levels. Fiber assembly also shows a clear threshold response to Mg^{2+} concentration: the assembly efficiency increases rapidly above 25 mmol/L, and stable long fibers form at concentrations above 50 mmol/L, corresponding to area coverage ratios >20% and contour length densities >4 μm/μm^2. These results quantitatively demonstrate the strong dependence of DNA nanostructure self-assembly on environmental conditions such as pH and ionic strength. The analytical framework established here provides a useful quantitative tool for the design, assembly, and application of 1D DNA nanomaterials.

Keywords Six-helix bundle DNA fibers; AFM image analysis; Self-assembly efficiency

一维DNA纳米材料因具有较高的长径比、丰富的功能化位点以及优良的生物相容性等性质，在多个前沿领域展现出广阔的应用前景[1,2]. 通过精确排列金属纳米粒子，一维DNA纳米结构可作为模板构筑纳米导线，用于分子尺度电子器件的构建[3]，其周期性结构可作为支架，用于组织酶级联反应体系或阵列化组装生物分子探针，在生物传感领域具有潜在价值[4]. 此外，一维DNA纤维结构还可模拟细胞骨架或细胞外基质的纤维环境，用于调控细胞行为[5,6]. 这些应用前景推动了一维DNA纳米材料的设计与制备研究[7~9].

然而，一维DNA纳米材料的自组装效率量化评估存在挑战. 传统的表征方法难以有效分离和定量分析一维长纤维结构[10]. 紫外吸收光谱等整体性测量手段仅能反映体系中DNA的总量，难以区分不同形态的组装产物[11]. 而凝胶电泳由于凝胶介质的空间位阻效应，长纤维在电泳过程中易因尺寸过大而滞留于凝胶孔隙中，或因长度的多分散性形成拖尾弥散条带，而非清晰可辨的单一谱带[12]. 尺寸排阻色谱在分析一维长DNA纤维时也面临类似困境，纤维团聚超过色谱柱孔径上限时无法有效分离，且流动相的剪切力易导致长纤维断裂，改变其原始长度分布[13]. 动态光散射基于单分散球形模型的计算假设，对具有显著各向异性的纤维结构并不适用. 因此，建立能够直接观测并量化一维DNA纳米材料形成效率的方法，已成为该领域亟需解决的技术瓶颈.

原子力显微镜(AFM)为DNA纳米结构提供了单分子水平的可视化表征手段，已成为该领域不可或缺的分析工具[14]. 对于具有明确边界和离散形貌的DNA纳米结构，如DNA折纸(DNA origami)构建的二维三角形，矩形等结构，AFM能够清晰呈现其几何形状，直接验证设计的准确性[12,15]. 通过AFM图像计数完整结构与缺陷结构的数量进行统计，可直接评估DNA纳米结构的组装效率[2]. 基于这种定量策略，已有研究系统分析了离子种类及浓度对DNA纳米结构组装效率的影响，从而优化组装条件，评估设计方案的可行性[13,16]. 此外，AFM还被用于研究活性氧(Reactive oxygen species，ROS)和紫外辐照等外界条件对DNA结构的损伤效应，拓展了其在DNA纳米结构稳定性评估中的应用[17,18]. 通过AFM对DNA折纸结构折叠过程中不同时间点的样品进行直接观察和量化统计，可以揭示DNA结构的自组装路径异质性[19]. 然而，上述基于单颗粒识别与计数的分析方法依赖于结构之间良好的空间分离性及清晰边界，其适用对象主要限于离散分布的纳米结构. 对于高长径比的一维DNA纤维体系，在组装或AFM样品制备过程中往往形成大量交叉与缠绕，单根纤维的起点与终点难以准确界定，使得图像分割与独立计数难以实现. 因此，传统单颗粒统计策略难以直接适用于连续分布的纤维网络结构. 目前，针对一维DNA纤维体系，有必要发展不依赖单颗粒识别的图像定量方法.

基于此，本文以六螺旋束(Six-helix bundle，6HB) DNA纤维作为模型体系，建立了一套基于AFM成像与图像统计分析的自组装效率可视化测量方法[20]. 通过对现有生物图像分析方法进行整合与参数化，实现从图像获取、结构提取到定量分析的系统化流程构建[21, 22]. 区别于依赖单颗粒计数的传统分析策略，本方法通过提取AFM图像中纤维网络的整体形貌特征，以面积覆盖率(Area coverage ratio)和轮廓长度密度(Contour length density)作为量化指标，将连续分布的一维结构转化为可统计分析的参数，从而实现对复杂纤维网络组装效率的定量评估. 利用该方法，本文系统考察了缓冲液pH(5~11)与Mg^{2+}浓度(6.25~87.5 mmol/L)对6HB DNA纤维组装行为的影响，明确了该结构有效组装区间，为一维DNA纳米材料的设计与组装条件优化提供了一种有效的定量分析方法.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

用于组装6HB DNA纤维的DNA单链由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，并经高效液相色谱(HPLC)纯化. 所有DNA序列见表1.

Table 1 DNA sequences used for the assembly of 6HB DNA fibers

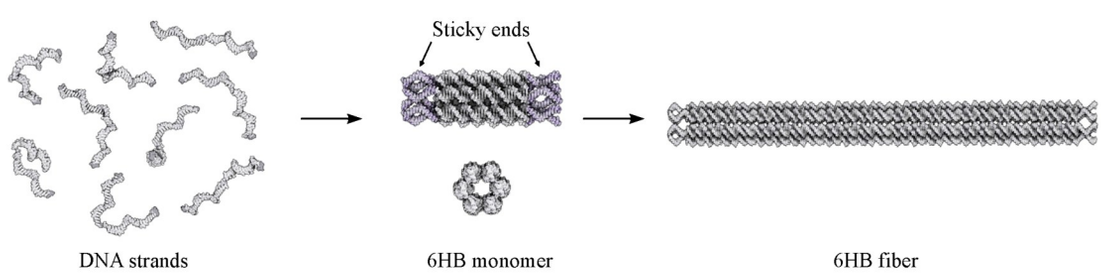
Name	Sequence(5′-3′)
X-1	TACTGACCTCGTGCGTTCGTACAAGAACCATTGACCTGCGCG
X-2	CGAACCTGATTAGAGACCCTGATGGCGGTGGAGACACTCACG
X-3	CTCGCGCTTCCCATTGGTCTCCTTCTATTGCTAGACCGGAGT
X-4	AGAAAGCCATACGCGCCTTCTTGCGGAACTGGTAGCCATGAG
X-5	GATTAGGTGGGCCGAAATAGACAACCTACGAACTAGCACCCA
X-6	TAATCGACGCTTTACGACAAGGCCGATTGATCACGAGTTCCG
Y-1	GCAATAGAAGCGGAACTCGTGTATGGCTTTCTTACGAACGCA
Y-2	ATGGTTCTTGCTCATGGCTACCCCACCTAATCCAGGGTCTCT
Y-3	CCACCGCCATTGGGTGCTAGTAGCGTCGATTAGAGACCAATG
Y-4	ATCAATCGGCACTCCGGTCTACGAGGTCAGTAAGAAGGCGCG
Y-5	CAGTTCCGCACGCGCAGGTCAAATCAGGTTCGTCTATTTCGG
Y-6	TCGTAGGTTGCGTGAGTGTCTGGAAGCGCGAGCTTGTCGTAA

10× TAE-Mg^{2+}缓冲液为实验室自配：三羟甲基氨基甲烷(400 mmol/L)、醋酸(200 mmol/L)、乙二胺四乙酸(20 mmol/L)和乙酸镁(125 mmol/L)均为分析纯级，购自阿拉丁生化科技股份有限公司.

Orion Star A111台式pH测量仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)；T100 Thermal Cycler聚合酶链式反应扩增仪(美国Bio-Rad公司)；Multimode Nanoscope VIII原子力显微镜(美国Bruker公司)，配备PEAKFORCE-Fluid+探针(弹簧常数0.7 N/m).

1.2 实验过程

1.2.1 6HB DNA纤维组装 本研究以6HB DNA纤维作为模型体系(Scheme 1). 该结构中每个6HB单元由多条DNA单链经程序化碱基配对组装，单元间通过互补黏性末端(Sticky ends)沿轴向连接形成



Scheme 1 Schematic illustration of 6HB DNA fibers

DNA strands assemble into 6HB monomers, which further connect axially *via* complementary sticky ends to form 6HB DNA fibers. The inset shows the cross-sectional view of a 6HB monomer.

6HB DNA纤维[9, 20].

首先，将构成6HB DNA纤维的DNA单链等比例混合于预设条件的缓冲液中，各DNA单链终浓度均为5 μmol/L. 在pH调控实验中，缓冲体系固定为4×TAE-Mg^{2+}，通过酸碱滴定将体系pH调节至5~11的梯度区间；缓冲溶液浓度调控实验中，体系pH固定为8，通过调节TAE-Mg^{2+}缓冲液浓度为0.5×TAE-Mg^{2+}~7×TAE-Mg^{2+}，使体系中Mg^{2+}浓度变化在6.25~87.5 mmol/L范围内.

混合组装液置于热循环仪中执行阶梯退火程序：70 ℃恒温5 min促使核酸二级结构完全变性；快速降温至62 ℃后，以0.1 ℃/h的速率缓慢降温至57 ℃，促进纤维结构的成核及轴向生长；组装产物置于4 ℃条件下保存，待后续进行形貌表征.

1.2.2 AFM表征与图像采集 将组装完成的样品用合成所用溶液条件稀释200倍，吸取8 μL滴加于新鲜剥离的云母表面，静置吸附5 min，随后用约1 mL超纯水轻柔冲洗并自然干燥. AFM扫描范围为10 μm×10 μm，分辨率512×512像素. 每个条件至少采集3个独立样品视野用于统计分析.

1.2.3 AFM图像处理与定量分析 所有AFM图像均在ImageJ软件中进行统一处理与定量分析. (1) AFM原始高度图背景校正：利用ImageJ中的背景展平(Background flattening)与行校正(Line correction)功能消除扫描过程中产生的基底倾斜及行扫描偏移. 随后对图像进行像素尺度校准，并统一转换为8 bit灰度格式，以便进行后续图像分析. (2) 灰度图阈值分割(Thresholding)：采用Otsu自适应阈值法对图像进行自动分割，该方法基于图像灰度直方图实现前景与背景的最优分割，其中纤维结构被识别为前景像素，而基底区域被归类为背景像素，可以减少人为参数选择带来的偏差. 在部分对比度较低的图像中，在Otsu阈值基础上进行小范围人工微调(调整幅度不超过±10%)，以保证纤维结构的连续性与完整识别[23]. (3) 二值图像骨架化处理(Skeletonization)：通过形态学骨架化算法将纤维结构转化为单像素宽度的中心线，从而得到单像素宽度的纤维骨架网络.

在此基础上提取两项结构参数用于定量分析：(1) 面积覆盖率(%)，即二值图像中纤维像素数占总像素数的比例；(2) 轮廓长度密度(μm/μm^2)，即单位面积内纤维骨架中心线的总轮廓长度. 所有数据均基于3次独立实验获得.

2 结果与讨论

2.1 AFM图像定量分析方法的建立

6HB DNA纤维为无限延伸的一维结构，在组装和AFM样品制备过程中容易发生交叉，叠加或局部缠绕，AFM图像中通常呈现为相互交织的纤维网络，单根完整纤维难以分辨. 针对离散DNA结构的直接计数方法难以获得可靠的定量统计结果，仅依赖形貌观察也难以准确评估其自组装效率，不利于不同实验条件之间的定量比较. 本研究建立了一套基于AFM图像分析的DNA纤维结构定量分析方法，并在ImageJ软件中实现标准化处理流程(图1). 该方法通过对AFM形貌图像进行统一预处理与结构提取(见1.2.3节)，将原始形貌信息转化为可比较的结构参数，从而实现对网络化交叉的6HB DNA纤维自组装效率的量化.

AFM图像质量容易受到扫描漂移、基底倾斜以及扫描轨迹误差等因素影响[24]. 因此，在定量分析

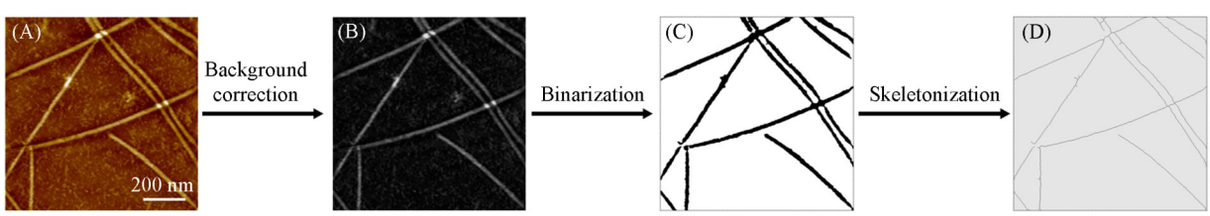


Fig. 1 Workflow of AFM image processing used in the fiber network quantification method

(A) Raw AFM topography image; (B) image after background flattening and line correction; (C) high-contrast binarized image obtained by threshold segmentation for area coverage ratio calculation; (D) single-pixel-width fiber skeleton extracted *via* skeletonization for contour length density calculation.

前需进行必要的图像校正处理[25]，以获得具有可比性的图像数据[26]. 在此基础上，通过阈值分割将连续的高度信息转换为二值图像获得清晰的结构边界[27,28]，并通过骨架化处理将其转化为单像素宽度的中心线结构[29]. 上述处理在保持纤维拓扑结构关系的同时，消除了纤维宽度对长度统计的影响，使复杂形貌转化为可量化的线性结构[23,30].

基于提取的纤维骨架网络，本研究定义了2个结构参数用于描述6HB DNA纤维的自组装效率. 其中面积覆盖率为二值图像中纤维像素数占视野总像素数的百分比，用于表征纤维结构在视野中的空间填充程度；轮廓长度密度为纤维骨架总长度与视野扫描面积的比值，用于反映单位面积内纤维结构的整体延展程度. 这2个参数分别从二维面积分布和一维长度延展2个维度对纤维网络进行定量描述，可较为全面地反映DNA纤维结构的组装效率与网络连续性. 相比仅统计单根纤维长度或数量的方法，该策略能够在复杂纤维网络条件下更稳定地表征体系的整体组装结果.

本文将传统依赖形貌观察的定性判断转化为可比较的参数，为不同缓冲条件下6HB DNA纤维组装行为的系统比较提供统一的量化基础，这为一维DNA材料自组装效率的AFM定量评估提供了一种可重复，可推广的分析策略.

2.2 Mg^{2+}浓度对6HB DNA纤维组装行为的影响

为考察阳离子微环境对6HB DNA纤维组装动力学的调控，在恒定DNA浓度与热退火程序下，系统评估了Mg^{2+}浓度(6.25~87.5 mmol/L)对6HB DNA纤维组装行为的影响.

AFM形貌观察表明，6HB DNA纤维的形成与延展对Mg^{2+}浓度具有显著依赖性(图2). 当浓度为6.25 mmol/L时，视野内主要呈现为离散短片段，对应的二值图像中纤维像素稀少，骨架化处理仅提取到少量不连续结构. Mg^{2+}浓度升高至12.5 mmol/L时，视野内开始出现分布稀疏的一维纤维结构，但尚未形成连续网络；骨架化提取的片段长度增加，但网络联通性仍较差. 当浓度进一步升至25 mmol/L时，一维纤维结构增多，部分区域出现交织分布特征，纤维网络开始形成，网络联通性提高. 当Mg^{2+}浓度为50 mmol/L时，视野内出现大面积连续延展的长纤维结构，形成较为致密的交联网络. 二值图像显示纤维在局部区域呈现较高覆盖度并形成连续网络结构. 进一步提高浓度至87.5 mmol/L时，整体形貌与50 mmol/L条件相近，二值化及骨架化图像中，纤维覆盖与网络联通性保持稳定；局部区域出现由侧向聚集形成的束状结构，整体形貌仍维持单根一维延展结构为主. 从原始AFM图像到二值化与骨架

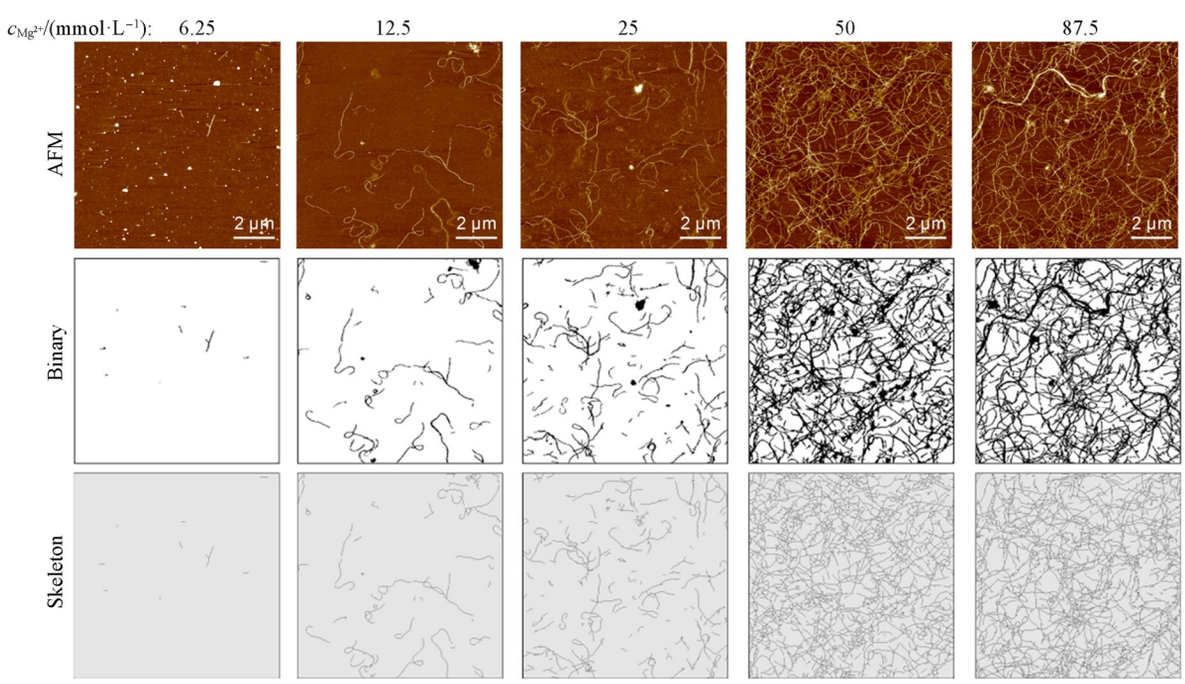


Fig. 2 AFM images of 6HB DNA fibers assembled with different Mg^{2+} concentrations

Top row: raw AFM images; middle row: binarized images; bottom row: skeletonized images.

化图像的逐级处理过程，清晰反映了不同Mg^{2+}浓度条件下6HB DNA纤维网络的形貌演变特征.

由图3可见，定量分析结果与形貌观察高度吻合. 随着Mg^{2+}浓度由6.25 mmol/L提高至50 mmol/L，纤维结构的面积覆盖率与轮廓长度密度均呈现持续上升趋势，覆盖率由约0升至约23%，轮廓长度密度由约0 μm/μm²升至约4.4 μm/μm². 当浓度进一步升至87.5 mmol/L时，两项指标趋于平台，覆盖率维持在21%左右，轮廓长度密度约为4.2 μm/μm²，未见显著增加，表明体系已进入饱和平台期. 综上所述，6HB DNA纤维的自组装对Mg^{2+}浓度存在明确的阈值响应特征. Mg^{2+}浓度在25 mmol/L以上进入快速增长区，达到或超过50 mmol/L进入高效组装状态，在此条件下可获得覆盖率> 20%，轮廓长度密度> 4 μm/μm²的连续纤维网络. 该浓度依赖性特征为6HB DNA纤维在当前缓冲体系中的有效组装窗口提供了明确的界定依据.

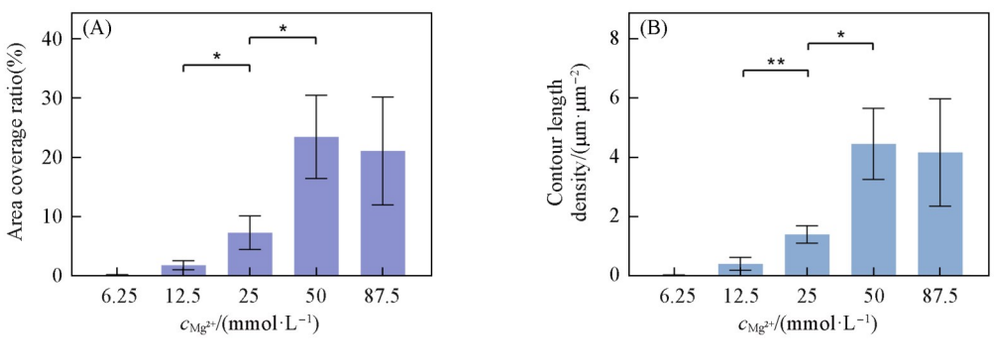


Fig. 3　Quantitative analysis of 6HB DNA fibers assembled with different Mg^{2+} concentrations

(A) Area coverage ratio(%); (B) contour length density(μm/μm²). Data are presented as mean±SD(n=3, independent samples). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA(*P < 0.05, **P < 0.01).

2.3　pH条件对6HB DNA纤维组装行为的影响

在确定Mg^{2+}浓度的适宜范围后，固定缓冲体系为4× TAE-Mg^{2+}，进一步调节体系pH值(5~11)，考察pH对6HB DNA纤维组装行为的影响.

AFM照片观察表明，6HB DNA纤维的组装对pH条件表现出显著的依赖性(图4). 在pH 6~8范围内，视野内均可观察到连续的一维纤维结构，并形成较为致密的网络分布. 对应的二值图像显示纤维覆盖面积较大，骨架化提取呈现连续延展特征，未见明显断裂或碎片化. 在pH=8时，纤维覆盖范围与网络致密程度达到本实验条件下的最高水平. 当pH升至9时，连续纤维结构仍然存在，但二值图像显示纤维覆盖面积减小，骨架网络间距增大，密度有所降低. 在pH≥10时，视野内仅剩极少短片段和无

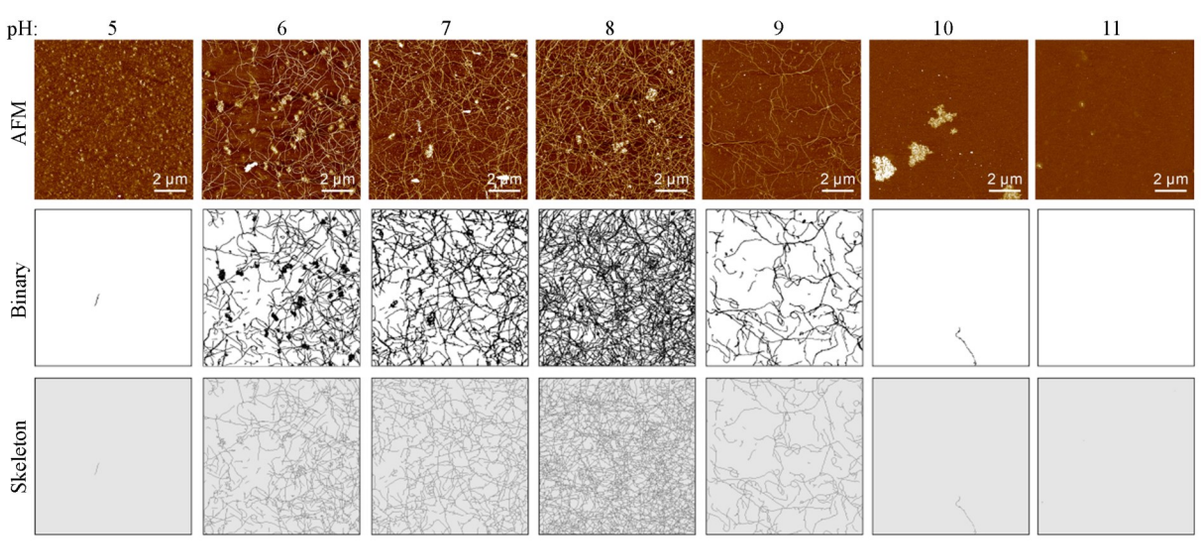


Fig. 4　AFM images of 6HB DNA fibers assembled with different pH values

Top row: raw AFM topography; middle row: binarized images; bottom row: skeletonized images.

定形聚集体，二值图像中纤维像素稀少，骨架化仅能提取极少量不连续结构．同样，pH = 5时体系同样难以维持有效的线性组装，视野内分散大量碎片，定量统计结果接近背景水平．

定量分析结果显示，在pH 6~8范围内，面积覆盖率与轮廓长度密度均处于较高水平，覆盖率维持在20%~40%之间，轮廓长度密度在4~8 μm/μm²之间，并在pH为8时达到最大值（覆盖率约36%，轮廓长度密度约8 μm/μm²）．当pH升至9时，两项指标有所下降，但仍保持可观水平．在极端pH条件下（pH≤5或pH≥10），两项指标均显著降低至接近背景值（覆盖率和轮廓长度密度均约为0），表明长尺度连续结构已无法形成（图5）．

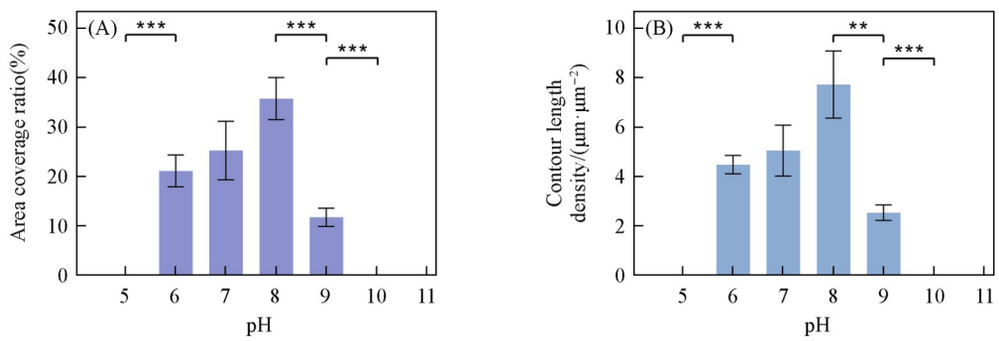


Fig. 5　Quantitative analysis of 6HB DNA fibers assembled with different pH values

(A) Area coverage ratio(%); (B) Contour length density(μm·μm^{-2}). Data are presented as mean ± SD(n=3, independent samples). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA(*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

综上所述，6HB DNA纤维的自组装对pH存在明确的适宜区间．有效组装需要pH维持在6~8范围内，最适pH为8，在此条件下可获得覆盖率>20%，轮廓长度密度>4 μm/μm²的连续纤维网络．当pH偏离该区间时，组装效率显著降低，体系由连续网络向碎片化或无序聚集状态转变．

2.4　6HB DNA纤维组装条件窗口的归纳

基于建立的AFM图像定量分析方法，以及Mg^{2+}浓度和pH分别对6HB DNA纤维组装行为影响的系统考察，进一步考察缓冲液中2种关键组分对纤维形成效率的协同调控作用，在二维参数空间内构建了6HB DNA纤维组装的响应图谱（图6）．

首先，在恒定pH条件下，面积覆盖率随Mg^{2+}浓度变化呈现阈值型响应行为[图6(A)]．采用基于非线性最小二乘法的sigmoidal函数进行经验拟合，以描述面积覆盖率随Mg^{2+}浓度变化的类阈值响应行为变化并提取特征参数．结果显示，25 mmol/L约为体系的临界浓度．浓度低于此阈值时，组装程度较低，表现为短片段或低密度稀疏纤维；当浓度跨越25 mmol/L后，面积覆盖率迅速提升；在50 mmol/L以上浓度区间内，指标趋于平台，体系进入相对稳定的高覆盖网络状态．这一特征源于Mg^{2+}的静电屏蔽效应：作为二价阳离子，Mg^{2+}能够有效中和DNA骨架负电荷，降低链间静电斥力[31]．当浓度低于临界阈值（25 mmol/L）时，电荷屏蔽不充分，6HB单元间堆叠效率受限；当浓度达到并超过该阈值后，静电屏蔽趋于饱和，推动体系进入高效组装状态[32]；进一步提高浓度至87.5 mmol/L时，由于屏蔽效应已饱和，组装效率不再增强，呈现平台特征[13, 33]．

其次，在恒定Mg^{2+}浓度条件下，面积覆盖率对pH的响应呈现单峰分布特征，采用Gaussian函数进行经验拟合[图6(B)]，以描述体系在pH空间中的最优组装区间及对称性衰减趋势．pH 6~8区间内结构形成程度维持在较高水平，并在pH=8附近达到峰值；当pH偏离该区间时，结构参数显著下降；在pH≤5或pH≥10条件下，体系难以维持长尺度连续结构，主要表现为碎片化片段或无序聚集体．这一分布特征可由pH对核酸碱基配对稳定性的影响解释，在酸性条件（pH≤5）下，腺嘌呤和胞嘧啶的质子化干扰氢键配对，导致双螺旋局部解链；在强碱条件（pH≥10）下，碱基去质子化降低双链热力学稳定性[34,35]．pH = 6~8环境能够较好地平衡单链溶解度与碱基互补配对稳定性，其中pH=8为最优条件，因此呈现峰值响应[36]．

基于上述单变量响应规律，进一步在二维参数空间内划分结构演化边界．整合pH值与Mg^{2+}浓度的

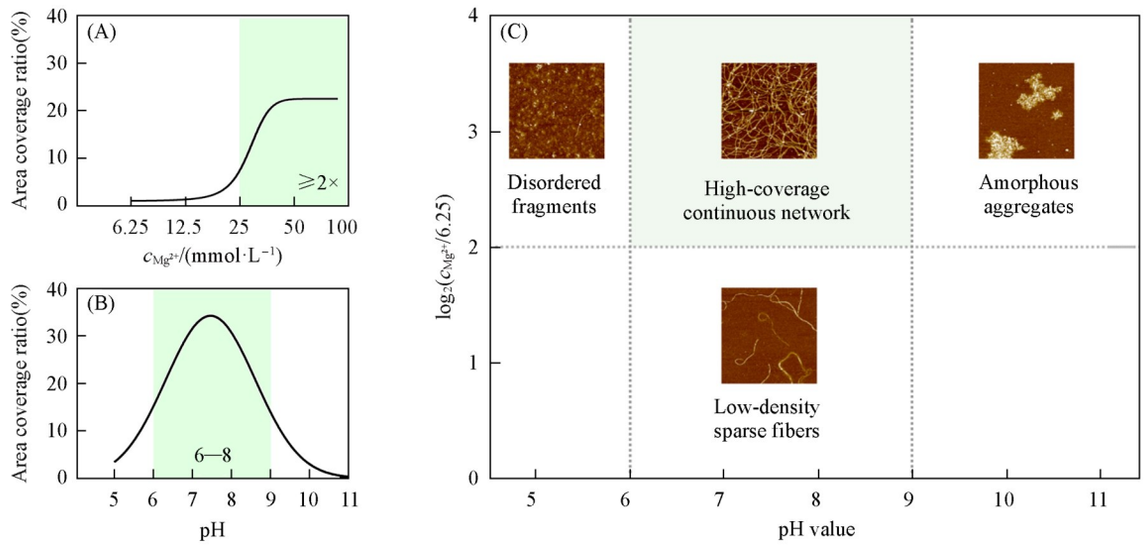


Fig. 6 Quantitative response analysis and structural state mapping of 6HB DNA fibers assembly in the pH-Mg^{2+} parameter space

(A) Dependence of area coverage ratio on Mg^{2+} concentration at constant pH. The data were empirically fitted with a sigmoidal function; (B) Dependence of area coverage ratio on pH at constant Mg^{2+} concentration. The data were empirically fitted with a Gaussian function; (C) Structural state diagram of 6HB DNA fibers in the pH-Mg^{2+} space. The Mg^{2+} concentrations on the *Y*-axis are expressed as $\log_2$-transformed values relative to the lowest tested concentration (6.25 mmol·L^{-1}). Representative AFM images show distinct morphologies. Dashed lines indicate boundaries between different structural states. Shaded regions denote the effective assembly windows.

双轴响应，可在pH-Mg^{2+}参数空间中划分出结构演化边界[图6(C)]. 依据面积覆盖率，轮廓长度密度及对应AFM形貌特征，可将体系划分为四类典型结构状态：碎片化，低密度稀疏纤维，高覆盖连续网络以及无序聚集. 图中虚线所示边界为基于实验数据界定的结构转变区间，明确6HB DNA纤维的有效组装窗口为pH 6~8且Mg^{2+}浓度≥25 mmol/L；当参数超出该范围时，结构形成效率下降或网络连续性受损.

3 结　　论

以6HB DNA纤维作为一维DNA纳米材料的模型体系，建立了一套基于AFM与图像分析统计技术的自组装效率可视化测量方法. 该方法以面积覆盖率与轮廓长度密度作为定量指标，将一维纤维网络的复杂形貌转化为可比较的数值数据，解决了传统方法难以对交叉缠绕结构进行定量评估的问题. 该方法基于网络整体特征提取，不依赖特定序列设计或结构细节，理论上有望拓展至其它一维核酸组装体系(如DNA纳米管，束状结构及RNA纤维)，从而为该类材料的定量表征提供通用分析框架. 利用该方法，系统考察了缓冲液pH与Mg^{2+}浓度对6HB DNA纤维组装行为的影响. 结果表明，6HB DNA纤维的自组装对Mg^{2+}浓度存在明确的阈值响应特征，在25 mmol/L以上进入快速增长区，当浓度达到50 mmol/L以上时，体系进入高效组装状态；对pH则存在适宜的响应区间(pH 6~8)，并在pH=8时达到最优. 综合二维参数空间分析能够明确6HB DNA纤维的有效组装窗口为pH 6~8且Mg^{2+}浓度≥25 mmol/L. 上述结果以可视化且量化的方式验证了DNA纳米结构自组装对pH值和离子强度等环境条件的高度依赖性，建立的定量分析框架将一维DNA纳米材料的形貌评估从定性观察拓展为可比较的数值分析，为深入研究多种缓冲液组分对自组装效率的影响提供了方法基础，可望为一维DNA纳米材料的设计，制备与应用提供有力的定量分析工具.

参　考　文　献

[1] Seeman N. C., Sleiman H. F., *Nat. Rev. Mater.*, **2017**, *3*(1), 17068
[2] Rothemund P. W. K., *Nature*, **2006**, *440*(7082), 297—302

[3] Keren K., Berman R. S., Buchstab E., Sivan U., Braun E., *Science*, **2003**, *302*(5649), 1380—1382
[4] Fu J., Yang Y. R., Johnson-Buck A., Liu M., Liu Y., Walter N. G., Woodbury N. W., Yan H., *Nat. Nanotechnol.*, **2014**, *9*(7), 531—536
[5] Um S. H., Lee J. B., Park N., Kwon S. Y., Umbach C. C., Luo D., *Nat. Mater.*, **2006**, *5*(10), 797—801
[6] Elblová P., Anthi J., Liu M., Lunova M., Jirsa M., Stephanopoulos N., Lunov O., *JACS Au*, **2025**, *5*(4), 1591—1616
[7] Fang X., Zheng J., Gao W., Liu Z., Li X., Li C., Gao T., Zhang R., *Coord. Chem. Rev.*, **2026**, *552*, 217525
[8] Green L. N., Subramanian H. K. K., Mardanlou V., Kim J., Hariadi R. F., Franco E., *Nat. Chem.*, **2019**, *11*(6), 510—520
[9] Ong L. L., Hanikel N., Yaghi O. K., Grun C., Strauss M. T., Bron P., Lai-Kee-Him J., Schueder F., Wang B., Wang P., Kishi J. Y., Myhrvold C., Zhu A., Jungmann R., Bellot G., Ke Y., Yin P., *Nature*, **2017**, *552*(7683), 72—77
[10] Jones M. R., Seeman N. C., Mirkin C. A., *Science*, **2015**, *347*(6224), 1260901
[11] Hong F., Zhang F., Liu Y., Yan H., *Chem. Rev.*, **2017**, *117*(20), 12584—12640
[12] Castro C. E., Kilchherr F., Kim D. N., Shiao E. L., Wauer T., Wortmann P., Bathe M., Dietz H., *Nat. Methods*, **2011**, *8*(3), 221—229
[13] Zhang F., Jiang S., Wu S., Li Y., Mao C., Liu Y., Yan H., *Nat. Nanotechnol.*, **2015**, *10*(9), 779—784
[14] Hansma H. G., Hoh J. H., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1994**, *23*, 115—140
[15] Saleem S. S., Ravichandran S., Ravichandran S., Chinnadurai K. R., Saravanan A., Vickram S., *ACS Appl. Bio Mater.*, **2025**, *8*(10), 8467—8512
[16] Högberg B., Liedl T., Shih W. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*(26), 9154—9155
[17] Fang W., Xie M., Hou X., Liu X., Zuo X., Chao J., Wang L., Fan C., Liu H., Wang L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*(19), 8782—8789
[18] Zhang S., Zhang H., Li M., Song H., Sun J., Fan C., Xie Y., Wang H., Ge Z., *Nano Lett.*, **2024**, *24*(42), 13438—13446
[19] Wang J., Wei Y., Zhang P., Wang Y., Xia Q., Liu X., Luo S., Shi J., Hu J., Fan C., Li B., Wang L., Zhou X., Li J., *Nano Lett.*, **2022**, *22*(17), 7173—7179
[20] Yin P., Hariadi R. F., Sahu S., Choi H. M. T., Park S. H., Labean T. H., Reif J. H., *Science*, **2008**, *321*(5890), 824—826
[21] Stein A. M., Vader D. A., Jawerth L. M., Weitz D. A., Sander L. M., *J. Microscopy*, **2008**, *232*(3), 463—475
[24] Engel A., Müller D. J., *Nat. Struct. Biol.*, **2000**, *7*(9), 715—718
[25] Hansma H. G., Laney D. E., *Biophys. J.*, **1996**, *70*(4), 1933—1939
[26] Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J. Y., White D. J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A., *Nat. Methods*, **2012**, *9*(7), 676—682
[27] Sezgin M., Sankur B., *J. Electron. Imaging*, **2004**, *13*, 146—168
[28] Otsu N., *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.*, **1979**, *9*(1), 62—66
[29] Saha P. K., Borgefors G., Sanniti Di Baja G., *Pattern Recognition Letters*, **2016**, *76*, 3—12
[30] Zhang T. Y., Suen C. Y., *Commun. ACM*, **1984**, *27*(3), 236–239
[31] Woodson S. A., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2005**, *9*(2), 104—109
[32] Bloomfield V. A., *Biopolymers*, **1997**, *44*(3), 269—282
[33] Ke Y., Ong L. L., Shih W. M., Yin P., *Science*, **2012**, *338*(6111), 1177—1183
[34] Tao Q., Chen Q., Bian X. J., Liu G., Yan J., *Chin. J. Anal. Chem.*, **2021**, *49*(5), 743—751(陶晴, 陈谦, 卞晓军, 刘刚, 颜娟. 分析化学, **2021**, *49*(5), 743—751)
[35] Ramakrishnan S., Ijäs H., Linko V., Keller A., *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **2018**, *16*, 342—349
[36] Fang W. N., Fan C. H., Liu H. J., *Acta Polym. Sin.*, **2017**, (12), 1993—2000(方维娜, 樊春海, 柳华杰. 高分子学报, **2017**, (12), 1993—2000)

(Ed.: F, K, V)