

基于 DNA 纳米结构的传感界面调控及生物检测应用*

叶德楷 左小磊** 樊春海**

(中国科学院上海应用物理研究所物理生物化学研究室 上海光源生物成像中心 上海 201800)

摘要 生物传感技术在环境、安全和医学诊断等应用中具有重要意义。如何精确调控自组装界面上生物识别探针与界面的相互作用来提高生物传感的性能则是其中的关键问题。常规界面组装过程中, DNA 等生物分子往往在界面形成非均一的自组装层, 分子结合能量壁垒高, 识别效率低。我们通过构建有序 DNA 纳米结构, 发展了纳米尺度精确调控界面性质的方法。通过在界面上形成以熵驱动主导的均匀自组装层, 增加探针分子间的有效距离, 并通过精确调控界面上 DNA 纳米结构的尺寸, 显著提高界面 DNA 杂交效率与速率。我们在 DNA 四面体上修饰不同的生物识别分子(DNA、抗体、核酸适配体等), 可构建通用检测平台, 实现对核酸、蛋白、小分子及细胞的高灵敏检测, 并且在复杂样本中同样保持了优异的检测性能。在此基础上, 我们将四面体三维结构探针应用于细胞内以及活体检测, 研究了 DNA 四面体在细胞内的运输途径及靶向定位方式, 并实现对细胞内 ATP 分布的传感成像及小鼠体内肿瘤组织的靶向成像, 有望发展活体生物传感的新探针。

关键词 生物传感 界面组装 DNA 纳米结构 电化学 细胞成像

中图分类号: O65; O647 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2017) 01-0036-11

DNA Nanostructure-Based Engineering of the Biosensing Interface for Biomolecular Detection*

Dekai Ye, Xiaolei Zuo**, Chunhai Fan**

(Division of Physical Biology & Bioimaging Center, Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

Abstract The biosensing technology plays an important role in environmental monitoring, safety control and medical diagnosis. Precise control of the interaction between bio-recognition probe and the interface is critical to improve the sensitivity, specificity and selectivity of biosensors. In a typical bioprobe immobilization, the heterogeneity of self-assembled monolayers on the surface increases the binding energy barrier and decreases the recognition efficiency and rate. We found that DNA nanostructures, such as tetrahedral DNA nanostructures (TDNs), could increase the homogeneity of self-assembled monolayers via enthalpy-entropy compensation, which enables precise regulation of interfacial property at the nanoscale. By regulating the intermolecular distance of bioprobes, the hybridization efficiency and hybridization rate of DNA probes can be improved significantly. The detection limit of DNA and microRNA can be pushed down to 10 aM limit. The detection limit of antigen

收稿: 2016 年 12 月 8 日, 收修改稿: 2016 年 12 月 24 日, 网络出版: 2017 年 1 月 5 日(特约)

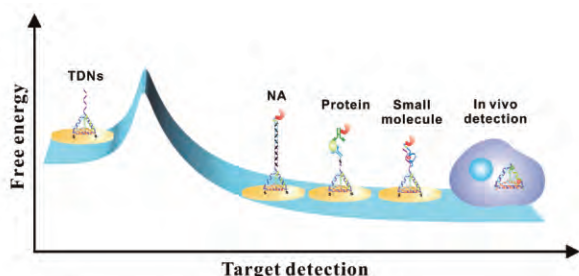
* 国家自然科学基金项目(No. 21422508) 资助

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21422508).

** Corresponding author e-mail: zuoxiaolei@sinap.ac.cn(Zuo Xiaolei); fchh@sinap.ac.cn(Fan Chunhai)

detection can be improved to 100 pM and the detection limit of small molecule (cocaine) can be pushed to 33 nM. By using TDNs, we developed a universal detection platform for nucleic acids, proteins, small molecules and cells with superior detection sensitivity. To further use TDN probes in cells and in vivo, we explored the transport pathways of TDNs into the cell and directed their targeting location to specific organelles. We aim to develop DNA nanostructure-based bioprobes for intracellular and in-vivo imaging.

Key words biosensing; interfacial engineering; DNA nanostructure; electrochemical; cell imaging



By employing tetrahedral DNA nanostructures, the homogeneity of self-assembled monolayer is significantly improved due to the enthalpy-entropy compensation. Universal detection platform has been developed based on tetrahedral DNA nanostructures for the ultrasensitive detection of various biomarkers.

Contents

- 1 Introduction
- 2 Physicochemical perspectives on DNA immobilization: enthalpy-entropy compensation
- 3 DNA hybridization regime on DNA nanostructured biosensing interface
- 4 Biosensors with designed DNA nanostructures
 - 4.1 Nucleic acids detection
 - 4.2 Protein detection
 - 4.3 Small molecules detection
 - 4.4 In vivo detection
- 5 Conclusion and outlook

1 引言

癌症以及重大疾病的早期检测需要大幅提升生物检测的灵敏度、特异性、重现性及抗干扰能力,而这也正是生物传感领域所面临的长期挑战性问题^[1~6]。生物传感检测需要将生物分子的识别信息转化为物理化学信息^[1,7~9]。由于这种转化通常发生在固液界面上,两相交的表界面构成了电子迁移、物质传输、能量交换与信号转化的重要场所^[10~28]。界面的结构状态决定了生物传感界面的性质与功能,界面修饰与组装成为了调控传感性能

的有效途径^[12,29~38]。

用于界面组装的生物识别探针(核酸、抗体、核酸适配体等)的尺寸属于纳米尺度^[35,39,40]。深入理解生物探针分子与纳米尺度界面的相互作用,能够进一步提高生物探针的识别效率与信号转导的效率,包括纳米尺度界面上生物分子的吸附、组装和折叠等基本物理化学问题^[22,41~57];界面纳米结构对界面生物探针自组装的影响^[12,33,34,36,58];界面纳米调控对分子的传质过程以及能量转换的影响等^[15~17,19,21,40,59,60]。在这方面,DNA纳米技术为生物探针纳米尺度界面的研究提供了前所未有的机遇^[61~64]。通过“DNA折纸术”,可以构建出任意形状、尺寸、维度的精确DNA纳米结构,并能实现生物探针分子等功能单元在DNA纳米结构上的偶联^[59,65~71]。DNA纳米技术与生物传感技术的有机结合,可以在深入研究纳米尺度生物分子界面作用机制的基础之上,针对生物传感领域所面临的长期挑战性问题,大幅提升检测的灵敏度、特异性、重现性及抗干扰能力^[35,38,72~83]。

2 界面自组装中的物理化学过程

自组装过程是一个从充分混乱均相体系中通过各组分间的相互作用逐渐重组为相对规则有序体系的过程^[84~89]。从物理化学的视角分析,这一过程包含了复杂的焓熵变化(图1)。以最常见的巯基修饰DNA在金界面上的自组装过程为例,理想情况下巯基修饰DNA可以通过Au-S键的形成快速组装到金界面上,并在金界面上以静电排斥为驱动不断重排自组装成分散的直立结构^[88,90]。但在实际体系中,单链DNA分子在自组装过程中除了受到静电排斥力外,还有DNA链与金界面的非特异性吸附作用力、单链间的碱基堆积作用力等,因此单链DNA除了由熵驱动的趋于分散重排外,还会在焓驱动下发生DNA单链倒伏、DNA链间缠绕及DNA链紧密堆积等行为。最终,DNA单链在金界面的自组装在多种作用共同影响下并伴随着焓及熵的多种变化模式,由焓变驱动为主导而形成包含多种结构形式的

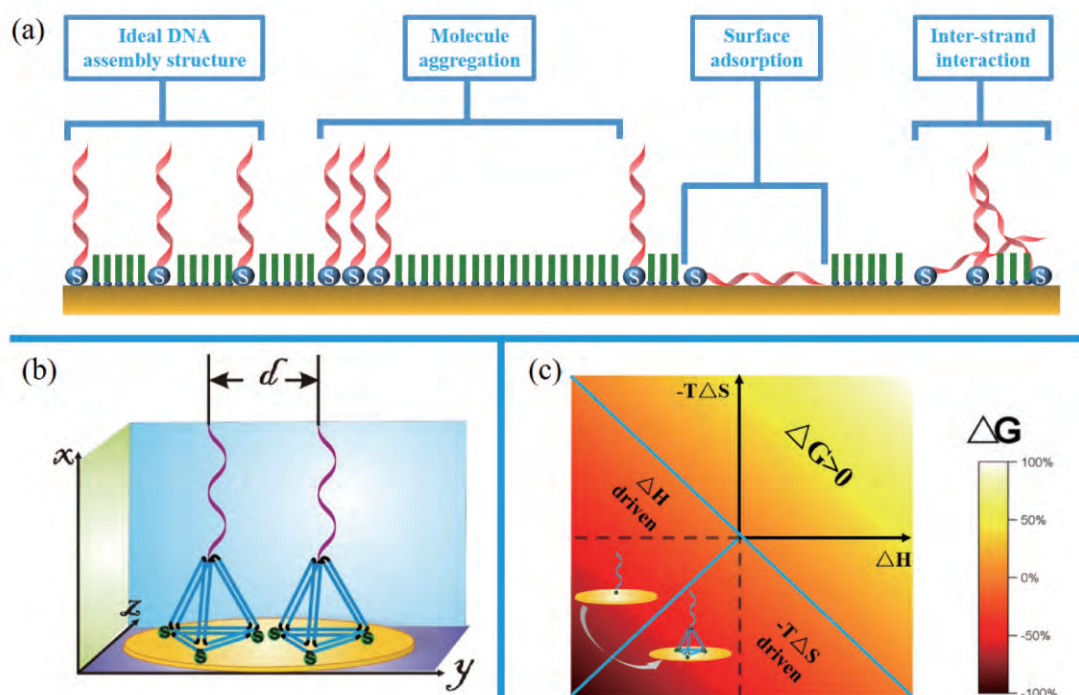


图1 DNA 探针在界面自组装过程示意图: (a) DNA 单链探针在界面的自组装; (b) DNA 四面体探针在界面自组装^[40]; (c) DNA 单链探针及四面体探针在界面自组装过程中的热力学变化

Fig. 1 Schematic diagram of DNA self-assembly on surface. (a) Self-assembly of single strand DNA on surface. (b) Self-assembly of TDNs on surface^[40]. (c) Thermodynamics change during the DNA self-assembly on surface

非均一 DNA 自组装层^[6, 72, 82]。这种 DNA 自组装层给目标 DNA 分子的识别增添了额外的能量壁垒,因此,分子识别过程需要消耗更多能量去克服倒伏的单链、探针 DNA 分子间的纠缠等,导致识别效率的降低与识别速度的下降^[12, 33, 34, 36, 40, 87]。之前的研究已发展了很多方法,可以在一定程度上减少 DNA 在自组装过程中产生的聚集体和其他结构^[88, 91],例如通过短链硫醇的反向填充可以减少 DNA 单链在金表面的吸附,但是该方法还无法避免 DNA 单链之间相互作用引起链间缠绕及紧密堆积;利用 DNA 二维结构探针(茎环结构、假结结构等)可以进一步减少链间缠绕结构^[8, 51, 87, 92, 93]。然而,这些方法仍然无法精确调控 DNA 探针的界面组装过程,界面上 DNA 探针的均一性组装仍然是一个挑战性问题。

DNA 纳米技术为解决这一问题提供了一种有效的途径^[38, 40, 72 ~ 83, 94 ~ 99]。Fan 等在国际上率先提出了 DNA 三维纳米结构探针的策略^[74],结合焓熵补偿等物理化学原理,构筑了新型的 DNA 探针自组装平台。研究证明, DNA 四面体三维 DNA 纳米结构具有合成简单、产率高及稳定性好等优点。在 DNA 四面体的三个顶点修饰巯基基团,另一顶点则可以伸出 DNA 单链探针,用于生物识别。DNA 四

面体的三维空间结构使得顶端 DNA 单链探针更加远离金表面,同时通过侧向空间距离使得相邻探针链之间的分子间距增加。因此, DNA 四面体三维 DNA 纳米结构探针的应用,不仅有效消除了 DNA 单链探针与金界面的非特异性吸附,同时也最大程度降低了相邻 DNA 单链探针之间的缠绕。在这一过程中,非特异性吸附以及 DNA 单链探针之间缠绕的消除引起焓变的减少, DNA 四面体三维纳米结构探针之间的斥力引起的熵变增加,自组装过程趋向于熵增主导的重排过程, DNA 四面体三维结构探针也会更趋向于均匀分布,形成均一、高效的探针自组装层。

3 DNA 纳米结构界面上的 DNA 杂交行为

DNA 由单链杂交为双链平衡态的过程伴随着吉布斯自由能的变化(ΔG),界面探针的杂交效率越高, ΔG 越有利于杂交反应的进行;同样 DNA 杂交的活化能(E_a) 等也决定了 DNA 的杂交速率(图 2)。因此,当 DNA 单链探针在金界面形成非均一性自组装层时, DNA 探针在金界面的非特异性吸附、探针链间缠绕及 DNA 单链探针紧密堆积等不可控结构会导致杂交所需活化能更大,杂交速率会随之降低;

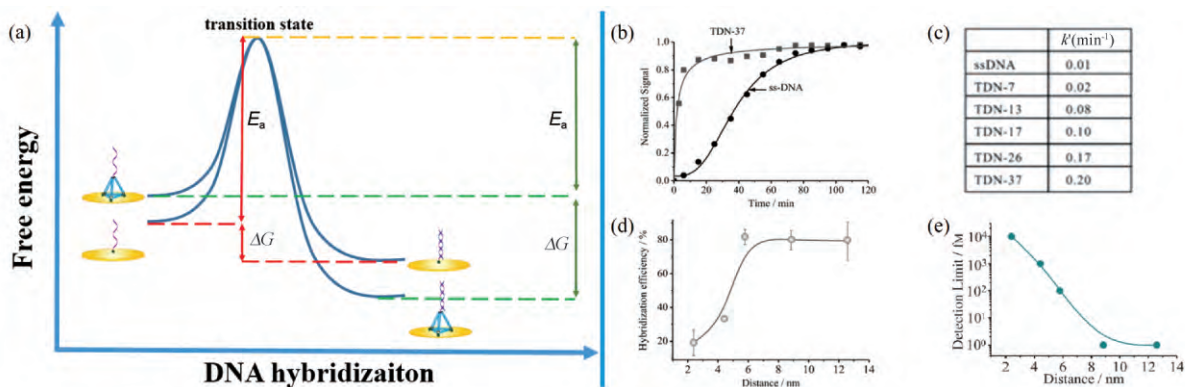


图2 DNA 三维纳米结构界面上的 DNA 杂交: (a) DNA 杂交过程的吉布斯自由能变化及活化能变化; (b) 37bp DNA 四面体探针及 DNA 单链探针上 DNA 杂交的动力学过程^[40]; (c) DNA 单链探针及不同大小四面体探针上的 DNA 杂交速率常数^[40]; (d) 不同大小四面体探针的杂交效率^[40]; (e) 不同大小四面体探针对靶 DNA 序列的检测灵敏度^[40]

Fig. 2 DNA hybridization on DNA nanostructured surface. (a) Scheme of the change in Gibbs free energy and activation energy during DNA hybridization. (b) The kinetics of DNA hybridization both with single strand DNA probe and 37bp TDNs^[40]. (c) The rate constant of DNA hybridization on single strand DNA and TDNs of different sizes^[40]. (d) DNA hybridization efficiency on TDNs^[40]. (e) The limit of detection to target^[40] DNA on different sizes of TDNs.

而 ΔG 也不利于杂交反应的进行,导致杂交效率的降低^[40, 84, 85, 87]。

我们利用精确可控、尺寸可调的 DNA 三维纳米技术,对 DNA 在三维纳米结构界面上的杂交过程进行了系统研究,并深入探讨了探针间的纳米距离对 DNA 杂交热力学以及动力学的影响^[40]。结果表明, DNA 探针链间的纳米距离越大, ΔG 越负移, E_a 也越小。在单链探针形成的非均一自组装界面上, DNA 的杂交效率为 $\sim 15\%$; 通过 DNA 三维纳米结构探针精确调控,杂交效率可提高至 $\sim 85\%$, 杂交速率也有着显著的提高 (~ 20 倍)。在此基础之上,更进一步探讨了杂交行为的改变对传感界面传感性能的提高,发现检测灵敏度也由 10 pM 提升至 1 fM (提高 $\sim 10\,000$ 倍),同时探针的特异性也得到了有效的保持。

4 基于 DNA 纳米结构界面的生物传感设计

DNA 四面体三维纳米结构探针的引入实现了对 DNA 探针自组装界面的精确调控,进而实现了对杂交热力学及动力学的调控,极大提升了传感器的性能。这一设计理念不仅适用于核酸类目标分子的检测,而且可以推广至其他生物识别界面的设计中^[6, 35, 38-40, 72-83, 94, 95, 97-106],同样可以提升传感界面的性能,例如抗体、核酸适配体等的自组装界面。抗体、酶等蛋白质类在界面上的自组装同样存在各种复杂情况,取向不均一、非特异性吸附以及密度不

可控导致的识别能力下降乃至失活,最终影响生物传感检测的灵敏度、特异性以及抗干扰能力等性能。

4.1 核酸检测

核酸是生命的基本物质之一,包括 DNA 和 RNA,它们参与到遗传信息的存储、复制、传递、翻译等重要生命活动之中。体内各类核酸信息的表达水平与生命活动的进行状态息息相关,核酸的突变等往往伴随着相关疾病的发生。而一些疾病,如肿瘤在发生过程中,也会伴随特异性核酸序列如循环肿瘤 DNA、微小 RNA (microRNA) 等的异常表达^[107],改变组织或体液中的核酸分布。但是在疾病早期,由于疾病相关的核酸目标分子浓度极低,现有的检测技术在灵敏度、选择性以及特异性等性能尚需要提升。目前较为常用的核酸检测技术包括基因芯片技术、PCR (聚合酶链式反应) 技术等^[108]。基因芯片技术虽具有较高通量,但是检测灵敏度较差 ($\sim \text{nM}$ 水平); PCR 技术具有较高的检测灵敏度,但是操作复杂、抗干扰能力差,且存在较高的假阳性或假阴性结果。

通过 DNA 四面体三维结构探针在界面的自组装,可以制备出均一的 DNA 探针界面,使 DNA 探针分子的生物识别活性得到有效保持,提高识别效率^[40]。同时,这种基于 DNA 四面体的三维纳米结构界面具有优异的抗非特异性吸附的性能,可以有效缓解蛋白质类物质在界面上吸附对检测造成的影响^[74]。传统的 DNA 单链自组装技术,为了改善界

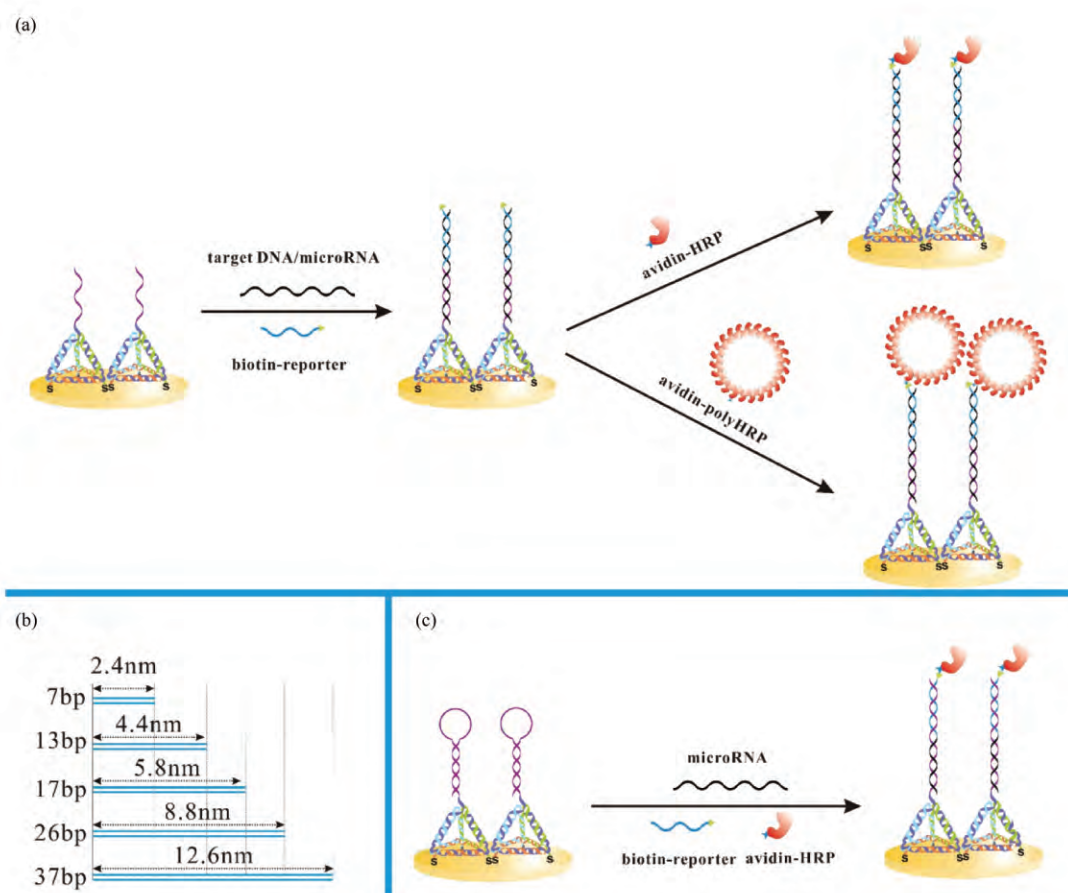


图3 基于DNA三维纳米结构探针的核酸检测: (a) 基于夹心结构法的DNA与microRNA检测及基于avidin-HRP与avidin-polyHRP的信号放大法示意图^[83]; (b) 不同大小DNA四面体探针与DNA探针间距关系示意图^[40]; (c) 基于茎环结构法microRNA检测示意图^[76]

Fig.3 Nucleic acid detection based on TDNs. (a) Schematic diagram of DNA and microRNA detection within sandwich structure on TDNs and the different signal amplification methods using avidin-HRP and avidin-polyHRP^[83]. (b) The relation of lateral distance between the DNA probes on the surface to TDNs with different sizes^[40]. (c) Schematic diagram of the microRNA detection by the hairpin structured probes on TDNs^[76]

面组装状态、提高抗非特异吸附性能,通常需要短链硫醇的反向填充(back-filling),增加了自组装过程的复杂度^[91]。而DNA四面体三维纳米结构探针的组装只需要一步,则可兼顾探针组装的均一性以及优异的抗非特异吸附性能,极大简化了自组装的过程。在检测性能方面,与DNA单链自组装技术相比,检测的灵敏度提升250倍,检测特异性(以单碱基错配分辨能力为例)最高提升100倍,在血清等复杂体系中检测信号基本不受影响(图3)。

DNA四面体三维结构探针另一优势是DNA四面体的尺寸可程序化调控。通过精确调控DNA四面体的边长,我们可以精确的调控DNA探针分子之间的距离,从而进一步优化DNA探针界面的性能^[40]。通过设计合成边长从7碱基对(7bp)到

36bp的DNA四面体,可以控制DNA探针分子之间的距离为2.4~12.6nm。DNA探针分子间距直接影响了DNA检测的灵敏度,随着分子间距的增加,检测灵敏度可以从10pM提升至1fM。利用DNA四面体技术来调控DNA探针分子间距,具有合成简单、调控精确度高等优点。而传统的界面纳米技术如光刻技术^[109],通常光刻精确度达不到与生物探针尺寸相匹配的程度(10nm及以下)。

DNA四面体三维纳米结构探针在短小且同源性高的核酸序列灵敏检测中也颇具优势。microRNA是这类核酸序列的典型代表。传统核酸方法在检测microRNA方面具有一些先天缺陷: microRNA的短序列特性通常造成PCR方法的低效率和高假阳性;微阵列技术虽具有较高的通量,但在

检测 microRNA 时存在严重的交叉杂交 (cross-hybridization) 等^[108]。在四面体三维纳米结构顶端延伸出茎环结构探针, 则可实现对 microRNA 的灵敏检测^[76, 81, 83, 95]。DNA 四面体纳米结构保证了茎环探针的可控界面组装, 有效避免了探针的链间杂交; 同时茎环结构的存在保证了探针的高特异性, 可以避免源性高的相似序列对检测的干扰。结果表明, microRNA 的检测灵敏度达到 1 fM, 可以与其他 microRNA 进行有效区分。

在灵敏检测极低浓度的核酸分子方面, PCR 方法依然具有较大优势, 但也存在仪器设备复杂、操作步骤繁琐、对环境要求较高等弊端。为了发展可以替代 PCR 的方法, 必须使检测灵敏度能够达到 aM 量级。我们也在 DNA 四面体纳米结构界面上进行了尝试, 并在充分利用纳米结构界面优势的同时, 引入了信号放大系统, 例如 HRP 酶多聚体 (polyHRP)、杂交链式反应等^[81, 83, 101]。研究表明, 对 DNA 和 microRNA 的检测灵敏度分别可以达到 100 aM 及 10 aM。在 10 μ L 的检测体系中, 10 aM 相当于体系中仅含有 60 个 microRNA 分子, 因而这是一个极高的灵敏度(图 3)。

4.2 蛋白检测

作为生命基本物质之一, 蛋白也是构成有机体的重要材料以及体内各生理活动的直接参与者, 生命活动过程中伴随着众多蛋白表达水平的动态调控。如抗体蛋白是体内免疫系统的重要成分, 酶蛋白参与体内能量代谢、信号通路等。生命体内多种疾病的发生也会引起某些相关蛋白的异常表达, 相关标志蛋白表达水平的检测分析成为疾病诊断的重要手段之一^[110]。

传统蛋白分子的检测依赖于抗原-抗体的酶联免疫法, 此类方法在捕获抗体组装过程中普遍存在着分布不均匀及空间取向不一致等问题, 导致界面抗体的活性降低乃至失活, 极大程度上限制了蛋白的快速高灵敏检测^[39, 80, 111, 112]。将抗体通过 DNA 桥联在 DNA 四面体纳米界面上, 由于 DNA 四面体的界面调控作用, 抗体在界面上更加均匀分布, 且提高了空间取向自由度, 有利于抗原蛋白的结合; 同时 DNA 四面体组装界面上组装缺陷的减少以及 DNA 四面体的刚性空间结构也降低了非特异性吸附, 可显著提高靶蛋白检测的灵敏度。结果表明, 该方法最低可实现 100 pg/mL 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的

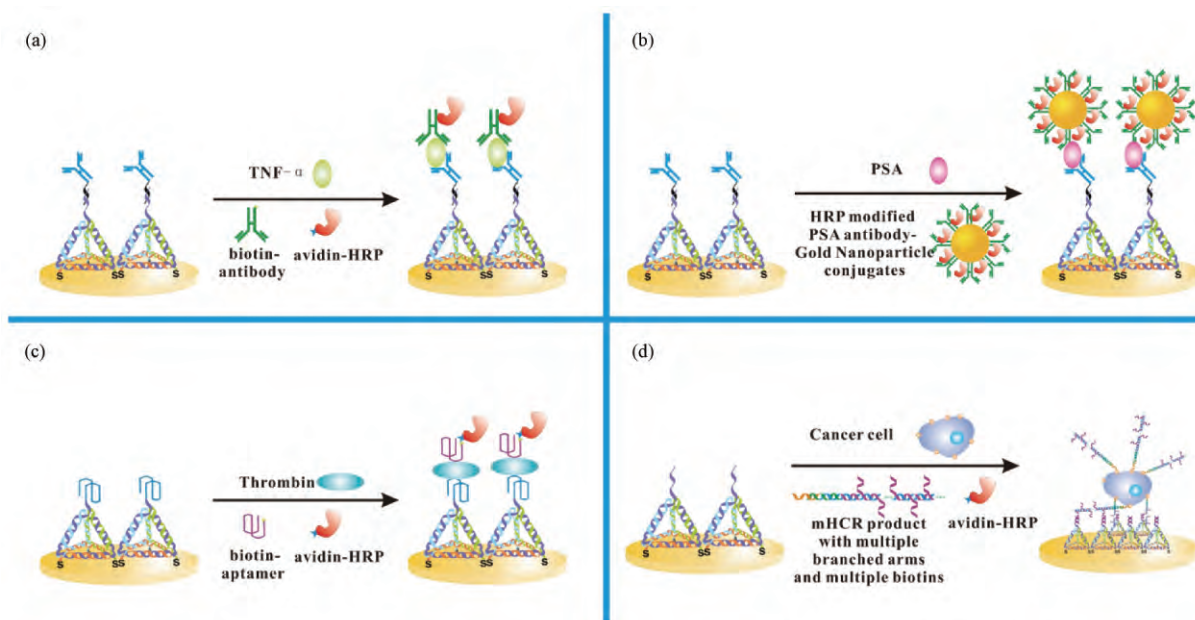


图 4 基于 DNA 三维纳米结构探针的蛋白检测示意图: (a) 基于抗体偶联法的 TNF- α 酶联免疫检测^[80]; (b) 基于纳米金信号放大法对 PSA 高灵敏检测^[39]; (c) 基于核酸适配体夹心法对凝血酶蛋白的检测^[74]; (d) 结合 aptamer 对癌细胞特异膜蛋白抗原的靶向识别及 DNA 杂交实现癌细胞的高灵敏检测^[97]

Fig. 4 Scheme of proteins detection based on TDNs. (a) TNF- α detection by modifying the antibody on TDNs^[80]. (b) PSA detection with higher sensitivity by signal amplification with HRP modified gold nanoparticles^[39]. (c) Thrombin detection based on the sandwich structure of two aptamers on TDNs^[74]. (d) Cancer cells detection by targeting the specific protein on cell membrane with the combination of DNA hybridization and aptamer-protein recognition^[97]

检测,进一步通过连接在金纳米颗粒上的信号抗体对检测信号进一步放大,可将前列腺特异抗原(PSA)的检测限降低到1 pg/mL。更为重要的一点是通过DNA探针的解螺旋,结合有靶标蛋白的抗体脱离固相界面,进一步通过DNA杂交反应可以将识别抗体连接到四面体顶端,实现生物传感界面再生。这一过程避免了在界面上多次重复固定DNA四面体,可降低检测成本并简化操作。该方法不仅在临床样品分析与传统方法保持高度一致性,且具有较好普适性,对于甲胎蛋白(AFP)及癌胚抗原(CEA)同样具有优异的检测效果,有望进一步推广应用(图4)。

除了抗体对蛋白的特异性识别外,具有特定序列的核酸适配体同样能特异性结合目标蛋白,并具有亲和性强及特异性高的特点。核酸适配体由于其成本低廉、性质稳定及方便修饰等,越来越多地被应用于生物传感检测中。Pei等将核酸适配体延伸在DNA四面体顶端并特异性捕获凝血酶蛋白,再用另一段生物素化的核酸适配体共同组成夹心结构,通过酶联信号放大实现对靶蛋白凝血酶的高灵敏检测^[74]。该方法最低可检测到100 pM的凝血酶蛋白,比单链核酸适配体探针组装界面的检测灵敏度提高了三个数量级。更进一步,结合DNA四面体探针的核酸检测能力及核酸适配体对细胞膜蛋白的特异性结合作用,可实现对肿瘤细胞的特异性捕获与检测,检测灵敏度达到4个MCF-7细胞^[97]。

4.3 小分子检测

与核酸、蛋白等生物大分子不同,小分子由于其结构简单、性质单一,特异作用少,检测方法更为局限。通过光谱分析法,如红外吸收、拉曼散射等,可以对小分子结构精确分析,但是存在靶分子特征峰不明显、样品分离度要求高和分析方法复杂等问题。

通过抗体捕获法也可以对一部分小分子进行特异性检测,但是一般只能适用于竞争结合法,相对灵敏度不高^[5]。核酸适配体可以特异性结合小分子,如可卡因(cocaine)、三磷酸腺苷(ATP)、阿霉素(DOX)等,并已应用于小分子传感检测中^[22, 43-45, 50, 52, 54]。核酸适配体虽然可以特异性捕获靶分子,但是由于小分子结构简单、体积较小,难以构建夹心法检测策略并进行信号放大;另外,传统组装方法由于核酸适配体的密度和取向不可控,导致检测灵敏度相对较差。

核酸适配体切割技术为构建小分子的三明治夹心法检测提供了契机,联合DNA四面体纳米结构界面组装技术,可以充分发挥核酸适配体的优势,实现小分子灵敏检测。将可卡因的核酸适配体分割为两段,其中一段作为捕获探针,而另一段作为信号探针^[45]。DNA四面体纳米结构结合可实现捕获探针的高效组装,保证了可卡因的高效识别,将可卡因的检测限降低至33 nM,远低于文献报道中微摩尔的检测限^[78]。在血清混合液等复杂体系中同样表现出优异的检测效果,有望应用于现场检测之中(图5)。

4.4 细胞和活体检测

DNA四面体纳米结构探针不仅可以在体外生物传感检测中发挥重要作用,在体内以及细胞内检测平台的发展中也独具特色^[65, 67-71]。研究发现,DNA四面体纳米结构探针不需要跨膜试剂的辅助就可以跨过细胞膜,进入细胞(图6)。与单链DNA相比,四面体纳米结构探针具有较强的胞内稳定性,为构建稳定的细胞内检测探针奠定了基础^[113]。更进一步,利用DNA纳米结构可精确设计的特点,可将DNA四面体的棱上序列替换为具有响应性的序列(例如ATP的核酸适配体等),与序列相连的四面

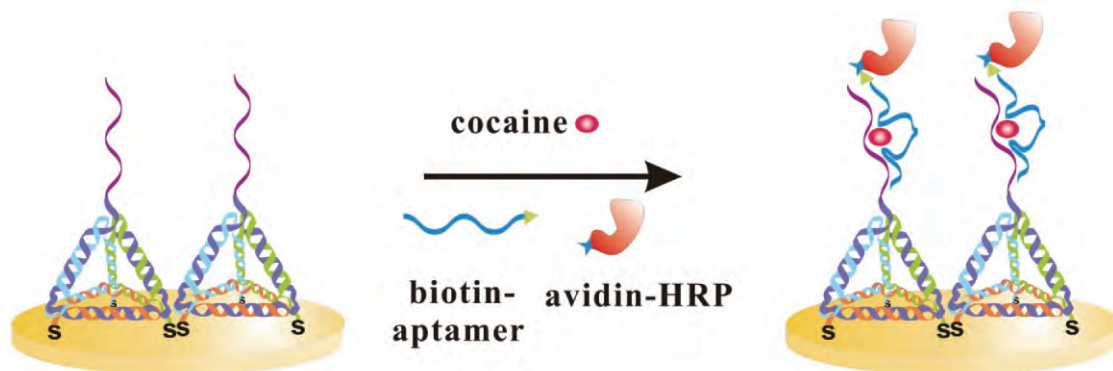


图5 DNA三维纳米结构上基于核酸适配体分段夹心法的可卡因检测^[78]

Fig. 5 Cocaine detection based on the sandwich of cocaine aptamer on TDNs^[78]

体顶点可进行信号标记(例如可用于荧光共振能量转移(FRET)的荧光分子),则可实现细胞内 ATP 的检测与细胞内成像^[79]。

为了进一步提高 DNA 四面体在细胞内的靶向检测,Liang 等通过全内反射显微镜对荧光标记的 DNA 四面体在胞内的运输途径进行了系统研究(图 6)。研究表明 DNA 四面体在细胞膜上主要通过小窝蛋白介导的内吞途径进入细胞,通过微管依赖的途径在胞内运输,最终主要停留在溶酶体中,并在 24 h 仍可以保持完整四面体结构^[113]。为了将 DNA 四面体纳米结构探针靶向定位到细胞内的特定细胞器,Liang 等通过在 DNA 四面体上连接核定位序列(Nuclear localization sequence,NLS)多肽,观察到 DNA 四面体从溶酶体逃逸并进入细胞核内。该研究对于 DNA 四面体在细胞内的靶向检测奠定了基础。

在动物水平,免疫系统的防御机制会大大降低探针分子的稳定性。Jiang 等发现在 80% 的小鼠血清中 20 bp 的双链 DNA 仅能稳定存在 1 h;而 DNA 四面体可稳定存在 12 h。当 DNA 四面体侧链上伸出一条手臂链时,其能进一步抵抗血清的消化作用,

在血清中 24 h 时仍未完全降解^[68]。通过荧光及放射性标记进一步研究该手臂链四面体在小鼠体内代谢与分布,结果表明其经血液循环迅速分布,半衰期为 6 min,是 DNA 双链的两倍。并且在四面体上连接叶酸后,该四面体探针具有靶向小鼠肿瘤细胞的叶酸受体功能,实现了 DNA 四面体在体内的靶向传感成像(图 6)。

5 总结与展望

DNA 四面体作为一种简单而有序的 DNA 三维纳米结构,具有精确可编码、结构稳定、尺寸可控及易于修饰等优点。从几何学角度分析,四面体具有几何构型简单和结构稳定性良好等特点;而六面体等其他三维结构具有更复杂的几何构型。从生物探针角度分析,通过对 DNA 四面体底面的顶点进行疏基修饰,即可实现四面体在固相界面的组装,并且顶端只剩唯一顶点用来修饰生物识别分子(如 DNA、抗体和核酸适配体等),容易实现生物分子的界面组装调控。我们利用 DNA 四面体纳米结构在界面自组装的熵驱特性,实现了多种探针分子在金电极上的均一和可控组装,并且改变 DNA 四面体的纳米

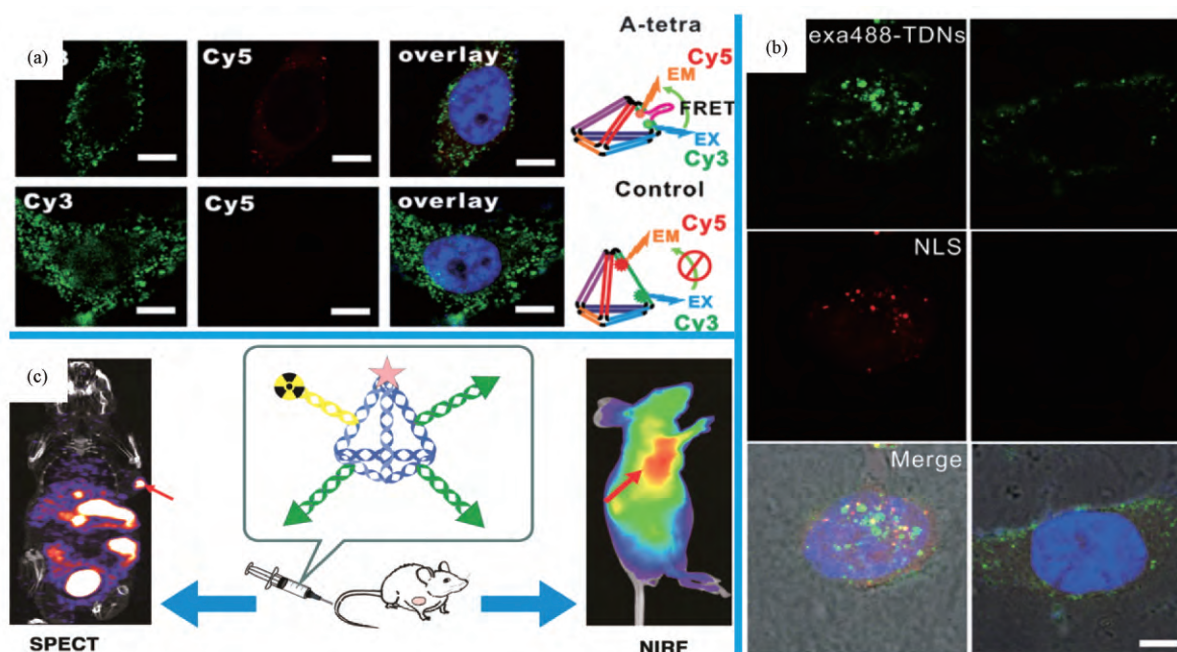


图 6 基于 DNA 三维纳米结构探针的体内检测:(a) 基于 DNA 四面体 ATP 响应结构的细胞内 ATP 传感成像^[79]; (b) 连接 NLS 多肽的 DNA 四面体探针在细胞内对细胞核的靶向定位^[113]; (c) 多臂 DNA 四面体叶酸探针在小鼠体内对肿瘤组织的靶向成像^[68]

Fig. 6 In vivo detection within TDNs. (a) Intracellular ATP sensing using reconfigurable TDNs^[79]. (b) Targeting of TDNs to cell nucleus by linked with NLS peptides^[113]. (c) Targeting imaging of tumor in mice using folic acid modified multiple armed TDNs^[68]

尺寸可进一步调节探针间的纳米距离,从而对分子识别动力学及热力学进行最优化。结合 DNA 四面体探针的优异特性及多种信号放大方式,我们实现了对体外核酸、蛋白及小分子的高灵敏检测以及体内/胞内的小分子和肿瘤组织的传感成像。

基于医学诊断及生物研究应用的进一步需求,生物传感检测不再满足于简单样本中的一次性检测,迫切需要能够对临床样本中单靶标或多靶标的持续性动态监测,以及体内靶分子动态分布的实时监控。为了能够满足当前应用研究的需求,我们在创建生物传感方法时需要通过在 DNA 纳米结构的组装控制、结构调控及信号输出等方面做进一步的设计,使其能够满足生物传感检测新的需求。如我们已经通过 DNA 四面体结构的别构效应调控 DNA 的杂交,实现 DNA 检测灵敏度及检测区间的动态调控。在下一步的工作中我们还需要对 DNA 四面体探针的组装过程进一步精确调控,实现同种界面多种 DNA 探针链分布的精确可控。此外,我们还需要将基于 DNA 纳米结构的生物传感与微流控技术、计算机技术等相结合,实现检测操作自动化、检测装置小型化、信号响应快速化和信号输出多元化,使生物传感检测方法实现临床转化应用。在给生物传感性能带来提升的同时,我们也希望 DNA 纳米技术能在更多领域发挥独特优势。

参考文献

- [1] Fan C, Plaxco K W, Heeger A J. *Trends Biotechnol.*, 2005, 23: 186.
- [2] Kelley S O, Mirkin C A, Walt D R, Ismagilov R F, Toner M, Sargent E H. *Nat. Nanotechnol.*, 2014, 9: 969.
- [3] Song S, Qin Y, He Y, Huang Q, Fan C, Chen H Y. *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39: 4234.
- [4] Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. *Chem. Rev.*, 2015, 115: 12491.
- [5] Shen J W, Li Y B, Gu H S, Xia F, Zuo X L. *Chem. Rev.*, 2014, 114: 7631.
- [6] Li D, Song S, Fan C. *Acc. Chem. Res.*, 2010, 43: 631.
- [7] Fan C, Wang S, Hong J W, Bazan G C, Plaxco K W, Heeger A J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, 100: 6297.
- [8] Fan C, Plaxco K W, Heeger A J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, 100: 9134.
- [9] Fan C, Plaxco K W, Heeger A J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124: 5642.
- [10] Zuo X, He S, Li D, Peng C, Huang Q, Song S, Fan C. *Langmuir*, 2010, 26: 1936.
- [11] Fan C H, Li G X, Zhu D X. *Chinese J. Chem.*, 2000, 18: 115.
- [12] Pei H, Li F, Wan Y, Wei M, Liu H, Su Y, Chen N, Huang Q, Fan C. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134: 11876.
- [13] Pei H, Li J, Lv M, Wang J, Gao J, Lu J, Li Y, Huang Q, Hu J, Fan C. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134: 13843.
- [14] Peng T, Qin W, Wang K, Shi J, Fan C, Li D. *Anal. Chem.*, 2015, 87: 9403.
- [15] Li K, Qin W, Li F, Zhao X, Jiang B, Wang K, Deng S, Fan C, Li D. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52: 11542.
- [16] Shen J, Xu L, Wang C, Pei H, Tai R, Song S, Huang Q, Fan C, Chen G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53: 8338.
- [17] Song S, Liang Z, Zhang J, Wang L, Li G, Fan C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48: 8670.
- [18] Yan J, Hu C, Wang P, Zhao B, Ouyang X, Zhou J, Liu R, He D, Fan C, Song S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54: 2431.
- [19] Zhang Y, Chao J, Liu H, Wang F, Su S, Liu B, Zhang L, Shi J, Wang L, Huang W, Wang L, Fan C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, 55: 8036.
- [20] Zhang Y, Li Q, Guo L, Huang Q, Shi J, Yang Y, Liu D, Fan C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, 55: 12450.
- [21] Zheng X, Liu Q, Jing C, Li Y, Li D, Luo W, Wen Y, He Y, Huang Q, Long Y T, Fan C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50: 11994.
- [22] Xia F, Zuo X, Yang R, Xiao Y, Kang D, Vallee-Belisle A, Gong X, Yuen J D, Hsu B B, Heeger A J, Plaxco K W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, 107: 10837.
- [23] Deng W P, Dou Y Z, Song P, Xu H, Aldalbahi A, Chen N, El-Sayed N N, Gao J M, Lu J X, Song S P, Zuo X L. *J. Electroanal. Chem.*, 2016, 777: 117.
- [24] Yang F, Zuo X, Li Z, Deng W, Shi J, Zhang G, Huang Q, Song S, Fan C. *Adv. Mater.*, 2014, 26: 4671.
- [25] Kang D, Zuo X, Yang R, Xia F, Plaxco K W, White R J. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 9109.
- [26] Zhang H, Jia S, Lv M, Shi J, Zuo X, Su S, Wang L, Huang W, Fan C, Huang Q. *Anal. Chem.*, 2014, 86: 4047.
- [27] Wang S P, Cai X Q, Wang L H, Li J, Li Q, Zuo X L, Shi J Y, Huang Q, Fan C H. *Chem. Sci.*, 2016, 7: 2722.
- [28] Kang D, White R J, Xia F, Zuo X L, Vallee-Belisle A, Plaxco K W. *NPG Asia Mater.*, 2012, 4: e1.
- [29] Soleymani L, Fang Z C, Lam B, Bin X M, Vasilyeva E, Ross A J, Sargent E H, Kelley S O. *ACS Nano*, 2011, 5: 3360.
- [30] Bin X M, Sargent E H, Kelley S O. *Anal. Chem.*, 2010, 82: 5928.
- [31] Lam B, Das J, Holmes R D, Live L, Sage A, Sargent E H, Kelley S O. *Nat. Commun.*, 2013, 4: 2001.
- [32] Soleymani L, Fang Z C, Sargent E H, Kelley S O. *Nat. Nanotechnol.*, 2009, 4: 844.
- [33] Zhu D, Chao J, Pei H, Zuo X, Huang Q, Wang L, Huang W, Fan C. *ACS Appl. Mater. Inter.*, 2015, 7: 11047.
- [34] Zhu D, Pei H, Chao J, Su S, Aldalbahi A, Rahaman M, Wang L, Wang L, Huang W, Fan C, Zuo X. *Nanoscale*, 2015, 7: 18671.
- [35] Zhu D, Pei H, Yao G, Wang L, Su S, Chao J, Wang L,

- Aldalbahi A, Song S, Shi J, Hu J, Fan C, Zuo X. *Adv. Mater.*, 2016, 28: 6860.
- [36] Zhu D, Song P, Shen J, Su S, Chao J, Aldalbahi A, Zhou Z, Song S, Fan C, Zuo X, Tian Y, Wang L, Pei H. *Anal. Chem.*, 2016, 88: 4949.
- [37] Zhu D, Zuo X, Fan C. *Sci. China-Chem.*, 2015, 45: 1214.
- [38] Lu N, Pei H, Ge Z, Simmons C R, Yan H, Fan C. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134: 13148.
- [39] Chen X Q, Zhou G B, Song P, Wang J J, Gao J M, Lu J X, Fan C H, Zuo X L. *Anal. Chem.*, 2014, 86: 7337.
- [40] Lin M, Wang J, Zhou G, Wang J, Wu N, Lu J, Gao J, Chen X, Shi J, Zuo X, Fan C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54: 2151.
- [41] Vallee-Belisle A, Ricci F, Plaxco K W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, 106: 13802.
- [42] Xia F, White R J, Zuo X, Patterson A, Xiao Y, Kang D, Gong X, Plaxco K W, Heeger A J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132: 14346.
- [43] Xia F, Zuo X, Yang R, White R J, Xiao Y, Kang D, Gong X, Lubin A A, Vallee-Belisle A, Yuen J D, Hsu B Y, Plaxco K W. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132: 8557.
- [44] Zuo X, Song S, Zhang J, Pan D, Wang L, Fan C. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129: 1042.
- [45] Zuo X, Xiao Y, Plaxco K W. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131: 6944.
- [46] Cash K J, Heeger A J, Plaxco K W, Xiao Y. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 656.
- [47] Hsieh K, White R J, Ferguson B S, Plaxco K W, Xiao Y, Soh H T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50: 11176.
- [48] Xiao Y, Lubin A A, Heeger A J, Plaxco K W. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44: 5456.
- [49] Xiao Y, Uzawa T, White R J, Demartini D, Plaxco K W. *Electroanalysis*, 2009, 21: 1267.
- [50] Swensen J S, Xiao Y, Ferguson B S, Lubin A A, Lai R Y, Heeger A J, Plaxco K W, Soh H T. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131: 4262.
- [51] Xiao Y, Lou X, Uzawa T, Plakos K J, Plaxco K W, Soh H T. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131: 15311.
- [52] Xiao Y, Piorek B D, Plaxco K W, Heeger A J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 17990.
- [53] Xiao Y, Qu X, Plaxco K W, Heeger A J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129: 11896.
- [54] Xiao Y, Rowe A A, Plaxco K W. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129: 262.
- [55] White R J, Phares N, Lubin A A, Xiao Y, Plaxco K W. *Langmuir*, 2008, 24: 10513.
- [56] Xiao Y, Lai R Y, Plaxco K W. *Nat. Protoc.*, 2007, 2: 2875.
- [57] Zhu Y, Earnest T, Huang Q, Cai X, Wang Z, Wu Z, Fan C. *Adv. Mater.*, 2014, 26: 7889.
- [58] Su S, Wu Y, Zhu D, Chao J, Liu X, Wan Y, Su Y, Zuo X, Fan C, Wang L. *Small*, 2016, 12: 3794.
- [59] Yao G, Li J, Chao J, Pei H, Liu H, Zhao Y, Shi J, Huang Q, Wang L, Huang W, Fan C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54: 2966.
- [60] Liu G, Sun C, Li D, Song S, Mao B, Fan C, Tian Z. *Adv. Mater.*, 2010, 22: 2148.
- [61] Wang F, Fan C. *Nat. Chem.*, 2016, 8: 738.
- [62] Zheng J P, Birktoft J J, Chen Y, Wang T, Sha R J, Constantinou P E, Ginell S L, Mao C D, Seeman N C. *Nature*, 2009, 461: 74.
- [63] Goodman R P, Schaap I A T, Tardin C F, Erben C M, Berry R M, Schmidt C F, Turberfield A J. *Science*, 2005, 310: 1661.
- [64] Han D R, Pal S, Nangreave J, Deng Z T, Liu Y, Yan H. *Science*, 2011, 332: 342.
- [65] Li J, Pei H, Zhu B, Liang L, Wei M, He Y, Chen N, Li D, Huang Q, Fan C. *ACS Nano*, 2011, 5: 8783.
- [66] Li J, Fan C, Pei H, Shi J, Huang Q. *Adv. Mater.*, 2013, 25: 4386.
- [67] Chen N, Li J, Song H, Chao J, Huang Q, Fan C. *Acc. Chem. Res.*, 2014, 47: 1720.
- [68] Jiang D, Sun Y, Li J, Li Q, Lv M, Zhu B, Tian T, Cheng D, Xia J, Zhang L, Wang L, Huang Q, Shi J, Fan C. *ACS Appl. Mater. Inter.*, 2016, 8: 4378.
- [69] Wei M, Chen N, Li J, Yin M, Liang L, He Y, Song H, Fan C, Huang Q. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51: 1202.
- [70] Wei M, Li J, Chen N, Huang Q, Fan C. *Chinese Sci. Bull.*, 2014, 59: 133.
- [71] Chen N, Wei M, Sun Y, Li F, Pei H, Li X, Su S, He Y, Wang L, Shi J, Fan C, Huang Q. *Small*, 2014, 10: 368.
- [72] Pei H, Zuo X, Zhu D, Huang Q, Fan C. *Acc. Chem. Res.*, 2014, 47: 550.
- [73] Abi A, Lin M H, Pei H, Fan C H, Ferapontova E E, Zuo X L. *ACS Appl. Mater. Inter.*, 2014, 6: 8928.
- [74] Pei H, Lu N, Wen Y, Song S, Liu Y, Yan H, Fan C. *Adv. Mater.*, 2010, 22: 4754.
- [75] Ge Z, Lin M, Wang P, Pei H, Yan J, Shi J, Huang Q, He D, Fan C, Zuo X. *Anal. Chem.*, 2014, 86: 2124.
- [76] Lin M, Wen Y, Li L, Pei H, Liu G, Song H, Zuo X, Fan C, Huang Q. *Anal. Chem.*, 2014, 86: 2285.
- [77] Song P, Li M, Shen J, Pei H, Chao J, Su S, Aldalbahi A, Wang L, Shi J, Song S, Wang L, Fan C, Zuo X. *Anal. Chem.*, 2016, 88: 8043.
- [78] Wen Y, Pei H, Wan Y, Su Y, Huang Q, Song S, Fan C. *Anal. Chem.*, 2011, 83: 7418.
- [79] Pei H, Liang L, Yao G, Li J, Huang Q, Fan C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51: 9020.
- [80] Pei H, Wan Y, Li J, Hu H, Su Y, Huang Q, Fan C. *Chem. Commun.*, 2011, 47: 6254.
- [81] Wen Y, Liu G, Pei H, Li L, Xu Q, Liang W, Li Y, Xu L, Ren S, Fan C. *Methods*, 2013, 64: 276.
- [82] Pei H, Zuo X L, Pan D, Shi J Y, Huang Q, Fan C H. *NPG Asia Mater.*, 2013, 5: e51.
- [83] Wen Y, Pei H, Shen Y, Xi J, Lin M, Lu N, Shen X, Li J, Fan C. *Sci. Rep.*, 2012, 2: 867.

- [84] Bracha D , Karzbrun E , Shemer G , Pincus P A , Bar-Ziv R H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,2013 ,110: 4534.
- [85] Gong P , Levicky R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,2008 ,105: 5301.
- [86] Guan J J , Lee J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,2005 ,102: 18321.
- [87] Opdahl A , Petrovykh D Y , Kimura-Suda H , Tarlov M J , Whitman L J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,2007 ,104: 9.
- [88] Lao R , Song S , Wu H , Wang L , Zhang Z , He L , Fan C. *Anal. Chem.* ,2005 ,77: 6475.
- [89] Zhang J , Lao R , Song S , Yan Z , Fan C. *Anal. Chem.* ,2008 ,80: 9029.
- [90] Zhang J , Song S , Zhang L , Wang L , Wu H , Pan D , Fan C. *J. Am. Chem. Soc.* ,2006 ,128: 8575.
- [91] Campuzano S , Kuralay F , Lobo-Castanon M J , Bartosik M , Vyvahare K , Palecek E , Haake D A , Wang J. *Biosens. Bioelectron.* ,2011 ,26: 3577.
- [92] Liu G , Wan Y , Gau V , Zhang J , Wang L , Song S , Fan C. *J. Am. Chem. Soc.* ,2008 ,130: 6820.
- [93] Xiao Y , Lubin A A , Baker B R , Plaxco K W , Heeger A J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,2006 ,103: 16677.
- [94] Dong S , Zhao R , Zhu J , Lu X , Li Y , Qiu S , Jia L , Jiao X , Song S , Fan C , Hao R , Song H. *ACS Appl. Mater. Inter.* ,2015 ,7: 8834.
- [95] Li Z , Zhao B , Wang D , Wen Y , Liu G , Dong H , Song S , Fan C. *ACS Appl. Mater. Inter.* ,2014 ,6: 17944.
- [96] Wang D , Fu Y , Yan J , Zhao B , Dai B , Chao J , Liu H , He D , Zhang Y , Fan C , Song S. *Anal. Chem.* ,2014 ,86: 1932.
- [97] Zhou G , Lin M , Song P , Chen X , Chao J , Wang L , Huang Q , Huang W , Fan C , Zuo X. *Anal. Chem.* ,2014 ,86: 7843.
- [98] Ge Z , Fan C , Yan H. *Chinese Sci. Bull.* ,2014 ,59: 146.
- [99] Lin M , Song P , Zhou G , Zuo X , Aldalbah A , Lou X , Shi J , Fan C. *Nat. Protoc.* ,2016 ,11: 1244.
- [100] Chen S , Dou Y , Zhao Z , Li F , Su J , Fan C , Song S. *Anal. Chem.* ,2016 ,88: 3476.
- [101] Wen Y L , Wang L L , Xu L , Li L Y , Ren S Z , Cao C M , Jia N Q , Aldalbah A , Song S P , Shi J Y , Xia J Y , Liu G , Zuo X L. *The Analyst* ,2016 ,141: 5304.
- [102] Chao J , Zhu D , Zhang Y , Wang L , Fan C. *Biosens. Bioelectron.* ,2016 ,76: 68.
- [103] Li Y , Wen Y , Wang L , Liang W , Xu L , Ren S , Zou Z , Zuo X , Fan C , Huang Q , Liu G , Jia N. *Biosens. Bioelectron.* ,2015 ,67: 364.
- [104] Wan Y , Wang P , Su Y , Zhu X , Yang S , Lu J , Gao J , Fan C , Huang Q. *Biosens. Bioelectron.* ,2014 ,55: 231.
- [105] Wang P , Wan Y , Deng S , Yang S , Su Y , Fan C , Aldalbah A , Zuo X. *Biosens. Bioelectron.* ,2016 ,86: 536.
- [106] Deng W , Xu B , Hu H , Li J , Hu W , Song S , Feng Z , Fan C. *Sci. Rep.* ,2013 ,3: 1789.
- [107] Lu J , Getz G , Miska E A , Alvarez-Saavedra E , Lamb J , Peck D , Sweet-Cordero A , Ebert B L , Mak R H , Ferrando A A , Downing J R , Jacks T , Horvitz H R , Golub T R. *Nature* ,2005 ,435: 834.
- [108] Pritchard C C , Cheng H H , Tewari M. *Nat. Rev. Genet.* ,2012 ,13: 358.
- [109] Qin D , Xia Y N , Whitesides G M. *Nat. Protoc.* ,2010 ,5: 491.
- [110] Nam J M , Thaxton C S , Mirkin C A. *Science* ,2003 ,301: 1884.
- [111] Shi J X , Zhang X E , Xie W H , Zhou Y F , Zhang Z P , Deng J Y , Cass A E G , Zhang Z L , Pang D W , Zhang C G. *Anal. Chem.* ,2004 ,76: 632.
- [112] Shao W H , Zhang X E , Liu H , Zhang Z P. *Bioconjugate Chem.* ,2000 ,11: 822.
- [113] Liang L , Li J , Li Q , Huang Q , Shi J , Yan H , Fan C. *Angew. Chem. Int. Ed.* ,2014 ,53: 7745.