DNA自组装结构在纳米诊疗中的应用

代江兵^{1,2}, 谷佩霖^{1,2}, 冯灵玉^{1,2}, 李宇^{1,2}, 彭红珍^{1,2,3}, 李晴暖¹, 王丽华^{1,3}, 樊春海^{4*}

1. 中国科学院上海应用物理研究所, 中国科学院界面物理与技术重点实验室, 上海 201800

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 中国科学院上海高等研究院, 上海 201210

4. 上海交通大学化学化工学院, 上海 200240

*通讯作者, E-mail: fanchunhai@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2019-02-12; 接受日期: 2019-03-12; 网络版发表日期: 2019-04-29

国家自然科学基金(编号: 21675167, 31571014)、中国科学院前沿科学重点研究(编号: QYZDJ-SSW-SLH031-02)和中国科学院王宽诚率先人才计划-卢嘉锡国际团队项目资助

摘要 DNA分子具有良好的生物相容性和可编程性, 被广泛用于构建新型纳米生物材料. 研究者利用DNA纳米技术已构建了尺寸、形貌及对称性精确可控且可对环境条件做出特异性响应的DNA自组装结构, 它们在生物成像及检测、药物的精准输送等纳米诊疗领域有着极大的应用潜力. 然而, DNA纳米材料应用于活体系统存在稳定性不足、细胞摄取效率不高以及药物的包裹及可控释放程度不够等问题. 本文简述了DNA自组装结构的构建方法以及将这些结构用于生物成像、生物检测和药物载带方面的进展, 概括了提高DNA自组装结构体内稳定性及细胞摄取效率的方法, 最后讨论了DNA自组装结构应用于纳米诊疗中所面临的机遇与尚待解决的问题.

关键词 DNA自组装结构, 生物成像, 生物检测, 药物载体

1 引言

1983年, Seeman等^[1]利用DNA分子的互补配对, 自组装形成了具有高度几何对称性的“DNA四臂结”, 开启了DNA纳米技术时代. 单链DNA为柔性分子, 理论上它的刚性长度小于1 nm, 可以轻易地形成环状和各种曲率的纳米结构; 双链DNA在长度小于50 nm时是一个直径为2 nm左右的刚性纳米棒^[2]. 研究者利用DNA单链的柔性和DNA双链的刚性, 通过精巧的设计, 已经构建了大量形态各异、结构精密的DNA纳米装置^[3,4]. DNA分子遵循Watson-Crick碱基配对原则, 具

有编程性和寻址性, 可实现DNA纳米结构的精确操控^[5~7]. 这是DNA纳米材料有别于其他纳米材料的独特的性质. 同时, DNA作为一种生物体的内源性分子, 具有很好的生物相容性, 在体内和体外环境中均能正常的发挥功能, 基本不会对生物系统的正常功能造成不利的影响^[8,9]. 而且, DNA的化学性质稳定, 使用固定相合成的方法可以轻易地获得特定的序列. 这些优点使得DNA成为一种理想的基础纳米材料^[10,11].

DNA纳米技术的进步涉及化学、生物、物理、医药等各个学科, 极大地促进了纳米生物学的发展^[12]. DNA纳米技术的主要目标是构建结构和性质精确可

引用格式: Dai J, Gu P, Feng L, Li Y, Peng H, Li Q, Wang L, Fan C. Self-assembled DNA structures for nanotheranostic applications. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 1137–1148, doi: 10.1360/SSC-2019-0017

控的DNA自组装结构,并将其用于生物系统的调控^[13]. 目前, DNA自组装结构在纳米诊疗领域展现出极大的应用潜力. 本文主要介绍了DNA自组装结构的构建方法以及这些结构在生物检测和药物治疗方面的应用,分析了DNA自组装结构在纳米诊疗领域存在的问题及相应的解决方案,最后展望了DNA自组装结构在纳米诊疗领域的应用前景.

2 DNA自组装结构的构建

2.1 DNA模块化组装(tile自组装)

Tile自组装是指将具有多个黏性末端(sticky end)的DNA模块单元(即tile)通过互补结合形成复杂的二维和三维结构,这是DNA自组装的一个重要思路. Seeman教授^[14]最早组装的DNA四臂结模块太过柔软(图1(a)), 利用该模块不能实现大尺寸结构的组装. 随后, Seeman课题组^[15]设计了刚性更强的DX模块(double-crossover tile)、TX (triple-crossover)模块、3螺旋和6螺旋管、十字交叉结、三臂结模块,并用它们组装得到了周期性的阵列结构^[16]. 利用模块化的组装方法也可以得到三维立体的结构. Mao课题组^[17]使用具有高度对称性的三臂结模块分层组装得到了四面体、立方

体、二十面体等一系列结构(图1(b)). Seeman和Mao等^[18,19]使用三臂结模块组装得到的DNA晶体(图1(c)), 是这种利用对称性结构进行周期性组装的重要里程碑. 它标志着我们不但可以控制晶体内部的空格大小,还能控制晶格中分子的手性,只需要将右手螺旋的DNA分子替换成它的镜像异构体——左手螺旋DNA(L-DNA)就能直接改变晶体的旋光性. DNA砖块(DNA brick)是由Yin等^[20]所开发的另一种DNA模块化组装方法, DNA砖块由一系列含有4个结合位点的单链所组成. 它可以组装得到数字、字母、各种动物的形态,也可以组装形成三维结构,被称为“乐高积木”(图1(d)). 这种模块化组装方法的优点是DNA序列的设计简单、每个模块只需要几条DNA链就能合成、副产物少、组装过程简便易行、成本低廉.

2.2 DNA折纸(DNA origami)

所谓“DNA折纸术”,就是用一根长链的DNA(scaffold DNA)折叠成目标形状,再用一些短链DNA(staple strand)将形状固定. 2006年, Rothemund^[21]开创性地利用DNA折纸术构建了DNA自组装结构,如图2(a)所示,这种方法可以得到任意尺寸和形态的结构,如笑脸图形和美国地图. 通过优化算法来设计staple

图 1 DNA模块化方法构建DNA自组装结构. (a) DNA四臂结模块组装示意图^[14]; (b) 三臂结模块分层组装DNA多面体^[17]; (c) 模块组装形成DNA晶体^[19]; (d) 利用单链DNA模块模拟“乐高积木”进行组装^[20] (网络版彩图)

Figure 1 DNA tile-assembled nanostructures. (a) Self-assembly of four-armed junctions ^[14]. (b) Three-point-star motif assembled into tetrahedron, dodecahedron, or bucky ball ^[17]. (c) DNA crystal formed from DNA triangles ^[19]. (d) Single-stranded tiles strategy to create lego-like building blocks ^[20] (color online).

图 2 DNA折纸术构建二维和三维结构. (a) 利用DNA折纸术构建不同形貌的DNA自组装结构^[21]; (b) 多层DNA折纸术构建三维DNA自组装结构^[23]; (c) DNA折纸术构建DNA四面体结构^[24]; (d) 将蛋白分子用作订书钉链构建DNA自组装结构^[25] (网络版彩图)

Figure 2 DNA origami for constructing 2D and 3D structures. (a) DNA origami strategy and AFM images of three examples of DNA origami structures ^[21]. (b) Shih's multilayer origami approach and TEM images of representative structures ^[23]. (c) DNA origami-based DNA tetrahedron ^[24]. (d) DNA origami strategy involving proteins as staples instead of short DNA strands ^[25] (color online).

链,使得这种方法具有很强的通用性. DNA折纸术应用到三维纳米结构的组装已有大量文献报道: Gothelf和Kjems等^[22]利用DNA链将DNA折纸术构建的二维平面结构“缝合”在一起,形成一个中空的、盒盖能够打开或者关闭的盒状结构. Shih课题组^[23]开发了一种称为“多层折纸术”的方法,它是将DNA螺旋管密集地堆叠在一起形成各种形态的纳米结构(图2(b)),这些结构已经得到了广泛的应用. Yan等^[24]开发了另一种方法,他们将一条DNA骨架链通过反复折叠形成一个四面体的结构,通过未配对的“铰链”来确定四面体的各个面(图2(c)). 另外, Dietz等^[25]用蛋白分子代替DNA折纸术中的staple链,这些蛋白分子类似于转录激活因子,可以与特定的DNA双链区域结合,如图2(d)所示. 通过这种方式折叠骨架链得到圆环或者其他设计的结构.

相比模块化组装方法, DNA折纸术的优势是骨架链和staple链不需要精确的计量比就能实现高效组装,且可以得到更复杂的拓扑结构^[26]. DNA折纸术的最新发展方向是构建更复杂、更精细化的结构,并将其用于解决生物工程和生物医学中的问题,如纳米材料编

织、生物传感、精确给药等^[27].

2.3 DNA纳米复合材料构建多功能纳米结构

利用DNA复合材料组装多功能纳米结构,是近几年出现的一种新方法. 它主要是将金属粒子、生物分子、高分子聚合物等功能分子通过化学合成与DNA相连,在DNA碱基互补配对和功能分子相互识别的条件下,共同作用完成DNA纳米超结构的组装. 相比于DNA tile与DNA origami两种方法,该方法组装得到的DNA纳米超结构具有更强的结构复杂性和多功能性. 如图3(a)所示, Bergstrom等^[28]对DNA链的端基进行修饰,改变了DNA的线性组装,将若干条DNA链组装形成一个环状超结构. Sleiman等^[29]基于这种结构,通过互补链的杂交,组装了纳米金,说明在超结构中DNA依然保持了很好的杂交性能. Gianneschi等^[30]和Herrmann等^[31]用DNA和疏水性的聚合物合成的嵌段共聚物在水溶液中组装出了胶束,胶束中的DNA单链依然保持了杂交性能(图3(b)). Sleiman等^[32]在DNA自组装结构上连接上特定设计的聚合物,用来引导复杂有序

图3 DNA纳米复合材料组装多功能纳米结构。(a) 在DNA链的末端引入刚性的顶点组装DNA环状结构^[28]。(b) 两亲性DNA嵌段共聚物组装球形胶束或者DNA纳米棒^[31]。(c) 疏水性聚合物引导DNA立方体的有序组装^[32]。(d) 在顶点连接纳米金组装DNA三棱柱^[33]。(e) 方块折纸与多肽链通过静电相互作用组装纳米线^[35] (网络版彩图)

Figure 3 Supramolecule-templated DNA nanostructures. (a) Conjugation of synthetic vertices into DNA nanostructures [28]. (b) Spherical micelle or rod-like micelle assembled from amphiphilic DNA block copolymers [31]. (c) Micelle-of-cubes formation with DNA modified with hydrophobic polymer [32]. (d) Metal-assisted assembly of DNA triangular prism [33]. (e) DNA origami and peptides co-assembled into nanowire [35] (color online).

DNA纳米超结构的组装(图3(c)). 在DNA模块的臂结中镶嵌纳米颗粒作为支架可以更好地稳定纳米结构(图3(d))^[33]. 这种结构可以轻松地完成手性转换和电子传递. 相比于DNA, 蛋白分子具有更强的序列特异性和更精密复杂的三、四级结构, 将核酸和蛋白分子结合在一起, 发挥这两种分子的协同效应, 能构建出结构更精密、功能更强的复合结构^[34]. Ke等^[35]利用多肽链和DNA origami的协同组装制备了结构高度有序的纳米线(图3(e)). 另外, 改变DNA的碱基, 组装得到的更强稳定的DNA纳米结构产物的工作也已被报道^[36].

3 DNA自组装结构在纳米诊疗领域的应用

DNA纳米技术可以对DNA自组装结构上的配体分子(荧光分子和各种识别探针等)进行精确的编辑, 还可以设计出能对体系做出特异性响应的动态纳米装置; DNA自组装结构具有很好的生物相容性, 便于修饰、不需要转染试剂就能进入细胞, 这些优点使DNA自组装结构广泛用于生物成像、生物检测以及药物的精准输送等方面^[37]. 用于检测和成像的DNA纳米探针

主要是将传统分子探针的关键组分嫁接到DNA自组装结构上, 如荧光探针、电化学探针等^[38]. 它通常包括目标分子识别以及荧光信号放大的过程. DNA分子的可修饰性使其能够用于药物的靶向运输和可控释放, 有利于实现疾病的精准治疗. 本章主要介绍了DNA自组装结构用于生物荧光成像、电化学检测及用做药物载体等方面的应用.

3.1 DNA自组装结构用于生物荧光成像

荧光成像具有实时、原位、动态的成像优点, 对生物样品损伤小. 利用DNA自组装结构编码荧光分子构建成像探针主要有两种方法, 第一种是根据荧光分子的强度进行编码. Luo等^[39]利用DNA树枝状结构对荧光分子进行编辑(图4(a)), 精确控制了探针中不同荧光分子的数目, 利用两种常见的荧光分子组合出了具有多种荧光信号的彩色探针, 实现了多靶标DNA的同时检测. 这种方法的优点是信号的编码及读出非常简便, 缺点是编码得到的荧光探针种类较少. 另一种方法是根据荧光分子的位置进行编码, Yin等^[40]利用长度为800 nm的DNA六螺旋管将三种荧光分子组合出

图 4 DNA自组装结构用于荧光成像. (a) 利用DNA树枝状结构对荧光分子的强度编码构建荧光探针^[39]; (b) 利用DNA六螺旋对荧光分子的位置编码构建荧光探针^[40]; (c) 利用反应特异性对靶标进行标记实现荧光成像^[41]; (d) 利用探针的位置特异性实现肾脏的成像^[42] (网络版彩图)

Figure 4 Self-assembled DNA structures for fluorescence imaging. (a) Y-DNA synthesized fluorescence probe based on the ratio of fluorescence intensity [39]. (b) Fluorescent barcode constructed by geometrical encoding [40]. (c) Small molecule imaging using reaction labeling [41]. (d) Kidney imaging based on selective accumulation of DNA origami [42] (color online).

了多达216种荧光探针(图4(b)), 这些探针在全内反射显微镜(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRF)下可以被准确区分, 他们利用这种探针实现了白色念珠菌表面抗原的原位成像. 利用构建的DNA荧光探针标记靶标分子也有两种方式. 第一种是通过反应特异性对靶标进行标记成像. 这种方法的特点是可以对靶标进行原位标记, 背景信号弱, 可实现靶标的高信噪比成像. 本课题组^[41]将能对pH、Hg²⁺、ATP做出特异性响应的DNA配体引入到DNA四面体中, 利用DNA四面体的变构效应引起光学信号的变化实现对这些靶标的成像(图4(c)). 另一种方法是利用位置特异性对靶标进行成像. 我们利用DNA折纸对小鼠急性肾损伤进行成像和治疗的工作, 就是基于DNA折纸经活体代谢会聚集在肾脏的特点(图4(d))^[42]. Stasevich等^[43]在mRNA的3'非翻译区连接了24个MS2结构, 招募荧光蛋白实现了单个mRNA分子的成像等都是利用位置特异性进行标记. 这种方法对单个靶标的成像具有很好的效果, 但要实现多靶标的同时成像, 需要靶标间的

位置有明显的区分. 利用荧光修饰的DNA短链与DNA自组装结构发生随机、短暂的结合, 再结合点重构的方法, 可以实现荧光探针在几十纳米范围内的成像, 如DNA-PAINT、STORM等超分辨成像技术^[44]. 也可以利用TIRF对闪烁的荧光点进行单分子追踪^[45]. 这些技术的发展使得基于DNA自组装结构的荧光探针能更好地用于生物成像.

3.2 DNA自组装结构结合电化学用于生物检测

DNA自组装结构结合电化学技术用于生物检测是近年来发展的一种新方法, 其特点是简便易行、信噪比高、稳定性好^[46]. 2003年, Fan等^[47]将二茂铁修饰的DNA茎环结构修饰到金电极上构建了E-DNA检测探针, 开创性地构建DNA自组装结构和电化学结合的生物检测新策略. 该方法对靶标DNA的检测限可达10 pM, 同时具有很高的特异性. 这种通过DNA变构效应引起电信号变化的检测方法具有很好的普适性(图5(a)). 但是, DNA茎环结构的刚性不足致使它们在

图 5 DNA自组装结构结合电化学用于生物检测。(a) DNA茎环结构结合电化学用于DNA分子检测^[47]; (b) 利用DNA四面体控制电极表面探针的朝向和密度实现高灵敏度检测^[48]; (c) DNA四面体精确调控电极表面探针的密度和相对距离用于不同生物分子的检测^[54]; (d) 动态DNA四面体用于微环境pH的检测^[56] (网络版彩图)

Figure 5 Biodetection using self-assembled DNA structures and electrochemical process. (a) DNA stem-loop structure-based electrochemical sensor [47]. (b) Tetrahedron DNA-assisted electrochemical sensor [48]. (c) Detection of various biomarkers using tetrahedron DNA-based electrochemical platform [54]. (d) A pH sensor based on dynamic DNA tetrahedron nanodevice [56] (color online).

金电极表面容易受到聚集的影响而自发打开,产生假阳性信号。并且,此方法不能有效地控制DNA茎环结构在金电极表面的分布,影响检测的灵敏度。2010年后,我们发展了一系列基于DNA四面体的电化学传感器。DNA四面体具备优于DNA二维结构的刚性,可使探针具有固定的朝向和可控的相对位置,可实现更灵敏的检测。利用DNA四面体调控探针与金电极之间的距离,可避免探针在异质性界面的聚集,使得探针位于溶液相,提高了检测的灵敏度和选择性(图5(b))^[48,49]。我们利用DNA四面体结构的刚性在金电极表面形成了有序的单层DNA,控制了亚甲基蓝和二茂铁在金电极上的朝向和分布,对DNA介导电子转移的动力学进行了系统的研究^[50]。我们还利用DNA四面体控制金电极上探针的朝向和密度,减小了探针与靶标的位阻效应和探针相互之间的缠绕和聚集,结合杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)实现了对小RNA的检测,检测限达到了10 aM^[51]。为了进一步精确调控探

针在金电极上的密度、空间位置及朝向,我们利用不同大小的四面体控制了探针在金电极表面的组装密度^[52]。通过这些研究发现,随着探针间的距离逐渐增大,DNA探针与靶标杂交的效率升高,完成杂交所需要的时间减小,对靶标DNA的检测灵敏度可以提高4个数量级。这种探针具有更高的灵敏度,可以检测到单个碱基错配的信号。这种方法可用于小RNA、蛋白质、生物小分子和活细胞等各种靶标的快速检测,在癌症诊断治疗领域有很好的应用潜力(图5(c))^[53~55]。

此外,还可以利用动态DNA纳米机械进行生物检测。2016年,我们将可伸缩的DNA四面体修饰在金电极表面,实现了对微环境pH的检测(图5(d))^[56]。这些工作融合DNA自组装结构和电化学检测的优势,解决了传统检测方法中灵敏度不高、特异性不好的问题。

3.3 DNA自组装结构作为药物载体

纳米材料作为药物(小分子药物、蛋白和核酸药

物等)的载体实现药物的准确输送和可控释放,一直是纳米生物研究的热点. DNA自组装结构作为一种高效率、可定制的载体,具有以下优势:良好的生物相容性,靶向性,结构、形貌及表面化学修饰的可控性^[57,58]. 蒽环类药物是一类常用的小分子抗癌药物,它可以插入到DNA双链中,从而阻止生命体中生物大分子的合成. Ding和Yan等^[59]利用DNA纳米管和三角折纸载带阿霉素,可以有效地杀伤具有药物抗性的癌细胞(图6(a)). 2014年,该课题组^[60]利用DNA折纸载带阿霉素对异植肿瘤鼠进行了有效的治疗,实现了DNA自组装结构在癌症治疗领域的应用. Church课题组^[61]将抗体连接到DNA纳米管中,通过核酸适体与靶标分子的结合来控制纳米管的开合,实现了抗体药物的可控释放,有效抑制了白血病细胞的生长(图6(b)). 这种基于DNA自组装结构构建逻辑门从而控制药物释放的方法使得药物的输送和释放具有很强的可控性. 核酸药物分子可以直接通过碱基互补配对连接到DNA

自组装结构上. 未甲基化的CpG序列可以通过与Toll样受体9的结合来刺激机体产生免疫反应. Liedl课题组^[62]在由30个螺旋管组成的DNA自组装结构表面连接了62个CpG分子,它对脾脏细胞产生的免疫刺激效应与用脂质体转染的等浓度CpG相似(图6(c)),说明DNA自组装结构作为药物载体,可使核酸药物分子在体内发挥很好的药效. 另外一些核酸药物分子,如核酸适体、siRNA,通过DNA自组装结构载带进入细胞,对癌细胞发挥作用的工作也已被报道^[57]. DNA自组装结构还可以作为无机纳米颗粒的载体. Ding课题组^[63]利用三角折纸载带金棒实现了肿瘤组织的双光子成像和光热治疗. 我们利用滚轮扩增反应在纳米金的表面生长了含有重复序列的DNA长链,并将其组装成DNA方块折纸,进一步在方块折纸的表面连接了穿膜肽促使纳米金大量进入细胞(图6(d))^[64]. 这些研究充分证实DNA自组装结构作为载体可实现药物的精准投递及体内的可控释放,在纳米诊疗领域具有很大的应用潜力.

图 6 DNA自组装结构载带药物进入细胞. (a) DNA自组装结构载带小分子药物进入细胞^[59]; (b) DNA自组装结构载带蛋白质进入细胞^[61]; (c) DNA自组装结构载带核酸药物进入细胞^[62]; (d) DNA自组装结构载带无机纳米颗粒进入细胞^[64] (网络版彩图)

Figure 6 Drug delivery using self-assembled DNA structures. (a) Delivery of drug molecules with DNA origami ^[59]. (b) A DNA origami cage for conditional delivery of protein ^[61]. (c) DNA tubes for the delivery of CpG ^[62]. (d) DNA nanoribbons-assisted delivery of nanoparticles ^[64] (color online).

4 DNA自组装结构用于纳米诊疗所面临的挑战

通过简单的化学合成将功能分子(无机小分子、生物大分子、无机纳米颗粒等)定位连接到DNA自组装结构上从而形成多功能DNA复合材料^[65,66]。这些材料在纳米诊疗领域已经展现出极大的应用潜力^[67]。但是, DNA自组装材料应用于活体系统还存在一些问题, 例如, DNA自组装结构需要较高的阳离子浓度来维持结构的稳定; DNA自组装结构穿过细胞膜的能力有限; DNA自组装结构进入生物系统后, 容易被血清中的各种生物酶所降解, 这些问题都在一定程度上限制了其应用^[68]。因此, 提高DNA自组装结构的稳定性, 提升其动力学性能并改善它的细胞摄取效率就显得十分重要。

4.1 提高DNA自组装结构在体内的稳定性

DNA自组装结构应用于活体系统, 需要特别考虑它在低的镁离子浓度, 37℃以及核酸酶条件下的稳定

性。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)是一种经常用于细胞和组织培养的混合物, 其中含有多种生物酶, 对核酸分子有很强的降解作用。然而, Bermudez课题组^[69]证实DNA四面体结构在FBS中的降解速率只有单链的1/3, 他们认为这主要是由于折叠的DNA结构影响了酶与DNA链的结合, 从而阻止了生物酶对DNA链的降解作用(图7(a))。通过对DNA链进行修饰也可抑制核酸酶对DNA的降解作用。Sleiman课题组^[70]在DNA链上修饰了一条C12烷基链, 利用该复合物可以将DNA立方体连接到人体血清蛋白(human serum albumin, HSA)上, 组成一个纳米超结构(图7(b))。这种结构在血清中的稳定性达到了22 h, 而没有连接HSA的DNA立方体在血清中稳定存在的时间只有几分钟。DNA折纸术构建的纳米结构需要高浓度的镁离子来维持结构稳定。Shih等^[71]发现DNA折纸在组织培养液中的变性是随着离子浓度的降低和时间的推移逐步发生的。因而, 在培养基中加入对细胞无毒性的硫酸镁可以解决降解问题(图7(c))。Dietz等^[72]研究温度对DNA自组装结构稳定性的影响, 发现多层折纸术构建的DNA自组装结

图7 DNA自组装结构在生理条件下的稳定性。(a) DNA四面体抑制限制性内切酶对DNA链的降解作用^[69]; (b) 修饰C12烷基链的DNA立方体与HSA结合后增强立方体在血清中的稳定性^[70]; (c) 在血清中加入无毒性的镁离子增强DNA自组装结构在生理条件下的稳定性^[71]; (d) DNA的多层堆积可以增强其在血清中的稳定性^[72] (网络版彩图)

Figure 7 Improving the biostability of self-assembled DNA structures. (a) DNA tetrahedra was resistant to enzymatic digestion ^[69]. (b) Modifying the DNA nanocube with alkyl chains could increase their serum stability ^[70]. (c) Addition of Mg^{2+} in medium resulted in longer lifetimes of self-assembled DNA structures ^[71]. (d) Multilayer origami could increase the nuclease and temperature stability of self-assembled DNA structures ^[72] (color online).

构具有很强的稳定性, 它们可以在超过50℃的条件下稳定存在(图7(d)), 多层折纸还可以有效抑制核酸酶的降解作用. 这些结果说明DNA链的密集堆积、对DNA链的骨架进行化学修饰、对DNA链的端基进行保护都有利于DNA自组装结构在含有酶的培养基和较高温度下保持良好的稳定性. 另外, 使用病毒衣壳、脂质体等包裹DNA自组装结构, 也可以增强DNA自组装结构在生理环境下的稳定性.

4.2 提高DNA自组装结构的细胞摄取效率

Turberfield课题组^[73]最早探索了细胞在没有转染试剂的作用下摄取DNA自组装结构. 他们在DNA四面体的两条棱上分别修饰了Cy3和Cy5两种荧光, 通过荧光成像的方法证实了DNA四面体不需要转染试剂就能进入细胞. 利用Cy3与Cy5的能量共振转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)作用说明了进入细胞的四面体依然保持了很好的完整性. 这是一个让研究者很惊讶的结果, 因为DNA作为一种水溶性的材料, 本身又带有负电, 这会妨碍它靠近细胞膜. 但随后不久, Mirkin课题组^[74]在纳米颗粒上密集修饰DNA链构建了“球形核酸”纳米结构, 也可以在没有转染试剂的作用下高效率进入细胞. 这说明由DNA分子组装

的三维纳米结构比单链更利于细胞的摄取. 我们利用单分子荧光实验证明DNA四面体是通过受体介导的内吞作用进入细胞, 然后进入细胞的溶酶体, 它可以在细胞内稳定存在至少8 h (图8(a))^[75]. 利用靶向分子的作用可以增强细胞对DNA自组装结构的主动摄取. Mao课题组^[76]在DNA自组装结构上修饰叶酸, 通过癌细胞表面大量表达的叶酸受体介导了细胞对DNA自组装结构的摄取(图8(b)). 核酸适体可以通过DNA合成直接连接到DNA自组装结构上, 它不但可以提高细胞对DNA自组装结构的摄取效率, 而且具有特异性^[77]. Tan等^[78]利用核酸适体sgc8构建了DNA纳米火车, sgc8可以与急性白血病细胞特异性结合, 从而促使这种癌细胞高效率的摄取DNA纳米火车(图8(c)). “隐藏”DNA自组装结构也是促进细胞对DNA自组装结构摄取的有效方法. Perrault和Shih^[79]利用病毒衣壳蛋白和脂质体包裹DNA八面体, 使其免疫原性下降了2倍, 生物效应提升了17倍(图8(d)). 人体血清蛋白、小牛血清蛋白包裹的DNA自组装结构可以聚集在癌症组织, 防止吞噬细胞对DNA自组装结构进行清除^[80]. 综上所述, 相比于线性DNA链, 三维DNA自组装结构的对称性、大小和功能化修饰对细胞的摄取效率有明显的影响. 虽然裸的DNA自组装结构是通过内吞作用进入细

图 8 提高细胞对DNA自组装结构的摄取效率. (a) DNA四面体进入细胞的途径^[75]; (b) 连接靶向分子增强细胞对DNA自组装结构的摄取效率^[76]; (c) 连接核酸适体增强细胞对DNA自组装结构的摄取效率^[78]; (d) 用脂质体包裹DNA结构增强细胞对DNA自组装结构的摄取效率^[79] (网络版彩图)

Figure 8 Enhancing cellular uptake of self-assembled DNA structures. (a) Cellular uptake and transport of DNA tetrahedron ^[75]. (b) Connecting folate tags to DNA nanotubes to increase the uptake ^[76]. (c) Aptamer-tethered DNA nanotrains to enhance the uptake efficiency ^[78]. (d) Lipid-coated DNA octahedron to improve the cellular uptake of self-assembled DNA structures ^[79] (color online).

胞溶酶体,但通过对其修饰可改变被细胞摄取的途径,从而提高细胞对其的摄取效率^[81,82]。

5 总结和展望

DNA纳米技术发展到现在,研究者利用多种不同的方法构建了具有不同结构、形态和功能的DNA自组装结构,并将这些结构成功应用到纳米诊疗领域的研究中去。但是,DNA纳米技术的发展还处于早期阶段,依然面临许多问题:(1) DNA合成的成本高昂以及DNA序列的错配限制了更复杂DNA自组装结构的构建。(2) 对于DNA折纸术而言,需要更多、更长的骨架链来丰富结构的尺寸和多样性。同时,DNA序列的设计方法还需要优化,以便于更简单的合成所需的纳米

结构。(3) 超大结构的组装是通过分层组装或模块化组装实现,组装时的热力学和动力学还需要进行定量的分析,来减少发生错误组装的可能性。(4) DNA自组装结构上异质性分子的精确组装,DNA自组装结构与功能分子的可控连接等问题仍需深入研究。(5) 动态DNA自组装结构的变化效率不高、速率较慢等等。当然,随着DNA纳米技术的不断进步,它也显示出了巨大的应用前景,例如,(1) 用于生物分子和细胞的生化性质研究,如蛋白质结构解析、单分子、单细胞研究等。(2) 用于模拟生物系统,探究生物分子之间的相互作用。(3) 用于人类疾病的诊断和治疗。DNA纳米技术作为跨学科的研究领域需要不同领域的研究者共同合作来解决所面临的问题。同时,随着这项技术的发展将会为许多学科指引新的发展方向。

参考文献

- 1 Kallenbach NR, Ma RI, Seeman NC. *Nature*, 1983, 305: 829–831
- 2 Yang D, Hartman MR, Derrien TL, Hamada S, An D, Yancey KG, Cheng R, Ma M, Luo D. *Acc Chem Res*, 2014, 47: 1902–1911
- 3 Pinheiro AV, Han D, Shih WM, Yan H. *Nat Nanotech*, 2011, 6: 763–772
- 4 Wang P, Meyer TA, Pan V, Dutta PK, Ke Y. *Chem*, 2017, 2: 359–382
- 5 Yang D, Campolongo MJ, Nhi Tran TN, Ruiz RCH, Kahn JS, Luo D. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2010, 2: 648–669
- 6 Tan LH, Xing H, Lu Y. *Acc Chem Res*, 2014, 47: 1881–1890
- 7 Seeman NC, Sleiman HF. *Nat Rev Mater*, 2017, 3: 17068
- 8 Bujold KE, Lacroix A, Sleiman HF. *Chem*, 2018, 4: 495–521
- 9 Pan L, Kong H, Sun Y, Wang L, Fan C, Zhu Y. *Sci Sin Chim*, 2016, 46: 188–194 (in Chinese) [潘亮, 孔华庭, 孙艳红, 王丽华, 樊春海, 诸颖. 中国科学: 化学, 2016, 46: 188–194]
- 10 Roh YH, Ruiz RCH, Peng S, Lee JB, Luo D. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 5730–5744
- 11 Xing S, Jiang D, Cui C, Wang L, Huang Q. *Sci Sin Chim*, 2015, 45: 1220–1225 (in Chinese) [邢淑, 江大卫, 崔呈俊, 王丽华, 黄庆. 中国科学: 化学, 2015, 45: 1220–1225]
- 12 Chandrasekaran AR, Levchenko O. *Chem Mater*, 2016, 28: 5569–5581
- 13 Dave N, Liu J. *ACS Nano*, 2011, 5: 1304–1312
- 14 Seeman NC. *Nature*, 2003, 421: 427–431
- 15 Winfree E, Liu F, Wenzler LA, Seeman NC. *Nature*, 1998, 394: 539–544
- 16 Lin C, Liu Y, Rinker S, Yan H. *ChemPhysChem*, 2010, 7: 1641–1647
- 17 He Y, Ye T, Su M, Zhang C, Ribbe AE, Jiang W, Mao C. *Nature*, 2008, 452: 198–201
- 18 Simmons CR, Zhang F, MacCulloch T, Fahmi N, Stephanopoulos N, Liu Y, Seeman NC, Yan H. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 11254–11260
- 19 Zheng J, Birktoft JJ, Chen Y, Wang T, Sha R, Constantinou PE, Ginell SL, Mao C, Seeman NC. *Nature*, 2009, 461: 74–77
- 20 Wei B, Dai M, Yin P. *Nature*, 2012, 485: 623–626
- 21 Rothmund PWK. *Nature*, 2006, 440: 297–302
- 22 Andersen ES, Dong M, Nielsen MM, Jahn K, Subramani R, Mamdouh W, Golas MM, Sander B, Stark H, Oliveira CLP, Pedersen JS, Birkedal V, Besenbacher F, Gothelf KV, Kjems J. *Nature*, 2009, 459: 73–76
- 23 Douglas SM, Dietz H, Liedl T, Högberg B, Graf F, Shih WM. *Nature*, 2009, 459: 414–418
- 24 Ke Y, Sharma J, Liu M, Jahn K, Liu Y, Yan H. *Nano Lett*, 2009, 9: 2445–2447

- 25 Praetorius F, Dietz H. *Science*, 2017, 355: eaam5488
- 26 Douglas SM, Marblestone AH, Teerapittayanon S, Vazquez A, Church GM, Shih WM. *Nucl Acids Res*, 2009, 37: 5001–5006
- 27 Hong F, Zhang F, Liu Y, Yan H. *Chem Rev*, 2017, 117: 12584–12640
- 28 Shi J, Bergstrom DE. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1997, 36: 111–113
- 29 Aldaye FA, Sleiman HF. *Angew Chem*, 2006, 118: 2262–2267
- 30 Chien MP, Rush AM, Thompson MP, Gianneschi NC. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 5076–5080
- 31 Ding K, Alemdaroglu FE, Börsch M, Berger R, Herrmann A. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 46: 1172–1175
- 32 Edwardson TGW, Carneiro KMM, McLaughlin CK, Serpell CJ, Sleiman HF. *Nat Chem*, 2013, 5: 868–875
- 33 Yang H, McLaughlin CK, Aldaye FA, Hamblin GD, Rys AZ, Rouiller I, Sleiman HF. *Nat Chem*, 2009, 1: 390–396
- 34 Luo Q, Hou C, Bai Y, Wang R, Liu J. *Chem Rev*, 2016, 116: 13571–13632
- 35 Jiang T, Meyer TA, Modlin C, Zuo X, Conticello VP, Ke Y. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 14025–14028
- 36 Malyshev DA, Dhami K, Laverigne T, Chen T, Dai N, Foster JM, Corrêa IR, Romesberg FE. *Nature*, 2014, 509: 385–388
- 37 Li J, Song S, Liu X, Wang L, Pan D, Huang Q, Zhao Y, Fan C. *Adv Mater*, 2008, 20: 497–500
- 38 Chandrasekaran AR, Wady H, Subramanian HKK. *Small*, 2016, 12: 2689–2700
- 39 Li Y, Cu YTH, Luo D. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 885–889
- 40 Lin C, Jungmann R, Leifer AM, Li C, Levner D, Church GM, Shih WM, Yin P. *Nat Chem*, 2012, 4: 832–839
- 41 Pei H, Liang L, Yao G, Li J, Huang Q, Fan C. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 9020–9024
- 42 Jiang D, Ge Z, Im HJ, England CG, Ni D, Hou J, Zhang L, Kuttyreff CJ, Yan Y, Liu Y, Cho SY, Engle JW, Shi J, Huang P, Fan C, Yan H, Cai W. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2: 865–877
- 43 Morisaki T, Lyon K, DeLuca KF, DeLuca JG, English BP, Zhang Z, Lavis LD, Grimm JB, Viswanathan S, Looger LL, Lionnet T, Stasevich TJ. *Science*, 2016, 352: 1425–1429
- 44 Iinuma R, Ke Y, Jungmann R, Schlichthaerle T, Woehrstein JB, Yin P. *Science*, 2014, 344: 65–69
- 45 Jungmann R, Avendaño MS, Woehrstein JB, Dai M, Shih WM, Yin P. *Nat Methods*, 2014, 11: 313–318
- 46 Fan C, Zhuang Y, Li G, Zhu J, Zhu D. *Electroanalysis*, 2000, 12: 1156–1158
- 47 Fan C, Plaxco KW, Heeger AJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 9134–9137
- 48 Pei H, Lu N, Wen Y, Song S, Liu Y, Yan H, Fan C. *Adv Mater*, 2010, 22: 4754–4758
- 49 Wen Y, Lin M, Pei H, Lu N, Fan C. *Prog Chem*, 2012, 24: 1656–1664 (in Chinese) [闻艳丽, 林美华, 裴昊, 鲁娜, 樊春海. 化学进展, 2012, 24: 1656–1664]
- 50 Lu N, Pei H, Ge Z, Simmons CR, Yan H, Fan C. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 13148–13151
- 51 Ge Z, Lin M, Wang P, Pei H, Yan J, Shi J, Huang Q, He D, Fan C, Zuo X. *Anal Chem*, 2014, 86: 2124–2130
- 52 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: 2151–2155
- 53 Ge Z L, Pei H, Wang L H, Song S P, Fan C H. *Sci Sin Chim*, 2011, 54: 1273–1276 (in Chinese) [葛志磊, 裴昊, 王丽华, 宋世平, 樊春海. 中国科学: 化学, 2011, 54: 1273–1276]
- 54 Lin M, Song P, Zhou G, Zuo X, Aldalbahi A, Lou X, Shi J, Fan C. *Nat Protoc*, 2016, 11: 1244–1263
- 55 Wen Y, Pei H, Shen Y, Xi J, Lin M, Lu N, Shen X, Li J, Fan C. *Sci Rep*, 2012, 2: 867
- 56 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: 6860–6865
- 57 Li J, Fan C, Pei H, Shi J, Huang Q. *Adv Mater*, 2013, 25: 4386–4396
- 58 Zhao Y, Guo L, Dai J, Li Q, Li D, Wang L. *Chin J Anal Chem*, 2017, 45: 1078–1086 (in Chinese) [赵彦, 郭琳洁, 代江兵, 李茜, 李迪, 王丽华. 分析化学: 2017, 45: 1078–1086]
- 59 Jiang Q, Song C, Nangreave J, Liu X, Lin L, Qiu D, Wang ZG, Zou G, Liang X, Yan H, Ding B. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 13396–13403
- 60 Zhang Q, Jiang Q, Li N, Dai L, Liu Q, Song L, Wang J, Li Y, Tian J, Ding B, Du Y. *ACS Nano*, 2014, 8: 6633–6643
- 61 Douglas SM, Bachelet I, Church GM. *Science*, 2012, 335: 831–834
- 62 Schüller VJ, Heidegger S, Sandholzer N, Nickels PC, Suhartha NA, Endres S, Bourquin C, Liedl T. *ACS Nano*, 2011, 5: 9696–9702
- 63 Jiang Q, Shi Y, Zhang Q, Li N, Zhan P, Song L, Dai L, Tian J, Du Y, Cheng Z, Ding B. *Small*, 2015, 11: 5134–5141
- 64 Yan J, Hu C, Wang P, Zhao B, Ouyang X, Zhou J, Liu R, He D, Fan C, Song S. *Angew Chem*, 2015, 127: 2461–2465
- 65 Jones MR, Seeman NC, Mirkin CA. *Science*, 2015, 347: 1260901

- 66 He Y, Zhong Y, Su Y, Lu Y, Jiang Z, Peng F, Xu T, Su S, Huang Q, Fan C, Lee ST. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 5695–5698
- 67 Busseron E, Ruff Y, Moulin E, Giuseppone N. *Nanoscale*, 2013, 5: 7098–7140
- 68 Mei Q, Wei X, Su F, Liu Y, Youngbull C, Johnson R, Lindsay S, Yan H, Meldrum D. *Nano Lett*, 2011, 11: 1477–1482
- 69 Keum JW, Bermudez H. *Chem Commun*, 2009, 321: 7036–7038
- 70 Lacroix A, Edwardson TGW, Hancock MA, Dore MD, Sleiman HF. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 7355–7362
- 71 Hahn J, Wickham SFJ, Shih WM, Perrault SD. *ACS Nano*, 2014, 8: 8765–8775
- 72 Castro CE, Kilchherr F, Kim DN, Shiao EL, Wauer T, Wortmann P, Bathe M, Dietz H. *Nat Methods*, 2011, 8: 221–229
- 73 Walsh AS, Yin HF, Erben CM, Wood MJA, Turberfield AJ. *ACS Nano*, 2011, 5: 5427–5432
- 74 Rosi NL, Giljohann DA, Thaxton CS, Lytton-Jean AKR, Han MS, Mirkin CA. *Science*, 2006, 312: 1027–1030
- 75 Liang L, Li J, Li Q, Huang Q, Shi J, Yan H, Fan C. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 7745–7750
- 76 Ko SH, Liu H, Chen Y, Mao C. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 3039–3043
- 77 Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T. *Biotech Adv*, 2015, 33: 1141–1161
- 78 Zhu G, Zheng J, Song E, Donovan M, Zhang K, Liu C, Tan W. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 7998–8003
- 79 Perrault SD, Shih WM. *ACS Nano*, 2014, 8: 5132–5140
- 80 Auvinen H, Zhang H, Nonappa H, Kopilow A, Niemelä EH, Nummelin S, Correia A, Santos HA, Linko V, Kostianen MA. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6: 1700692
- 81 Liu Z, Li F, Guo L, Zhao Y, Li J, Liu X, Wang L, Fan C. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 109–115 (in Chinese) [刘卓, 李凡, 郭琳洁, 赵彦, 李江, 刘小果, 王丽华, 樊春海. 中国科学: 化学, 2017, 47: 109–115]
- 82 Lee H, Lytton-Jean AKR, Chen Y, Love KT, Park AI, Karagiannis ED, Sehgal A, Querbes W, Zurenko CS, Jayaraman M, Peng CG, Charisse K, Borodovsky A, Manoharan M, Donahoe JS, Truelove J, Nahrendorf M, Langer R, Anderson DG. *Nat Nanotech*, 2012, 7: 389–393

Self-assembled DNA structures for nanotheranostic applications

Jiangbing Dai^{1,2}, Peilin Gu^{1,2}, Lingyu Feng^{1,2}, Yu Li^{1,2}, Hongzhen Peng^{1,2,3}, Qingnuan Li¹, Lihua Wang^{1,3}, Chunhai Fan^{4*}

¹ CAS Key Laboratory of Interfacial Physics and Technology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China

⁴ School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

*Corresponding author (email: fanchunhai@sjtu.edu.cn)

Abstract: DNA molecule is regarded as the basic material to construct novel nanomaterials due to its good biocompatibility and programmability. Self-assembled DNA structures with controllable size, shape, symmetry, as well as environment-responsive properties were designed and fabricated, which has great potential for application in nanotheranostic fields such as imaging, detection, and drug delivery. However, there are some problems on *in vivo* application of these DNA-based materials, such as poor stability in living systems, low cell uptake efficiency and drug delivery and controllable release. This review briefly summarized the design methods of self-assembled DNA structures, and their applications in imaging, bioassay, and drug delivery, and provided the strategies to improve the stability and cell penetration ability of these nanostructures. We finally discussed the opportunities and challenges for using self-assembled DNA nanostructures for nanotheranostic applications.

Keywords: self-assembled DNA structures, bioimaging, biodetection, drug carrier

doi: 10.1360/SSC-2019-0017