核酸功能化金纳米探针在活细胞荧光成像方面的应用

杨雪娇, 徐静娟*, 陈洪渊

南京大学化学化工学院, 生命分析化学国家重点实验室, 南京 210023

*通讯作者, E-mail: xujj@nju.edu.cn

收稿日期: 2019-10-28; 接受日期: 2019-12-10; 网络版发表日期: 2020-03-07

国家重点研发计划(编号: 2016YFA0201200)和国家自然科学基金(编号: 21535003)资助项目

摘要 荧光标记的核酸功能化金纳米探针结合了纳米材料与核酸技术的优势, 具有增强的稳定性、良好的生物相容性、独特的光学性质及精确的可编程性, 开辟了活细胞传感的新纪元. 信号放大型的核酸功能化金纳米探针在原位检测含量较低但功能强大的RNA、蛋白质等生物标志物方面尤其表现出明显的优势. 本文从活细胞成像分析的角度, 重点介绍了荧光标记的核酸功能化金纳米探针的性质、设计原理及应用进展.

关键词 核酸功能化金纳米探针, 活细胞成像, 生物标志物, 信号扩增, 荧光共振能量转移

1 引言

核酸分子是细胞内最主要的4种生物大分子之一, 核苷酸链之间可以根据Watson-Crick碱基互补配对原则进行特异性的结合, 传递生物体的遗传信息. 随着分子生物学和生物化学的发展, 研究者通过体外筛选技术得到了多种人工合成的功能性核酸分子, 如脱氧核酶(DNAzyme, 也称DNA酶)^[1~4]、适配体(aptamer)^[5~9]、适体酶(aptazyme)^[10,11]等. 与内源核酸不同, 这些功能性核酸分子能够与特定的分析物相互作用或结合, 从而导致构象变化或催化某个反应; 同时, 功能性核酸合成技术成熟、结构多样、易于修饰, 在生物传感方面表现出巨大的潜力. 然而, 自由核酸分子进入细胞的过程极具挑战性, 且容易被细胞内的酶降解, 因此无法直接用于细胞内分析物的原位检测. 为了解

决这一问题, 当务之急是将核酸分子与其他纳米载体结合, 构建复合型的纳米探针.

在过去的几十年里, 纳米材料因其独特的物理和化学特性受到普遍关注. 其中, 金纳米材料合成简单、稳定性强、容易修饰、生物相容性好, 被广泛应用于传感^[12~14]、诊断^[15,16]、治疗^[17~19]等各个领域. 近年来, 纳米技术发展的一个新趋势是将不同特性的纳米材料整合到一起, 构建功能多样的复合型纳米材料, 其性能远远超出各个组分单独作用的效果. 荧光标记的核酸功能化金纳米探针结合了多功能复合纳米材料和光学成像技术的优势, 核酸与金纳米结构之间协同作用, 表现出许多增强的性质, 如良好的细胞转染能力、优异的胞内稳定性、独特的靶向性和神奇的信号放大能力等^[20~23]. 另一方面, 这些优异的性质又激励研究者不断开发新型的纳米工具, 用于生物传感、活

引用格式: Yang XJ, Xu JJ, Chen HY. Application of nucleic acid-functionalized gold nanoprobe in live-cell fluorescence imaging. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 583–593, doi: 10.1360/SSC-2019-0139

细胞成像、疾病诊断与治疗等纳米医学领域的各个方面。

本文重点介绍了荧光标记的核酸功能化金纳米探针的性质、构建原理及其在原位传感生物标志物方面的应用进展, 并对其发展方向进行了展望。

2 核酸功能化金纳米探针的性质

当核酸功能化金纳米探针用于活细胞成像时, 细胞摄取、探针本身的毒性及其在细胞内的稳定性都是需要重点考察的性能。金纳米结构的局域表面等离子体共振(localized surface plasmon resonance, LSPR)往往在探针光学信号的变化中起着至关重要的作用。

2.1 局域表面等离子体共振

金纳米材料是指最少有一维尺寸小于100 nm的金颗粒, 包括金纳米球(AuNP)^[12,13,15~17,24]、金纳米棒(AuNR)^[18,19,25,26]、金纳米星(AuNS)^[14,27]、金纳米笼(AuNC)^[28]等多种结构。当它们受到特定波长的入射光照射时, 表面的导带电子会立即感应到电磁场并产生与入射光频率相同的电子云振荡, 这种现象被称作局域表面等离子体共振^[29,30]。这一过程分为两种类型的光-物质相互作用: (1) 散射, 即入射光以相同的频率重新辐射到各个方向; (2) 吸收, 这种情况下光被转化成热量, 即声子或晶格振动。这两种过程共同导致入射光强度的衰减(消光)。此外, 金纳米结构表面产生的强电场将极大地增强或淬灭其表面或临近的分析物产生的荧光或拉曼等光学信号。利用这些光-物质相互作用, 研究者设计了许多基于金纳米材料的新型探针和工具, 并将其应用于生物传感等领域^[31~35]。

金纳米结构的LSPR性质(如散射与吸收的比率、峰位置等)由许多参数决定, 包括尺寸、形状、结构、形态及纳米结构周围的环境等。通常, 当周围介质的介电常数改变时, 金纳米结构的LSPR峰将发生位移。而尺寸改变对金纳米结构的LSPR峰位置的影响很小, 当金纳米球的直径从13 nm增大到100 nm时, 其LSPR峰仅仅从519 nm红移到550 nm^[36]。在生物医学方面, 人们对LSPR峰分布在近红外(NIR)区域的金纳米结构更感兴趣。因为生物体内的水、血液和软组织对这一波段光的吸收和散射较少, 入射光可以很容易地深入到软组织内。为了将金纳米结构的LSPR峰调整到近红外

区域, 必须依靠尺寸之外的其他参数, 如非球形纳米颗粒的形状和纵横比、纳米笼或纳米壳的厚度等。只要对这些参数进行轻微调整, LSPR峰就会发生大幅度的位移^[37,38], 由此得到一系列实用的金纳米结构。

2.2 核酸在金纳米材料上的组装

在过去的几十年里, 无数研究人员为金纳米结构功能化的发展做出了贡献, Mirkin课题组^[39]和Alivisato课题组^[40]尤为突出。目前, 将DNA等核酸链连接到金纳米结构表面的方法主要有两种: (1) 含有硫醇或二硫键的DNA链通过与金纳米结构表面形成强的Au-S键(184 kJ/mol)实现自组装^[39,41]; (2) DNA序列末端多个重复的“A”碱基作为锚定区段, 能够较强地吸附到金纳米结构表面^[42,43]。其中, 基于Au-S键的自组装是最常用且最有效的方案。本节重点介绍了该方案及据此改进的组装方式。

合成的金纳米材料表面往往带有大量的保护基团(如柠檬酸根等), 这些基团可能与DNA的磷酸基团发生静电排斥, 使DNA链无法在金纳米结构表面密集堆积。为了解决这个问题, 人们采取了盐老化的方法, 即通过缓慢增加反应体系的盐浓度来平衡电荷, 保证DNA链能够靠近纳米结构表面。研究表明, 金纳米材料表面连接的DNA链的量与体系最终的盐浓度成正比, 直到空间位阻不允许进一步吸附^[44]。反过来, 密集的核酸负载可以防止金纳米材料在较高的盐浓度下发生聚集, 从而保证了探针溶液的稳定性。此外, 高度定向的核酸单层还赋予了探针在不借助转染试剂的情况下进入细胞的能力^[45,46], 这为探针在活细胞内的应用奠定了基础。

虽然盐老化可以有效增加核酸在金纳米材料表面的连接数量, 但其本身是一个非常耗时的过程, 通常需要1~2天的时间才能完成。为了克服这一弱点, Zu等^[47]将含氟表面活性剂引入到反应体系, 仅用2 h就完成了老化步骤, 大大降低了时间和人工成本。然而, 由于表面活性剂的细胞毒性较强, 这类探针在活细胞成像和诊断中的应用受到极大的限制。Liu等^[48]在不使用表面活性剂、不进行盐老化的情况下, 通过调节反应溶液的pH值, 实现了DNA链在AuNP表面的定量吸附。但是, 酸性环境会破坏DNA的二级结构, 所以该方法的实用性不强。随后, 该课题组^[49]提出了一种新的策略, 采用快速冷冻的方式在2 min内完成了DNA链与

金纳米颗粒的有效组装(图1). 该方法无需借助其他试剂, 操作简单, 为核酸分子与金纳米材料之间的Au-S自组装开辟了新的道路.

近期, Tang等^[50,51]利用Au-Se键自组装构建了一系列多肽修饰的金纳米探针, 实现了细胞内蛋白酶的原位成像. 这类探针中的Au-Se键比Au-S键具有更强的热稳定性, 能够抵抗mM级谷胱甘肽(GSH)的干扰. 该方案有望成为核酸功能化金纳米探针的主要组装方式之一.

此外, 研究表明, 核酸的碱基能够吸附到金纳米材料表面, 不同碱基的亲合力由强到弱依次是A>C>G>T^[52]. Fan等^[42]基于“A”碱基对金纳米颗粒的吸附作用, 利用末端包含不同数量“A”碱基的核酸序列, 构建了一系列用于传感目标DNA序列的核酸功能化金纳米探针, 并研究了末端“A”碱基数目对探针中核酸序列空间分布的影响. 该方案得到的探针的稳定性与Au-S键组装得到的探针的稳定性相当, 但核酸序列在纳米颗粒表面的修饰量大大降低, 目前尚未得到广泛应用.

2.3 稳定性

核酸功能化金纳米探针进行生物传感和成像的前提是, 它们能够在细胞和血液等复杂环境中保持稳定. 首先, 探针必须在酶和核酸酶环境中稳定存在足够长的时间, 这样才有可能实现预期的功能. 多项研究表明, 修饰在金纳米结构表面的DNA分子比自由的DNA分子具有更好的核酸酶抗性, 探针被降解的程度在可接受的范围之内^[41,53~55]. Mirkin课题组^[56]和Olvera de la Cruz课题组^[57]都对这一现象的原理进行了研究, 他们认为局部高盐、DNA周围高浓度的二价离子以及

DNA被限制在金纳米颗粒表面等因素共同导致酶促降解效率的下降.

此外, Au-S键的稳定性也是需要研究的重要内容, 因为探针中的Au-S键可能遭受生物体内硫醇类物质(如谷胱甘肽等)的置换. Wang等^[58]用荧光法研究了GSH对AuNP/DNA探针Au-S键稳定性的影响. 结果显示, 在12 h内, AuNP表面的DNA链被非特异性释放的速度非常缓慢. 而Mirkin等^[53]的研究表明, 即使探针与较高浓度的GSH孵育48 h, 仍然有超过60%的DNA链稳定地连接在金纳米颗粒表面.

2.4 细胞毒性

未经修饰的金纳米球(AuNP)的细胞毒性与其尺寸密切相关, 粒径在1~2 nm之间的AuNP具有很高的毒性, 而粒径小于或大于这一范围的AuNP几乎无毒^[59]. 对于粒径更大的AuNP或AuNR等材料, 它们本身的细胞毒性可以忽略不计, 但合成过程中添加的表面活性剂(如十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基氯化铵等)却极易引起细胞死亡. 本课题组^[60]研究表明, 有效的表面修饰及后续的清洗步骤几乎能够完全除去金纳米棒周围的表面活性剂, 对降低纳米材料的细胞毒性具有极大的帮助. 此外, 已有许多课题组研究过核酸功能化金纳米探针的细胞毒性^[61~63]. Wright等^[64]用台盼蓝拒染法评估了发卡、单链、双链三种结构的DNA修饰的金纳米颗粒的细胞毒性. 结果显示, 用三种探针孵育24 h后, 所有细胞的存活率都维持在95%以上. 本课题组^[65]也用MTT实验探究了AuNP/DNA荧光探针对于HeLa细胞活性的影响, 实验现象与上述结果相似. 另一方面, AuNP/DNA在细胞的基因表达、细胞周期循环和凋亡诱导等过程中也不会引起任何可观测到的变化^[66,67]. 由此可见, 核酸功能化金纳米探针具有良好的生物相容性, 可以用于活细胞内生物标志物的原位成像.

3 核酸功能化金纳米探针的构建及应用

顾名思义, 核酸功能化金纳米探针主要由两部分组成: 金纳米材料载体及其表面修饰的DNA、RNA等核酸链. 通常, 这些核酸序列必须具备目标物识别和信号转换两项功能. 当用于荧光成像时, 这类探针中的核酸序列还需要标记荧光基团或者量子点等发光物质.

图1 通过盐老化(1)、降低pH值(2)和冷冻(3)等方法将DNA连接到AuNP的示意图^[49] (网络版彩图)

Figure 1 Scheme of attaching DNA to AuNPs by (1) salt-aging, (2) lowering pH, and (3) freezing ^[49] (color online).

核酸结构的改变, 导致发光物质与金纳米材料或有机淬灭基团之间的距离发生变化、共振能量转移效率改变, 从而表现出荧光信号的差异. 本节主要介绍了几种传统型核酸功能化金纳米探针和信号扩增型核酸功能化金纳米探针的设计原理及其活细胞传感应用.

3.1 经典的核酸功能化金纳米探针

荧光标记的核酸功能化金纳米探针制备简单、响应迅速, 且具有良好的特异性和生物相容性, 已经被广泛用于细胞内RNA^[68~70]、端粒酶^[71~73]、小分子^[74,75]、特定离子^[55,76]等多种物质的检测和分析. 其中, 经典的模型主要包括纳米耀斑和纳米信标两类.

2007年, Mirkin等^[77]设计了一种基于链取代的AuNP/DNA荧光探针用于成像活细胞内的mRNA, 他们将这种探针命名为“纳米耀斑”(nanoflare). 如图2(a)所示, 硫醇化的识别序列首先通过Au-S键连接到AuNP表面, 然后与标记有荧光团的短序列杂交形成“纳米耀斑”. 由于AuNP的LSPR吸收波段与荧光团的发射峰有重叠, 探针的荧光信号被淬灭; 当目标mRNA存在时, 识别序列与mRNA结合形成更稳定的杂交双链, 荧光团标记的序列被置换下来并远离AuNP, 荧光恢复, 从而实现了细胞内mRNA的可视化检测. 之后, 该课题组^[75]将上述探针加以改进, 构建了一种灵敏检测小分子ATP的适配体纳米耀斑(图2(b)). Liu等^[78]基于适配体对细胞色素c的特异性亲和作用及

caspase-3对特定多肽序列的剪切作用, 构建了一种能够同时检测两种目标物的纳米耀斑. 该探针能够实时监测细胞的凋亡进程, 为研究细胞凋亡的分子机制提供了一种有力的工具.

分子信标(molecular beacon, MB)的概念是由Tyagi和Kramer^[79]在1996年首次提出的. 传统的分子信标是一种末端分别标记有荧光基团和淬灭基团的茎-环结构的寡聚核苷酸链, 具有独特的信号转换和靶向识别能力. 但是, 传统分子信标对核酸酶比较敏感且背景荧光无法被完全淬灭, 这严重限制了它们在生物体系中的应用. 金纳米材料作为载体和淬灭剂, 可以有效解决以上问题. Wright等^[80]将荧光团标记的MB修饰到AuNP表面构建了一种纳米信标(nanobeacon), 用于检测活细胞内的mRNA. 当MB保持发卡构型时, 末端标记的荧光团与AuNP彼此靠近, 荧光信号被淬灭; 一旦目标mRNA与MB杂交, 发卡被打开, 荧光团就可以远离AuNP表面并恢复荧光信号. Tang等^[62]将多种荧光标记的MB组装到同一个AuNP上, 实现了四种mRNA的同时检测(图3(a)). Zhang等^[73]在纳米信标的基础上, 利用端粒酶能够在引物序列末端扩增出“TTAGGG”序列的性质, 设计了一种能够传感活细胞内端粒酶的新型探针(图3(b)). 该探针特异性强、空间定位准确, 实

图2 (a) 纳米耀斑应用于活细胞内的survivin mRNA检测^[77]. (b) 适配体纳米耀斑的设计及刺激响应机理^[75] (网络版彩图)

Figure 2 (a) Nanoflare for survivin mRNA detection in living cells^[77]. (b) The design and stimuli-responsive mechanism of aptamer nanoflare^[75] (color online).

图3 (a) 四色纳米信标用于检测细胞内的多种mRNAs^[62]. (b) 纳米探针的设计及其在活细胞端粒酶检测中的工作机制^[73] (网络版彩图)

Figure 3 (a) The four-color nanobeacon for detection of multiple intracellular mRNAs^[62]. (b) The design and working mechanism of the nanoprobe for detecting telomerase in living cells^[73] (color online).

现了细胞和活体等不同层面上的肿瘤检测。

基于单荧光强度变化的探针表现出了良好的应用价值, 但容易受光源漂移、细胞内物质(如核酸酶、GSH等)和热力学波动的影响而产生假阳性信号。为了解决上述问题, Wang课题组^[58]开发了一种基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的新型纳米耀斑。探针信号序列(Flare)的两端修饰了一对荧光团, 并与AuNP上的识别序列部分杂交, 此时探针只能发出绿色荧光; 当目标mRNA与识别序列结合后, Flare被置换并形成稳定的发卡结构, 荧光供受体彼此靠近, 产生强的FRET信号。实验结果表明, 这种FRET探针能够有效地避免核酸酶降解和GSH还原等因素引起的假阳性信号, 展示出更加可靠的比率检测性能。在此基础上, 他们还将i-motif作为识别序列, 构建了一种能够比率传感活细胞内pH值的FRET探针(图4)^[76]。在酸性pH下, i-motif能够自身折叠形成四联体结构并远离AuNP, 进而引起FRET效率升高。该探针能够在生理pH范围内作出出色的响应, 并且在活细胞传感中表现出良好的时空分辨率。

3.2 信号扩增型核酸功能化金纳米探针

传统核酸功能化纳米探针的目标物识别和信号转换都是按照1:1的形式进行的, 灵敏度被限制在一定的范围内。对于一些在细胞代谢中扮演重要角色但含量极低的分析物, 这些探针无法发挥作用。为了解决上述问题, 人们开发了一系列基于核酸扩增技术的改良探针。这些探针能够进行1:n形式的信号转换, 灵敏度比传统型探针提高了几个数量级。本节根据核酸扩增技术的不同, 对常见的信号扩增型核酸纳米探针进行了归类和总结。

3.2.1 DNA酶催化扩增

DNA酶(DNAzyme), 又称脱氧核酶, 是通过体外筛选技术得到的一类具有催化功能的单链DNA片段。DNAzyme催化性质稳定, 具有可编程性, 已被广泛用作生物传感器的构建元素。目前已报道的大部分DNAzyme都以金属离子为辅助因子, 其活性具有金属离子特异性, 因此DNAzyme非常适用于传感金属离子。2013年, Lu等^[81]报道了一种可以在活细胞内传感 UO_2^{2+} 的AuNP/DNAzyme荧光探针。当 UO_2^{2+} 存在时, 酶链被激活, 形成具有催化活性的二级结构, 引发底物链断

图4 FRET纳米探针用于活细胞内pH值的传感^[76]。(a) 双荧光团标记的i-motif纳米探针的原理图。(b) 不同pH值介质中的HeLa细胞的共聚焦图片(网络版彩图)

Figure 4 FRET nanoprobe for sensing pH in living cells^[76]. (a) Scheme of the dual-fluorophore-labeled i-motif nanoprobe. (b) Confocal images of nigericin-treated HeLa cells exposed to external media at different pH (color online).

裂。断裂后的底物链与酶链之间结合不稳定, 自发进行解链并远离AuNP和淬灭基团, 荧光信号恢复。随后, 该课题组^[82]将DNA酶和金纳米壳(AuNS)结合, 构建了一种近红外光热激活的纳米探针, 实现了细胞内 Zn^{2+} 的原位成像。如图5所示, 该探针在NIR激光照射前不具有催化活性, 避免了探针被细胞外 Zn^{2+} 消耗的情况, 提高了探针的利用率和特异性。近期, Le等^[83]报道了一种基于DNA酶和AuNP的分子马达, 将这类探针的应用范围推广到金属离子之外的分析物。基底链和酶链按照一定的比例组装在AuNP表面, 基底链上标记了荧光基团, 酶链用一条短的DNA序列进行封闭。该方案以目标miRNA作为激活酶链、开启催化反应的开关, 在 Mn^{2+} 辅助下, 实现了活细胞内miRNA的信号扩增检测。

分裂式DNA酶(split DNAzyme)是DNAzyme的一个分支, 包含一些局部酶片段, 这些片段本身都没有活性, 但可以在目标物或其他物质的推动下进行组合。组装后的分裂式DNAzyme具有催化活性, 能够识别并切断底物链。与经典的DNAzyme相比, 分裂式DNA酶具有更高的通用性和功能性。最近, Wang等^[84]设计了

图5 NIR激活的AuNS/DNAzyme探针用于传感细胞内的金属离子^[82] (网络版彩图)

Figure 5 NIR activated AuNS/DNAzyme probe for sensing intracellular metal ion ^[82] (color online).

一种基于分裂式DNAzyme的AuNP/DNA探针,用于活细胞内miRNA的荧光成像(图6(a)). 两条分裂式DNAzyme片段分别与AuNP表面的底物链杂交,底物链上标记的荧光团被淬灭. 目标miRNA能够辅助上述功能性核酸链形成活性二级结构,催化基底链断裂,输出荧光信号. 同时,被释放的miRNA会自动转移到邻近的DNAzyme片段上,不断循环作用产生放大的荧光信号.

适配体(aptamer)与DNA酶(DNAzyme)嵌合产生了一类新型的核酸酶分子,称为适体酶(aptazyme). 其中,适配体区域的目标物识别事件可以转化成DNA酶的激活,进而产生可检测的光学信号. 2016年, Wang等^[10]报道了第一个用于活细胞内ATP传感的AuNP/aptazyme纳米复合物. 如图6(b)所示, aptazyme与ATP的特

异性结合促进了DNA活性二级结构的形成. 活化后的aptazyme在 Mg^{2+} 的辅助下催化底物链断裂,进而导致标记有荧光团的底物链片段与aptazyme链解链,并远离AuNP表面. 被释放的活性aptazyme链可以进一步催化其他基底链断裂,实现了荧光信号的扩增. 实验结果表明, aptazyme功能化的金纳米探针具有更高的灵敏度,检测限比基于aptamer的传统型ATP传感器高出2~3个数量级. 目前,基于DNAzyme催化扩增的核酸纳米探针已经被广泛用于活细胞内金属离子^[81,85,86]、RNA^[83,87,88]、蛋白质^[89]、小分子^[10]等多种分析物的灵敏成像与检测.

3.2.2 滚环扩增

滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)是一种简单有效的等温DNA扩增技术. 在聚合酶和环状DNA模板的辅助下,短链的DNA或RNA引物可以被扩增产生一条包含数十至数百个串联重复序列的单链DNA或RNA产物. 许多以RCA产物为原料构建的DNA纳米结构,如DNA折纸、DNA纳米管、DNA纳米笼等,已经被用于生物检测、药物输送和细胞捕获等多个领域^[90-93]. 另一方面,基于RCA技术的传感器可以将单个分子结合事件转化成放大了数千甚至数万倍的可输出信号,非常适用于低含量目标物的超灵敏检测. Li课题组^[94]和Zhang课题组^[95]分别利用RCA技术实现了细胞膜上蛋白质和聚糖的原位成像. 本课题组^[96]基于AuNP与RCA技术开发了一种级联信号放大策略,实现了细胞膜上hERG钾离子通道蛋白的原位可视化检

图6 (a) 分裂式DNA酶功能化的金纳米探针用于活细胞内miRNA的扩增检测^[84]. (b) AuNP/aptazyme纳米探针用于传感活细胞内的ATP分子^[10] (网络版彩图)

Figure 6 (a) Gold nanoparticle loaded split-DNAzyme probe for amplified miRNA detection in living cells ^[84]. (b) AuNP/aptazyme nanoprobe for sensing ATP in living cells ^[10] (color online).

测(图7). 该方法通用性强、灵敏度高, 为成像细胞膜组分提供了一种有力的工具. 但是, 由于RCA反应条件较为苛刻, 扩增过程需要聚合酶参与, 基于RCA技术的核酸功能化纳米探针很难应用于活细胞内部物质的原位传感.

3.2.3 基于toehold介导链取代的扩增

toehold是悬挂在双链DNA末端的只包含几个碱基序列的单链DNA片段. 链取代是指两条DNA链彼此杂交, 与此同时置换掉其他的预杂交DNA单链的过程, 这一反应通常在toehold处被引发并通过分支迁移过程进行^[97]. 链取代反应的驱动力是Watson-Crick碱基互补配对, 其反应速度可以通过改变toehold片段和间隔序列的长度进行调节. 与RCA相比, toehold介导的链取代反应条件简单, 无需酶的参与, 更容易在复杂的生物系统中进行.

基于toehold介导的链取代反应, Xiang等^[98]构建了一种目标物启动的分子机器, 实现了活细胞内痕量miRNA的灵敏检测(图8). 该分子机器的工作过程包含两步链取代反应, 通过消耗燃料DNA链, 保证了目标miRNA可以循环作用, 不断置换出标记有荧光团的报告序列. 被释放的报告序列会自发形成稳定的发卡结构, 拉近荧光供受体之间的距离, 产生强的FRET信号. 该方案不包含复杂的二级结构, 在检测中表现出良好

图7 基于AuNP和RCA技术的双信号放大策略用于细胞膜上hERG通道蛋白的超灵敏成像^[96] (网络版彩图)

Figure 7 The dual-amplification strategy based on AuNP and RCA for ultrasensitive imaging of hERG channel proteins in the membrane^[96] (color online).

图8 以DNA为燃料的分子机器用于活细胞内低表达的let-7a miRNA的扩增成像^[98] (网络版彩图)

Figure 8 The DNA-fueled molecular machine for amplified imaging under-expressed let-7a miRNA in living cells^[98] (color online).

的动力学性质. Yin课题组也报道了一篇类似的工作^[99], 并在此基础上, 设计了一种改良的纳米机器^[100], 将细胞内的ATP作为燃料, 避免了额外的细胞输送过程, 具有更高的实用性.

Jiang等^[101]设计了一种基于杂交链反应(hybridization chain reaction, HCR)的扩增型纳米探针, 实现了活细胞内mRNA的荧光成像. 如图9所示, 两种荧光标记的发卡DNA链通过静电吸附组装到AuNP表面. 目标mRNA可以引发H1和H2杂交事件的链式反应, 形成一条具有缺口双螺旋结构的杂交链, 并从AuNP表面分离出来. 由于H1和H2的杂交双螺旋中包含多个临近的FAM和TAMRA荧光团, 通过观察它们之间的FRET信号, 就可以确定细胞内mRNA的相对含量. 实验结果显示, 这种复合纳米探针能够通过一种独立于内吞的机制进入到细胞内, 并完成高灵敏度的检测, 检测限低至pM级.

催化发卡组装(catalyzed hairpin assembly, CHA)是toehold介导链取代反应的另一种类型, 两种发卡DNA链在目标序列的催化下杂交生成双链结构, 但不会像HCR一样发生链式反应. Zhang等^[102]将金纳米棒(AuNR)与CHA技术结合, 开发了一种灵敏、智能的诊疗一体化方案(图10). 当目标miRNA存在时, AuNR表

图9 基于CHA的纳米机器用于miRNA的原位分析^[101] (网络版彩图)

Figure 9 The CHA-based nanomachine for *in situ* miRNA analysis^[101] (color online).

图10 NIR激光诱导的链取代扩增用于活细胞内miRNA的检测^[102] (网络版彩图)

Figure 10 NIR laser triggered strand displacement amplification for miRNA detection in living cells^[102] (color online).

面HDP的发卡构型被打开.与此同时,在808 nm激光的照射下,AuNR的光热效应使探针的温度升高,释放出

两端连接的发卡型DNA链HAP.随后,被释放的HAP与开环的HDP杂交,置换掉目标miRNA,并发出荧光信号.在此过程中,目标miRNA的角色类似催化剂,可以重复作用而不受损耗.该探针不仅可以检测细胞内肿瘤标志物的含量,而且能够指导后续光热治疗的实施,为癌症的精准治疗提供了一种新的思路.

由于Watson-Crick碱基互补配对的特异性和可编程性,toehold介导的链取代反应已经被广泛用于RNA原位传感方法的建立.近期,随着适配体的引入,基于该扩增技术的核酸纳米探针也开始在离子、小分子和蛋白质检测中发挥作用^[103~106].

4 总结与展望

核酸功能化金纳米探针设计灵活、结构稳定、特异性强,在原位传感RNA、蛋白质、糖链及小分子等生物标志物方面具有广阔的应用前景.尤其,随着核酸扩增技术与纳米技术的结合,探针的灵敏度得到了大幅度的提升,使活细胞内含量非常微小的分析物的可视化检测得以实现,为癌症的早期诊断提供了一种潜在的工具.然而,目前已报道的核酸纳米探针距离活体成像应用还有很长的路要走,有许多困难尚需克服:(1)扩增成像过程往往需要借助额外的“燃料”,探针组难以同步输送,这可能影响反应的动力学并增加信号的错误率;(2)荧光探针的灵敏度受限于荧光分子发光强度弱、容易被漂白等不足,在生物体系中的信号稳定性有待提高.虽然前路漫漫,但我们坚信,在各国科研人员的共同努力下,这些问题会逐步解决,高度集成化的核酸纳米探针终将在生物成像和纳米医学等领域做出更大的贡献.

参考文献

- 1 Tian Y, He Y, Chen Y, Yin P, Mao C. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 4355–4358
- 2 Shimron S, Elbaz J, Henning A, Willner I. *Chem Commun*, 2010, 46: 3250–3252
- 3 Torabi SF, Wu P, McGhee CE, Chen L, Hwang K, Zheng N, Cheng J, Lu Y. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 5903–5908
- 4 Wu Z, Fan H, Satyavolu NSR, Wang WJ, Lake R, Jiang JH, Lu Y. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 8721–8725
- 5 Shanguan D, Li Y, Tang Z, Cao ZC, Chen HW, Mallikaratchy P, Sefah K, Yang CJ, Tan W. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11838–11843
- 6 Xing H, Wong NY, Xiang Y, Lu Y. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, 16: 429–435
- 7 Wu P, Gao Y, Zhang H, Cai C. *Anal Chem*, 2012, 84: 7692–7699
- 8 Xiong X, Liu H, Zhao Z, Altman MB, Lopez-Colon D, Yang CJ, Chang LJ, Liu C, Tan W. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 1472–1476
- 9 Tan W, Donovan MJ, Jiang J. *Chem Rev*, 2013, 113: 2842–2862

- 10 Yang Y, Huang J, Yang X, Quan K, Wang H, Ying L, Xie N, Ou M, Wang K. *Anal Chem*, 2016, 88: 5981–5987
- 11 Liu J, Lu Y. *Anal Chem*, 2004, 76: 1627–1632
- 12 Ma Y, Promthaveepong K, Li N. *Anal Chem*, 2016, 88: 8289–8293
- 13 Wang C, Nie XG, Shi Y, Zhou Y, Xu JJ, Xia XH, Chen HY. *ACS Nano*, 2017, 11: 5897–5905
- 14 Wang W, Zhang L, Li L, Tian Y. *Anal Chem*, 2016, 88: 9518–9523
- 15 Degliangeli F, Kshirsagar P, Brunetti V, Pompa PP, Fiammengio R. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 2264–2267
- 16 Li S, Xu L, Ma W, Wu X, Sun M, Kuang H, Wang L, Kotov NA, Xu C. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 306–312
- 17 Kyriazi ME, Giust D, El-Sagheer AH, Lackie PM, Muskens OL, Brown T, Kanaras AG. *ACS Nano*, 2018, 12: 3333–3340
- 18 Dong Q, Wang X, Hu X, Xiao L, Zhang L, Song L, Xu M, Zou Y, Chen L, Chen Z, Tan W. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 177–181
- 19 Zhang P, Wang C, Zhao J, Xiao A, Shen Q, Li L, Li J, Zhang J, Min Q, Chen J, Chen HY, Zhu JJ. *ACS Nano*, 2016, 10: 3637–3647
- 20 Lin YW, Liu CW, Chang HT. *Anal Methods*, 2009, 1: 14
- 21 Yang Y, Zhong S, Wang K, Huang J. *Analyst*, 2019, 144: 1052–1072
- 22 Heuer-Jungemann A, Harimech PK, Brown T, Kanaras AG. *Nanoscale*, 2013, 5: 9503–9510
- 23 Zhang JJ, Lan T, Lu Y. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8: 1801158
- 24 Zheng Y, Zhong X, Li Z, Xia Y. *Part Part Syst Charact*, 2014, 31: 266–273
- 25 Ye X, Jin L, Caglayan H, Chen J, Xing G, Zheng C, Doan-Nguyen V, Kang Y, Engheta N, Kagan CR, Murray CB. *ACS Nano*, 2012, 6: 2804–2817
- 26 Zhang Z, Wang J, Nie X, Wen T, Ji Y, Wu X, Zhao Y, Chen C. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 7317–7326
- 27 Liu Y, Pan M, Wang W, Jiang Q, Wang F, Pang DW, Liu X. *Anal Chem*, 2019, 91: 2086–2092
- 28 Chen J, Glaus C, Laforest R, Zhang Q, Yang M, Gidding M, Welch MJ, Xia Y. *Small*, 2010, 6: 811–817
- 29 Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. *J Phys Chem B*, 2003, 107: 668–677
- 30 Yang X, Yang M, Pang B, Vara M, Xia Y. *Chem Rev*, 2015, 115: 10410–10488
- 31 Chen S, Zhang Y, Shih TM, Yang W, Hu S, Hu X, Li J, Ren B, Mao B, Yang Z, Tian Z. *Nano Lett*, 2018, 18: 2209–2216
- 32 Xu L, Zhao S, Ma W, Wu X, Li S, Kuang H, Wang L, Xu C. *Adv Funct Mater*, 2016, 26: 1602–1608
- 33 Zong S, Chen C, Wang Z, Zhang Y, Cui Y. *ACS Nano*, 2016, 10: 2950–2959
- 34 Chen Z, Peng Y, Cao Y, Wang H, Zhang JR, Chen HY, Zhu JJ. *Nano Lett*, 2018, 18: 3759–3765
- 35 Abeyasinghe N, Kumar S, Sun K, Mansfield JF, Jin R, Goodson Iii T. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 16299–16307
- 36 Xia Y, Halas NJ. *MRS Bull*, 2011, 30: 338–348
- 37 Ye X, Gao Y, Chen J, Reifsnnyder DC, Zheng C, Murray CB. *Nano Lett*, 2013, 13: 2163–2171
- 38 Huang X, El-Sayed MA. *J Adv Res*, 2010, 1: 13–28
- 39 Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ. *Nature*, 1996, 382: 607–609
- 40 Alivisatos AP, Johnsson KP, Peng XG, Wilson TE, Loweth CJ, Bruchez MP, Schultz PG. *Nature*, 1996, 382: 609–611
- 41 Xu Q, Lou X, Wang L, Ding X, Yu H, Xiao Y. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 27298–27304
- 42 Pei H, Li F, Wan Y, Wei M, Liu H, Su Y, Chen N, Huang Q, Fan C. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 11876–11879
- 43 Yang K, Wang H, Ma N, Zeng M, Luo H, He D. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 44546–44553
- 44 Cutler JI, Auyeung E, Mirkin CA. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 1376–1391
- 45 Giljohann DA, Seferos DS, Patel PC, Millstone JE, Rosi NL, Mirkin CA. *Nano Lett*, 2007, 7: 3818–3821
- 46 Verma A, Stellacci F. *Small*, 2010, 6: 12–21
- 47 Zu Y, Gao Z. *Anal Chem*, 2009, 81: 8523–8528
- 48 Zhang X, Servos MR, Liu J. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 7266–7269
- 49 Liu B, Liu J. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 9471–9474
- 50 Hu B, Kong F, Gao X, Jiang L, Li X, Gao W, Xu K, Tang B. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 5306–5309
- 51 Luan M, Shi M, Pan W, Li N, Tang B. *Chem Commun*, 2019, 55: 5817–5820
- 52 Yao G, Pei H, Li J, Zhao Y, Zhu D, Zhang Y, Lin Y, Huang Q, Fan C. *NPG Asia Mater*, 2015, 7: e159
- 53 Rosi NL, Giljohann DA, Thaxton CS, Lytton-Jean AKR, Han MS, Mirkin CA. *Science*, 2006, 312: 1027–1030
- 54 Wang Z, Kanaras AG, Bates AD, Cosstick R, Brust M. *J Mater Chem*, 2004, 14: 578

- 55 Huang J, He Y, Yang X, Wang K, Ying L, Quan K, Yang Y, Yin B. *Chem Commun*, 2014, 50: 15768–15771
- 56 Seferos DS, Prigodich AE, Giljohann DA, Patel PC, Mirkin CA. *Nano Lett*, 2009, 9: 308–311
- 57 Zwanikken JW, Guo P, Mirkin CA, Olvera de la Cruz M. *J Phys Chem C*, 2011, 115: 16368–16373
- 58 Yang Y, Huang J, Yang X, Quan K, Wang H, Ying L, Xie N, Ou M, Wang K. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 8340–8343
- 59 Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahnke-Dechent W. *Small*, 2007, 3: 1941–1949
- 60 Yang XJ, Li XL, Chen HY, Xu JJ. *ACS Appl Bio Mater*, 2019, 2: 2994–3001
- 61 Zheng T, Li GG, Zhou F, Wu R, Zhu JJ, Wang H. *Adv Mater*, 2016, 28: 8218–8226
- 62 Pan W, Zhang T, Yang H, Diao W, Li N, Tang B. *Anal Chem*, 2013, 85: 10581–10588
- 63 Li XL, Zhang ZL, Zhao W, Xia XH, Xu JJ, Chen HY. *Chem Sci*, 2016, 7: 3256–3263
- 64 Wong AC, Wright DW. *Small*, 2016, 12: 5592–5600
- 65 Yang XJ, Zhang K, Zhang TT, Xu JJ, Chen HY. *Anal Chem*, 2017, 89: 4216–4222
- 66 Prigodich AE, Seferos DS, Massich MD, Giljohann DA, Lane BC, Mirkin CA. *ACS Nano*, 2009, 3: 2147–2152
- 67 Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 3280–3294
- 68 Briley WE, Bondy MH, Randeria PS, Dupper TJ, Mirkin CA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 9591–9595
- 69 Wang Z, Zhang R, Wang Z, Wang HF, Wang Y, Zhao J, Wang F, Li W, Niu G, Kieseewetter DO, Chen X. *ACS Nano*, 2014, 8: 12386–12396
- 70 Pan W, Li Y, Wang M, Yang H, Li N, Tang B. *Chem Commun*, 2016, 52: 4569–4572
- 71 Qian R, Ding L, Yan L, Lin M, Ju H. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 8205–8208
- 72 Ma Y, Wang Z, Zhang M, Han Z, Chen D, Zhu Q, Gao W, Qian Z, Gu Y. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 3304–3308
- 73 Liu Z, Zhao J, Zhang R, Han G, Zhang C, Liu B, Zhang Z, Han MY, Gao X. *ACS Nano*, 2018, 12: 3629–3637
- 74 Jin F, Zheng J, Liu C, Yang S, Li Y, Li J, Lian Y, Yang R. *Analyst*, 2014, 139: 3714–3717
- 75 Zheng D, Seferos DS, Giljohann DA, Patel PC, Mirkin CA. *Nano Lett*, 2009, 9: 3258–3261
- 76 Huang J, Ying L, Yang X, Yang Y, Quan K, Wang H, Xie N, Ou M, Zhou Q, Wang K. *Anal Chem*, 2015, 87: 8724–8731
- 77 Seferos DS, Giljohann DA, Hill HD, Prigodich AE, Mirkin CA. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 15477–15479
- 78 Zhang X, Liao N, Chen G, Zheng A, Zeng Y, Liu X, Liu J. *Nanoscale*, 2017, 9: 10861–10868
- 79 Tyagi S, Kramer FR. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 303–308
- 80 Jayagopal A, Halfpenny KC, Perez JW, Wright DW. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 9789–9796
- 81 Wu P, Hwang K, Lan T, Lu Y. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 5254–5257
- 82 Wang W, Satyavolu NSR, Wu Z, Zhang JR, Zhu JJ, Lu Y. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 6798–6802
- 83 Peng H, Li XF, Zhang H, Le XC. *Nat Commun*, 2017, 8: 14378
- 84 Wu Y, Huang J, Yang X, Yang Y, Quan K, Xie N, Li J, Ma C, Wang K. *Anal Chem*, 2017, 89: 8377–8383
- 85 Li L, Feng J, Fan Y, Tang B. *Anal Chem*, 2015, 87: 4829–4835
- 86 Yang C, Yin X, Huan SY, Chen L, Hu XX, Xiong MY, Chen K, Zhang XB. *Anal Chem*, 2018, 90: 3118–3123
- 87 Yang Y, Huang J, Yang X, He X, Quan K, Xie N, Ou M, Wang K. *Anal Chem*, 2017, 89: 5850–5856
- 88 Liu J, Cui M, Zhou H, Yang W. *ACS Sens*, 2017, 2: 1847–1853
- 89 Chen J, Zuehlke A, Deng B, Peng H, Hou X, Zhang H. *Anal Chem*, 2017, 89: 12888–12895
- 90 Hu R, Zhang X, Zhao Z, Zhu G, Chen T, Fu T, Tan W. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 5821–5826
- 91 Sun W, Ji W, Hall JM, Hu Q, Wang C, Beisel CL, Gu Z. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 12029–12033
- 92 Esteban-Fernández de Ávila B, Angell C, Soto F, Lopez-Ramirez MA, Báez DF, Xie S, Wang J, Chen Y. *ACS Nano*, 2016, 10: 4997–5005
- 93 Zhao W, Cui CH, Bose S, Guo D, Shen C, Wong WP, Halvorsen K, Farokhzad OC, Teo GSL, Phillips JA, Dorfman DM, Karnik R, Karp JM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 19626–19631
- 94 Gao T, Wang B, Shi L, Zhu X, Xiang Y, Anzai JI, Li G. *Anal Chem*, 2017, 89: 10776–10782
- 95 Zhang X, Li R, Chen Y, Zhang S, Wang W, Li F. *Chem Sci*, 2016, 7: 6182–6189
- 96 Yang XJ, Zhang K, Xu JJ, Chen HY. *Anal Chem*, 2018, 90: 6199–6205
- 97 Zhang DY, Seelig G. *Nat Chem*, 2011, 3: 103–113
- 98 Li D, Zhou W, Yuan R, Xiang Y. *Anal Chem*, 2017, 89: 9934–9940
- 99 Liang CP, Ma PQ, Liu H, Guo X, Yin BC, Ye BC. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 9077–9081

- 100 Ma PQ, Liang CP, Zhang HH, Yin BC, Ye BC. *Chem Sci*, 2018, 9: 3299–3304
- 101 Wu Z, Liu GQ, Yang XL, Jiang JH. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 6829–6836
- 102 Dai W, Dong H, Guo K, Zhang X. *Chem Sci*, 2018, 9: 1753–1759
- 103 Xing Y, Liu B, Chao J, Wang L. *RSC Adv*, 2017, 7: 47425–47434
- 104 Li W, Wang L, Jiang W. *Chem Commun*, 2017, 53: 5527–5530
- 105 Yang L, Meng L, Song J, Xiao Y, Wang R, Kang H, Han D. *Chem Sci*, 2019, 10: 7466–7471
- 106 Wang J, Huang J, Quan K, Li J, Wu Y, Wei Q, Yang X, Wang K. *Chem Commun*, 2018, 54: 10336–10339

Application of nucleic acid-functionalized gold nanoprobe in live-cell fluorescence imaging

Xue-Jiao Yang, Jing-Juan Xu^{*}, Hong-Yuan Chen

State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China

^{*}Corresponding author (email: xujj@nju.edu.cn)

Abstract: Combining nanomaterials and nucleic acid technology, fluorescent nucleic acid-functionalized gold nanoprobe possess many advantages, such as improved stability, good biocompatibility, unique optical properties and precise programmability, which open a new era for live-cell imaging. In particular, amplified nucleic acid-functionalized gold nanoprobe are ideal for *in situ* detecting powerful but low-abundance biomarkers. In this review, from the perspective of live-cell fluorescence imaging and analysis, the major properties, design principles and applications of nucleic acid-functionalized gold nanoprobe are introduced.

Keywords: nucleic acid-functionalized gold nanoprobe, live-cell imaging, biomarker, signal amplification, FRET

doi: [10.1360/SSC-2019-0139](https://doi.org/10.1360/SSC-2019-0139)