DNA步行者分子机器研究新进展

汪晶¹, 王东霞¹, 马嘉懿¹, 孔德明^{1,2*}

1. 南开大学化学学院分析科学研究中心, 天津 300071

2. 天津市生物传感与分子识别重点实验室, 天津 300071

*通讯作者, E-mail: kongdem@nankai.edu.cn

收稿日期: 2018-10-22; 接受日期: 2018-12-04; 网络版发表日期: 2019-02-26

国家自然科学基金(编号: 21874075)资助项目

摘要 作为人类向大自然学习过程中迈出的重要一步, 人工分子机器的研究越来越受到人们的重视. 由于具有碱基配对的精确性、序列的可编程性、二级结构的多样性和可控性等一系列优势, DNA被认为是最有前途的一类分子机器构筑材料之一. 本综述依据驱动力的不同, 对一类重要的分子机器——DNA步行者分子机器的最新研究进展进行了介绍, 并对该类分子机器的未来发展进行了展望.

关键词 分子机器, DNA步行者, 生物传感, 生物成像, 纳米探针

1 引言

分子机器是由一定数量的分子组装而成的, 能够在合适的外界刺激下, 执行类似于机械运动的分子组装体^[1,2]. 随着分子生物学的日益发展, 人们发现, 就生物体内的很多生理活动而言, 如果追溯到分子层面, 都依赖于分子机器的运转. 如人们所熟知的光合作用就是在许多功能各异的生物分子机器的相互配合下共同完成的, 最终实现由光能向化学能的转变; 而生物体系内多肽和蛋白质分子的合成也可视为在多种分子机器的共同作用下, 将遗传信息由DNA转录传递给RNA, 再由核糖体对RNA中存储的信息进行翻译来完成的^[3]. 总而言之, 大自然造物主正向人们展示着一个又一个精巧的生物分子机器. 近年来, 科学家从自然界中汲取灵感, 开始尝试人工分子机器的设计与合成, 赋予其天然分子机器的某些功能和特性.

作为遗传信息的载体, DNA被认为是最有前途的一类分子机器构筑材料, 这不仅要归因于生命内源性物质良好的生物相容性, 而且与其他材料相比其具有一些特定优势, 如精确的碱基配对原则、序列的可编程性、结构的多样性和可控性、成熟的合成技术及易于修饰等^[4]. 利用DNA作为构筑元件, 人们设计并制备了多种类型的分子机器^[5,6], 包括DNA镊子(DNA tweezers)^[7]、DNA齿轮(DNA gears)^[8]、DNA起重机(DNA cranes)^[9]、DNA步行者(DNA walkers)^[10,11]、DNA马达(DNA motors)^[12]和DNA机器人(DNA robots)^[13,14]等. 其中, DNA步行者是一类可执行复杂操作的分子机器^[15], 它可以在纳米尺度上、以可控的方式在指定的轨道内行走, 从而有望解决分子机器构建过程中所面临的一个主要问题, 即如何控制纳米尺度的目标物沿预设的轨道进行机械运动的问题, 在生物传感、生物成像、新材料的组装与合成、药物递送、生命过程的

引用格式: Wang J, Wang DX, Ma JY, Kong DM. Recent research progress on DNA walker-based molecular machines. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 776–786, doi: 10.1360/N032018-00228

监控及生物计算机等领域显示了极大的应用前景. 在科研人员的不懈努力之下, DNA步行者已由最初一维(1D)线性轨道上的步行运动^[16], 发展到了后来的在二维(2D)折纸轨道^[17], 乃至当前基于纳米粒子三维(3D)轨道上的运动^[18].

本文聚焦于DNA步行者分子机器的最新研究进展, 根据驱动方式的不同对其进行分类和总结, 并对这类分子机器的发展前景进行了展望.

2 链杂交驱动的双足DNA步行者分子机器

利用Watson-Crick碱基配对来指挥DNA序列的杂交是分子机器的一个重要驱动途径^[19]. 在这类分子机器的设计中, 除了轨道DNA链和步行者DNA链外, 往往还需要加入一条或多条燃油DNA链, 借助于这三种DNA链之间的杂交作用, 推动步行DNA链的前行. 2012年, Qu课题组^[20]设计了在燃油DNA链辅助下, 携带有目标分子——凝血酶的步行者DNA链在预设轨道上的可控线性运动. 如图1所示, 当相继加入燃油链A1和A2后, 借助于三链杂交体的形成, “双足”步行DNA链的两足分别位在红色和绿色轨道上. 然后加入燃油链D1, 让其与A1形成杂交体, 使定位在红色轨道上的足抬起, 并在加入A3链之后走到紫色轨道上. 依据相同的方式, 通过选择性地加入不同的燃油链, 可以精确地控制分子机器在轨道上的行走步数, 并使其停留在任何期望的位置. 在体系中进一步引入催化剂DNA链(catalyst strands), 可以极大地加快该步行者分子机器的行进速度, 使其比先前的基于DNA杂交的分子机器快约1个数量级^[20]. 步行DNA链设计为分支结构, 其中两支作为“足”执行步行运动, 另一支则可用于捕获目标分子, 用以在分子机器前行过程中捕获和转移蛋白质或一些其他无机分子.

在本例中, 步行DNA链行走于预设的一维轨道上, 而就目前报道的DNA步行者而言, 也多以一维和二维步行运动为主, 三维步行者的研究仅仅处于起步阶段. 但毫无疑问, 相比于一维和二维步行者, 三维步行者更为引人注目. 一方面因为其更接近于生物分子机器的真实情况, 另一方面在于构建轨道的纳米材料(如金纳米粒子(AuNP)、磁纳米粒子及碳纳米管等)具有较大的比表面积, 其上可装载高密度的DNA轨道, 使分子机器所能行走的步数更多、运行效率更高.

图1 DNA杂交驱动的双足DNA步行者在一维轨道上的行走^[20] (网络版彩图)

Figure 1 DNA hybridization-based biped DNA walkers on one-dimensional orbit ^[20] (color online).

Ellington课题组^[21]在2015年研究了一种新型的三维DNA纳米机器(图2(a)). 通过把发夹型DNA链(H1、FAM-H2)修饰在链霉亲和素包裹的微球表面组装成三维轨道, 以催化DNA链作为步行者. 借助于两个连续的Toehold介导的链置换反应, 先后实现步行DNA链在轨道上的杂交和释放, 同时将荧光标记的燃油DNA链装载到微球表面. 借助于这种单纯的DNA杂交反应, 可以完成步行DNA链在三维轨道上的连续行走, 行走步数可达30步. 该工作为在纳米微球表面构建DNA纳米机器提供了成功的范例, 构建的分子机器有望应用于生物分析和疾病诊断等多个领域.

借助相似的策略, Jiang课题组^[22]在2017年报道一种构筑在磁性纳米微球上的三维DNA步行者分子机器(图2(b)). 不同的是, 它首先借助于待测DNA链的连接作用, 将步行DNA链固定在磁性纳米微球表面, 从而激活其在轨道上的步行运动, 最终把携带有G-四链体结构的DNA链组装到纳米微球表面. 再利用荧光探针N-甲基吡啶二丙酸(NMM)对G-四链体的特异性识

图2 DNA杂交驱动的三维DNA步行者分子机器。(a) 步行DNA链未固定在纳米粒子上^[21]; (b) 步行DNA链被靶标固定在纳米粒子上^[22] (网络版彩图)

Figure 2 DNA hybridization-driven 3D DNA walker. The walking DNA strand is (a) not immobilized on the nanoparticle ^[21], and (b) immobilized on the nanoparticle by the target ^[22] (color online).

别, 点亮纳米微球。在这一设计中, 每个靶分子可激活一个步行DNA链, 进行多步的步行运动, 产生大量信号分子, 在核酸分析中显示了优越的性能, 检测限可达4.1 fM。

Fan课题组^[23]在2018年报道将DNA杂交链式反应“锚定”在DNA二维折纸结构上(图3(a)), 实现了沿着DNA折纸中预设路径的分子级联反应。借助于单分子成像技术, 观察到DNA分子机器的行走轨迹并完成相关动力学测试。为展示分子机器的智能运算能力, 在DNA二维纳米结构上设计了一个迷宫, 迷宫有入口A和出口J, 以及四个非出口的终点(C, F, G, H)。利用分子机器的并行运算能力解答这个迷宫问题(图3(b))。分子机器行走中, DNA分子会从起点开始, 走向出口或走向一个终点。通过原子力显微镜, 观察到分子行走的所有路径, 从而可以获得迷宫正确行走路径的解(图3(c, d))。

3 熵驱动DNA步行者分子机器

就前面提到的链杂交驱动的DNA步行者分子机器而言, 实际上是依靠分子机器运行过程中, 体系中杂交碱基数目增多所释放出来的能量推动分子机器的持续运转。但有观点认为, 这种能量驱动的方式容易引起非特异性的DNA杂交, 从而导致背景信号的升高甚至

图3 单分子DNA巡航机器人的迷宫测试。(a) 十个顶点的迷宫示意; (b) 类似于计算机树的迷宫结构; (c) 复杂巡航线路的原子力表征结果; (d) 原子力中发现的典型行走路径^[23] (网络版彩图)

Figure 3 PSEC-driven graph traversal on a maze. (a) A maze design with ten vertices. (b) The maze is equivalent to a rooted tree with ten vertices. (c) An AFM image showing the result of a traversal experiment that generated all possible paths. (d) Typical paths found in the mixture ^[23] (color online).

是假阳性结果的产生。因此, Yurke等^[24]于2007年开创性地提出了利用熵增来驱动核酸纳米机器运行的新思路。Yin课题组^[25]则将这一思路应用于三维DNA步行者分子机器的设计(图4), 实现了细胞内微小RNA(miRNA)的高灵敏成像。借助于靶标链(T)的连接作用, 将步行DNA链(W)装载到三维分子轨道上, 然后利用步行DNA链和燃油DNA链在轨道DNA链上交替发生的Toehold介导的链置换反应, 实现步行DNA链在轨道上的连续行走及荧光标记DNA链的持续释放。在分子机器的运行过程中, 体系中杂交的碱基数目没有增加。但随着DNA链从纳米粒子表面的脱离, 游离的DNA链增多, 导致了体系的熵增, 进而推动了分子机器的持续运转。

4 生物酶驱动的DNA步行者分子机器

很多生物酶都以核酸作为底物, 在核酸化学中发挥着举足轻重的作用。在DNA分子机器的构筑过程中,

图 4 熵驱动的三维DNA步行者分子机器^[25] (网络版彩图)
Figure 4 Entropy-driven 3D DNA walker ^[25] (color online).

生物酶也毫无意外地成为驱动分子机器快速运转的一个重要选择。目前文献报道的用于驱动DNA步行者分子机器的生物酶主要有切口酶^[26]和核酸外切酶III (Exo III)^[27]。由于生物酶具有高效、可靠的特性,使得与之相关的分子机器运转效率与传统的分子机器相比高出近三个数量级。

4.1 切口酶驱动

Turberfield课题组^[28]在DNA折纸的二维平面上构筑了一个100 nm长的DNA轨道(图5(a)),借此来观察步行DNA链在轨道上的匀速前进。轨道DNA链存在一个切口酶识别位点。当步行DNA链与轨道DNA链结合形成杂交体之后,轨道链被切口酶切成两段。其中较短的一段(6个碱基)从杂交体上脱落,得到的单链部分可以作为“toehold”位点,引发相邻的轨道链与杂交体的链取代反应,步行DNA链从一个轨道行进到另一个轨道。利用相同的原理,实现步行DNA链在轨道上的连续行走,从轨道的一端走到另一端。利用原子力显微镜,可以实时观察每一个行进步骤,清晰地揭示出分子机器的机械操作细节。

切口酶的驱动方式也被成功地应用于三维DNA步行者分子机器的设计。Le课题组^[29]将荧光标记的轨道DNA链和带有靶标识别单元的配体链(图5(b))按照一定的比例固定在AuNP上。利用AuNP猝灭轨道链的荧光,借助于靶标(链霉抗生素蛋白、血小板衍生生长因子或天花基因)与两个配体链(L1和L2)同时结合,将步行DNA链连接在AuNP表面,使步行DNA链可以

图 5 切口酶驱动DNA步行者分子机器。(a) 在DNA折纸轨道上的步行运行。其中上图为DNA折纸轨道的布局,轨道的正面是绿色单链轨道,反面是两排发夹(蓝色);下图为分子机器的运行机制^[28]。(b~d) 在三维轨道上的步行运行。其中(b)图中步行DNA链依靠与靶标的结合作用连接在AuNP上^[29]; (c, d) 图中步行DNA链则直接连接在AuNP上,通过与短链DNA杂交或设计成发夹结构进行封闭^[30,31] (网络版彩图)

Figure 5 Nicking endonuclease-driven DNA walkers. (a) Walking operation on the DNA origami track. The above picture shows the layout of the DNA origami track. The front of the track is a green single-chain track, and the reverse side is two rows of hairpins (blue); the figure below shows the operating mechanism of the molecular machine ^[28]. (b~d) Walking on a three-dimensional orbit. Where in (b), the walking DNA strand is linked to AuNPs by binding to the target ^[29]; in the (c, d) the walking DNA strand is directly linked to the AuNP, and blocked by hybridizing with a short-stranded DNA or by designing as a hairpin structure ^[30,31] (color online).

与轨道DNA链以一种类似于分子内的方式结合。结合之后,底物链被切口酶切成两段。随着稳定性的下降,杂交体解链,释放的步行DNA链在轨道上行走,同时实现荧光信号的放大。研究表明,步行DNA链在每个AuNP上的行走步数可达~375步。为克服溶液中游离的步行DNA链与底物链的非特异性结合,降低背景信号,他们将步行DNA链上的底物识别位点用一个短的阻断链(blocker)进行部分封闭。进而借助于底物链与阻断链的竞争作用,提高信号放大的特异性。

Brock大学Li课题组^[30]则是将步行DNA链直接连接在了AuNP表面, 并对其识别位点用阻断链进行了封闭(图5(c)). 在靶标DNA的存在下, 阻断链与靶标结合, 释放出的步行DNA链在切口酶的驱动下在轨道上自动前行.

利用类似的策略, 南京大学Li课题组^[31]设计了一种T4多聚核苷酸激酶(T4 PNK)和 λ 核酸外切酶引发的、切口酶驱动的双链DNA步行者分子机器(图5(d)), 实现了T4 PNK的酶活性检测. 在这一设计中, 步行DNA链首先设计为发夹结构, 切口酶识别位点包埋于发夹的环中, 链的5'-端为羟基. 在T4 PNK的作用下, 5'-端的羟基转化为磷酸基团, 触发 λ 核酸外切酶对发夹中双链的水解作用, 导致发夹结构打开, 环部的切口酶识别位点释放. 步行DNA链随之与轨道DNA链结合, 在切口酶的推动下引发分子机器的步行运动.

4.2 核酸外切酶III驱动

Fan课题组^[32]于2017年报道了以核酸外切酶III为驱动力的三维DNA步行者分子机器. 三维DNA轨道构筑在球型的AuNP上. 当步行DNA链(图6, 红色)与轨道DNA链(绿色)结合形成二倍体时, 轨道DNA链的3'-端处于平末端或凹进的状态, 可以作为Exo III的底物而被逐个碱基地切除. 释放出来的步行DNA链又会与邻近的轨道DNA链结合, 实现预期的步行运动. 由于Exo III的水解速率比核酸内切酶高出约100~1000倍, 确保了DNA步行运动的高速持续运行. 但也正是由于该酶超高的水解效率, 实验过程中酶的用量要进行严格的控制, 否则可能会带来较高的背景信号.

Wang课题组^[18]也构建了一个Exo III参与的三维DNA步行者分子机器, 实现了癌胚抗原(CEA)的高灵敏度、高特异性级联放大检测. 在这一工作中, 他们在分子机器之前加入了一个步行DNA链的生成步骤

(图7). 利用靶标CEA与发夹型DNA链H1中的适配体序列作用, 导致发夹结构打开, 释放出的单链部分利用Toehold介导的链置换反应与另一发夹DNA链H2结合生成Exo III的底物. 该底物在Exo III作用下生成步行DNA链. 再度利用Toehold介导的链置换反应实现步行DNA链在三维轨道上的行走, 并把可形成G-四链体的H4链固定在DNA轨道上, 最后, 利用荧光探针NMM对G-四链体的特异性识别, 给出输出信号. 该生物传感器用于CEA检测的线性范围为 $10\sim 100\text{ ng mL}^{-1}$, 检出限为 1.2 pg mL^{-1} , 并具有良好的特异性. 通过人血清中的CEA的检测证明了其在生物传感中的适用性, 并在临床诊断中显示出巨大的应用潜力. 在这一例子中, DNA链的步行运动实际上还是借助于链杂交作用进行驱动, Exo III只是参与到了前一步的步行DNA链的放大制备当中.

5 DNA酶驱动的DNA步行者分子机器

由于生物酶具有高效、可靠的特性,使得与之相

图 6 Exo III 驱动的三维DNA步行者分子机器^[32] (网络版彩图)

Figure 6 Exo III-driven 3D DNA walker molecular machine [32] (color online).

图 7 Exo III辅助的DNA步行者分子机器用于癌胚抗原检测^[18] (网络版彩图)

Figure 7 Exo III-assisted DNA walker for CEA detection [18] (color online).

关的分子机器运转效率与传统的分子机器相比高出近三个数量级。由于将生物酶引入到细胞内部相对比较困难, 因此, 生物酶驱动 DNA 步行分子机器, 很难应用于活细胞内部。用金属离子辅助的 DNA 酶代替生物酶用于步行者分子机器的设计, 可以有效地解决这个问题。DNA 酶是指通过体外筛选技术得到的具有催化活性的一类人工模拟酶^[33~37]。由于具有天然酶所无法比拟的一些优势(稳定、价廉、易于修饰、存储方便、可人工批量合成等), 不仅在生物传感和基因治疗领域显示了广阔的应用前景, 而且被成功地应用于 DNA 步行者分子机器的研究。

5.1 Mn^{2+} DNA 酶驱动

利用 Mn^{2+} 辅助的 DNA 酶进行驱动, Le 课题组^[38] 构建了一个三维 DNA 步行者分子机器, 实现了细胞内 miRNA 的影像检测。轨道 DNA 链和步行 DNA 链按一定比例组装在 20 nm 的 AuNP 上, 轨道 DNA 链用荧光基团进行标记, 其上包含 DNA 酶的底物序列(图 8); 步行 DNA 链上包含 DNA 酶的酶序列, 并用锁链(locking strand)进行封闭, 防止其与底物序列结合。当锁链遇到

图 8 Mn^{2+} DNA 酶驱动 DNA 步行者分子机器在活细胞内的操作^[38] (网络版彩图)

Figure 8 Operation of Mn^{2+} -driven DNA walker in living cells^[38] (color online).

靶标 miRNA 并与之结合从步行 DNA 链上脱离下来以后, 步行 DNA 链上的酶序列与轨道 DNA 链上的底物序列结合, 并在 Mn^{2+} 的辅助下将底物序列切成两段, 释放出轨道链上的荧光基团和步行 DNA 链。随着步行 DNA 链在轨道链上的持续行走, 可实现荧光信号的放大。通过简单的共孵育, 即可将分子机器所需的 Mn^{2+} 引入到细胞内部, 从而在活细胞内部实现 DNA 步行者分子机器的高速运转。这也成为该工作的一大亮点。

5.2 Zn^{2+} DNA 酶驱动

Yang 课题组和 Jiang 课题组通过构建 Zn^{2+} DNA 酶驱动的三维 DNA 步行者分子机器, 分别实现了活细胞内 miRNA 的原位成像分析和体外放大检测。在 Yang 课题组^[39]报道的方法中, 分子机器的轨道链(图 9(a), MB1)和步行链(MB2)都用荧光基团 Cy5 进行标记, 并均设计为发夹结构。 Zn^{2+} DNA 酶的底物序列和酶序列分别包埋在 MB1 和 MB2 的环部。当其进入到细胞内部后, 细胞内的靶标 miRNA 可以将 MB2 的发夹结构打开, 释放出的酶序列与 MB1 环上的底物序列结合, 并在辅因子 Zn^{2+} 的存在下将其切成两段。这样, 借助于 Zn^{2+} DNA 酶对轨道链上底物序列的连续切割, 推动细胞内分子机器的自动运行。实验结果表明, 一个靶标分子可以引发一系列的剪切反应, 实现有效的信号放大。miRNA 体外检测的检出限为 0.1 nM, 并成功地实现了细胞内 miRNA 的原位成像。Jiang 课题组^[40]则是将 Zn^{2+} DNA 酶驱动的三维 DNA 步行者分子机器作为一个信号放大步骤, 进行了无酶(无生物酶)、无标记的荧光生物传感器的设计(图 9(b))。

分子机器的运行原理同样是利用靶标 miRNA 释放步行 DNA 链上的酶序列, 引发步行 DNA 链在轨道链上的行走及对轨道链的连续剪切。剪切反应释放的短链 DNA 又可用于引发随后的催化发夹组装(CHA)反应, 给出包含多个 G-四链体结构单元的长双链 DNA, 借助 NMM 给出放大的荧光信号输出。利用 DNA 分子机器及 CHA 的协同信号放大, 可以实现靶标 miRNA 的高灵敏检测, 检出限约为 7.9 fM。

5.3 Mg^{2+} DNA 酶驱动

与 Zn^{2+} 不同, Mg^{2+} 在人体内的含量较为丰富, 细胞内的含量可达 5 mM。 Mg^{2+} 不仅是调节体液平衡的重要因素之一, 还是许多酶的激活剂。利用 Mg^{2+} DNA 酶作

图9 Zn^{2+} DNA酶驱动的DNA步行者分子机器用于活细胞内miRNA的原位成像(a)^[39]和无酶、无标记miRNA传感器的设计(b)^[40] (网络版彩图)

Figure 9 Zn^{2+} -driven DNA walker for (a) *in situ* imaging of miRNAs in living cells^[39] and (b) design of enzyme-free, label-free miRNA sensors^[40] (color online).

为驱动力,人们也进行了DNA步行者分子机器的设计研究,实现了多种生物靶标的体外检测和细胞内成像研究^[28,38]。在这一方面,Wang课题组^[41]开展了较为系统的研究工作。2016年,该课题组构建了 Mg^{2+} DNA酶驱动的三维DNA分子机器(图10(a)),实现了活细胞内ATP分子的成像分析。分子机器的设计如下:固定在AuNP上的底物链用荧光基团标记,其上包含DNA酶的底物序列。步行DNA链设计为适配体酶链,其上同时含有DNA酶的酶序列及ATP的适配体序列。步行DNA链并未固定在AuNP上,而是事先以3:1的比例与底物链混合。也就是说,AuNP上有1/3的底物链处于与步行DNA链结合的状态。但在两者形成的杂交体中,由于适配体序列处于一种松散状态,不能形成活化的 Mg^{2+} DNA酶。而当与ATP结合后,适配体序列折叠成特定的紧密结构,进而形成 Mg^{2+} 的结合位点,引发对

图10 Mg^{2+} DNA酶驱动的DNA步行者分子机器。分别采取了适配体酶(a)^[41]、裂分DNA酶(b)^[42]和发夹锁定DNA酶(c)的策略进行分子机器的设计^[43] (网络版彩图)

Figure 10 Mg^{2+} -driven DNA walker. Molecular machine design was carried out using (a) aptamer enzyme^[41], (b) splitting DNAzyme^[42] and (c) hairpin-locking DNAzyme strategy^[43] (color online).

底物链的切割反应,启动步行DNA链(携带ATP分子)在轨道上行走,产生增强的荧光信号。

之后,该课题组又设计了两种 Mg^{2+} DNA酶驱动的DNA步行者分子机器。值得一提的是,这两种分子机器实现了不需要外加 Mg^{2+} ,仅在细胞内源性 Mg^{2+} 存在下的miRNA影像检测。在这两种分子机器的设计过程中,分别使用了裂分(splitting)的和发夹锁定的DNA酶。在前一种设计方案中(图10(b))^[42],固定在AuNP表面的

轨道由三条DNA链组成, 其中一条为DNA酶的底物链, 标记其上的荧光基团被AuNP和荧光猝灭基团共同猝灭. 另两条为拆分成两段的酶链. 三条链组成杂交体, 其中两条链各甩出一段单链DNA尾巴. 当靶标miRNA与这两段尾巴同时结合形成四链杂交体后, 产生 Mg^{2+} 的结合位点. 在 Mg^{2+} 的存在下, DNA酶被激活, 底物链被切成两段, 最终导致整个杂交体解链. 释放出的靶标miRNA在AuNP上寻找新的三链杂交体轨道, 实现步行运动. 在这一设计中, 在轨道上进行步行运动的是靶标miRNA. 在后一种分子机器设计方案中(图9(c))^[43], 同样是以细胞内的靶标miRNA作为步行链. Mg^{2+} DNA酶的底物序列和酶序列被设计在了同一条DNA链上, 标记荧光基团后被固定在AuNP表面作为分子机器的轨道. 通过将该链设计成发夹结构, 使酶序列与底物序列相互远离而不能形成活化的DNA酶. 在细胞内靶标miRNA的存在下, 链的二级结构发生变化而转化成活化的 Mg^{2+} DNA酶. 在 Mg^{2+} 的存在下, 底物序列被切成两段, 给出荧光信号的同时, 释放的靶标miRNA在DNA轨道上行走. 如前所述, 这两个例子的亮点在于利用内源性的 Mg^{2+} 即可驱动分子机器在细胞内的持续运转. 但由于细胞内 Mg^{2+} 的浓度低于 Mg^{2+} DNA酶所需的最佳浓度, 导致分子机器在细胞内的行走速率偏慢, 需要8~10 h才能使细胞内的荧光信号达到最大. 添加外源性的 Mg^{2+} 可以在一定程度上加快分子机器的运转速率.

6 适配体底物驱动DNA步行者分子机器

就前面提到的DNA步行者分子机器而言, 虽然有些已经被证明可以应用于活细胞内部, 但它们都存在一个共同的问题, 即集成化的程度不够. 也就是说, 它们并没有把分子机器运行所需的主要成分都集成到同一纳米体系当中. 当进行细胞实验时, 这些游离于体系之外的成分(如金属离子、燃油DNA链等)需要额外添加, 这不仅增加了操作的复杂性, 而且很难控制这些成分在细胞内的时空分布, 从而影响分子机器的运转效率. 为此, Ye课题组^[44]在2018年报道了一个高度集成的DNA分子机器. 它借助于细胞内源性的ATP, 利用ATP与适配体的结合作用进行驱动, 实现了分子机器在细胞内的持续运转(图11). 分子机器的轨道有两条DNA组成, 两者之间形成中间带有凸起的杂交体结构,

图 11 ATP驱动DNA步行者分子机器用于细胞内miRNA的成像分析^[44] (网络版彩图)

Figure 11 ATP-driven DNA walker for imaging analysis of intracellular miRNAs ^[44] (color online).

其中一条链连接在AuNP上, 另一条链用荧光基团标记. 步行DNA链同样连接在AuNP上, 并设计为发夹结构, 其中用于对靶标进行识别的序列一部分包埋在双链的茎部, 一部分设计在环上. 当它们整体地进入到细胞内以后, 细胞内的靶标miRNA与步行DNA链结合, 发夹结构打开. 释放出来的序列借助于Toehold介导的链置换反应将轨道中的荧光标记链取代下来. 而这条荧光标记链中的适配体序列随后又可以与细胞内的ATP分子结合重新释放出步行DNA链, 推动步行DNA链在轨道上前行. 同时, 荧光基团与AuNP彻底远离, 荧光恢复. 利用设计的分子机器, 实现了细胞内靶标miRNA的高灵敏成像分析. 在这一分子机器设计方案中, 推动分子机器运转的ATP分子由细胞提供, 分子机器运转过程中无需再添加其他任何的辅助试剂, 有利于推进分子机器在细胞甚至是活体中的应用. 但分子机器的设计相对复杂, 需要对步行DNA链和轨道DNA链的序列进行严格的筛选.

7 光驱动DNA步行者分子机器

就前面介绍的利用核酸杂交和酶促反应驱动DNA步行者分子机器而言,存在的一个共同问题就是难以实现远程控制,并且运行效率会受到能量供应等因素的限制.为实现DNA分子机器的手动和远程控制,Endo课题组^[45]尝试以光作为驱动力,进行了步行者分子机器的设计(图12).他们将轨道DNA链固定在二维的DNA折纸上.每一条轨道链都由两段DNA序列组成,两两之间用二硫键连接.步行链则由三段DNA序列组成,相邻两段之间用光敏性的苊分子进行连接.在步行链与轨道链形成的杂交体中,两个苊分子与二硫键相互接近.这样,在350 nm的光照下,苊分子吸收光的能量并与二硫键之间发生电子转移,将二硫键断开.其中,轨道链中较短的一段从杂交体上脱离,释放出一小段的步行DNA序列.然后,借助于Toehold介导的链置换反应,步行DNA链行进到邻近的轨道上.值得一提的是,这种光驱动的DNA步行运动可以借助于高速原子力显微镜进行实时追踪.

8 混合驱动DNA步行者分子机器

实际上,就一个DNA步行者分子机器而言,所采用的驱动方式可以不仅仅局限于一种,即可以采取多种方式进行联合驱动.2011年,Willner课题组^[17]报道了这样一种联合驱动的“双足”DNA步行者分子机器,

图12 光驱动DNA步行者分子机器^[45] (网络版彩图)

Figure 12 Light-driven DNA walker ^[45] (color online).

如图13所示,在起始状态下,步行者的两足分别定位于轨道I和II上.当加入 Hg^{2+} 后,借助于T- Hg^{2+} -T碱基对的形成,一足从轨道I迈到轨道III上.当把体系的pH进一步调节到酸性条件,使轨道II形成i-motif结构时,又可以使另一足从轨道II迈到轨道IV上,从而实现步行DNA链在轨道上的步行运动.这种步行运动既可以前行,也可以后退.如将体系的pH从酸性调节至中性以破坏i-motif结构,可以使轨道IV上的足后退到轨道II上.进一步加入半胱氨酸,让其与 Hg^{2+} 反应破坏T- Hg^{2+} -T碱基对,又可以使定位在轨道III上的足退回轨道I上.在这一例子中,通过联合使用 Hg^{2+} /半胱氨酸和 H^+ / OH^- 触发步行DNA链的行走,实现了步行运动的可控操作.

9 总结与展望

分子机器在疾病精准诊断、药物靶向传输、超高密度信息存储^[23]、新材料开发^[46,47]、传感器设计等众多领域都有着潜在的应用前景.本综述根据所用的驱动力的不同,对一类重要的分子机器——DNA步行者分子机器进行了介绍.在各国科学家的共同努力下,DNA步行者分子机器的研究获得了一系列重要的进展,初步实现了分子机器在活细胞内的应用研究.但仍有许多问题亟待解决,如运行效率仍远低于天然的分

图13 混合驱动的“双足”DNA步行者分子机器^[17] (网络版彩图)

Figure 13 Hybrid-driven “biped” DNA walker ^[17] (color online).

子机器、尚无法应用于生物活体领域等. 就目前设计的DNA步行者分子机器而言, 多利用靶标分子启动步行DNA链的运行, 但由于一个靶标分子往往只能启动一条步行DNA链的运动, 分子机器运转效率偏低. 如果靶标可以重复使用, 即如果一个靶标分子可以启动多个步行DNA链的步行运动, 无疑会极大地提高DNA步行者的运行效率. 为实现活体应用的目标, 则需要构建高度集成化的DNA分子机器, 即将分子机器运行所

需要的各种元件尽可能地组装在同一稳定的纳米体系当中, 从而将分子机器运转所需的各种成分整体地输送到靶标部位, 提高各个成分在靶标部位浓度分配的可控性, 改善分子机器的运转效率. 总的来说, 有关DNA步行者分子机器的研究近年来虽然获得了极大的进展, 但距离人们真正地享受到分子机器给人类生活带来的便利, 还有很长的路要走, 仍需要科学家的不懈努力.

参考文献

- Kay ER, Leigh DA. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 10080–10088
- Davis AP. *Nature*, 1999, 401: 120–121
- Mickler M, Schleiff E, Hugel T. *ChemPhysChem*, 2008, 9: 1503–1509
- Shin JS, Pierce NA. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 10834–10835
- Bath J, Turberfield AJ. *Nat Nanotech*, 2007, 2: 275–284
- Liu H, Liu D. *Chem Commun*, 2009, 421: 2625–2636
- Yurke B, Turberfield AJ, Mills AP, Simmel FC, Neumann JL. *Nature*, 2000, 406: 605–608
- Tian Y, Mao C. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 11410–11411
- Wilner OI, Willner I. *Chem Rev*, 2012, 112: 2528–2556
- Sherman WB, Seeman NC. *Nano Lett*, 2004, 4: 1203–1207
- Omabegho T, Sha R, Seeman NC. *Science*, 2009, 324: 67–71
- Kelly TR. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 4124–4127
- Lund K, Manzo AJ, Dabby N, Michelotti N, Johnson-Buck A, Nangreave J, Taylor S, Pei R, Stojanovic MN, Walter NG, Winfree E, Yan H. *Nature*, 2010, 465: 206–210
- Thubagere AJ, Li W, Johnson RF, Chen Z, Doroudi S, Lee YL, Izatt G, Wittman S, Srinivas N, Woods D, Winfree E, Qian L. *Science*, 2017, 357: eaan6558
- Xing Y, Liu B, Chao J, Wang L. *RSC Adv*, 2017, 7: 47425–47434
- Tian Y, He Y, Chen Y, Yin P, Mao C. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 4355–4358
- Wang ZG, Elbaz J, Willner I. *Nano Lett*, 2011, 11: 304–309
- He MQ, Wang K, Wang WJ, Yu YL, Wang JH. *Anal Chem*, 2017, 89: 9292–9298
- Alivisatos AP, Johnsson KP, Peng X, Wilson TE, Loweth CJ, Bruchez MP, Schultz PG. *Nature*, 1996, 382: 609–611
- Wang C, Tao Y, Song G, Ren J, Qu X. *Langmuir*, 2012, 28: 14829–14837
- Jung C, Allen PB, Ellington AD. *Nat Nanotech*, 2015, 11: 157–163
- Li W, Wang L, Jiang W. *Chem Commun*, 2017, 53: 5527–5530
- Chao J, Wang J, Wang F, Ouyang X, Kopperger E, Liu H, Li Q, Shi J, Wang L, Hu J, Wang L, Huang W, Simmel FC, Fan C. *Nat Mater*, 2018, doi: 10.1038/s41563-018-0205-3
- Zhang DY, Turberfield AJ, Yurke B, Winfree E. *Science*, 2007, 318: 1121–1125
- Liang CP, Ma PQ, Liu H, Guo X, Yin BC, Ye BC. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 9077–9081
- Bath J, Green SJ, Turberfield AJ. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 4358–4361
- Liu S, Cheng C, Liu T, Wang L, Gong H, Li F. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 99–104
- Wickham SFJ, Endo M, Katsuda Y, Hidaka K, Bath J, Sugiyama H, Turberfield AJ. *Nat Nanotech*, 2011, 6: 166–169
- Zhang H, Lai M, Zuehlke A, Peng H, Li XF, Le XC. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 14326–14330
- Yang X, Tang Y, Mason SD, Chen J, Li F. *ACS Nano*, 2016, 10: 2324–2330
- Feng C, Wang Z, Chen T, Chen X, Mao D, Zhao J, Li G. *Anal Chem*, 2018, 90: 2810–2815

- 32 Qu X, Zhu D, Yao G, Su S, Chao J, Liu H, Zuo X, Wang L, Shi J, Wang L, Huang W, Pei H, Fan C. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 1855–1858
- 33 Liu J, Lu Y. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 6642–6643
- 34 Willner I, Shlyahovsky B, Zayats M, Willner B. *Chem Soc Rev*, 2008, 37: 1153–1165
- 35 Liu J, Lu Y. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 7587–7590
- 36 Wang Z, Lee JH, Lu Y. *Adv Mater*, 2008, 20: 3263–3267
- 37 Travascio P, Li Y, Sen D. *Chem Biol*, 1998, 5: 505–517
- 38 Peng H, Li XF, Zhang H, Le XC. *Nat Commun*, 2017, 8: 14378
- 39 Liu J, Cui M, Zhou H, Yang W. *ACS Sens*, 2017, 2: 1847–1853
- 40 Wang R, Wang L, Xu X, Jiang W. *Sens Actuat B-Chem*, 2018, 268: 287–292
- 41 Yang Y, Huang J, Yang X, Quan K, Wang H, Ying L, Xie N, Ou M, Wang K. *Anal Chem*, 2016, 88: 5981–5987
- 42 Wu Y, Huang J, Yang X, Yang Y, Quan K, Xie N, Li J, Ma C, Wang K. *Anal Chem*, 2017, 89: 8377–8383
- 43 Yang Y, Huang J, Yang X, He X, Quan K, Xie N, Ou M, Wang K. *Anal Chem*, 2017, 89: 5850–5856
- 44 Ma PQ, Liang CP, Zhang HH, Yin BC, Ye BC. *Chem Sci*, 2018, 9: 3299–3304
- 45 Yang Y, Goetzfried MA, Hidaka K, You M, Tan W, Sugiyama H, Endo M. *Nano Lett*, 2015, 15: 6672–6676
- 46 De Bo G, Gall MAY, Kitching MO, Kuschel S, Leigh DA, Tetlow DJ, Ward JW. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 10875–10879
- 47 Lam KH, Jin R. *Curr Opin Struct Biol*, 2015, 31: 89–95

Recent research progress on DNA walker-based molecular machines

Jing Wang¹, Dong-Xia Wang¹, Jia-Yi Ma¹, De-Ming Kong^{1,2*}

¹ Research Centre for Analytical Sciences, College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China

² Tianjin Key Laboratory of Biosensing and Molecular Recognition, Tianjin 300071, China

*Corresponding author (email: kongdem@nankai.edu.cn)

Abstract: As an important step in learning from nature, artificial molecular machines have attracted more and more public attention. Due to the distinct advantages of well-defined Watson-Crick base pairing rule, programmable sequence, diverse and controllable secondary structures, DNA are considered as promising building blocks for artificial molecular machines. In this review, recent research progress on DNA walker, an important member in artificial molecular machine family, is introduced on the basis of difference in driving forces, and the future development of this kind of molecular machines is prospected.

Keywords: molecular machines, DNA walker, biosensing, bioimaging, nanoprobe

doi: [10.1360/N032018-00228](https://doi.org/10.1360/N032018-00228)