基于DNA折纸的荧光阵列构建及应用

王飞¹, 王丽华², 樊春海^{1,2}, 李茜^{1*}

1. 上海交通大学化学化工学院, 上海 200240;

2. 中国科学院上海应用物理研究所, 物理生物实验室, 上海 201800

* 联系人, E-mail: liqian@sinap.ac.cn

2018-08-15 收稿, 2018-09-14 修回, 2018-09-17 接受, 2018-10-31 网络版发表

国家自然科学基金(41474032, 21505148)资助

摘要 以DNA折纸为模板的荧光阵列具有精准的结构可编程性以及可定量编程的光谱特征. 利用DNA折纸灵活的设计性, 多种维度不同模式的荧光阵列构建方案相继被提出, 并在生物传感、超分辨成像、新型荧光探针设计等领域得到了应用. 本文简要介绍了DNA折纸技术, 对不同维度DNA折纸上的荧光阵列的构建和应用做了综述, 并展望了基于DNA折纸的荧光阵列的发展趋势和应用前景.

关键词 荧光阵列, DNA折纸, DNA-PAINT, 纳米标尺, 超灵敏传感

有机荧光分子具有体积小、亮度高等优良的光学性能, 广泛应用于纳米到微米尺度范围内的各种生物结构的成像以及靶标分子的检测等领域. 与单分散的荧光组合相比, 结构上精确调控的荧光分子阵列提供了荧光分子空间排布的精确可控性和光谱的定量编程性等特性, 为扩展荧光分子的应用范围提供了新的可能性.

DNA纳米技术利用充分定义的DNA双螺旋结构以及可预测的Watson-Click碱基互补配对原则来构建自主设计的纳米物体, 其中DNA折纸技术尤为突出. 2006年Rothemund^[1]首次报道了DNA折纸技术. 他使用一条长的骨架DNA单链和数百条短的订书钉单链, 通过杂交方式的设计构建了矩形、三角形、五角星、笑脸等DNA纳米结构, 称之为DNA折纸(DNA origami). DNA折纸的设计与合成过程如下: (1) 根据目标形状设计骨架单链的折叠路径; (2) 根据DNA序列互补杂交的空间结构特点设计订书钉链的结合方式, 订书钉链的长度一般控制在15~60个碱基; (3) 根据订书钉链的结合位置, 生成每一条订书钉链的核苷

酸序列; (4) 将骨架链与订书钉链混合, 设置合适的退火程序确保订书钉链结合到骨架链的设计位点, 退火得到目标DNA折纸结构. 使用相似的策略, 研究人员已经可以合成各种形状的二维结构. 通过调节结合的螺旋数目, 可以得到非整数圈的转动, 进而调节三维的折叠方向. 研究人员陆续构建了DNA纳米管^[2,3]、DNA纳米棒^[4]、三维球体^[5]、立方体^[6]等多种空间结构(图1). DNA折纸已发展成为广泛使用的构建纳米尺度的空间分子阵列的平台^[8,9].

DNA折纸具有纳米级的精确寻址能力, 为设计位置精确的空间阵列提供了结构基础. 以矩形DNA折纸为例, 订书钉链的3'端和5'端分别呈现出5.18×6 nm的矩阵结构, 提供了400多个可寻址位点, 便于设计不同模式的阵列结构. DNA折纸技术的发展使得多种维度多种形状的DNA折纸可以较为便捷地设计和组装, 因此一维(1D)、二维(2D)和三维(3D)阵列的设计均具有丰富的DNA折纸模板. 此外, DNA单链通过碱基互补配对形成双链, 这一简单有效并具有高度正交性的结合方式, 为DNA折纸上阵列的稳定构

引用格式: 王飞, 王丽华, 樊春海, 等. 基于DNA折纸的荧光阵列构建及应用. 科学通报, 2019, 64: 989–1000

Wang F, Wang L H, Fan C H, et al. Assembly and application of DNA origami-based fluorescence arrays (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 989–1000, doi: 10.1360/N972018-00844

图1 (网络版彩色)不同形貌DNA折纸的设计和组装示例^[7]. (a) 结构示意图; (b) 透射电子显微镜图

Figure 1 (Color online) Representative examples of different DNA origami structures^[7]. Schematic illustration (a) and transmission electron microscope images (b) of DNA origami

建和多样化编程提供了分子基础.

相对于原子力显微成像(atomic force microscopy, AFM)等表征手段,基于光学的成像方法可以用来观察没有产生显著形貌变化的样品,包括DNA折纸表面伸出的单条荧光短链.探测器件(例如电子倍增电荷耦合器件(EMCCD)和互补金属氧化物半导体(CMOS))的发展也为荧光信号的探测提供了更高的时间分辨率,方便通过荧光标记来研究分子间短暂的相互作用,为近年来分子间作用机制的研究做出了重要贡献. DNA-PAINT(DNA point accumulation for imaging in nanoscale topography)超分辨成像方法^[10,11]的提出和应用,使得纳米尺度空间分辨率的形貌表征成为可能. Dai等人^[12]通过对成像方法与数据处理过程的优化,实现了5 nm以下的空间分辨率,为DNA折纸上荧光阵列的形貌表征提供了新的方法.

本文侧重于介绍基于DNA折纸的多维度荧光阵列的构建与光学超分辨表征,并简要介绍了相关应用,展望了基于DNA折纸的荧光阵列的发展趋势.

1 基于DNA折纸的荧光阵列构建

DNA折纸技术在近年来得到了快速的发展,在分子量、结构复杂度、生物应用等方面取得了重大发展.近原子精度的空间控制能力使其可以将多种纳米颗粒组装成为功能化的器件^[13],包括通过对金属颗粒的精确排布实现表面等离子信号增强^[14-17]、通过对蛋白的精确排布建立单分子作用研究平台^[18]等,充分体现了DNA折纸的灵活多样的结构设计和丰富的可寻址位点所带来的优势.利用这一优势,我们可以根据功能的需要定制阵列的排布方法,针对于不

同应用需求实现各种空间维度和形状的有机荧光小分子阵列排布.

1.1 基于DNA折纸的一维荧光阵列

具有结构特征的一维荧光阵列不仅可以通过编码不同颜色的荧光分子来获得丰富的多色荧光探针,同时空间阵列包含的结构信息也可以用于研究分子间相互作用模式,因此在研究DNA纳米结构与细胞膜的相互作用以及纳米药物的循环模式等领域具有应用潜力.利用DNA折纸技术组装的一维纳米棒结构具有微米级的机械刚性长度^[19],确保了1D荧光阵列空间结构的稳定性. DNA纳米结构上高达单碱基的修饰位点选择性,提供了低于1 nm的空间可编程性.这些结构特性为1D阵列的设计提供了基础,使得DNA纳米棒成为1D分子阵列构建的理想模板^[20-22].

Lin等人^[20]在一个长度为800 nm的六螺旋DNA纳米棒上定义了3个荧光编码区,每一个编码区长度约为28 nm,分别组装不同的荧光分子(Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647, Cy3)作为RGB三原色通道.每1个编码区有3种选择,因此通过3种荧光分子类型的编码可以构建 $3^3=27$ 种不同组合,即可构建27种不同的条形码.在每1个编码区内,订书钉链延长21个碱基作为结合位点,荧光分子标记的DNA单链与结合位点互补杂交形成荧光编码位点.为了进一步提高条形码的信息容量,他们设计了更多的编码区,将可编码信息量进一步提高.单分子荧光多色成像表明荧光编码区的实测间距与设计相吻合(图2(a)),说明在DNA折纸上构建的荧光条形码结构具有较高的一

图2 不同维度DNA折纸上的荧光分子阵列示例。(a) 基于一维DNA纳米棒结构的1D荧光阵列^[20]。(b) 基于二维矩形DNA折纸的2D多色荧光阵列及其荧光结构表征, 每一个颜色的圆点代表一种荧光分子^[12]。(c) 基于立体DNA支架上的3D荧光阵列^[23]

Figure 2 Representative examples of fluorescence arrays of different dimensions on DNA origami templates. (a) 1D arrays on a DNA nanorod^[20]. (b) Multi-colored 2D arrays on a rectangular DNA origami. Dots of different colors represent different fluorescent molecules^[12]. (c) 3D arrays on a cubic DNA origami^[23]

致性。实验发现, 当多种荧光条形码在体系中同时存在时, 仍然可以通过荧光成像清晰区分, 表明荧光条形码具有发展成为多色生物探针的潜力。

1.2 基于DNA折纸的二维荧光阵列

二维荧光阵列的构建主要依赖于平面形的DNA折纸, 其中矩形DNA折纸的使用最为广泛。矩形DNA折纸的订书钉链的3'端和5'端均呈现规则的矩阵结构, 方便构建像素化的规则的分子阵列。通过对指定间隔的订书钉链的延长或修饰即可实现2D的分子阵列(图2(b))。蜂窝形的折叠示意图^[12]简化了2D形状排布的设计过程, 每一个单元对应该位置的订书钉链, 折纸表面二维形状的设计可以通过对蜂窝示意图的单元的编程实现。2D阵列的构建无论对于成像还是单分子行为研究都具有十分重要的意义。2D阵列的结构不仅可以提供更多维度的信息编码位点, 促进功能的多样化设计, 并且可以用于探索分子的空间排布方式对其功能的影响。同时2D模板上界面效应加速了化学反应^[24], 使得平面DNA折纸成为了一种优秀的生物传感平台。此外, DNA折纸表面荧光阵列的形状编码可以提供“所见即所得”的信息^[25], 可以用于构建纳米显示器实现信息的可视化。以DNA折纸为模板的2D分子阵列的构建在近年得到了广泛的研究和应用。Jungmann等人^[25]在方块折纸上设计了可以分别呈现0~9, 10个数字的结构, 在不同的成像条件下可以分别显示不同的数字(图2(b)), 是

纳米尺度信息可视化的重要探索。

1.3 基于DNA折纸的三维荧光阵列

DNA纳米技术的近年来的快速发展使得研究人员相继提出了多种3D结构的组装策略, 为3D荧光阵列的构建提供了模板。与2D阵列的构建思路类似, 3D阵列的构建依赖于对立体DNA折纸结构的修饰位点的选择。

Linuma等人^[23]利用三角架结构单元来构建多面体结构的DNA折纸。首先将M13 mp18骨架链与订书钉链退火得到三角架结构; 然后通过三角架单体的进一步组装获得不同的多面体结构, 通过对三角架的手臂间夹角的设计实现对多面体的边数控制。三角架的每一个手臂由16条平行的双螺旋结构组成, 确保了结构的刚性。通过延长多面体顶点处订书钉链, 得到了荧光链的结合位点(图2(c)), 荧光分子的空间排布呈现为不同的3D阵列结构。

2 荧光阵列结构排布的光学超分辨表征

纳米结构的表征对于理解分子机制及进一步的应用具有重要意义。荧光分子的信号可以通过多种仪器检测, 对其荧光阵列结构的表征主要依赖于相应的成像设备。AFM可以成像表面形貌发生较为明显变化的结构^[26], 而对于荧光阵列, 一般是荧光分子直接修饰在DNA折纸的订书钉链上, 或是通过短链互补杂交的方式锚定在DNA折纸的特定位点, 其

引起的形貌变化小于AFM可观察的范围,无法通过物理形状直接判断.

超分辨成像方法的提出使得通过光学方法表征超越光学衍射极限的结构成为可能. 利用基于随机定位的超分辨成像方法(包括光激活定位显微技术(PALM)^[27]、随机光学重建显微技术(STORM)^[28]、点累积纳米拓扑成像(point accumulation for imaging in nanoscale topography, PAINT)^[29]等), 研究人员已经可以实现10 nm以下的空间分辨率. 基于随机定位的超分辨方法中, 通过对缓冲液条件、DNA链长度、成像条件等优化, 使得大部分荧光分子处于暗态, 少数稀疏的荧光分子处于亮态, 根据点扩散函数(point spread function, PSF)的拟合来进行超分辨的单分子定位, 最后合并所有的单分子定位位点得到重建的超分辨图像. PAINT与DNA特异性相结合而产生的DNA-PAINT方法, 是PAINT技术的一个独特分支. DNA-PAINT技术的提出为DNA纳米结构的光学形貌

表征提供了新的思路, 目前已发展出2D成像、3D成像、多色成像、快速成像等针对于不同目标的超分辨成像方法.

2.1 DNA-PAINT荧光超分辨成像

Jungmann等人^[10]首先通过单分子荧光成像的方法, 展示了荧光短链与DNA折纸结构结合与解离的单分子作用动态过程. 他们发现解离系数(k_{off})与双链形成的长度密切相关, 当结合长度大约在7个碱基时, 表现为荧光短链与DNA折纸的瞬态结合. 基于此现象, 他们发展了DNA-PAINT超分辨成像技术. 不同于使用荧光分子直接标记目标, 该技术使用一段短的DNA序列作为目标链, 与之互补的另一条短单链(imager)使用荧光分子标记. 在成像溶液中, 目标短链被imager瞬态结合产生荧光闪烁现象(blinking)(图3(a)). 通过控制荧光闪烁的亮态和暗态持续时间, 实现了可用于超分辨重建的单分子定位,

图3 荧光阵列的光学超分辨成像. (a) DNA-PAINT超分辨成像中的荧光闪烁现象^[10]. (b) Exchange-PAINT对同一个DNA折纸上多种靶标的超分辨成像^[25]. (c) 动态FRET-PAINT超分辨成像^[30]

Figure 3 Optical super-resolution imaging of fluorescence arrays. (a) Blinking events in DNA-PAINT super-resolution imaging^[10]. (b) Exchange-PAINT imaging of multiple targets on the same DNA origami^[25]. (c) Dynamic FRET-PAINT super-resolution imaging^[30]

进而实现了纳米尺度上的空间结构表征。Chen等人^[31]验证了DNA-PAINT暂态结合具有高度的特异性,单分子定位的准确度与其发出的光子数密切相关。实验表明当积分时间高到300 ms时,可以分辨出DNA折纸上间距只有6 nm的2个位点^[11]。2012年, Lin等人^[20]使用DNA-PAINT对荧光条码1D阵列进行了清晰的超分辨成像。这些荧光条码排布在DNA纳米棒结构表面,位置间隔低至42 nm,超越衍射极限。

3D结构的DNA-PAINT成像一般通过对单分子光斑椭圆度的判断来确定轴向(z 方向)的定位。通过向光路中引入一个柱透镜,处于不同轴向位置的荧光分子产生不同椭圆度的光斑,对光斑所在位置的荧光强度分布进行二维高斯拟合,即可得到每一个随机闪烁位点的3D位置信息,进一步重建形成3D超分辨图像。Linuma等人^[23]对三角支架组装成的立体结构的定点进行标记,并使用3D DNA-PAINT的方法表征了构建的3D荧光阵列。

由于DNA折纸精确的可寻址特性,使得DNA-PAINT成像技术已经发展成为一种稳定的纳米结构的光学表征手段,可用于多种维度的荧光阵列排布的形貌表征。DNA-PAINT技术已经被广泛应用于3D纳米结构^[23]、细胞内的DNA与抗体结合^[25]、定量成像^[32]、高密度靶标^[12]等表征中。

2.2 Exchange-PAINT多路超分辨成像

由于在DNA-PAINT中, imager与DNA折纸上互补单链的结合是瞬态的,因此可以采用序列正交的多个imager分别对不同的位点进行成像。Jungmann等人^[25]发展了一种名为Exchange-PAINT的多路DNA-PAINT方法,可用于多种目标结构的超分辨重建。首先,不同类型的靶标使用相互正交的DNA序列标记,然后加入和第一种序列互补配对的imager(i1),进行DNA-PAINT成像。此时只有第1种靶标的结合位点可以被检测到,从而实现对第1种结构的特异成像。然后移除i1,加入i2,对第2种结构进行特异成像。依此顺序逐步完成对所有类型靶标的成像。

利用这一策略, Jungmann等人^[25]在同一块DNA折纸表面伸出的阵列中编码了0~9, 10个数字(图3(b)),并使用Exchange-PAINT的方法,对10个数字的形貌分别进行了表征。相对于传统的多色成像方法,该方法利用相同的光照条件和探测条件即可完成多目标的成像。DNA序列的高度可编程性,使得成

像目标的数目可以超越常规多色成像中荧光分子光谱的限制。同时,利用同一种荧光分子作为成像探针,可以克服使用多种荧光分子发光特性的差异,有利于提升定量分析的准确性。

2.3 基于FRET的DNA-PAINT超分辨成像

在DNA-PAINT成像过程中,游离在溶液中的imager仍然会产生背景荧光信号,限制了成像缓冲液中imager浓度的进一步提高。由于闪烁频率与imager的浓度正相关,浓度的限制进一步制约了DNA-PAINT的成像速度。为了解决这一问题, Auer等人^[30]将荧光共振能量转移(förster resonance energy transfer, FRET)技术与DNA-PAINT相结合,提出了FRET-PAINT的策略。他们将受体分子固定在阵列目标位点,而供体分子作为imager游离在成像缓冲液中。通过激发供体分子接收受体分子的发射信号得到荧光信号。在未形成FRET对的情况下,能量无法从供体传递到受体,因此无法探测到来自受体的荧光信号,而供体自身的发射信号在探测范围内也很微弱,从而实现了低背景荧光成像。只有在imager结合到折纸上的目标位点形成FRET对时,能量才能够从供体传递到受体,受体发光产生可探测的荧光信号。这种低背景的成像方式使得imager的浓度不再受限制,使得阵列结构的超分辨表征可以在数十秒的时间内完成。

由于受体分子在成像一定次数后被激光漂白,限制了单个受体分子的定位次数, Auer等人^[30]进一步提出了动态FRET-PAINT的方法(图3(c))。溶液中同时存在供体和受体分子,当2种荧光分子同时结合到DNA折纸上时,产生基于FRET的荧光信号,确保荧光闪烁事件持续更长时间。利用动态FRET-PAINT方法,可以清晰表征20 nm间隔的4×4阵列结构。该方法结合Dai等人^[12]提出的两部漂移校正算法,有望进一步提高DNA-PAINT技术的稳定性及时间空间分辨率,拓宽其应用范围。

3 基于DNA折纸的荧光阵列的应用

3.1 纳米标尺

在一块矩形DNA折纸上,通过对订书钉链的延长,可以提供200多个可独立标记的可寻址位点,这一技术为基于点定位的超分辨成像方法提供了丰富的纳米尺选择。另外, DNA折纸的分子量和结构都高

度均一,保证了其作为标尺本身的稳定性和可靠性.

2009年,Steinhauer等人^[33]首次提出了使用DNA折纸作为超分辨成像标尺的策略.他们在DNA折纸上设计了间隔为89.5 nm的两个荧光位点,研究了不同的成像方法以及不同界面封闭条件下的成像质量,为成像条件的优化提供了可行的方法.随后,Schmied等人^[21]进一步使用DNA纳米柱作为3D超分辨成像的标准(图4(a)).通过将DNA纳米柱垂直于成像界面或平躺于成像界面,分别提供轴向和横向的距离信息,提供了0~200 nm范围的3D成像标尺. Kaplan等人^[34]利用DNA折纸上固定间隔的1D荧光阵列作为超分辨成像的标尺,对酵母菌的Septin蛋白进行了单分子的成像表征,为Septin复合物内部首尾相连的单体组装方式提供了确定性的证据(图4(b)). Dai等人^[12]通过对DNA-PAINT成像中2D的荧光阵列内部栅格结构的校正进一步提升了成像分辨率,并发展出了无漂移标签的DNA-PAINT成像方法.

3.2 超灵敏生物传感器

生物传感器是一种将生物化学反应转换为更便于读取的信号器件,可以识别小分子、酶、蛋白、核酸等多种目标分子,并将其转化为可探测的光学信号、电子信号等^[35-39]. 传感器灵敏度的提高对于实际样本中生物信标的检测以及便携式设备的开发具有重要的意义. DNA折纸提供了创建分子阵列并精确控制其空间排布的平台. 通过对分子间相对位置

的设计来调控信号在DNA折纸表面的传递路径,并在经过的节点处产生响应信号,从而实现信号的放大,可以大幅度提高检测的灵敏度.

Wang等人^[40]提出了利用DNA Walker作为荧光信号放大器的策略. 如图5(a)所示,他们在一个矩形DNA折纸平台上构建FRET对标记的双链,当目标DNA链存在时,结合到DNA折纸上伸出的一个初始停留位点. 然后在该初始停留位点旁边伸出一系列序列相同的停留位点,每一个停留位点均包含1个淬灭分子BBQ650和荧光分子ATTO647N组成的FRET对. 当目标DNA链结合到一个位点后,形成的双链被切口酶切断,淬灭分子脱离并产生1个黏性末端,通过DNA链取代反应,目标分子转移到下一个停留位点,再次被酶切后继续向后转移. 以此方式实现了目标DNA分子在DNA折纸上的“走动”,每走一步1个FRET对被打开,从而实现了荧光信号的放大. 单个DNA折纸上可以排布多达184个停留位点,使得单个分子的探测可以直接通过常规的共聚焦显微镜直接进行可视化观察(图5(b)).

Selnhhin等人^[41]利用动态的DNA折纸,通过对DNA折纸形态的改变来调控分子阵列,构建了超灵敏的生物传感平台. 他们使用2个矩形DNA折纸组装成DNA合页结构,内侧的2个表面分别修饰供体分子阵列和受体分子阵列,可以形成多到60个FRET对. 在目标DNA链存在的情况下, DNA折纸从关闭状态转变为打开状态,受体分子与供体分子间的距离同

图4 用于纳米标尺的荧光阵列示例. (a) DNA纳米棒上的1D荧光阵列通过与界面夹角的变化用作3D标尺^[21]. (b) 荧光阵列作为表征蛋白结构的长度标尺^[34]

Figure 4 Representative examples of fluorescence arrays used as nanorulers. (a) The fluorescence array on a DNA nanorod used as a 3D ruler through changing the angle between DNA nanorod and the surface^[21]. (b) A fluorescence array used as the length ruler to characterize the structure of a protein^[34]

图5 基于DNA折纸荧光阵列的生物传感器示例. (a), (b) 荧光阵列上的DNA walker作为信号放大器^[40]. (c)~(e) 动态DNA折纸上的荧光阵列作为输出信号^[41]

Figure 5 Representative examples of biosensors based on the fluorescence array on DNA origami. (a), (b) A DNA walker on the fluorescence array used as the signal amplifier^[40]. (c)~(e) A fluorescence array on a dynamic DNA origami used as output signal^[41]

时增大,产生荧光信号输出(图5(c)). 相对于基于单个FRET对的传感器,FRET阵列对于单个目标分子的响应产生了更为强烈的荧光信号变化,单个目标的检测也可以通过常规的荧光显微镜直接观察(图5(d), (e)). 该方法提高了传感系统对单个目标分子的检测性能,为便携式超灵敏检测装置的开发提供了新的思路.

3.3 多色荧光探针

荧光显微镜是表征纳米到微米尺度的结构的重要工具之一. 相对于使用不同的荧光染料或融合蛋白的多靶标成像,基于DNA的荧光阵列提供了更多样的编码方案. 与微米级的荧光阵列相比^[42],以DNA折纸为模板的荧光阵列具有纳米尺度的精确结

构,在多靶标探测的成像中具有更高的标记密度和准确性. 因此基于DNA折纸的荧光阵列具有活体成像多色探针的应用潜力.

Woehrstein等人^[43]在矩形DNA折纸上设计了由3种不同荧光分子组成的二维荧光阵列(图6(a)),构建了数字化调节的尺寸小于100 nm的超荧光探针. 他们发现荧光亮度与标记的荧光分子数目具有很好的线性关系,因此提出通过数字化地改变荧光分子的数目来获得具有不同光学特性的探针. 选择荧光分子数分别为0, 6, 14, 27, 44作为5个数字化的荧光强度状态(图6(b)),结合3种荧光分子本身的激发和发射光谱特性的差异,可以组合成 $5^3=125$ 种具有不同光谱特性和光强特性的超级探针(图6(c)). 将此探针应用于核酸检测,实现了超灵敏、定量的多路同时检测.

图6 基于荧光阵列的多色荧光探针示例。(a)~(c) 基于DNA折纸的超荧光分子的荧光强度编码^[43]。(d), (e) 荧光阵列上不同的荧光分子用于报告不同的分类结果^[44]

Figure 6 Representative examples of multi-color fluorescent probes based on fluorescence arrays. (a)~(c) Intensity barcoding of DNA origami-based metafluorophores^[43]. (d), (e) Different dyes on fluorescence array to report different sorting results^[44]

由于荧光分子的多样的修饰特性和荧光信号探测的便捷性, 荧光分子已经成为监控生物化学反应的常用标签, 在DNA计算等领域得到了广泛的应用。近年来随着DNA折纸模板上的反应体系逐渐发展, 利用具有独特空间特性的荧光阵列, 研究人员发展了基于荧光阵列的报告反应路径、分子运动轨迹等方

法。Thubagere等人^[44]在DNA折纸上构建了表征分类终点的多色荧光阵列(图6(d)), 位于起点的不同方向的每一种荧光分子表征一种分类结果。基于这种方向特性, 他们构建了一个利用DNA折纸空间可寻址性质的DNA计算系统, 实现了分类机器人的功能(图6(e))。

4 前景展望

近年来,随着DNA纳米技术的不断发展与成熟,DNA折纸已经成为广泛使用的荧光阵列的构建平台之一,不同维度、不同模式的构建方案相继被提出,并在新型荧光探针的开发、超分辨成像、超灵敏的生物传感等领域得到了应用.随着利用细菌进行大量的DNA单链合成方法的提出^[45,46],研究人员已经可以一次性制备大量的DNA折纸,极大地满足了细胞及活体成像的需求.然而到目前为止,其应用仍处于较为初级的阶段,对其结构信息的应用也不够充分.以Woehrstein等人^[43]开发的超荧光探针为例,目前仍无工作报告将其应用于活体中超多目标结构的同时成像表征.对DNA纳米结构在活在细胞及活体中存在状态的深入研究,尤其对其在细胞摄取和体内循环过程中的结构变化研究,有望进一步促进荧光阵列在活体成像中的应用.结构信息作为纳米荧光阵列的一个新维度的信息,在生物传感中得到了广泛的研究并带来了传感系统性能的优化,而在成像中的利用仍未充分,在表征相分子间互作用的方向性和运动极性等方面需要进一步开发.

此外,与DNA计算等生物计算的结合也已成为DNA折纸上荧光阵列的一个重要应用方向.DNA的结构信息可以用来设计DNA计算体系^[47],荧光分子可以作为运算的监视分子.DNA-PAINT等超分辨成像技术的日益成熟与成像空间分辨率的持续提高,已经可以满足DNA折纸上各种形状的结构表征.得益于DNA折纸带来的界面效应,研究人员发现在DNA折纸上构建的DNA计算网络具有更快的计算速度^[24].将DNA折纸作为构建逻辑电路的基板^[48],构建纳米尺度的DNA计算机,使用DNA折纸可以作为显示器件用于计算结果的可视化输出,将有利于设计功能更为完善的生物计算体系.

另一方面,由于DNA分子具有多种可修饰性,将荧光阵列与其他功能性的分子相结合^[49-51],可以用于开发多功能的荧光阵列,在成像的同时进行原位的智能调控等.随着DNA折纸技术的进一步发展,尺度更大的折纸结构相继出现^[52-54],提供了更为丰富的修饰位点.可以预见,随着研究的深入,针对于DNA折纸上荧光阵列的研究将逐渐从结构上的设计扩展为功能与应用的挖掘,进一步促进扩大其应用领域.

参考文献

- 1 Rothemund P W K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 2006, 440: 297-302
- 2 Rothemund P W K, Ekani-Nkodo A, Papadakis N, et al. Design and characterization of programmable DNA nanotubes. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 16344-16352
- 3 Fu Y M, Zeng D D, Chao J, et al. Single-step rapid assembly of DNA origami nanostructures for addressable nanoscale bioreactors. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 696-702
- 4 Mathieu F, Liao S P, Kopatscht J, et al. Six-helix bundles designed from DNA. *Nano Lett*, 2005, 5: 661-665
- 5 Han D R, Pal S, Nangreave J, et al. DNA origami with complex curvatures in three-dimensional space. *Science*, 2011, 332: 342-346
- 6 Andersen E S, Dong M, Nielsen M M, et al. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, 2009, 459: 73-U75
- 7 Liu X G, Zhang F, Jing X X, et al. Complex silica composite nanomaterials templated with DNA origami. *Nature*, 2018, 559: 593-598
- 8 Hong F, Zhang F, Liu Y, et al. DNA origami: Scaffolds for creating higher order structures. *Chem Rev*, 2017, 117: 12584-12640
- 9 Tian Y, Zhang Y G, Wang T, et al. Lattice engineering through nanoparticle-DNA frameworks. *Nat Mater*, 2016, 15: 654-661
- 10 Jungmann R, Steinhauer C, Scheible M, et al. Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami. *Nano Lett*, 2010, 10: 4756-4761
- 11 Raab M, Schmied J J, Jusuk I, et al. Fluorescence microscopy with 6 nm resolution on DNA origami. *ChemPhysChem*, 2014, 15: 2431-2435
- 12 Dai M J, Jungmann R, Yin P. Optical imaging of individual biomolecules in densely packed clusters. *Nat Nanotechnol*, 2016, 11: 798-807
- 13 Yao G B, Li J, Chao J, et al. Gold-nanoparticle-mediated jigsaw-puzzle-like assembly of supersized plasmonic DNA origami. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 2966-2969
- 14 Zhang Y N, Chao J, Liu H J, et al. Transfer of two-dimensional oligonucleotide patterns onto stereocontrolled plasmonic nanostructures through DNA-origami-based nanoimprinting lithography. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 8036-8040
- 15 Liu Q, Song C, Wang Z G, et al. Precise organization of metal nanoparticles on DNA origami template. *Methods*, 2014, 67: 205-214

- 16 Daems D, Pfeifer W, Rutten I, et al. Three-dimensional DNA origami as programmable anchoring points for bioreceptors in fiber optic surface plasmon resonance biosensing. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 23539–23547
- 17 Liu B, Song C Y, Zhu D, et al. DNA-origami-based assembly of anisotropic plasmonic gold nanostructures. *Small*, 2017, 13: 1603991
- 18 Sun L L, Gao Y J, Xu Y, et al. Real-time imaging of single-molecule enzyme cascade using a DNA origami raft. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 17525–17532
- 19 Pfitzner E, Wachauf C, Kilchherr F, et al. Rigid DNA beams for high-resolution single-molecule mechanics. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 7766–7771
- 20 Lin C, Jungmann R, Leifer A M, et al. Submicrometre geometrically encoded fluorescent barcodes self-assembled from DNA. *Nat Chem*, 2012, 4: 832–839
- 21 Schmied J J, Forthmann C, Pibiri E, et al. DNA origami nanopillars as standards for three-dimensional superresolution microscopy. *Nano Lett*, 2013, 13: 781–785
- 22 Zanicchi F C, Manzo C, Alvarez A S, et al. A DNA origami platform for quantifying protein copy number in super-resolution. *Nat Methods*, 2017, 14: 789–792
- 23 Linuma R, Ke Y G, Jungmann R, et al. Polyhedra self-assembled from DNA tripods and characterized with 3D DNA-PAINT. *Science*, 2014, 344: 65–69
- 24 Chatterjee G, Dalchau N, Muscat R A, et al. A spatially localized architecture for fast and modular DNA computing. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12: 920–927
- 25 Jungmann R, Avendano M S, Woehrstein J B, et al. Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT. *Nat Methods*, 2014, 11: 313–318
- 26 Helmig S, Gothelf K V. AFM imaging of hybridization chain reaction mediated signal transmission between two DNA origami structures. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 13633–13636
- 27 Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, 313: 1642–1645
- 28 Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*, 2006, 3: 793–795
- 29 Sharonov A, Hochstrasser R M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 18911–18916
- 30 Auer A, Strauss M T, Schlichthaerle T, et al. Fast, background-free DNA-PAINT imaging using FRET-based probes. *Nano Lett*, 2017, 17: 6428–6434
- 31 Chen J X, Bremauntz A, Kiskey L, et al. Super-resolution MBPAINT for optical localization of single-stranded DNA. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5: 9338–9343
- 32 Jungmann R, Avendano M S, Dai M J, et al. Quantitative super-resolution imaging with QPAINT. *Nat Methods*, 2016, 13: 439
- 33 Steinhauer C, Jungmann R, Sobey T L, et al. DNA origami as a nanoscopic ruler for super-resolution microscopy. *Angew Chem Int Edit*, 2009, 48: 8870–8873
- 34 Kaplan C, Jing B, Winterflood C M, et al. Absolute arrangement of subunits in cytoskeletal septin filaments in cells measured by fluorescence microscopy. *Nano Lett*, 2015, 15: 3859–3864
- 35 Song S P, Wang L H, Li J, et al. Aptamer-based biosensors. *Trac Trend Anal Chem*, 2008, 27: 108–117
- 36 Pei H, Lu N, Wen Y L, et al. A DNA nanostructure-based biomolecular probe carrier platform for electrochemical biosensing. *Adv Mater*, 2010, 22: 4754–4758
- 37 Song S P, Qin Y, He Y, et al. Functional nanoprobe for ultrasensitive detection of biomolecules. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 4234–4243
- 38 Ye D K, Zuo X L, Fan C H. DNA nanotechnology-enabled interfacial engineering for biosensor development. *Annu Rev Anal Chem*, 2018, 11: 171–195
- 39 Zhang H L, Chao J, Pan D, et al. DNA origami-based shape IDs for single-molecule nanomechanical genotyping. *Nat Commun*, 2017, 8: 14738
- 40 Wang D F, Vietz C, Schroder T, et al. A DNA walker as a fluorescence signal amplifier. *Nano Lett*, 2017, 17: 5368–5374
- 41 Selnihhin D, Sparvath S M, Preus S, et al. Multifluorophore DNA origami beacon as a biosensing platform. *ACS Nano*, 2018, 12: 5699–5708
- 42 Marcon L, Battersby B J, Ruhmann A, et al. “On-the-fly” optical encoding of combinatorial peptide libraries for profiling of protease specificity. *Mol Biosyst*, 2010, 6: 225–233
- 43 Woehrstein J B, Strauss M T, Ong L L, et al. Sub-100-nm metafluorophores with digitally tunable optical properties self-assembled from DNA. *Sci Adv*, 2017, 3: e1602128

- 44 Thubagere A J, Li W, Johnson R F, et al. A cargo-sorting DNA robot. *Science*, 2017, 357: eaan6558
- 45 Praetorius F, Kick B, Behler K L, et al. Biotechnological mass production of DNA origami. *Nature*, 2017, 552: 84–87
- 46 Ducani C, Kaul C, Moche M, et al. Enzymatic production of “monoclonal stoichiometric” single-stranded DNA oligonucleotides. *Nat Methods*, 2013, 10: 647–652
- 47 Pei H, Liang L, Yao G B, et al. Reconfigurable three-dimensional DNA nanostructures for the construction of intracellular logic sensors. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 9020–9024
- 48 Liu H J, Wang J B, Song S P, et al. A DNA-based system for selecting and displaying the combined result of two input variables. *Nat Commun*, 2015, 6: 10089
- 49 Kuzyk A, Laitinen K T, Torma P. DNA origami as a nanoscale template for protein assembly. *Nanotechnology*, 2009, 20: 235305
- 50 Tian T, Li J, Xie C, et al. Targeted imaging of brain tumors with a framework nucleic acid probe. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 3414–3420
- 51 Jiang D W, Sun Y H, Li J, et al. Multiple-armed tetrahedral DNA nanostructures for tumor-targeting, dual-modality *in vivo* imaging. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 4378–4384
- 52 Wagenbauer K F, Sigl C, Dietz H. Gigadalton-scale shape-programmable DNA assemblies. *Nature*, 2017, 552: 78–83
- 53 Tikhomirov G, Petersen P, Qian L L. Fractal assembly of micrometer-scale DNA origami arrays with arbitrary patterns. *Nature*, 2017, 552: 67–71
- 54 Zhang F, Jiang S, Wu S, et al. Complex wireframe DNA origami nanostructures with multi-arm junction vertices. *Nat Nanotechnol*, 2015, 10: 779–784

Summary for “基于 DNA 折纸的荧光阵列构建及应用”

Assembly and Application of DNA Origami-based Fluorescence Arrays

Fei Wang¹, Lihua Wang², Chunhai Fan^{1,2} & Qian Li^{1*}

¹ School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

² Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

* Corresponding author, E-mail: liqian@sinap.ac.cn

Organic fluorescent molecules with excellent optical properties such as small size and high brightness, are widely used in the field of bioimaging and target molecule detection. Compared to monodispersed fluorescent molecules, fluorescence arrays provide spatial controllability and quantitative programmability for patterning fluorescent molecules, which open new possibilities for expanding the applications of fluorescent molecules.

The development of DNA origami techniques allows sub-nanometer addressing capabilities, which is the structural basis for organizing molecules at designed positions. DNA single strands form duplex through complementary pairing, which provides simplicity, efficiency and high orthogonality for construction and diverse programming of fluorescence arrays on DNA origami. Meanwhile, the flexible design of DNA origami provides abundant templates for one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional fluorescence arrays of different shapes, making it widely used as a platform for building nanoscale spatial molecular arrays.

The characterization of topography on DNA origami tremendously relies on atomic force microscopy (AFM). However, fluorescent molecules on DNA origami usually do not introduce significant topographical change, therefore, cannot be observed well using AFM. Recently developed DNA-PAINT (point accumulation for imaging in nanoscale topography) super-resolution imaging method is based on transient interactions between DNA oligos, which realize the characterization of nanoscale structures by fluorescent imaging. It is a new routine for the characterization of the fluorescence arrays on origami. The development of detectors such as EMCCD and CMOS also provides a higher time resolution for the detection of fluorescent signals, facilitating more accurate dynamic study of interaction between molecules.

In this review, we summarize recent research progress on the DNA origami-based fluorescence arrays. We introduced the design and assembly principle of DNA origami as template for patterning fluorescent dyes, and reviewed the existing strategies for the construction of fluorescence arrays on DNA origami with different shapes. Then we describe the characterization techniques of DNA origami-based fluorescence arrays, focusing on recently developed super-resolution imaging. Furthermore, we introduced the application of DNA origami-based fluorescence arrays in bioimaging, biosensing and diagnostics. We highlighted the fundamental biochemical properties of the fluorescence arrays, such as designable topography, quantized fluorescence intensity and localized reaction and summarized the progress routes and challenges in the fundamental study and applications of DNA origami-based fluorescence arrays. Finally, we offered a perspective on the roadmap of DNA origami-based fluorescence arrays as follows: (1) the fixed relative positions of each fluorescent molecule in the array could provide information for mechanical tests. (2) Combination of fluorescence arrays with bio-computing could also be an important application direction. (3) Due to the variety of modifications of DNA molecules, fluorescence arrays can be combined with other functional molecules to develop multifunctional fluorescence arrays for *in-situ* intelligent regulation while performing imaging.

fluorescence array, DNA origami, DNA-PAINT, nanometer ruler, ultrasensitive sensing

doi: 10.1360/N972018-00844