



基于DNA纳米技术的生物大分子组装与成像

李佳怡^{1,2†}, 陈远方^{1,2†}, 杨雨荷^{1,2*}

1. 国家纳米科学中心, 纳米系统与多级制造重点实验室, 北京 100190;

2. 中国科学院大学, 北京 100049

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: yangyh@nanoctr.cn

2023-05-29 收稿, 2023-08-11 修回, 2023-08-16 接受, 2023-08-17 网络版发表

国家重点研发计划(2022YFA1206400)和国家自然科学基金(22277017)资助

摘要 DNA纳米结构作为理想的纳米支架, 具有空间可寻址、几何结构可编程、易于化学修饰、生物相容性好等优势, 现已广泛应用于实现各类生物分子在纳米尺度的定向排列与组装, 并逐渐在多个交叉领域发挥重大作用. DNA折纸术的出现更是提供了结构更为复杂且精确的DNA骨架设计. 本文首先从寡核苷酸链与生物分子的偶联、DNA-生物分子复合物的组装与纯化这三个方面简述了DNA骨架与生物分子的基本组装方法. 随后, 着重总结了DNA纳米结构-生物大分子自组装体在酶级联反应体系构建中的应用以及DNA纳米支架在AFM、荧光以及冷冻电子显微镜等辅助生物成像技术方面的应用. 最后, 综合讨论了DNA纳米技术本身在以上领域中目前存在不足并提出展望.

关键词 DNA纳米结构, DNA折纸, 生物分子组装, 生物成像

在纳米尺度上, 以特定的排列和方向组装生物分子一直是科研领域的一项重要课题. 这类技术在解析生物分子相互作用网络以及生物系统机制的研究中已取得一定成果^[1]. DNA纳米技术这一概念由美国纽约大学的Seeman教授^[2]于1982年首次提出, 并在之后的几十年内发展出了模块(瓦片)组装(tile-based assembly)的策略, 即先将几条简单的DNA单链自组装得到具有特定黏性末端的模块结构, 再利用这些模块作为基本单元拼接得到目标DNA纳米结构. 目前最为常见的策略是由Rothemund^[3]在2006年提出的DNA折纸术(DNA origami). 这一技术利用数百条短链DNA(称之为订书针, staples)辅助一条长链DNA(称之为脚手架, scaffold)折叠得到设计的图案, 并成功指导构建了一系列具有高曲率的多维DNA纳米结构, 为设计更为复杂、精巧的纳米结构和纳米器件提供了更多的可能性. 2012年,

尹鹏课题组^[4]提出了一种单链DNA模块(single-stranded tiles, SSTs)的组装策略. 该策略将一条DNA单链分为4个能连接其他模块的区域, 将该模块作为纳米结构的基本“像素”, 通过众多序列不同的“像素”间相互组装得到形态各异的平面或立体结构. DNA纳米结构作为理想的纳米支架, 凭借其空间可寻址、几何结构可编程、化学易修饰、生物相容性好等优点, 现已广泛应用于实现各类生物分子在纳米尺度的定向排列与组装, 并逐渐在多个交叉领域发挥重大作用. 本文首先阐述了DNA纳米结构与生物大分子的组装方法, 包括寡核苷酸与生物分子的连接、DNA纳米结构与生物分子复合物的组装和纯化等步骤; 其次, 简要总结了DNA纳米结构-生物大分子自组装的相关应用, 主要包括酶级联反应体系的构建; 最后, 重点介绍了DNA纳米结构在原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)、

引用格式: 李佳怡, 陈远方, 杨雨荷. 基于DNA纳米技术的生物大分子组装与成像. 科学通报, 2023, 68: 4383–4400

Li J Y, Chen Y F, Yang Y H. DNA nanotechnology-based biomolecular assembly and imaging (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68: 4383–4400, doi: 10.1360/TB-2023-0511

荧光以及冷冻电子显微镜(简称冷冻电镜)等成像技术中的应用。

1 DNA骨架-生物分子的组装方法

DNA纳米骨架作为一种能在纳米尺度操纵生物分子的工具,在生物分子的表征和应用过程中发挥着重要的作用。组装DNA骨架与生物分子复合体结构需经历3个主要步骤:(1)单链DNA-生物分子的偶联;(2)单链DNA-生物分子复合体与DNA纳米骨架的杂交;(3)组装产物的纯化。这三个步骤的实现为生物分子在纳米尺度上的精确排列提供了可能,推动了该领域的研究进展。

1.1 DNA与生物分子的偶联

DNA与蛋白质之间的连接包含两个主要步骤,即DNA的修饰与蛋白质的修饰。由于单链DNA可以通过化学方法逐步合成,其修饰过程相对便捷且多元化,同时各类带有功能基团的DNA单链也早已商业化。然而,对于蛋白质的修饰,尚未有通用的标准方法^[5]。常用的蛋白偶联位点主要分为两类:氨基酸侧链残基(如赖氨酸、半胱氨酸)和蛋白质的N-/C-末端。这些位点也可进一步被修饰上不同的化学基团、蛋白质标签等^[6]。根据蛋白质修饰策略和其与DNA连接方式的不同,DNA-蛋白质偶联的方法大致可分为三类:非共价位点特异性连接、共价非位点特异性偶联以及共价位点特异性偶联(图1(a))。

1.1.1 非共价位点特异性连接

蛋白与DNA能够通过某些亲和分子对间的相互作用,以非共价的方式实现连接。生物素(biotin)-链霉亲和素(streptavidin, STV)系统是一种常用的偶联策略^[7],商业合成的带有生物素修饰的寡核苷酸单链能够与利用基因工程融合了STV的目标蛋白质实现高度亲和连接(图1(b)-i)^[8]。野生型的STV通常具有4个配位点,可通过改造使其成为具有单配位点的变种,且亲和力和稳定性与野生型几乎一致^[9],进而更好地控制DNA与蛋白质连接过程中的当量配比。氨三乙酸(nitrilotriacetic acid, NTA)和六组氨酸肽(hexahistidine peptide, Histag)的组合也常用于生物偶联反应(图1(b)-ii)。NTA修饰的寡核苷酸能够与目标蛋白中融合了Histag的位点在Ni(II)的存在下相互绑定^[9]。Co(III)离子也可代替Ni(II)离子作为一种惰性、稳定的NTA-Histag作用媒介^[10]。此外,抗原-抗体系统也是一种具有广泛应用前景的偶联

方法,抗体能够以很高的亲和力和特异性与一些小分子抗原相结合^[11,12],实现DNA与生物大分子的相互连接(图1(b)-iii)。

相较于上述方法,使用核酸适配体或DNA结合蛋白可省略DNA链进行特殊化学修饰这一步骤。核酸适配体是一段具有特殊序列,能够特异性结合多种目标分子的DNA或RNA链段(图1(b)-iv)。通过使用结合蛋白质的核酸适配体,可在DNA骨架上组装多蛋白纳米阵列^[13]、包覆核酸适配体的DNA折纸纳米管^[14]、纳米盘^[14]等结构,且已成功应用于血液透析和蛋白质检测等领域。此外,使用DNA结合蛋白也能免去对DNA进行修饰的步骤。锌指(zinc-finger)蛋白含有特异性识别并结合特定双链DNA序列的区域^[15],因此构造一段包含靶序列双链DNA片段的寡核苷酸就可直接与融合了锌指的目标蛋白进行偶联(图1(b)-v)^[16-18]。除锌指蛋白外,其余如CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)^[19]和TALEN(transcription activator-like effector nucleases)^[20]等能够与DNA结合的蛋白质也有望成为DNA-蛋白质偶联的有效手段。

1.1.2 共价非位点特异性偶联

为实现稳定的共价偶联、避免使用复杂的蛋白质编辑技术,科研人员通常会选择蛋白质表面上具有特殊性质官能团的氨基酸残基作为反应位点,与寡核苷酸进行交联。其中,赖氨酸上的 ϵ -氨基是一类广泛应用反应位点^[21]。此外,介于巯基较强的亲核性,半胱氨酸也被用来与马来酰亚胺基团修饰的DNA分子相互偶联^[22]。然而,由于每种蛋白质表面的赖氨酸/半胱氨酸的数量和分布都均不相同,这种偶联方法始终面临着反应当量难以控制、偶联位点缺乏特异性的问题。

上述氨基酸残基与DNA的连接主要是通过一些特殊的交联剂进行的。图1(c)-i和图1(c)-ii展示了两类常见的异型双官能团交联剂,即N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)-propionate (SPDP)^[23]和sulfo-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC)^[24]的反应机理。这两类交联剂均能同时与赖氨酸的 ϵ -氨基和寡核苷酸上的巯基发生反应,完成DNA与蛋白质的偶联。此外,Kohman等人^[25]还使用含有光敏性o-nitrobenzyl基团的交联剂实现了光引发的蛋白可控释放(图1(c)-iii)^[25]。另有研究表明,使用光敏性交联剂将BSA包覆在DNA折纸结构载体的表面,不仅能保护DNA结构不受降解,同时也能在光刺激下脱落、释放出载体的内容物^[22]。此外,通过直接在核苷酸上修

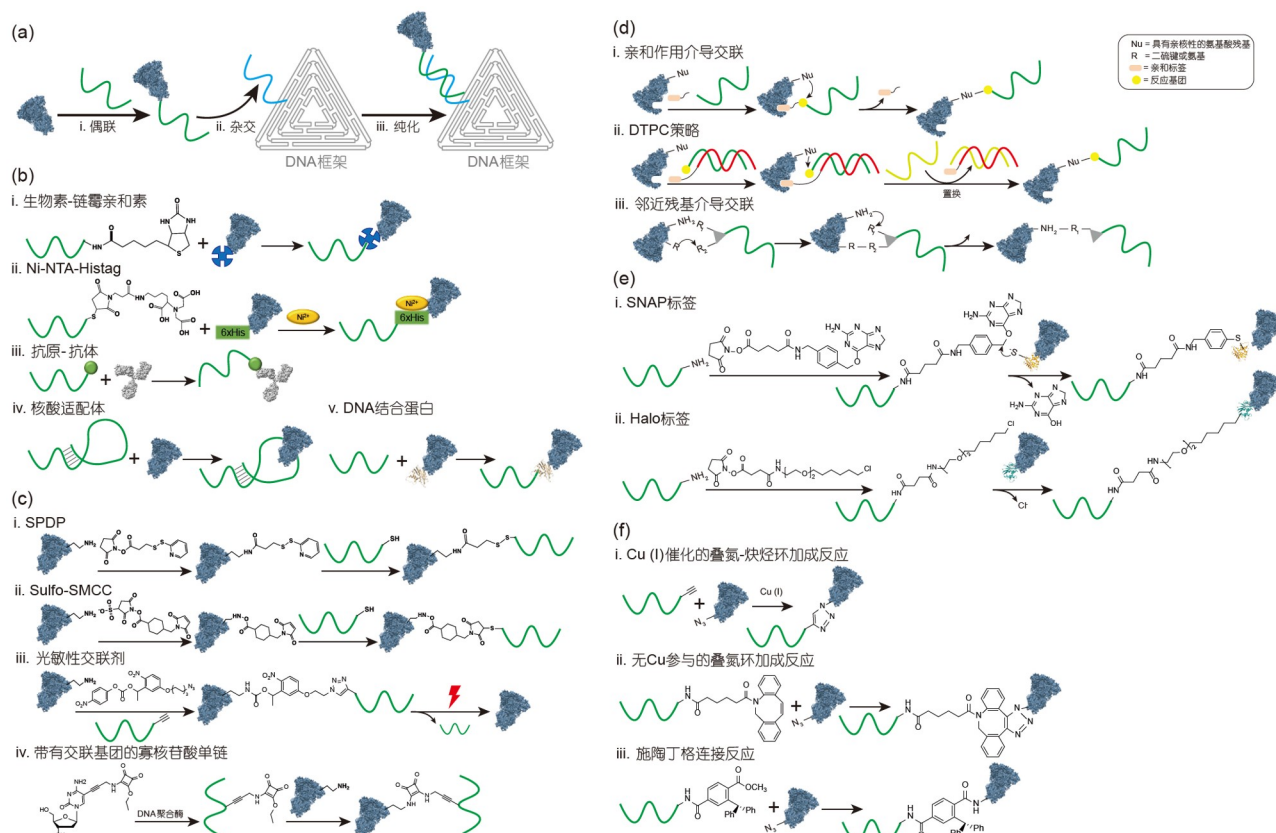


图1 DNA-蛋白质复合体组装流程及寡核苷酸与蛋白质偶联策略。(a) DNA-蛋白质复合体组装流程: i. DNA和蛋白质偶联; ii. 将偶联产物与DNA纳米结构杂交; iii. 纯化。(b) 非共价偶联方法: i. 生物素-链霉亲和素系统^[8]; ii. Ni-Histag由NTA介导的亲亲和系统^[9]; iii. 抗原-抗体亲和系统^[11,12]; iv. 核酸适配体对蛋白质的特异性亲和; v. 利用DNA结合蛋白实现的非共价偶联^[16-18]。(c) 共价偶联方法: i. SPDP交联剂介导的赖氨酸残基修饰^[23]; ii. Sulfo-SMCC介导的赖氨酸残基修饰^[24]; iii. 光敏性交联剂^[25]; iv. 原位合成带有交联基团的寡核苷酸单链^[26]。(d) 区域特异性方法: i. 亲和介导的区域选择性偶联; ii. DTPC策略^[30,31]; iii. 邻近残基介导的区域选择性偶联。(e) 蛋白质标签: i. SNAP标签偶联机理; ii. Halo标签偶联机理。(f) 叠氮基团共价偶联策略: i. Cu(I)催化的叠氮基团和炔烃环加成反应; ii. 无须铜参与的叠氮基团环加成反应; iii. 施陶丁格连接反应^[41]。

Figure 1 Assembly workflow of DNA-protein complex and oligonucleotide-protein conjugation strategies. (a) Assembly workflow of DNA-protein complex: i. DNA-protein conjugation; ii. hybridization onto DNA nanostructures; iii. purification. (b) Non-covalent conjugation methods: i. Biotin-streptavidin^[8]; ii. Ni-NTA-Histag^[9]; iii. antigen-antibody system^[11,12]; iv. special affinity from protein aptamer; v. DNA-binding protein^[16-18]. (c) Covalent conjugation method: i. SPDP crosslinker for lysine residue^[23]; ii. sulfo-SMCC crosslinker for lysine residue^[24]; iii. photolabile crosslinker^[25]; iv. *in situ* crosslinking^[26]. (d) Regioselective conjugation methods: i. Affinity-guided selectivity; ii. DTPC strategy^[30,31]; iii. residue of proximity-guided crosslinking moiety. (e) Protein tags: i. SNAP-tag; ii. Halo-tag. (f) Azido-DNA conjugation methods: i. Copper (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition; ii. copper-free azide cycloaddition; iii. staudinger ligation^[41].

饰反应性基团并参与聚合, 可得到自身具有交联能力的寡核苷酸链, 直接用于蛋白质的修饰, 无须添加任何其他试剂^[26](图1(c)-iv)。

1.1.3 共价位点特异性偶联

大量研究表明, 偶联位点的不确定性可能会影响目标蛋白的活性, 例如被两条寡核苷酸标记的葡萄糖-6磷酸脱氢酶(G6PDH)仅有相对于野生型~40%的活性, 并且3或4条链标记还会进一步降低酶的活性^[27]。据推测, 固定在活性位点附近的寡核苷酸可能会妨碍目标蛋白与底物的相互接触。下面介绍的几类位点特异性偶联方法一定程度上可解决蛋白活性降低的问题。

其一, 区域特异性的偶联策略。这一策略借助了引导基团和目标位点的相互作用来提高目标反应区域附近反应基团的局部浓度, 进而实现反应区域的选择性, 通常采用亲和标签作为引导基团(图1(d)-i)。例如, Hamachi课题组^[27]运用了NTA(识别Histag)等亲和对成功将待修饰探针引入到目标蛋白的特定区域并共价偶联在一起。蛋白G对大多数抗体的Fc区域具有很高的亲和性, 也可作为一种引导基团^[28]。Rosier等人^[29]就是在抗体的Fc区域通过非天然氨基酸(unnatural amino acid, UAA)引入了一个反应性基团, 同时在蛋白G的半胱氨酸上偶联了一条寡核苷酸, 在蛋白G的亲合作用下, Fc

区域的反应性基团与蛋白G接触并实现偶联, 以此实现了寡核苷酸与目标抗体的间接偶联. 此外, Kurt课题组^[30,31]还推出了一种名为DTPC(DNA-template protein conjugation)的通用偶联策略(图1(d)-ii). 该策略首先将一条修饰有亲和标签的寡核苷酸与目标蛋白非共价结合, 而后将带有反应性基团的目标寡核苷酸链与之前的单链互补配对, 实现目标反应性基团在特定的区域内与目标蛋白的共价偶联. 另一种区域特异性的方法是在寡核苷酸上修饰某些双官能团交联剂, 这种交联剂可以先将一个官能团通过化学反应的形式锚定在目标位置附近的氨基酸残基上, 引导另一基团与目标蛋白质残基产生稳定交联, 实现区域特异性选择的能力(图1(d)-iii). 例如, Nielsen等人^[32]设计了一类双官能团蛋白质改性试剂, 其中一个基团能短暂地与蛋白二硫键反应, 同时引导另一个基团与二硫键附近的赖氨酸残基通过还原胺化反应实现偶联. Märcher等人^[33]也合成了一种能与两个邻近赖氨酸残基发生反应的试剂, 且能在反应位点留下一个叠氮化物标签, 以便于进一步修饰其他具有DBCO(dibenzocyclooctyne)官能团的DNA链或其他类型的探针.

其二, 使用蛋白质标签(protein tag)进行蛋白的自我标记. 蛋白质标签是一类能够催化自身与其特异性底物之间共价连接的特殊蛋白质, 将其与目标蛋白通过蛋白质工程的方法融合在一起, 就能实现目标蛋白与修饰有底物的寡核苷酸之间的共价偶联(图1(e)). 常见的蛋白质标签有SNAP-tag(20 kD)^[18,34]和Halo-tag(34 kD)^[18,34]. 二者间相互正交的反应还可以同时标记不同的蛋白质^[35,36]. 通过融合另一个可以预结合DNA的锌指蛋白, 还能进一步提高蛋白质标签的偶联反应速率^[37]. 然而, 蛋白质标签法仍存在一些应用局限, 如这些标签只能融合到目标蛋白的N-或C-端, 且尺寸较大的蛋白标签偶联精确度较低.

其三, 使用非生物体自然存在的官能团进行反应的生物正交技术将为生物偶联位点提供优良的选择性^[38]. 叠氮化物-炔烃的环加成反应就是一种典型的生物正交反应(图1(f)-i), 通常由Cu(I)进行催化^[39], 但这种离子在生物体内具有一定毒性. 因此, 目前也推出了生物相容性的催化剂(如CuAAC^[39]), 叠氮化物-环烯烃环加成^[40]等无需铜参与催化的衍生方法(图1(f)-ii). 此外, 施陶丁格反应(Staudinger reaction)也可以在无铜催化的条件下实现叠氮基团与磷化氢修饰的DNA的偶联(图1(f)-iii)^[41]. 生物正交反应的反应位点可由上述区域

特异性方法^[33]或蛋白质标签法^[42]引入, 而使用非天然氨基酸不但能引入反应位点^[39], 还能将位点以氨基酸为单位插入到目标蛋白的任意给定位置^[43], 极大地提升了偶联位点的特异性. 例如, Rosier等人^[29]将光敏性反应基团通过非天然氨基酸法引入到蛋白G上; 再如, 颜颢课题组^[44]通过琥珀密码子抑制的方法在MS2噬菌体颗粒表面引入了非天然氨基酸, 成功在其表面修饰了一系列的寡核苷酸单链.

1.2 单链DNA-生物分子复合物与DNA骨架的杂交与产物纯化

1.2.1 杂交

为组装完整的生物大分子纳米结构, 还需杂交偶联了DNA单链的生物分子与DNA骨架上伸出的互补单链. 为了在提高产率的同时保持蛋白质活性, 必须精确控制杂交阶段的退火温度. 常规的退火程序是样品首先在37°C保温5 min, 再以2 min/°C的速度缓慢降温至10°C, 最后在4°C储存^[45]. 互补链的长度需要控制在大约10~20 nt的范围内, 以保证其熔点能落在低于37°C的温度区间^[46]. 此外, 增加杂交位点的数量也能有效提高组装产率^[45]. 为尽可能避免因多个蛋白之间位阻效应而导致的产率下降, 两蛋白锚点间距需要不断尝试优化(如葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶在DNA骨架上的锚点间距由60 nm变为10 nm时, 其杂交产率也从~93%下降到~45%^[21]). 使用某些具有重复序列的单链也能提高组装的产率, 重复序列的单链在进行互补配对时可以率先结合末端的少数几个碱基, 再逐渐“滑入”目标位点, 因而可以一定程度上克服潜在的蛋白空间位阻问题.

1.2.2 纯化

利用DNA骨架组装的蛋白根据不同的尺寸, 通常可采用快速蛋白质液相色谱法(fast protein liquid chromatography, FPLC)或琼脂糖凝胶电泳法(agarose gel electrophoresis, AGE)进行纯化. 由DNA模块或较小的DNA折纸螺旋束等组装的纳米结构通常能落在色谱柱的分离能力内, 可使用FPLC进行纯化; 其余更大的结构则往往采用AGE进行纯化^[45]. 此外, 超滤^[47]、密度梯度离心^[48]和自由流电泳^[49]等方法均能有效纯化功能化的DNA折纸样品. 一种具有很强泛用性且能大规模应用的方法是利用某些特异性亲和标签对未被修饰的自由蛋白质进行分离. 例如, 在DNA纳米结构上修饰磁珠后, 就可以在磁场的作用下便捷地分离DNA骨架与

自由蛋白质分子^[50,51], 磁珠最后可以通过链置换的方式从纳米骨架上移除. Numajiri等人^[52]还通过利用His-tag与 Co^{2+} 树脂之间的亲和力, 成功纯化了DNA纳米结构. 这种利用亲和作用进行纯化的手段能够十分有效地分离过量的自由蛋白质, 特别是当目标蛋白的尺寸偏大, 超出常规分离方法的分辨率时(如利用磁珠法分离铁蛋白修饰的DNA Origami复合体时^[50], 过量铁蛋白去除率超过了99%, 而常规方法的去除率仅为60%~70%).

2 DNA纳米支架在酶级联反应中的应用

在细胞环境中, 酶在空间上的精密组织可促进和调节底物的运输, 以此来提高代谢通路效率. 自组装的DNA纳米结构具有几何形状可定义性、可编程性、纳米尺度的可寻址性和可功能化等优点, 在组装功能化酶方面具有很广泛的应用前景^[53]. 利用DNA纳米技术, 可实现一些关键参数(如生物分子组分之间的位置、化学计量比和相对距离)的精确控制.

酶级联反应与DNA纳米技术的结合可有效创建各种稳定的人工多酶复合物, 精确控制酶间相对位置与复合物的结构形状^[54]. 这一方法有助于高效地、特异性地控制酶间距, 促进底物扩散, 实现酶底物通道化和空间区隔化.

葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOx)/辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)对是在研究DNA纳米结构近距离作用和空间限制效应中最常用的酶级联反应对(图2(a)). 在这一生化酶级联反应中, 主酶GOx催化葡萄糖氧化生成葡萄糖酸, 同时产生氢过氧化物(H_2O_2). 随后, 次级酶HRP将 H_2O_2 作为底物消耗, 介导 ABTS^{2-} 氧化为 ABTS^- . 这一酶系的优点在于它的易于使用性、相对稳定性以及酶在DNA支架上的易附着性, 同时还可通过 H_2O_2 的产生实现对酶反应的监测^[55].

2.1 基于DNA支架的多酶体系空间排布

最早用于体外重构和调控酶级联反应的支架是一维的纳米结构. 相关研究表明, 通过将酶组装在这种一维的DNA纳米支架上, 有助于提高酶的反应速率. 2002年, Niemeyer等人^[56]将NAD(P)H:FMN氧化还原酶(黄酮还原酶)和荧光素酶级联组装在了线性双链DNA(dsDNA)上, 发现DNA的定向固定为酶提供了更加邻近的空间距离, 进而增强了酶级联的活性(图2(b)). 同样的策略也被用于构建一种由多个纤维素酶组成的人

工纤维素体. 与未经组装的纤维素混合物相比, 这种经dsDNA组装的纤维素体水解效率提高了1.7倍^[57]. 此外, Erkelenz等人^[58]同样使用线性dsDNA支架来组装细胞色素P450 BM3酶, 通过控制细胞色素P450 BM3酶的两个亚域之间的距离, 调节电子转移的效率, 进而影响重构全酶的活性.

二维的DNA纳米结构提供了设计更为复杂的酶系几何图案的能力. DNA折纸技术也使酶间距离更加精确可控, 现已成为研究酶级联距离依赖性的理想生物分子平台. 作为一类可编程和可寻址的支架, DNA纳米结构可在纳米尺度上组织酶级联, 提供最佳的酶底物通道以提高酶的催化活性. Wilner等人^[59]分别在2-六边形和4-六边形的DNA支架上组织了一个双酶级联(GOx/HRP), 发现组装在2-六边形上相较于组装在4-六边形上时, 酶级联活性提高了1.2倍. 这是由于组装在4-六边形结构上的酶间距离较远, 使 H_2O_2 部分扩散到溶液中, 导致中间体 H_2O_2 在HRP附近的局部浓度降低. 不久后, Fu等人^[21]使用DNA折纸来组装GOx-HRP级联, 实现了更加精确的酶间距控制(图2(c)). 通过在不同酶间距下测量酶复合物的活性, 他们发现, 当酶间距从10 nm增加到20 nm时, 酶级联活性随距离的增加呈现急剧下降的趋势, 而当距离进一步增加到65 nm时, 酶活性则呈现一个极其缓慢降低的趋势. 这可以归因于 H_2O_2 中间体的传递机制, 对于大于20 nm的酶间距离, 中间体的传递遵循三维扩散模型, 而对于近距离的酶, 中间体在连接蛋白质表面的扩散会受到限制. 数年后, Liu等人^[60]进一步在三点星(3PS)DNA支架上组装酶级联, 创建了一个MDH-OAD-LDH的三酶途径. 这种特定的几何排列方式优化了耦合反应中间体(NADH)的循环速率, 进而提高了酶复合物的总效率. 以上所有研究结果都支持了一个结论, 即适当控制酶间距离可增强它们之间的底物转运, 进而增强级联活性.

在三维DNA纳米结构的应用方面, DNA线框八面体曾被用于创建超过40种GOx/HRP排列方式的库(图2(d))^[61]. 利用该结构进行研究还表明, 与间断的支架结构相比, 连续的DNA支架结构更有利于酶级联活性的提升, 因为前者限制了底物扩散, 后者则提供了一个连续的底物通道区域. Fu等人^[21]使用一个通用的蛋白质桥梁来诱导“基于桥梁的级联反应”, 连续的水合层使底物得以在较长距离上进行通道运输, 也与上文结论互相支撑.

除上文提及的单维或多维的静态纳米结构外,

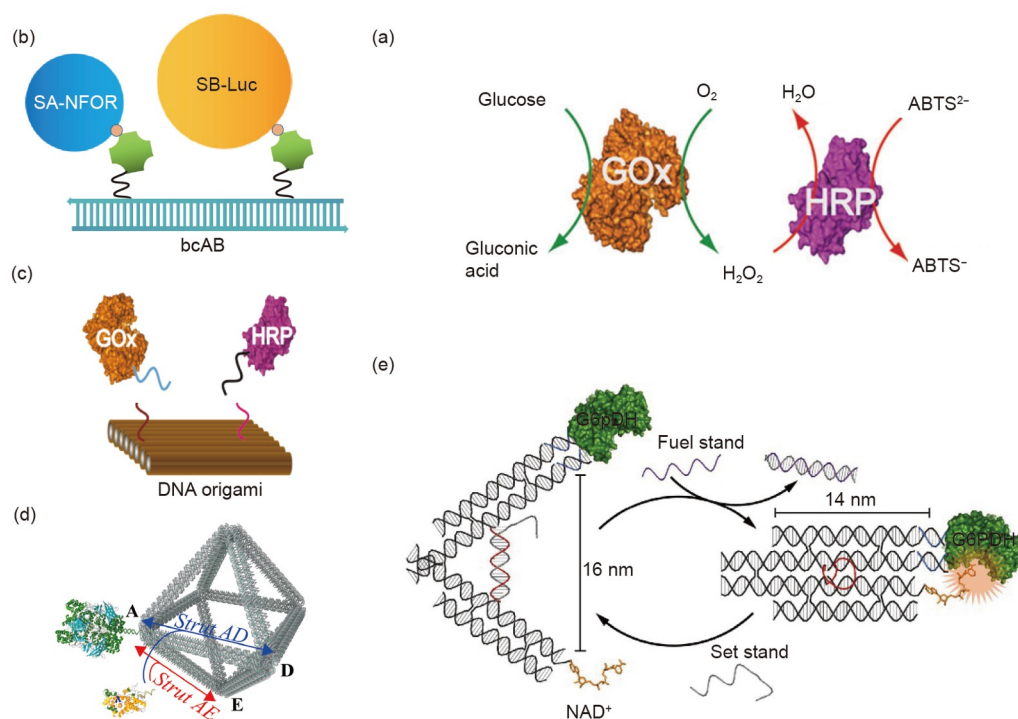


图 2 基于DNA支架的多酶体系空间排布。(a) GOx/HRP级联原理示意图^[21]；(b) NAD(P)H:FMN氧化还原酶和荧光素酶在dsDNA上的级联^[56]；(c) 利用DNA折纸精确控制GOx/HRP酶级联的酶间距^[21]；(d) 三维线框DNA折纸支架上的酶级联反应^[61]；(e) 调控G6PDH和NAD酶辅因子的DNA镊子^[64]

Figure 2 DNA scaffolded enzyme cascade arrangement. (a) Schematic representation of the GOx/HRP cascade system^[21]; (b) NAD(P)H:FMN oxidoreductase and luciferase cascade on dsDNA^[56]; (c) organization of a GOx/HRP cascade on a DNA origami with precisely controlled distance^[21]; (d) cascade enzyme reaction over a three-dimensional, wireframe DNA origami scaffold^[61]; (e) design of a tweezer complex using an enzyme-cofactor system involving glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and NAD⁺^[64]

DNA纳米机器(如DNA镊子)也提供了一个新的用于研究动态支架上酶级联反应的平台。这种结构能够实现两酶或酶的两个功能区之间空间距离的动态可逆调节。经典的DNA镊子由两个通过Holliday结合点连接的DNA双交叉(DX)基序组成。该结构还包含一个组装在镊子中间的DNA马达,可通过链位移反应驱动DNA马达实现螺旋-环结构和双螺旋结构之间的切换,进而实现镊子开放和关闭状态的交替^[62]。这一设计可以将DNA马达产生的小距离变换放大,使镊子两臂尖端之间实现彻底的空间分离^[63]。最初, DNA镊子的两个臂由于马达的螺旋-环结构处于关闭的状态,通过引入互补的组合链(反燃料),镊子可切换到开放状态。再通过引入与组合链互补的燃料链(燃料),通过链位移反应,镊子则可切换回关闭状态。例如, Liu等人^[64]将G6PDH和NAD⁺附着在DNA镊子两臂上,利用镊子开放和关闭之间的状态切换来实现对其催化功能的调控(图2(e))。此外,类似的DNA镊子同样证明可以被用来可逆地调

节GOx/HRP酶级联反应^[63]。

随后,人们对DNA镊子的尺寸、开合状态与机制、检测手段等方面都进行了一定程度的设计创新。例如, Marras等人^[65]引入了一种离子激活的可重构DNA纳米结构,可以在亚秒级的时间尺度内发生大规模的构象转换,克服了在链置换机制中DNA镊子作用缓慢的时间尺度上的局限性。此外, Hu等人^[66]提出了一种具有独特结构和机制的DNA镊子,可以调节由β-半乳糖苷酶(β-Gal)、葡萄糖氧化酶(GOx)和钾离子稳定的血红素-G四链体辣根过氧化物酶(HRP)模拟DNA酶组成的三酶催化级联反应。Kou等人^[67]建立了一种通用的电化学检测方法,利用可再生的DNA镊子来控制酶间距离的调节,实现高灵敏度的目标DNA检测。

2.2 区域隔离化和支架效应对酶级联的影响

生物体内代谢途径通常发生在膜限定的区域内,例如线粒体、溶酶体、过氧化物酶体和羧体小体^[68]。

这种物理、化学的分隔会对生化效应产生一定的影响,包括增加反应物的局部浓度,减少不稳定化合物的降解,降低中间体的生物毒性,保护封装内容物免受竞争反应的干扰,增强分子反应速率等^[68,69]。随着DNA纳米技术的发展,这种隔离策略可以通过DNA纳米反应器在体外模拟实现。通过将酶在DNA纳米反应器内部进行适当排列,不同反应化合物之间可实现相互分离。

Fu等人^[70]将GOx/HRP酶对附着在DNA折纸纳米带上,然后将其卷成纳米管,观察这个空间受限纳米管内酶级联的耦合效率。相较于自由状态或仅表面受限的酶级联,这种体积限制策略大大降低了H₂O₂中间体逃逸的可能性,进而增强了级联活性。随后,通过将不同的管状DNA折纸单元相互结合,每个单元配备GOx或HRP,构建获得了第一个基于模块化DNA折纸的体积限制的纳米反应器,实现了高效的、可设计的酶级联(图3(a))^[71]。这种坚固的管状DNA折纸内部类似于之前提到的纳米管,酶的分隔可以增强分子反应速率。然而,这种新的管状DNA折纸单元的优势在于可通过纯化来减少自由酶的活性,且结合单元数不限,适用于更复杂的反应设计。

不久后,Zhao等人^[72]又开发了一种采用通用方法构建的DNA纳米笼来封装酶,以增强其催化活性和稳定性(图3(b))。由于DNA螺旋的高负电荷性的磷酸骨架可以提供一个独特的电负性环境,他们认为这会使其腔内吸引一个由氢键结合的水分子组成的强烈结合的水合层进而限制底物的扩散。此外,Grossi等人^[73]从自然系统中酶和底物通过互相分离来控制反应速率中获得启发,设计了一种DNA纳米库(DV)用以封装信号酶,并通过可逆开合DV来控制底物进入封装的酶,以此来调节它们的催化活性(图3(c))。

除空间限制促进底物运输引起酶活性增强外,另有研究表明,DNA纳米支架本身产生的局部效应也可以改变单个酶固有的催化动力学^[55]。有假设认为,DNA螺旋中带负电荷的高密度磷酸骨架提供了一个局部反应环境,可以影响单酶的动力学常数。Zhao等人^[72]率先发现当GOx和HRP被封装在两个不同的DNA纳米笼中时,与未封装的酶相比,其活性增加了4倍。他们推测,这是因为DNA支架所创造的电负性环境吸引了水合层,从而稳定了高度有序的水分子周围的活性酶构象。此外,Zhang等人^[74]模拟了DNA表面附近的pH变化,发现接近DNA支架表面的环境pH明显低于体积溶液中的pH,说明质子被带负电的DNA界面吸引,且

GOx和HRP的酶活性都伴随着环境pH的降低而增加(图3(d))。随后,Xiong等人^[75]使用DNA八面体支架(OS)作为GOx的载体,同样验证了先前的假设;此外,他们还发现,DNA密度引起的局部pH环境变化可以以一种有趣的方式影响酶活性。另有报道称,亚毫摩尔级别的底物和DNA支架之间的结合相互作用也可以通过增加底物的局部浓度、结合速率以及停留时间来增强酶活性,dsDNA的凹槽就常作为小分子(底物)的结合位点。这些相互结合作用也可以通过碱基对之间的相互作用或者与带负电的磷酸根的静电相互作用而发生。例如,脱氢酶的NAD(H)、HRP的TMB和磷二酯酶(PET)的有机磷酸酯等底物都可以结合到双链DNA上,并通过促进底物与活性位点的结合来增强催化作用(图3(e))^[76,77]。

2.3 摆臂介导的底物定向通道

底物通道有助于中间体从一个酶直接定向转移到与之相邻的另一个酶,进而增强酶级联反应的活性。底物通道的一种实现方法是引入摆臂,也就是将一个共价的假体化学基团连接到酶复合物上,允许其在多个活性位点之间摆动,以便于中间体在相邻酶间的转运^[27]。

为模拟非细胞环境中的定向底物通道,Fu等人^[27]在两个耦合的脱氢酶之间引入了一个NAD⁺修饰臂,以促进它们之间的氢底物转移(图4(a))。他们使用了dsDNA来创建双酶复合物,发现与没有NAD⁺摆臂修饰的酶复合物相比,带有NAD⁺摆臂的酶复合物活性增强了90倍。结果表明,当摆臂-酶间距为7 nm时,酶级联活性最高,进一步缩小酶间距则会由于相邻蛋白间的空间位阻而导致组装收率降低(图4(b))。通过改变酶和摆臂的相对方向,他们发现当摆臂和酶的附着位点之间的角度为0°(平行)时,酶活性达到最高(图4(c))。此外,他们还使用了一个4×4的DNA支架来探究摆臂的相对数量对酶级联反应的影响。随着NAD⁺修饰的摆臂数量从1增加到4个,G6PDH-NAD⁺结构的酶活性呈线性增强,而MDH-NAD⁺结构的酶活性仅提高了2倍,表明与MDH相比,G6PDH更接近于酶活性饱和。动力学测量也表明,G6PDH的催化转化常数(k_{cat})约为MDH的10倍,米氏常数(K_m)则约为MDH的8倍。因此,通过增加MDH和NAD⁺对G6PDH的比率,多酶复合物的活性可以得到进一步提升。由4个MDH围绕一个G6PDH,再分别在一对G6PDH-MDH之间添加4个NAD⁺修饰的摆臂通道,最终得到的复合物表现出约3倍的活性提升(图4(d))。利用DNA纳米结构的可编程性,可精确控制包括酶间

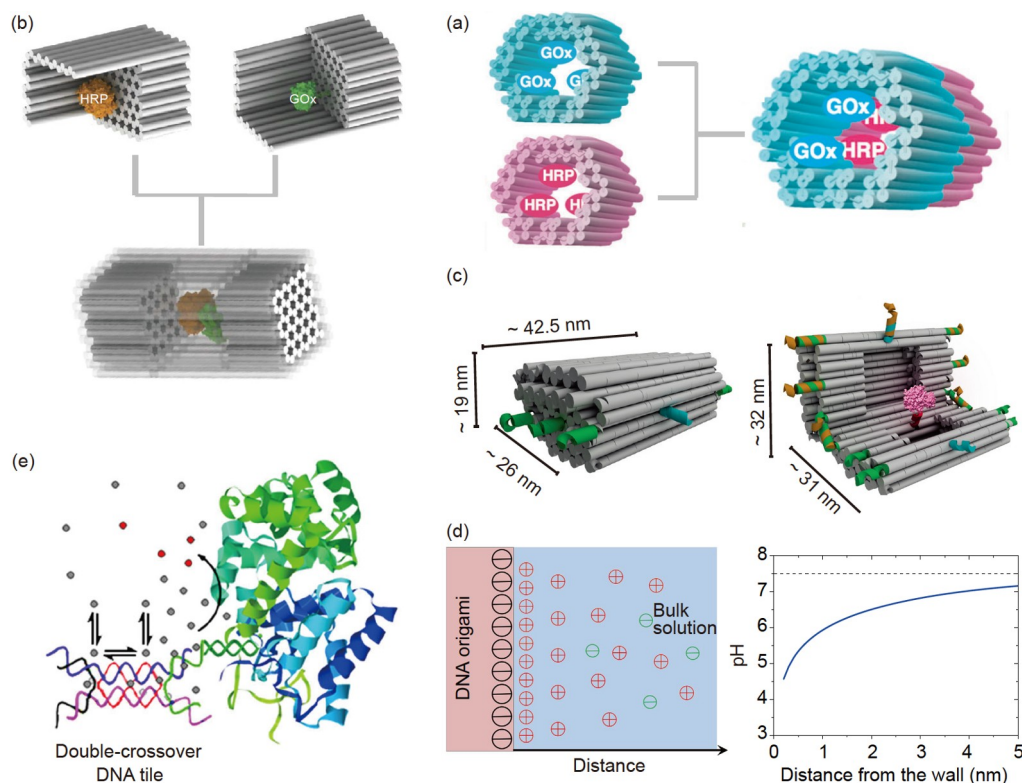


图3 区域隔离化和支架效应对酶活性的影响。(a) 基于DNA折纸的模块化酶级联纳米反应器^[71]；(b) 两个封装酶的DNA纳米笼的组合^[72]；(c) 一种可通过可逆开关调节酶底物可及性的DNA的纳米库^[73]；(d) DNA折纸表面正离子分布与pH变化^[74]；(e) 底物与DNA支架间微弱的相互作用对酶活性的提高^[76]

Figure 3 Effect of enzyme compartmentalization and DNA scaffold on enzyme activity. (a) A modular DNA origami-based enzyme cascade nanoreactor^[71]; (b) the combination of two nanocages for enclosing enzymes^[72]; (c) a DNA-based nano vault that can reversibly open and close to regulate enzyme-substrate accessibility^[73]; (d) the distribution of positive ions and pH near the surface of DNA origami^[74]; (e) micromolar binding interactions between substrates and DNA scaffolds that improve enzyme activity^[76]

距、方向和化学计量比在内的关键参数，以达到最佳的酶级联活性。更为重要的是，由于摆臂限制了酶间中间体的扩散，使得酶级联反应的特异性也得到了提高。正如图3(e)所示，该课题组通过添加乳酸脱氢酶(LDH)与MDH竞争NADH，模拟细胞内环境。在这种情况下，G6PDH-NAD⁺组装体与自由扩散的MDH和LDH之间的竞争更加激烈，G6PDH-MDH通路的耦合活性降低。然而，随着G6PDH-NAD⁺-MDH结构的比例增加，MDH的活性增加，表明完全组装的G6PDH-NAD⁺-MDH复合物可以有效地将NADH从G6PDH传递到MDH，减少自由LDH的底物竞争(图4(e))。因此，这种摆臂介导的底物通道策略极大地提高了酶催化反应的选择性，且仅通过修改DNA支架上的摆臂就可排除其他副反应的干扰^[27]。

在此基础上，NAD⁺修饰的摆臂还被进一步用于辅助二维酶网络上的G6PDH和乳酸脱氢酶(LDH)之间的

中间体(NAD⁺)传递(图4(f))^[78]。此外，NAD⁺修饰的DNA摆臂也成功地用于通过控制NAD⁺在酶间特异性转移，进而直接调节G6PDH-MDH和G6PDH-LDH两种酶途径切换(图4(g))^[79]。Wang等人^[80]随后还使用适配体来修饰DNA纳米结构的表面，调控局部底物分子的富集与排斥，最终实现了对酶级联反应活性的调节(图4(h))。

3 DNA纳米模板辅助生物成像技术

生物成像技术多用于呈现生物分析、细胞、组织乃至生物体的图像信息，而DNA折纸结构作为一种具有生物相容性的高度可编程纳米材料，能够极大地扩展现有生物成像技术。这里将着重介绍原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)成像技术、荧光成像技术和冷冻电子显微镜(cryogenic electron microscopy, cryo-EM)成像技术与DNA折纸技术结合所带来的各种优势。

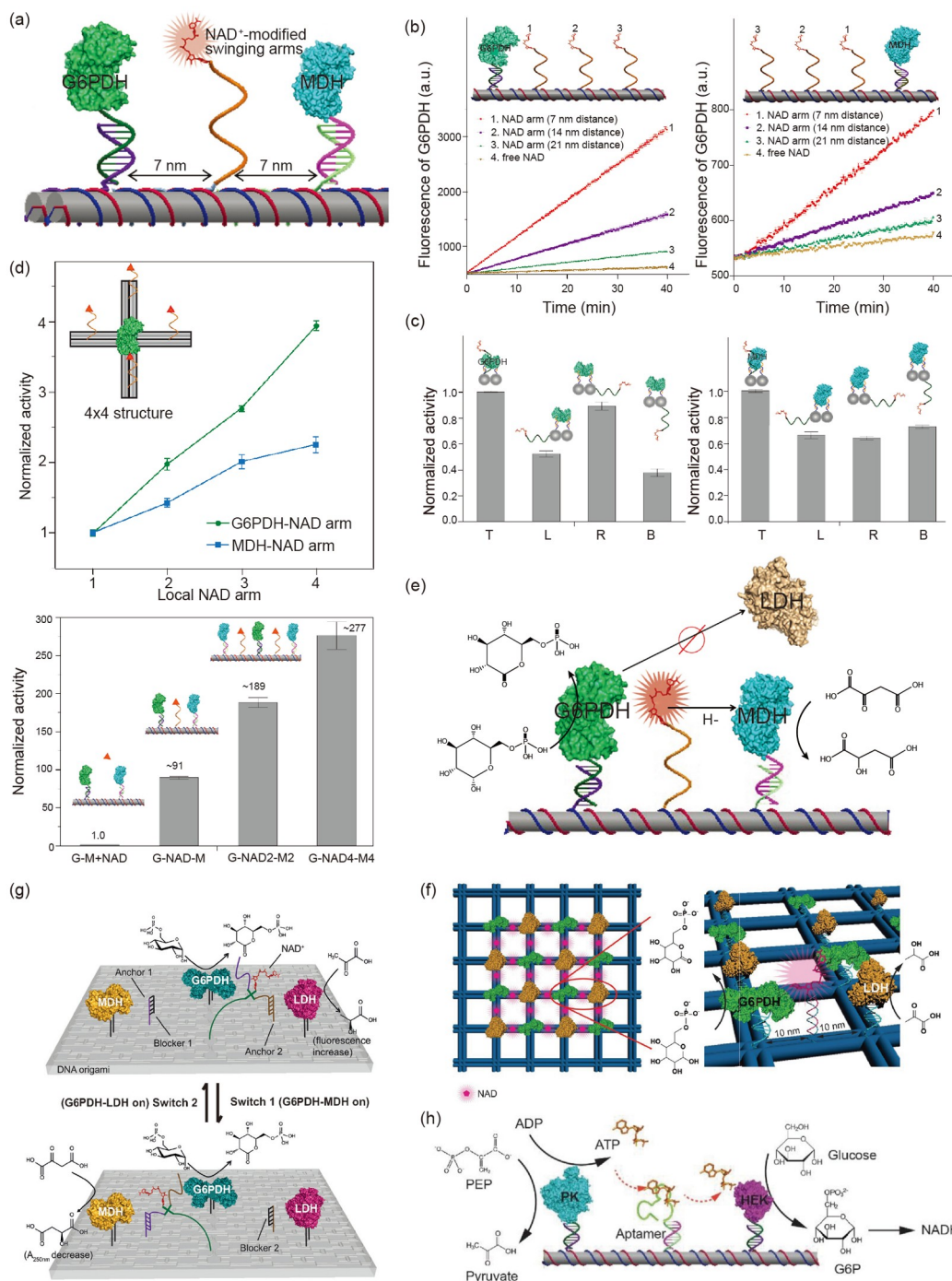


图 4 DNA 支架上的人工摆臂介导的酶底物定向通道。(a) 在两种脱氢酶间修饰NAD⁺摆臂来限制底物转运^[27]；(b) NAD⁺摆臂与酶间距对酶级联活性的影响^[27]；(c) NAD⁺摆臂与酶连接角度对酶级联活性的影响^[27]；(d) NAD⁺摆臂与酶化学计量比对酶级联活性的影响^[27]；(e) NAD⁺摆臂有利于酶级联特异性的提高^[27]；(f) NAD⁺摆臂修饰的DNA 2D网络^[78]；(g) 利用DNA折纸调控两种酶途径的切换^[79]；(h) 利用适配体修饰DNA纳米结构以实现酶间ATP分子的富集^[80]

Figure 4 Artificial swinging arms facilitate the substrate channeling between multi-enzyme complexes on DNA scaffolds. (a) Design of NAD⁺-modified swinging arm providing restricted diffusion of NAD⁺/NADH between two dehydrogenases^[27]；(b) effect of swinging arm-enzyme distance on enzyme cascade activity^[27]；(c) effect of swinging arm-enzyme orientation on enzyme cascade activity^[27]；(d) effect of swinging arm-enzyme stoichiometry on enzyme cascade activity^[27]；(e) swinging arms facilitate the specificity of enzyme cascade activity^[27]；(f) design of a 2D enzyme network with NAD⁺-modified swinging arms^[78]；(g) design of an enzyme pathway regulation pathway system on DNA origami^[79]；(h) design of an aptamer-modified DNA nanostructure providing the enrichment of ATP molecules between two kinases^[80]

3.1 DNA纳米技术辅助AFM成像和荧光成像扩展应用

AFM是一种借助微悬臂上的尖锐探针在气相或液相媒介中探测材料表面形貌的显微技术。由于AFM只能观察到样品的表面形貌,某些大小或外形相似的样品(例如不同的小分子、序列不同的DNA分子或分子量相近的不同蛋白质颗粒等)将很难使用AFM进行区分。而DNA纳米技术可以被用作“形状探针”,将这些难以分辨的信息转化成易于观察的形貌信息。例如, Ku-zuya等人^[81]设计了一种基于DNA折纸术的“单分子培根”的装置,能够在结合各类有机或无机小分子后,在3种具有显著差异的构象间转化(例如,其中“夹紧”的转变机理如图5(a)所示)。基于这一“形状探针”的原理,AFM还可以在DNA纳米技术的辅助下实现基因分型。Subramanian等人^[82]将DNA探针以“A、T、G、C”字母的形状排布在一个DNA折纸模板上,借助其直观地指示具有单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms)现象的DNA分子。当体系中出现带有特定核苷酸的目标DNA时,对应的字母图案就会在AFM下消失。Fan课题组^[83,84]还设计了一系列基于DNA折纸术的形状ID(shape IDs, 图5(b)),也可用于在AFM下指示单核苷酸多态性现象,还能进行HBV基因型甄别任务。在DNA纳米技术的帮助下,尺寸相近的蛋白质分子也可采用AFM进行区分。例如, Aghebat Rafat等人^[85]设计了一种带孔的DNA折纸平面结构,孔内修饰了一系列用来捕获目标蛋白的核酸适配体,通过观察DNA结构上孔洞周围的“条形码”即可分辨出孔内捕获的蛋白质分子的具体类型。

除了样品区分外,DNA折纸技术以单核苷酸为单位对分子进行精确排布的能力(即高度可寻址性),还赋予了AFM另一种应用场景,即评估某些结合反应受底物距离影响的程度,如两个核酸适配体的距离对蛋白质捕获的影响^[86]、胰蛋白酶与其两底物间的结合等^[87]。若进一步使用超高速原子力显微镜(high-speed atomic force microscopy, HS-AFM),还可拍摄得到抗体和两抗原结合各个阶段的瞬时构象变化情况,以及当抗原处于不同距离时抗体的构象^[88]。

在荧光成像领域,同样得益于DNA折纸模板的高度可定制性和可寻址性,基于DNA纳米技术的荧光成像技术在灵活性上得到了极大地提升,DNA荧光调色策略就是一个重要的扩展应用。由于荧光分子间的光

谱重叠^[89],传统的多重荧光成像往往需要对荧光分子进行精心筛选才能最终选用,而DNA折纸模板则提供了一个能够精确控制荧光分子数量的画布,使荧光调色成为可能。Lou课题组^[90,91]最初设计了分枝状的DNA框架结构来组织荧光分子,仅通过2种不同颜色荧光分子间的数量和比例调节就得到了数种介于两种颜色之间的“伪色彩”。2017年, Woehrstein等人^[92]则将这一策略应用到DNA折纸模板上,开发出一种名为“元荧光团(metafluorophores)”的结构。他们设计了一种最多可搭载132个荧光分子的DNA折纸“纳米调色盘”,通过连接不同数量的3种荧光分子(颜色分别为红、绿、蓝),得到了一种可定量调节亮度和颜色的荧光策略,并最终获得了124种“伪色彩”。

3.2 DNA纳米支架辅助冷冻电镜成像

在过去的30年里,单颗粒冷冻电子显微镜(single particle cryo-EM)在生物大分子成像领域得到了大规模应用^[93]。冷冻电镜单颗粒重构技术通过将样品快速冷冻制成冰层,在透射电子显微镜下进行成像,并按照如下基本步骤处理得到的三维结构:(1)自动或手动挑选出随机分布的颗粒;(2)将颗粒图像分类成二维聚类(2D class);(3)重构得到三维密度图并进行必要的优化。为了更加深入地理解DNA纳米结构的同时简化其设计步骤,研究者也使用冷冻电镜对DNA纳米结构自身进行了表征。第一个使用冷冻电镜表征的DNA结构是由He等人^[94]设计的DNA多面体笼,其解析分辨率为26~28 Å,DNA笼的大致形状在这一分辨率下已经可以辨识。随后,Kato等人^[95]通过进一步提高电镜的欠焦值和电子剂量,将一个DNA四面体的分辨率提升到了20 Å。接着,他们又使用了更小的遮罩(mask)对20 Å分辨率的密度模型进行了优化,最终得到12 Å的分辨率,此时,DNA双螺旋的大沟和小沟等特征已经可以被观察到。他们还成功将原子模型导入到这一密度图中。然而,DNA纳米结构本身的柔性仍是进一步提高其重构分辨率的一大技术障碍。例如,在一个空心DNA折纸盒^[96]的三维重构模型中,可以明显看到因结构柔性而出现的小面向外凸起和大面向内凹陷。Bai等人^[97]的研究也表明,DNA折纸柔性更高的外围部分分辨率(分辨率14.0 Å)远低于结构刚性较强的核心部分(分辨率9.7 Å)。2020年,Kube等人^[98]提出了一系列可用于优化柔性DNA折纸结构三维模型的新策略,包括多体优化(multibody refinement)和聚焦扫描优化(focal scanning

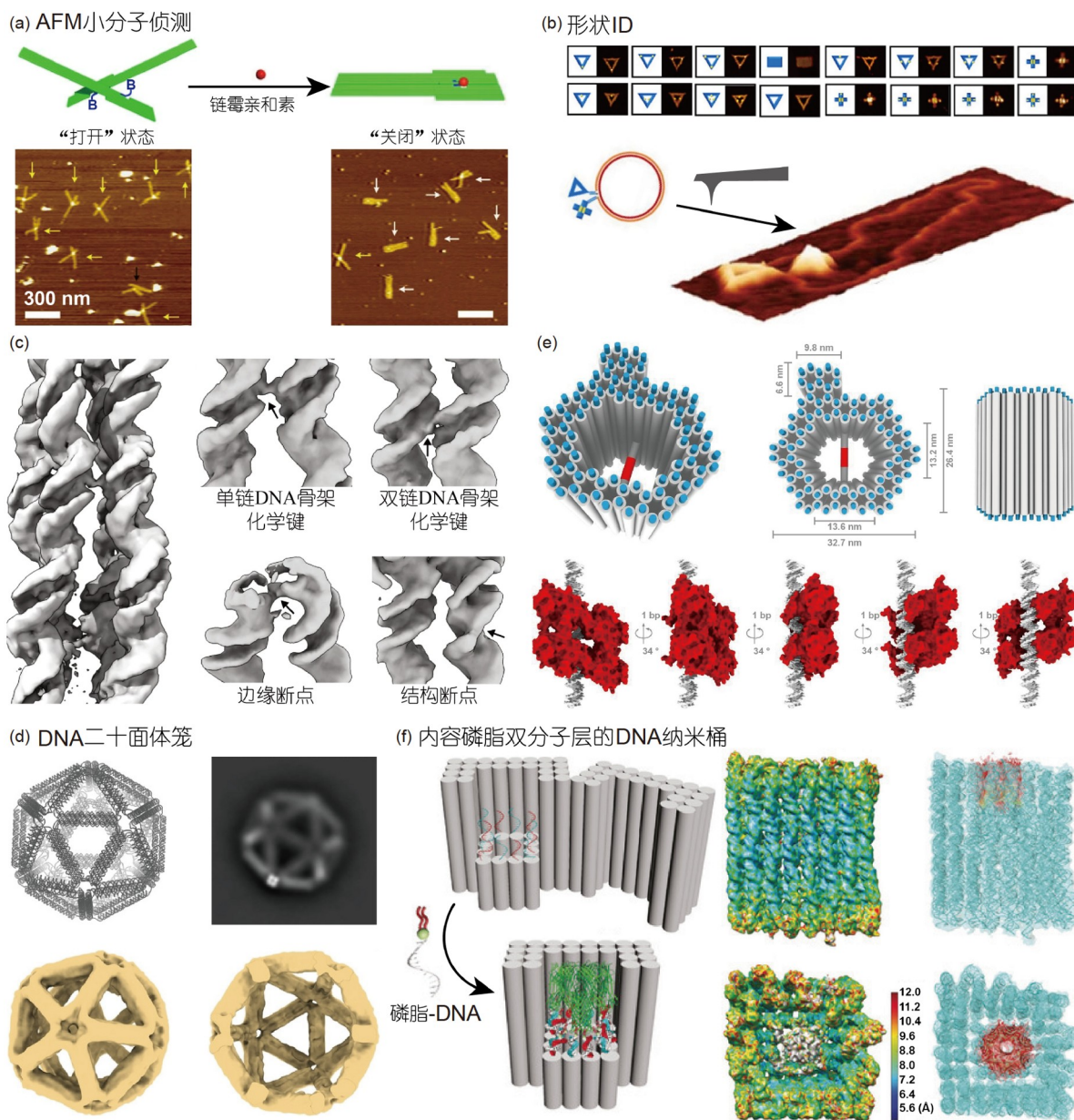


图 5 DNA纳米模板辅助生物成像技术. (a) 利用AFM进行小分子检测^[81]; (b) 用于基因分型的Shape IDs探针^[83,84]; (c) 高分辨率解析的DNA折纸结构表征, 从表征的结果中已经可以分辨出丰富的细节^[98]; (d) 每条边为4组双螺旋(两层结构)的DNA二十面体笼及其冷冻电镜重构结果^[99]; (e) DNA折纸术组装得到的空心蛋白质支架^[101]; (f) 用于辅助膜蛋白成像的带有磷脂的DNA纳米桶^[112]

Figure 5 DNA nanoscaffold-enabled bioimaging technologies. (a) Small molecule detection by AFM^[81]. (b) DNA origami Shape IDs for genotyping^[83,84]. (c) DNA origami object with high resolution. Abundant details can be recognized from the resulting cryo-EM map^[98]. (d) 3D reconstruction of a DNA icosahedron with 4 helices (two layers) on each edge^[99]. (e) DNA origami based hollow scaffold for DNA-binding protein determination^[101]. (f) Lipid-containing DNA nanobarrel for membrane protein determination^[112]

refinement). 基于这些优化手段, 他们成功得到了4.3 Å的总体分辨率, 从其结果中已能分辨出诸如磷酸骨架、链断点处的凹陷等丰富的结构细节(图5(c)). 2022年, Xu等人^[99]对一个每条边具有4组双螺旋束(两层两组双螺旋束)的DNA折纸二十面体笼进行了冷冻电镜

表征(图5(d)). 他们指出, 这种独特的“两层”设计加强了整体结构的刚性, 明显提高了三维重构结果的质量. 这一结果也进一步证明了结构的刚性在DNA纳米结构的重构过程中具有重要意义.

20世纪80年代, 纽约大学Seeman教授^[100]受“飞鱼

图”的启发,提出可以使用DNA组装得到的规律3D晶格模板来辅助蛋白质结晶这一设想,并希望借此辅助蛋白质的结构解析,由此开创了DNA纳米技术这一学科.随着冷冻电镜在结构生物学上的广泛应用,利用DNA纳米模板辅助解析蛋白质结构的设想再次引起了关注.在冷冻电镜成像过程中,DNA折纸骨架有望将目标蛋白结构的角度朝向信息映射到DNA结构自身的不对称标志物或“条码”上,使得某些各面特征不明显的蛋白也能在电镜下清晰地分辨出其正确朝向.此外,DNA折纸骨架还可通过包裹目标蛋白来克服蛋白质在水-空气界面处易变性或以特定取向被吸附的问题,例如,Martin等人^[101]设计的DNA折纸分子支架能够以可调节的取向固定一个DNA结合蛋白(通过调节中心结合链的碱基数量).在这个空心分子支架的一边凸出的10个双螺旋束可打破整体结构的对称性,更加有利于颗粒的辨识和分类(图5(e)). Aksel等人^[102]在另一项工作中使用DNA折纸“测角器”结构来表征一种DNA结合蛋白.该测角器的外围有着特殊的“条形码”结构,能够在电镜图像中指示目标蛋白的取向和倾角信息.某些分子量小于50 kDa的分子(如RNA)很难在冷冻电镜下以较高的信噪比直接观察,可以选择将其聚合成尺寸较大的结构以提高信噪比^[103],还可以将这些小分子量的蛋白质组装在DNA折纸骨架上,提高信噪比的同时还可保持分子的固有柔性^[104].

除了常规的可溶性蛋白外,自然状态下包覆在细胞膜中的蛋白质通常含有疏水区域,将其从细胞膜中提取可能会导致蛋白的聚集或变性^[105].使用洗涤剂^[106]或蛋白质纳米盘^[105]则可有效地在水溶液中稳定这些蛋白.DNA作为多功能纳米骨架,同样有望在结构生物学中作为膜蛋白的脂质支架.通过将数个蛋白质纳米盘集中在DNA折纸桶结构中,Zhao等人^[107]成功合成了一个直径45~70 nm的大型纳米盘.Iric等人^[108]利用修饰有脂质的环状双链DNA合成了直径低于40 nm的小型纳米盘结构.此外,DNA折纸的引入也为多重纳米盘的空间定向堆叠和定制提供了可能^[109].Dong等人^[110]曾提出过一种名为骨架引导组装(frame-guided assembly, FGA)的策略,可以用于组装类囊泡纳米结构,这种策略也同样被应用在类细胞膜脂质体结构的制备上^[111].Dong等人^[112]设计了一种带有磷脂双分子层的DNA折纸桶状结构(图5(f)),并用其成功对 α -hemolysin和HIV-1 Env三聚体等脂溶性蛋白完成了冷冻电镜表征.除单颗粒冷冻电镜外,Silvester等人^[113]还利用DNA

折纸技术设计了一种被称为“Signposts”的细胞膜标签,可用于冷冻断层显微镜(cryo-electron tomography, Cryo-ET)中表征细胞膜表面特定蛋白质的分布.

4 总结与展望

DNA纳米结构作为理想的纳米支架,具有结构可编程与空间可寻址等优势.本文着重介绍了DNA与蛋白组装的3个常见步骤,探讨了DNA纳米支架在生物大分子研究和生物成像技术方面的现状及其优势.然而,DNA纳米结构的相关应用研究仍处于初级阶段,仍面临诸多技术性挑战亟待解决.

其一,尽管DNA纳米结构已作为纳米级模板成功用于组装分子的位置、化学计量比和相对距离在内相关参数的精确控制,但对组装生物分子的空间方向定位控制仍未完全实现.然而,对于维持酶复合物的活性来说,确保组装后蛋白质活性位点的暴露是至关重要的.当整个蛋白质通过单个共轭位点组装到DNA支架上时,得到的组装体可围绕连接位点任意方向运动.当酶和DNA支架之间的连接位点增加到2个时,酶的运动则仅围绕在两个位点链接的轴上,进一步限制其空间旋转运动^[114,115].因而,对蛋白质空间方向的完全控制或许可以通过合理设计蛋白在DNA支架上连接位点的数量和位置来实现.

其二,欲优化整个复合体的稳定性以避免其内部功能受到影响仍具挑战性.DNA一直被认为是一种具有优良的细胞生物相容性和低细胞毒性的生物分子^[116],但其在生物缓冲液或细胞环境中保持完整的能力也面临着诸多挑战.尽管目前已有许多改善DNA纳米结构稳定性的措施^[117],但DNA和功能分子之间连接区域的不稳定性则往往不被关注,而这实际上是整个复合物结构中最脆弱的部分.例如,从纳米支架伸出的与功能分子结合的探针有被酶降解的可能性,因而关于探针数量、长度和序列等因素对组装结构稳定性的探索,可作为未来系统性研究的起点.

其三,尽管DNA纳米技术具有前文所述的优点,但其在冷冻电镜成像方面的应用仍处于初级阶段.目前,以下几个技术瓶颈阻碍了DNA纳米支架在冷冻电镜成像中的应用:(1) DNA在冷冻电镜成像中的分布不均和定向偏差导致难以获得高分辨率的图像^[102].使用洗涤剂可防止蛋白质吸附在空气-水界面上,解决蛋白质样品的取向偏好问题,进而改善其图像分辨率^[118].使用超薄碳层或石墨烯涂覆网格,使蛋白在遇到空气-水界

面之前即被吸附,也可解决取向偏好这一问题.也可采用倾斜的网格来收集冷冻电镜数据^[119],但这种方法有可能会影响图像的高分辨率信息.(2) DNA上的蛋白质常见的相对运动可能会导致成像过程中图像模糊甚至不可见.因此,在样品制备阶段,构建兼具刚性和特异性的DNA-蛋白质连接对限制蛋白的运动至关重要.在数据处理阶段,则需要着重通过对数据的三维聚类处理,以获得每个动态状态的高分辨率结构^[120].(3) DNA纳米结构的分散信号与蛋白质信号重叠,干扰后续的数据处理过程^[102].为最小化蛋白质成像伪影并保持高

表观分辨率,应确保DNA支架和蛋白质之间具有足够的距离.此外,DNA纳米结构的内在柔性,特别是DNA结构的外围^[97],若无法从图像中提取相应的信号也会导致蛋白质信号的模糊.基于DNA支架在冷冻电镜成像中存在的技术性挑战,需要设计对DNA支架具备更高分辨能力的有效的反馈平台,如AlphaFold和oxDNA等软件可在最小的实验经费下提供技术性帮助.未来,人们当致力于突破这些限制,使得DNA支架成为更有效的分子模板,更好地辅助冷冻电镜分析蛋白结构.

参考文献

- Dubey N C, Tripathi B P. Nature inspired multienzyme immobilization: Strategies and concepts. *ACS Appl Bio Mater*, 2021, 4: 1077–1114
- Zhang C, Su M, He Y, et al. Conformational flexibility facilitates self-assembly of complex DNA nanostructures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 10665–10669
- Rothmund P W K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 2006, 440: 297–302
- Ong L L, Hanikel N, Yaghi O K, et al. Programmable self-assembly of three-dimensional nanostructures from 10,000 unique components. *Nature*, 2017, 552: 72–77
- Hoyt E A, Cal P M S D, Oliveira B L, et al. Contemporary approaches to site-selective protein modification. *Nat Rev Chem*, 2019, 3: 147–171
- Sakamoto S, Hamachi I. Recent progress in chemical modification of proteins. *Anal Sci*, 2019, 35: 5–27
- Mallik L, Dhakal S, Nichols J, et al. Electron microscopic visualization of protein assemblies on flattened DNA origami. *ACS Nano*, 2015, 9: 7133–7141
- Weber P C, Ohlendorf D H, Wendoloski J J, et al. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*, 1989, 243: 85–88
- Howarth M, Chinnapen D J F, Gerrow K, et al. A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nat Methods*, 2006, 3: 267–273
- Wegner S V, Spatz J P. Cobalt(III) as a stable and inert mediator ion between NTA and His6-tagged proteins. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 7593–7596
- He Y, Tian Y, Ribbe A E, et al. Antibody nanoarrays with a pitch of ~20 nanometers. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 12664–12665
- Yamazaki T, Heddle J G, Kuzuya A, et al. Orthogonal enzyme arrays on a DNA origami scaffold bearing size-tunable wells. *Nanoscale*, 2014, 6: 9122–9126
- Chhabra R, Sharma J, Ke Y, et al. Spatially addressable multiprotein nanoarrays templated by aptamer-tagged DNA nanoarchitectures. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 10304–10305
- Zhao S, Tian R, Wu J, et al. A DNA origami-based aptamer nanoarray for potent and reversible anticoagulation in hemodialysis. *Nat Commun*, 2021, 12: 358
- Laity J H, Lee B M, Wright P E. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11: 39–46
- Kurokawa T, Kiyonaka S, Nakata E, et al. DNA origami scaffolds as templates for functional tetrameric Kir3 K⁺ channels. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 2586–2591
- Nakata E, Liew F F, Uwatoko C, et al. Zinc-finger proteins for site-specific protein positioning on DNA-origami structures. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 2421–2424
- Ngo T A, Nakata E, Saimura M, et al. Spatially organized enzymes drive cofactor-coupled cascade reactions. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 3012–3021
- R  z M H, Hidaka K, Sturla S J, et al. Torsional constraints of DNA substrates impact Cas9 cleavage. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 13842–13845
- Praetorius F, Dietz H. Self-assembly of genetically encoded DNA-protein hybrid nanoscale shapes. *Science*, 2017, 355: 1261–1262
- Fu J, Liu M, Liu Y, et al. Interenzyme substrate diffusion for an enzyme cascade organized on spatially addressable DNA nanostructures. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 5516–5519
- Seitz I, Ij  s H, Linko V, et al. Optically responsive protein coating of DNA origami for triggered antigen targeting. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14: 38515–38524

- 23 Zhao H, Xiu X, Li M, et al. Programming super DNA-enzyme molecules for on-demand enzyme activity modulation. *Angew Chem Int Ed*, 2023, 62: e202214450
- 24 Li Z, Zhang X, Qi H, et al. A novel renewable electrochemical biosensor based on mussel-inspired adhesive protein for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Sens Actuata B-Chem*, 2022, 372: 132601
- 25 Kohman R E, Cha S S, Man H Y, et al. Light-triggered release of bioactive molecules from DNA nanostructures. *Nano Lett*, 2016, 16: 2781–2785
- 26 Ivancová I, Pohl R, Hubálek M, et al. Squaramate-modified nucleotides and DNA for specific cross-linking with lysine-containing peptides and proteins. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 13345–13348
- 27 Fu J, Yang Y R, Johnson-Buck A, et al. Multi-enzyme complexes on DNA scaffolds capable of substrate channelling with an artificial swinging arm. *Nat Nanotech*, 2014, 9: 531–536
- 28 Akerström B, Brodin T, Reis K, et al. Protein G: A powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol*, 1985, 135: 2589–2592
- 29 Rosier B J H M, Cremers G A O, Engelen W, et al. Incorporation of native antibodies and Fc-fusion proteins on DNA nanostructures via a modular conjugation strategy. *Chem Commun*, 2017, 53: 7393–7396
- 30 Rosen C B, Kodali A L B, Nielsen J S, et al. Template-directed covalent conjugation of DNA to native antibodies, transferrin and other metal-binding proteins. *Nat Chem*, 2014, 6: 804–809
- 31 Nielsen T B, Thomsen R P, Mortensen M R, et al. Peptide-directed DNA-templated protein labelling for the assembly of a pseudo-IgM. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 9068–9072
- 32 Nielsen T, Märcher A, Drobnáková Z, et al. Disulphide-mediated site-directed modification of proteins. *Org Biomol Chem*, 2020, 18: 4717–4722
- 33 Märcher A, Palmfeldt J, Nisavic M, et al. A reagent for amine-directed conjugation to IgG1 antibodies. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 6539–6544
- 34 Jongsma M A, Litjens R H G M. Self-assembling protein arrays on DNA chips by auto-labeling fusion proteins with a single DNA address. *Proteomics*, 2006, 6: 2650–2655
- 35 Burgahn T, Garrecht R, Rabe K S, et al. Solid-phase synthesis and purification of protein–DNA origami nanostructures. *Chem Eur J*, 2019, 25: 3483–3488
- 36 Koßmann K J, Ziegler C, Angelin A, et al. A rationally designed connector for assembly of protein-functionalized DNA nanostructures. *ChemBioChem*, 2016, 17: 1102–1106
- 37 Nakata E, Dinh H, Ngo T A, et al. A modular zinc finger adaptor accelerates the covalent linkage of proteins at specific locations on DNA nanoscaffolds. *Chem Commun*, 2015, 51: 1016–1019
- 38 Sletten E, Bertozzi C. Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 6974–6998
- 39 Marth G, Hartley A M, Reddington S C, et al. Precision templated bottom-up multiprotein nanoassembly through defined click chemistry linkage to DNA. *ACS Nano*, 2017, 11: 5003–5010
- 40 Hao Z, Song Y, Lin S, et al. A readily synthesized cyclic pyrrolysine analogue for site-specific protein “click” labeling. *Chem Commun*, 2011, 47: 4502–4504
- 41 Baskin J M, Prescher J A, Laughlin S T, et al. Copper-free click chemistry for dynamic *in vivo* imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 16793–16797
- 42 Bird R E, Lemmel S A, Yu X, et al. Bioorthogonal chemistry and its applications. *Bioconjugate Chem*, 2021, 32: 2457–2479
- 43 van Eldijk M B, van Hest J C M. Residue-specific incorporation of noncanonical amino acids for protein engineering. In: Lemke E A. *Noncanonical Amino Acids: Methods and Protocols*. New York: Springer, 2018. 137–145
- 44 Stephanopoulos N, Liu M, Tong G J, et al. Immobilization and one-dimensional arrangement of virus capsids with nanoscale precision using DNA origami. *Nano Lett*, 2010, 10: 2714–2720
- 45 Fu J, Yang Y R, Dhakal S, et al. Assembly of multienzyme complexes on DNA nanostructures. *Nat Protoc*, 2016, 11: 2243–2273
- 46 Kalendar R. A guide to using FASTPCR software for PCR, *in silico* PCR, and oligonucleotide analysis. In: Basu C, ed. *PCR Primer Design*. New York: Springer, 2022: 223–243
- 47 Wang C H, Chen X Q, Su Y Y, et al. Precise regulating T cell activation signaling with spatial controllable positioning of receptors on DNA origami. *Chin J Anal Chem*, 2022, 50: 100091
- 48 Lin C, Perrault S D, Kwak M, et al. Purification of DNA-origami nanostructures by rate-zonal centrifugation. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e40
- 49 Timm C, Niemeyer C M. Assembly and purification of enzyme-functionalized DNA origami structures. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 6745–6750
- 50 Shaw A, Benson E, Högberg B. Purification of functionalized DNA origami nanostructures. *ACS Nano*, 2015, 9: 4968–4975
- 51 Abe K, Sugiyama H, Endo M. Construction of an optically controllable CRISPR-Cas9 system using a DNA origami nanostructure. *Chem Commun*, 2021, 57: 5594–5596
- 52 Numajiri K, Yamazaki T, Kimura M, et al. Discrete and active enzyme nanoarrays on DNA origami scaffolds purified by affinity tag separation. *J*

- [Am Chem Soc](#), 2010, 132: 9937–9939
- 53 Zhang F, Nangreave J, Liu Y, et al. Structural DNA nanotechnology: State of the art and future perspective. [J Am Chem Soc](#), 2014, 136: 11198–11211
 - 54 Jiao Y, Shang Y, Li N, et al. DNA-based enzymatic systems and their applications. [iScience](#), 2022, 25: 104018
 - 55 Klein W P, Thomsen R P, Turner K B, et al. Enhanced catalysis from multienzyme cascades assembled on a DNA origami triangle. [ACS Nano](#), 2019, 13: 13677–13689
 - 56 Niemeyer C M, Koehler J, Wuerdemann C. DNA-directed assembly of bienzymic complexes from *in vivo* biotinylated NAD(P)H:FMN oxidoreductase and luciferase. [ChemBioChem](#), 2002, 3: 242–245
 - 57 Sun Q, Madan B, Tsai S L, et al. Creation of artificial cellulosomes on DNA scaffolds by zinc finger protein-guided assembly for efficient cellulose hydrolysis. [Chem Commun](#), 2014, 50: 1423–1425
 - 58 Erkelenz M, Kuo C H, Niemeyer C M. DNA-mediated assembly of cytochrome P450 BM3 subdomains. [J Am Chem Soc](#), 2011, 133: 16111–16118
 - 59 Wilner O I, Weizmann Y, Gill R, et al. Enzyme cascades activated on topologically programmed DNA scaffolds. [Nat Nanotech](#), 2009, 4: 249–254
 - 60 Liu M, Fu J, Qi X, et al. A three-enzyme pathway with an optimised geometric arrangement to facilitate substrate transfer. [ChemBioChem](#), 2016, 17: 1097–1101
 - 61 Kahn J S, Xiong Y, Huang J, et al. Cascaded enzyme reactions over a three-dimensional, wireframe DNA origami scaffold. [JACS Au](#), 2022, 2: 357–366
 - 62 Zhou C, Yang Z, Liu D. Reversible regulation of protein binding affinity by a DNA machine. [J Am Chem Soc](#), 2012, 134: 1416–1418
 - 63 Xin L, Zhou C, Yang Z, et al. Regulation of an enzyme cascade reaction by a DNA machine. [Small](#), 2013, 9: 3088–3091
 - 64 Liu M, Fu J, Hejesen C, et al. A DNA tweezer-actuated enzyme nanoreactor. [Nat Commun](#), 2013, 4: 2127
 - 65 Marras A E, Shi Z, Lindell M G, et al. Cation-activated avidity for rapid reconfiguration of DNA nanodevices. [ACS Nano](#), 2018, 12: 9484–9494
 - 66 Hu Y, Wang F, Lu C H, et al. Switchable enzyme/DNAzyme cascades by the reconfiguration of DNA nanostructures. [Chem Eur J](#), 2014, 20: 16203–16209
 - 67 Kou B, Chai Y, Yuan Y, et al. Dynamical regulation of enzyme cascade amplification by a regenerated DNA nanotweezer for ultrasensitive electrochemical DNA detection. [Anal Chem](#), 2018, 90: 10701–10706
 - 68 Fu J, Wang Z, Liang X H, et al. DNA-scaffolded proximity assembly and confinement of multienzyme reactions. [Top Curr Chem](#), 2020, 378: 38
 - 69 Huang J, Gambietz S, Sacca B. Self-assembled artificial DNA nanocompartments and their bioapplications. [Small](#), 2022, 19(S1): 2202253
 - 70 Fu Y, Zeng 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
 - 71 Linko V, Eerikäinen M, Kostianen M A. A modular DNA origami-based enzyme cascade nanoreactor. [Chem Commun](#), 2015, 51: 5351–5354
 - 72 Zhao Z, Fu J, Dhakal S, et al. Nanocaged enzymes with enhanced catalytic activity and increased stability against protease digestion. [Nat Commun](#), 2016, 7: 10619
 - 73 Grossi G, Dalgaard Ebbesen Jepsen M, Kjems J, et al. Control of enzyme reactions by a reconfigurable DNA nanovault. [Nat Commun](#), 2017, 8: 992
 - 74 Zhang Y, Tsitkov S, Hess H. Proximity does not contribute to activity enhancement in the glucose oxidase–horseradish peroxidase cascade. [Nat Commun](#), 2016, 7: 13982
 - 75 Xiong Y, Huang J, Wang S T, et al. Local environment affects the activity of enzymes on a 3D molecular scaffold. [ACS Nano](#), 2020, 14: 14646–14654
 - 76 Gao Y, Roberts C C, Toop A, et al. Mechanisms of enhanced catalysis in enzyme-DNA nanostructures revealed through molecular simulations and experimental analysis. [ChemBioChem](#), 2016, 17: 1430–1436
 - 77 Lang X, Hong X, Baker C A, et al. Molecular binding scaffolds increase local substrate concentration enhancing the enzymatic hydrolysis of VX nerve agent. [Biotech Bioeng](#), 2020, 117: 1970–1978
 - 78 Yang Y R, Fu J, Wootten S, et al. 2D enzyme cascade network with efficient substrate channeling by swinging arms. [ChemBioChem](#), 2018, 19: 212–216
 - 79 Ke G, Liu M, Jiang S, et al. Directional regulation of enzyme pathways through the control of substrate channeling on a DNA origami scaffold. [Angew Chem Int Ed](#), 2016, 55: 7483–7486
 - 80 Wang Z, St. Iago-Mcrae E, Ebrahimiojarad A, et al. Modulation of enzyme cascade activity by local substrate enrichment and exclusion on DNA nanostructures. [Langmuir](#), 2022, 38: 12594–12601
 - 81 Kuzuya A, Sakai Y, Yamazaki T, et al. Nanomechanical DNA origami ‘single-molecule beacons’ directly imaged by atomic force microscopy. [Nat Commun](#), 2011, 2: 449

- 82 Subramanian H K K, Chakraborty B, Sha R, et al. The label-free unambiguous detection and symbolic display of single nucleotide polymorphisms on DNA origami. *Nano Lett*, 2011, 11: 910–913
- 83 Zhang H, Chao J, Pan D, et al. DNA origami-based shape IDs for single-molecule nanomechanical genotyping. *Nat Commun*, 2017, 8: 14738
- 84 Liu K, Pan D, Wen Y, et al. Identifying the genotypes of hepatitis B virus (HBV) with DNA origami label. *Small*, 2018, 14: 1701718
- 85 Aghebat Rafat A, Sagredo S, Thalhammer M, et al. Barcoded DNA origami structures for multiplexed optimization and enrichment of DNA-based protein-binding cavities. *Nat Chem*, 2020, 12: 852–859
- 86 Rinker S, Ke Y, Liu Y, et al. Self-assembled DNA nanostructures for distance-dependent multivalent ligand–protein binding. *Nat Nanotechnol*, 2008, 3: 418–422
- 87 Huang J, Suma A, Cui M, et al. Arranging small molecules with subnanometer precision on DNA origami substrates for the single-molecule investigation of protein–ligand interactions. *Small Struct*, 2020, 1: 2000038
- 88 Zhang P, Liu X, Liu P, et al. Capturing transient antibody conformations with DNA origami epitopes. *Nat Commun*, 2020, 11: 3114
- 89 Haraguchi T, Shimi T, Koujin T, et al. Spectral imaging fluorescence microscopy. *Genes Cells*, 2002, 7: 881–887
- 90 Li Y, Cu Y T H, Luo D. Multiplexed detection of pathogen DNA with DNA-based fluorescence nanobarcode. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 885–889
- 91 Lee J B, Roh Y H, Um S H, et al. Multifunctional nanoarchitectures from DNA-based ABC monomers. *Nat Nanotech*, 2009, 4: 430–436
- 92 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
- 93 Bai X, McMullan G, Scheres S H W. How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40: 49–57
- 94 He Y, Ye T, Su M, et al. Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra. *Nature*, 2008, 452: 198–201
- 95 Kato T, Goodman R P, Erben C M, et al. High-resolution structural analysis of a DNA nanostructure by cryoEM. *Nano Lett*, 2009, 9: 2747–2750
- 96 Andersen E S, Dong M, Nielsen M M, et al. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, 2009, 459: 73–76
- 97 Bai X, Martin T G, Scheres S H W, et al. Cryo-EM structure of a 3D DNA-origami object. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 20012–20017
- 98 Kube M, Kohler F, Feigl E, et al. Revealing the structures of megadalton-scale DNA complexes with nucleotide resolution. *Nat Commun*, 2020, 11: 6229
- 99 Xu Y, Yang Y R, Shi Q, et al. An infectious virus-like particle built on a programmable icosahedral DNA framework. *Angew Chem Int Ed*, 2023, 62: e202214731
- 100 Seeman N C. Nucleic acid junctions and lattices. *J Theor Biol*, 1982, 99: 237–247
- 101 Martin T G, Bharat T A M, Joerger A C, et al. Design of a molecular support for cryo-EM structure determination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E7456–E7463
- 102 Aksel T, Yu Z, Cheng Y, et al. Molecular goniometers for single-particle cryo-electron microscopy of DNA-binding proteins. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 378–386
- 103 Liu D, Thélot F A, Piccirilli J A, et al. Sub-3-Å cryo-EM structure of RNA enabled by engineered homomeric self-assembly. *Nat Methods*, 2022, 19: 576–585
- 104 Vallina N S, McRae E K S, Hansen B K, et al. RNA origami scaffolds as a cryo-EM tool for investigating aptamer–ligand binding of a broccoli-pepper FRET pair. 2022, bioRxiv: 2022.2008.2025.505116
- 105 Piao J, Zhao C, Dong Y. DNA nanostructure-assisted nanodiscs provide a toolbox to investigate membrane proteins. *Cell Rep Phys Sci*, 2022, 3: 100897
- 106 Seddon A M, Curnow P, Booth P J. Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1666: 105–117
- 107 Zhao Z, Zhang M, Hogle J M, et al. DNA-corralled nanodiscs for the structural and functional characterization of membrane proteins and viral entry. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 10639–10643
- 108 Iric K, Subramanian M, Oertel J, et al. DNA-encircled lipid bilayers. *Nanoscale*, 2018, 10: 18463–18467
- 109 Zhang Z, Chapman E R. Programmable nanodisc patterning by DNA origami. *Nano Lett*, 2020, 20: 6032–6037
- 110 Dong Y, Yang Y R, Zhang Y, et al. Cuboid vesicles formed by frame-guided assembly on DNA origami scaffolds. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 1586–1589
- 111 Wang C, Piao J, Li Y, et al. Construction of liposomes mimicking cell membrane structure through frame-guided assembly. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 15176–15180
- 112 Dong Y, Chen S, Zhang S, et al. Folding DNA into a lipid-conjugated nanobarrel for controlled reconstitution of membrane proteins. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 2072–2076
- 113 Silvester E, Vollmer B, Prazák V, et al. DNA origami signposts for identifying proteins on cell membranes by electron cryotomography. *Cell*, 2021, 184: 1110–1121.e16
- 114 Reginald S S, Lee H, Fazil N, et al. Control of carbon monoxide dehydrogenase orientation by site-specific immobilization enables direct electrical contact between enzyme cofactor and solid surface. *Commun Biol*, 2022, 5: 390

- 115 Zou X, Wei S, Badieyan S, et al. Investigating the effect of two-point surface attachment on enzyme stability and activity. [J Am Chem Soc](#), 2018, 140: 16560–16569
- 116 Zhang Q, Jiang Q, Li N, et al. DNA origami as an *in vivo* drug delivery vehicle for cancer therapy. [ACS Nano](#), 2014, 8: 6633–6643
- 117 Bila H, Kurisinkal E E, Bastings M M C. Engineering a stable future for DNA-origami as a biomaterial. [Biomater Sci](#), 2019, 7: 532–541
- 118 Chen J, Noble A J, Kang J Y, et al. Eliminating effects of particle adsorption to the air/water interface in single-particle cryo-electron microscopy: Bacterial RNA polymerase and CHAPSO. [J Struct Biol-X](#), 2019, 1: 100005
- 119 Tan Y Z, Baldwin P R, Davis J H, et al. Addressing preferred specimen orientation in single-particle cryo-EM through tilting. [Nat Methods](#), 2017, 14: 793–796
- 120 Roh S H, Hryc C F, Jeong H H, et al. Subunit conformational variation within individual GroEL oligomers resolved by Cryo-EM. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2017, 114: 8259–8264

Summary for “基于DNA纳米技术的生物大分子组装与成像”

DNA nanotechnology-based biomolecular assembly and imaging

Jiayi Li^{1,2†}, Yuanfang Chen^{1,2†} & Yuhe R. Yang^{1,2*}¹ CAS Key Laboratory of Nanosystem and Hierarchical Fabrication, National Center for Nanoscience and Technology of China, Beijing 100190, China;² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding author, E-mail: yangyh@nanocr.cn

Arranging biomacromolecules in a specific order and orientation on the nanoscale has long been a prominent research topic. Significant progress has been made in understanding intermolecular interactions within bionetworks and elucidating biosystem mechanisms. DNA nanostructures, serving as ideal scaffolds, have been extensively employed to achieve precise arrangement of diverse biomolecules at the nanoscale due to their well-defined geometry, programmability, addressability at the nanometer scale, functionalization capabilities and excellent biocompatibility. The advent of DNA origami has further enhanced the ability to design intricate and accurate DNA frameworks. This technique utilizes numerous short DNA strands, called staples, to fold a longer DNA strand, known as the scaffold, enabling the creation of more structurally complex and precise DNA architectures. This review is mainly structured into four main sections. Firstly, we provide a comprehensive overview of the various methods employed for the three key steps involved in assembling DNA nanostructures with biomolecules. These steps encompass the conjugation of oligonucleotides and biomolecules, the hybridization of DNA nanostructures with biomolecules, and the purification of DNA nanostructures–biomolecule complexes. Secondly, we briefly summarize the relevant applications of DNA nanostructures–biomolecules self-assembly, with a primary focus on the construction of enzyme cascade reaction systems. The combination of enzyme cascades and addressable DNA assembly has proven highly effective in creating stable artificial multi-enzyme complexes. This integration allows for precise control over the position, shape, and composition of the complexes, enabling efficient manipulation of enzyme distance, substrate channeling, and compartmentalization. Thirdly, we focus on the application of DNA nanostructures in diverse imaging techniques, including atomic force microscopy (AFM), fluorescence imaging, and cryo-electron microscopy (cryo-EM). DNA nanostructure offers distinct advantages in advancing bioimaging modalities, such as enabling multiplexed imaging, facilitating logical responsive imaging, and enabling protein structural analysis. While AFM has been extensively employed for the characterization of various biomolecules, it still has limitations in direct observation and comparison of freely dispersed molecules. However, by utilizing DNA nanostructures as a platform for loading molecules, it becomes possible to realize the visualization of dynamic intermolecular interactions using AFM. Besides, through precisely manipulating the number and combination of selected fluorophores, DNA nanostructures provide a means to mitigate the issue of spectral overlap among fluorophore colors. This precise control allows for tuning the overall color of probes, effectively overcoming spectrum overlapping and enabling the generation of distinct and distinguishable colors. Moreover, DNA nanostructures show potential in assisting the determination of protein orientation during cryo-electron microscopy (cryo-EM) imaging and potentially mitigating issues such as protein unfolding or nonrandom absorption at the water-air interface. The final section of this review discusses the technical challenges that need to be addressed to enhance the utilization of DNA nanoscaffolds, for example achieving precise orientation control of biomolecules on DNA scaffolds, optimizing the stability of the overall complexes to achieve *in vivo* functionality and overcoming technological bottlenecks that impede the application of DNA nanoscaffolds in cryo-EM imaging.

DNA nanotechnology, DNA origami, biomolecule assembly, biomolecule imagingdoi: [10.1360/TB-2023-0511](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0511)