中国科学: 化学 2021 年 第 51 卷 第 6 期: 651 ~ 664
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS
评 述 庆祝山东大学建校120周年专刊

DNA步行器在生物传感和活细胞成像领域的应用

张立燕†, 刘晓亭†, 杨亚允, 姜玮*

山东大学化学与化工学院, 济南 250100
†同等贡献
*通讯作者, E-mail: wjiang@sdu.edu.cn

收稿日期: 2021-03-02; 接受日期: 2021-03-24; 网络版发表日期: 2021-05-26
国家自然科学基金(编号: 22074081)资助项目

摘要 DNA步行器是一种基于DNA杂交的特异性、可预测性和可编程性的自组装纳米器件. 在特定的外部刺激下, 其行走部件可沿着预定的轨道自主地、渐进地移动. 这种自主运动和重复步进的特性赋予其优异的信号放大能力, 使得DNA步行器在化学测量方面展现出良好的应用前景. 本文系统评述了DNA步行器在生物传感和活细胞成像领域的研究进展.

关键词 DNA纳米机器, DNA步行器, 自组装, 生物传感, 活细胞成像

1 引言

DNA作为生命遗传信息的载体, 是由脱氧核糖核苷酸单元组成的大分子聚合物. DNA本身具有稳定的物理化学性质, 其碱基配对遵守精确的Watson-Crick碱基配对规则, 序列和结构具有可编程性、可预测性、多样性、功能性以及良好的生物相容性等[1,2], 且便于修饰, 合成技术成熟, 是理想的纳米构筑材料, 在DNA纳米技术、动态纳米结构的制备和功能纳米器件开发等方面显示出巨大的潜力[3~5].

DNA纳米机器是依据寡核苷酸独有的特性设计而成的分子自组装体, 通过响应外界刺激实现DNA不同结构和构象间的可控转化并执行类似机器的运动[6]. 目前, 研究者已经设计并制备出多种类型的DNA纳米机器, 包括DNA马达(DNA motor)[7,8]、DNA镊子(DNA tweezer)[9~11]、DNA齿轮(DNA gear)[12]、DNA机器人(DNA robot)[13]、DNA转子(DNA rotator)[14,15]、DNA节拍器(DNA metronome)[16]和DNA步行器(DNA walker)[17~23]等. 这些DNA纳米机器的结构和构象可控, 可根据需要设置为某些反应的开关. 并且其在受到外部刺激之后能够执行类似机器的运动, 可作为信号放大工具应用于分子计算、生物传感和生物成像等领域. 其中, 类比于自然界中存在的分子步行器(如动力蛋白、肌动蛋白和运动蛋白等), DNA步行器由行走组件、轨道和燃料分子或其他形式的供能组件构成, 可以驱动特定的寡核苷酸行走组件沿预先设定的轨道执行步进位移[24]. 已经构建的DNA步行器包括一维(one-dimensional, 1D)、二维(two-dimensional, 2D)和三维(three-dimensional, 3D)的步行器, 分别沿线性轨道[25~28]、平面[29,30]或DNA Origami[31,32]轨道, 以及基于纳米颗粒的三维轨道[33~39]步进位移. 就作用位点而言可分为单足[40,41]、双足[42~44]和多足[45]DNA步行器.

引用格式: Zhang L, Liu X, Yang Y, Jiang W. Application of DNA walker in biosensing and living cell imaging. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 651–664, doi: 10.1360/SSC-2021-0053

© 2021 《中国科学》杂志社

其运行主要通过链置换反应[46]、蛋白酶或核酸酶介导的水解反应[47~49]以及环境诱导DNA结构转变[50~52]等方式驱动. 由于驱动方式多种多样, DNA步行器可以在不同的条件下执行步进位移, 以满足多种研究需要. 对于DNA步行器的研究除了传统意义上的机械行为之外, 已经拓展到新型生物传感器的构建[53]、细胞成像[54]、药物递送[55]、癌症的靶向诊疗[56]等领域.

本文聚焦于DNA步行器的最新研究进展, 对其在生物传感和活细胞成像等领域的应用进行了归类总结和系统评述, 并对这类纳米机器的发展前景进行了展望.

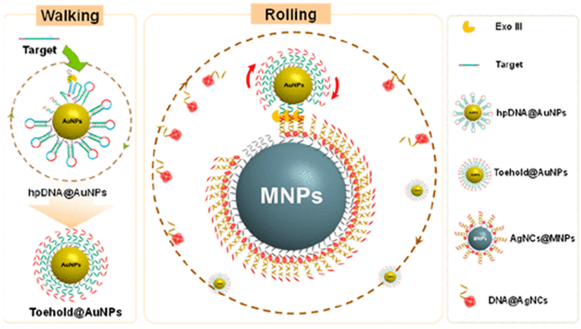


图 1 DNA步行器诱导的核酸外切酶III(Exo III)级联放大策略用于p53基因的检测[58](网络版彩图)

Figure 1 DNA walker-induced exonuclease III cascade amplification strategy for p53 gene detection [58] (color online).

2 DNA步行器在生物传感领域的应用

在特定的外部刺激下, DNA步行器可以沿着预定的轨道自动地、渐进地重复步进[24]. 如果每走一步或多步能产生一个信号分子, 那么DNA步行器可以在重复的步进过程中积累大量的信号拷贝, 赋予其优异的信号放大能力. 此外, 大多数的1D DNA步行器的行走具有方向性, 能够应用于编辑路径的信号输出. 2D和3D DNA步行器由于DNA的负载量大、局部有效浓度高、表面反应速度快等, 使得探针之间的有效碰撞增多, 其运行的持续性更强. 基于2D和3D DNA步行器的分析策略相较于传统溶液中的聚合酶链式反应放大、滚环扩增放大、杂交链式反应放大和催化发夹自组装放大等方式具有更强的信号扩增能力. 基于这一突出特征, 将DNA步行器应用于生物传感领域的报道日渐增多. 以下主要从核酸检测、蛋白质检测、真菌毒素检测、其他分子检测等方面归类评述了DNA步行器在生物传感领域的最新研究进展.

2.1 DNA步行器用于核酸检测

2.1.1 DNA检测

DNA携带合成RNA和蛋白质所必需的遗传信息, 控制着生物体的发育和正常运转. 近年来, 基于DNA步行器的分析策略逐渐被应用于特异性DNA检测, 包括基因片段检测和病原体分析等[57~64].

Wu等[58]报道了一种DNA步行器诱导的核酸外切酶III(Exo III)切割级联放大策略, 并应用于p53基因的检测. 如图1所示, 将金纳米颗粒(AuNPs)上修饰的含3′凸出末端的发夹DNA作为轨道链, 靶DNA作为行走链, 构建完整的DNA步行器. 首先通过目标物p53基因激活由Exo III驱动的DNA步行器的运行, 实现第一阶段的放大; 随后DNA步行器的运行产物引发第二阶段的Exo III切割级联放大. 基于两个阶段的级联放大, 该策略对p53基因显示出较宽的检测范围(0.5~500 fM)和较低的检测限(119 aM), 并且具有较高的选择性, 能够准确检测人类血液中的p53基因.

步行器在行走过程中不断消耗有限的轨道并最终将其耗尽, 导致行走终止, 影响步行器的持续运行能力和信号放大能力. 针对这一问题, Jiang课题组[59]提出了一种轨道可再生的DNA步行器, 并将其应用于埃博拉病毒的检测. 如图2所示, 通过补充新的DNA链使消耗掉的轨道不断重构再生. DNA步行器在再生的轨道上循环步进, 从而实现可持续的运行并积累大量信号. 其信号强度与埃博拉病毒基因片段浓度(0.01~500 pM)的对数呈良好的线性关系, 可获得低至3.5 fM的检测限, 并且能检测到人血清样品中的目标物. 该轨道可再生的DNA步行器提供了一种可持续运行的新方式, 并显著提高了DNA步行器的信号放大能力.

非酶DNA自组装反应的动力学较慢, 可能无法满足对样品的即时快速检测. 而生物酶具有高效的催化活性, 能够在几分钟甚至几秒钟内催化完成一个反应. 基于此, Yi课题组[62]提出了一种高度集成链置换反应驱动和酶驱动的双层3D DNA步行器, 用于快速灵敏地检测HIV. 如图3所示, 通过在纳米颗粒表面修饰内外两层轨道链构建双层DNA步行器. 目标物HIV片段激活链置换反应驱动的外层DNA步行器的运行, 其运行产物进而激活酶驱动的内层DNA步行器的运行, 从

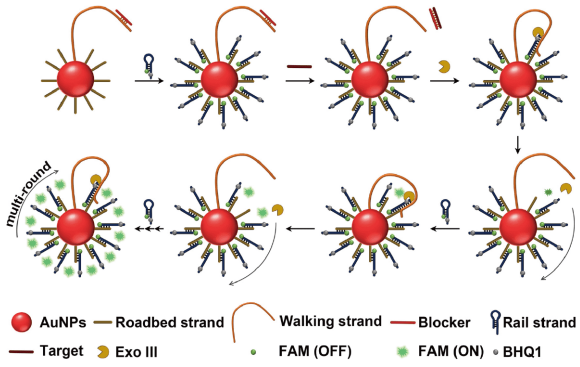


图 2　轨道再生型DNA步行器用于埃博拉病毒的检测[59](网络版彩图)

Figure 2　The track-regenerated DNA walker for Ebola virus detection [59] (color online).

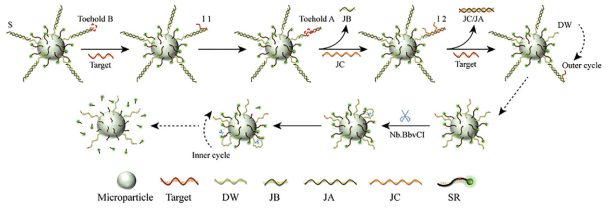


图 3　集成链置换驱动和酶驱动反应的双层3D DNA步行器用于HIV检测[62](网络版彩图)

Figure 3　Two-layer 3D DNA walker integrated with strand displacement driven and enzyme-powered reactions for HIV detection [62] (color online).

而释放大量的荧光信号用于检测HIV. 得益于双层DNA步行器的级联放大和酶催化的快速反应动力学, 该传感器可以在1 h内实现2~5 nM范围内的HIV检测, 并能够检测到人血清样本中低至0.1 nM的HIV片段, 为真实样本的快速灵敏检测提供了有力工具.

2.1.2　RNA检测

MicroRNAs (miRNAs)作为转录后调节因子的非编码RNA, 其同源之间序列相似、尺寸短、表达水平低、易被酶降解. 这些特性使得miRNA的检测方法需要具有较高的特异性、灵敏度和稳定性[65,66]. 近年来, 得益于DNA步行器的独特优势, 研究者致力于构建基于DNA步行器的生物传感器, 单独或结合其他放大方式应用于miRNAs的检测中[67~73].

Wang等[67]将链置换反应驱动的DNA步行器与滚环扩增放大策略相结合, 用于miRNA的检测. 如图4所示, 目标物miRNA激活链置换反应驱动的DNA步行器的运行, 运行产物在聚合酶和切刻酶的辅助下引发滚环扩增和底物水解反应, 产生大量的荧光信号. 该DNA步行器生物传感器对let-7a的检测范围为100 fM~1 nM, 检测限低至58 fM, 并具有良好的特异性, 可分辨单核苷酸变异, 为灵敏和特异性地检测miRNA提供了一种新思路.

Miao课题组[69]设计了一种结构可逆切换的DNA步行器, 如图5所示, 通过调节溶液的pH控制轨道链的拆解和重构, 进而调控DNA步行器的循环消耗和组装, 并结合基于核酸内切酶的扩增策略, 对miRNA进行灵敏和特异性的检测. 该方法能够检测到100 aM~100 pM

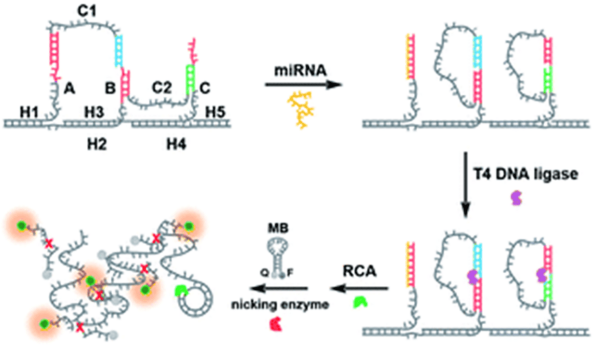


图 4　目标激活的DNA步行器用于miRNA的高选择性检测[67] (网络版彩图)

Figure 4　Target-fueled DNA walker for highly selective miRNA detection [67] (color online).

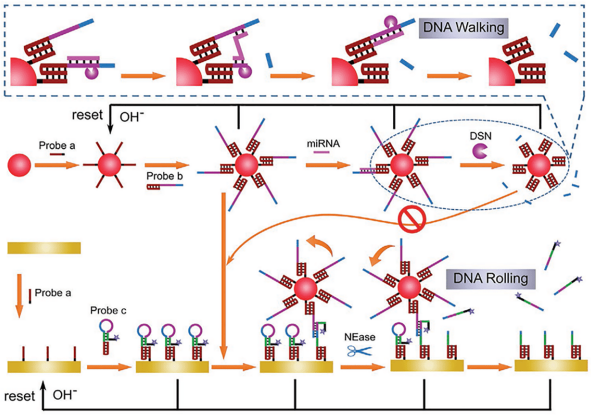


图 5　结构可逆转换的DNA步行器用于灵敏检测miRNA[69] (网络版彩图)

Figure 5　A DNA walker with reversible structure switching for sensitive detection of miRNA [69] (color online).

范围内的miRNA-21, 检测限低至39 aM且具有良好的抗干扰性能. 此外, 通过设计pH控制可拆卸的分子间DNA三螺旋, 可方便地重置主要传感元件, 满足miRNA的实时分析要求.

考虑到单一作用位点的DNA步行器在行走过程中易发生脱轨或迟滞从而影响其持续运行这一问题, Jiang课题组[70]报道了一种双足不等价的3D DNA步行器, 并将其应用于let-7a的检测中. 如图6所示, 设计含有两种不同作用位点的双足DNA行走链, 通过其与两种轨道链之间的结合亲和力的强弱差异调控行走链与轨道链之间的杂交稳定性, 以期减少双足行走链同时脱轨或迟滞事件的发生. 动力学和亲和力研究表明, 与单一作用位点的DNA步行器相比, 这种双足不等价的DNA步行器的可持续运行能力提高了一倍, 能够对浓度在0.2~20 nM范围内的let-7a进行检测, 并获得低至68 pM的检测限和在实际样品分析中令人满意的再现性.

3D DNA步行器的运行表现为单足或多足行走链在颗粒内的运动, 行走链的步进受其长度或作用位点的限制, 运行区域有限或可能脱轨, 从而影响DNA步行器的可持续运行和信号放大能力. 为了解决这一问题, Jiang课题组[71]设计了一种颗粒间相对运动的DNA步行器, 并用于寨卡病毒相关RNA片段(ZIKV-RNA)的检测. 如图7所示, 将轨道链和封闭的行走链分别修饰在两个不同的AuNPs上, 以形成轨道颗粒和行走颗粒. 在目标物ZIKV-RNA的刺激下, 行走链解封并与轨道链杂交, 通过DNAzyme切割反应驱动行走颗粒和轨道颗粒之间的相对运动. 由于行走颗粒上的多足行走链与轨道链的杂交具有协同性和良好的稳定性, 从而扩大了行走区域并降低了脱轨概率, 提高了步行器的可持续运行能力并获得较大的信号累积. 该步行器生物传感器对ZIKV-RNA显示出较宽的检测范围(1~15 nM)和较低的检测限(118 pM), 并能够实现复杂生物流体中ZIKV-RNA的灵敏分析.

2.2 DNA步行器用于蛋白质检测

灵敏准确地检测临床相关蛋白对疾病的早期诊断至关重要. 然而, 由于缺乏类似PCR的核酸扩增技术, 低丰度蛋白质的分析仍然面临很大挑战. 基于DNA步行器的分析策略可以有效地解决这一问题, 实现低丰度蛋白质的超灵敏检测[74~81].

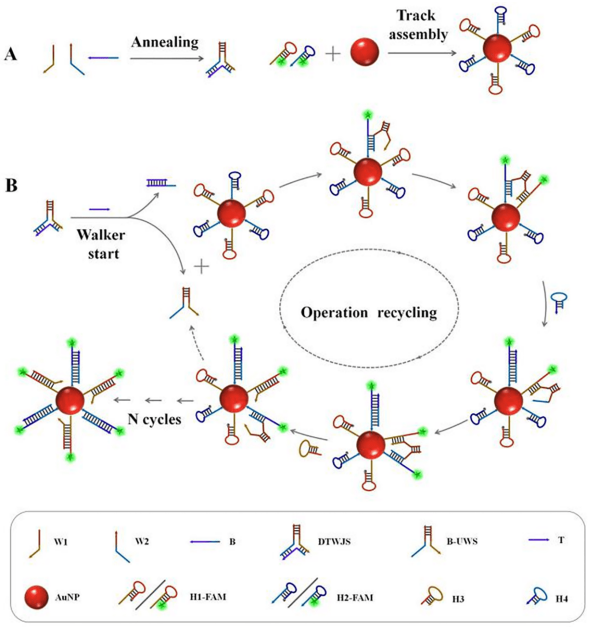


图 6 双足不等价的三维DNA步行器用于灵敏检测miRNA[70] (网络版彩图)

Figure 6 A bipedal-unequivalent three-dimensional DNA walker for sensitive detection of miRNA [70] (color online).

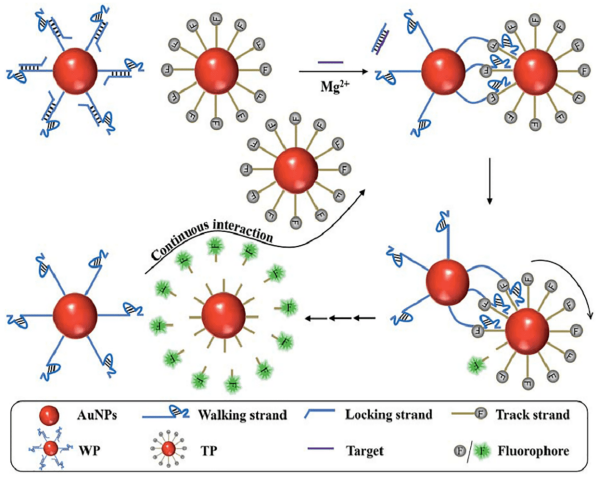


图 7 颗粒间相对运动的DNA步行器用于灵敏检测ZIKV-RNA[71] (网络版彩图)

Figure 7 An interparticle relatively motional DNA walker for sensitive detection of ZIKV-RNA [71] (color online).

Le课题组[74]构建了一种结合诱导的DNA步行器, 将DNA步行器的生物传感应用从简单的核酸检测扩展到蛋白质检测. 如图8(a)所示, 借助靶蛋白(链酶亲和素(图8(b))和血小板源生长因子(图8(c))与两个配体同时结合, 将行走链连接到负载轨道链的颗粒表面, 从而

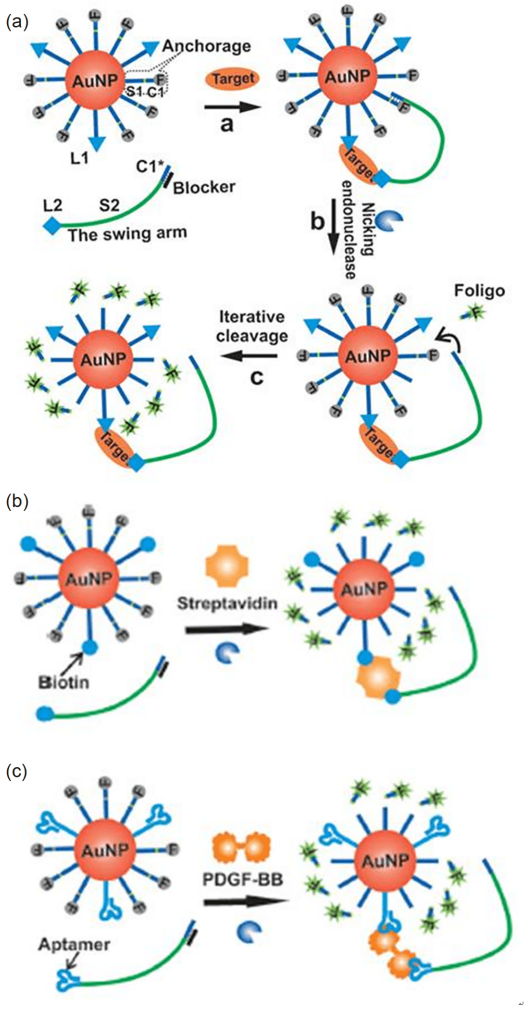


图 8　绑定诱导的DNA步行器. (a) DNA步行器的原理; (b) DNA步行器用于检测链酶亲和素; (c) DNA步行器用于检测血小板源生长因子[74] (网络版彩图)

Figure 8　Binding-induced DNA walker. (a) Principle of the DNA walker; (b) detection of streptavidin by DNA walker; (c) detection of platelet-derived growth factor by DNA walker [74] (color online).

通过分子内的邻近杂交效应激活DNA步行器. 该步行器适用于任何能够同时与两个配体结合的分子. 研究表明, 该DNA步行器传感器在链酶亲和素和血小板源生长因子的检测中表现出显著的优势, 检测限分别低至0.5和5 pM, 为痕量蛋白质的检测提供了有效的方法.

随后, Li课题组[75]设计了一种λ核酸外切酶和切口酶双酶协助的DNA步行器用于T4多聚核苷酸激酶(T4 PNK)的活性分析(图9). 通过T4 PNK催化5′-端羟基转化为磷酸基团引发λ核酸外切酶的水解反应, 暴露行走链, 进而触发切口酶驱动的DNA步行器的步进位移, 恢复大量被AuNP预先淬灭的染料荧光. 该方法的检测限为0.0067 U/mL, 线性范围为0.01~0.3 U/mL, 对复杂血清样品也有良好的特异性. 该DNA步行器为功能蛋白T4 PNK酶活性的检测提供了一种灵敏可靠的分析工具.

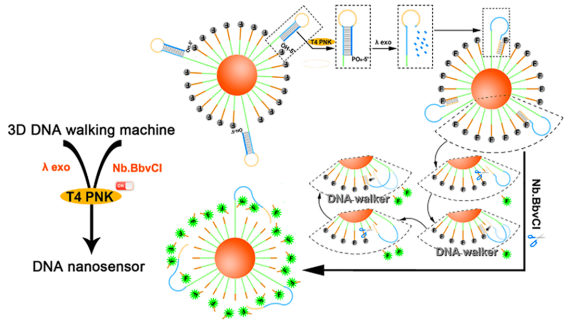


图 9　双酶协助的DNA步行器用于灵敏检测T4多聚核苷酸激酶[75] (网络版彩图)

Figure 9　A dual-enzyme-assisted DNA walker for sensitive detection of T4 polynucleotide kinase [75] (color online).

为了实现痕量蛋白的超灵敏检测, Jiang课题组[79]最近报道了一种DNAzyme步行器诱导DNAzyme作用的级联信号放大策略用于凝血酶的检测. 如图10所示, 靶凝血酶特异性地激活DNAzyme驱动的步行器的运行, 进而引发运行产物中新暴露出的DNAzyme催化报告探针的连续裂解. 该策略对凝血酶检测的线性范围为0.02~15 nM, 检出限为4.5 pM. 得益于DNA步行器的持续运行和DNAzyme水解反应的级联扩增效应, 检测灵敏度明显提高, 为蛋白质的灵敏检测提供了一种新策略.

2.3　DNA步行器用于真菌毒素的检测

真菌毒素作为真菌界生物体产生的一种毒性次级代谢产物, 通过污染各种食物引起急性食物中毒甚至癌症等. 灵敏准确地检测疾病相关真菌毒素对人类的健康和安全至关重要[82~89].

Pei课题组[83]报告了一种随机运行的DNA双步行器, 用于比色法检测细菌. 如图11所示, 在同一个目标细菌的刺激下两个不同的DNA步行器分别被激活运行, 其分别运行的产物又通过同一种方式作为信号输出. 基于DNA双步行器超快的反应动力学, 使得该方法能够在15 min内对细菌进行灵敏特异的检测, 线性

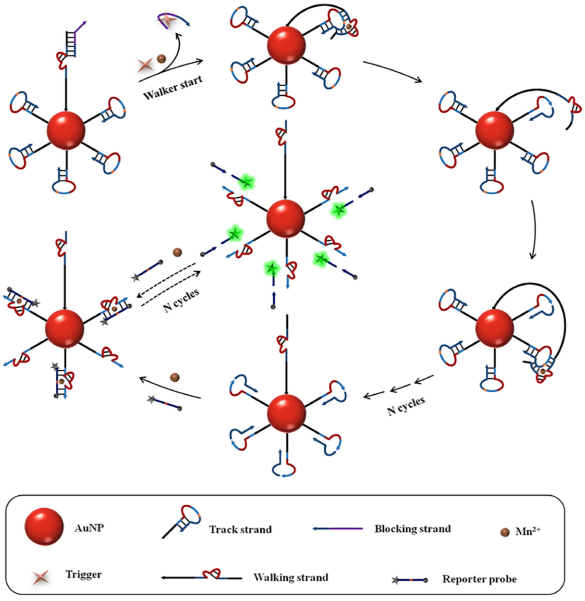


图 10 DNAzyme步行器诱导DNAzyme工作的级联信号放大策略用于凝血酶的检测[79] (网络版彩图)

Figure 10 DNAzyme walker induced DNAzyme working cascade signal amplification strategy for sensitive detection of protein [79] (color online).

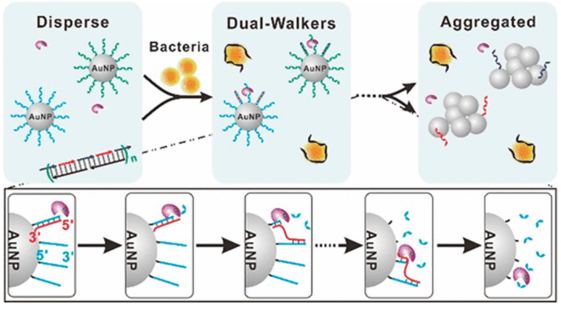


图 11 随机DNA双步行器用于比色法检测细菌[83] (网络版彩图)

Figure 11 Stochastic DNA dual-walkers for colorimetric bacteria detection [83] (color online).

响应范围为100~10^5 CFU/mL, 检测限为1.0 CFU/mL. 该DNA双步行器比色生物传感器具有快速、灵敏、特异、可靠等特点, 为检测细菌提供了一种有效的分析工具.

与此同时, Ye等[85]构建了一种级联运行的3D DNA步行器用于超灵敏检测卡那霉素. 如图12所示, 通过两种单足3D DNA步行器实现目标识别、信号转导和信号放大的集成. 当卡那霉素存在时, 上游的DNA步行器首先被启动运行, 其运行产物作为激活剂激活下游的DNA步行器进行级联信号放大. 这种级联运行的DNA步行器可以在60 min内实现对浓度在0.5~1000 pM范围内的卡那霉素的超灵敏检测, 检测限为28 fM, 是快速筛选食品中抗生素的有效途径.

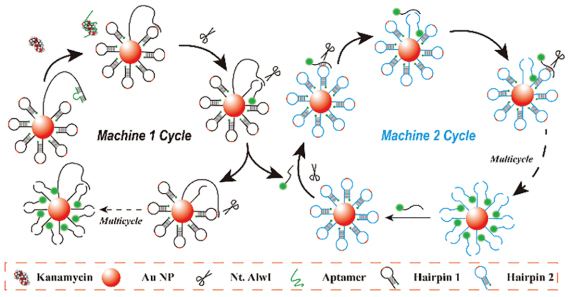


图 12 一种酶驱动的级联运行的3D DNA步行器用于超灵敏检测卡那霉素[85] (网络版彩图)

Figure 12 Enzyme-powered cascade three-dimensional DNA walker for ultrasensitive determination of kanamycin [85] (color online).

2.4 DNA步行器用于其他分子的检测

除了上述对DNA、RNA、蛋白质和真菌毒素的检测外, 研究者还设计了基于DNA步行器的生物传感器, 用于检测其他癌症生物标志物[90~97].

Zhang课题组[91]构建了一种靶触发的3D DNA步行器并与Exo III辅助的电化学比率法结合, 用于超灵敏检测外泌体. 如图13所示, 借助于外泌体表面蛋白与配体的作用将行走链连接到负载轨道链的颗粒表面, 从而通过分子内的邻近杂交效应激活DNAzyme驱动的DNA步行器的运行, 运行产物进而引发Exo III辅助的水解反应. 在最佳条件下, 能够对5.0×10^4~1.0×10^{10}颗粒/mL浓度范围内的外泌体进行检测, 检出限为1.3×10^4颗粒/mL, 并具有良好的选择性. 此外, 还对其在人血清中外泌体的临床应用试验进行了验证, 并取得了良好的重现性.

Yang课题组[94]报道了一种可编程目标启动的DNA步行器, 该步行器由分子内构型可变化的DNAzyme行走链和聚腺嘌呤A功能化的轨道链组装在AuNP上而成. 如图14所示, 针对目标物特异性编程行走链的识别域, 通过目标物刺激引发行走链的构型变化, 进而特异性地启动DNAzyme驱动的DNA步行器. 该DNA步行器生物传感器对腺苷的检出限为10 nM,

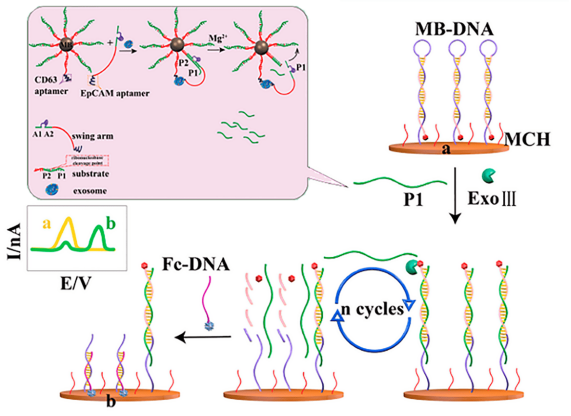


图 13　靶触发的3D DNA步行器与核酸外切酶III辅助的电化学比率法结合用于超灵敏检测外泌体[91] (网络版彩图)

Figure 13　Target triggered 3D DNA walker combined with exonuclease III-assisted electrochemical ratio method for ultrasensitive determination of exosomes [91] (color online).

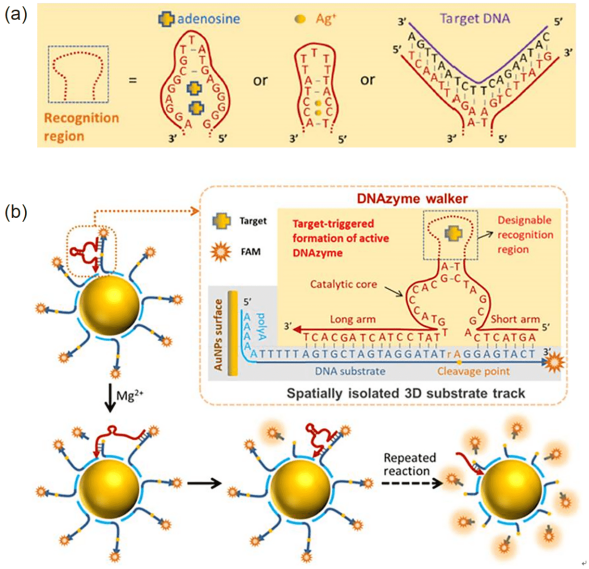


图 14　可编程目标启动的DNAzyme步行器用于小分子生物标志物的检测[94] (网络版彩图)

Figure 14　Programmable target-initiated DNAzyme walker for detection of small molecule [94] (color online).

对Ag^{+}的检出限为0.1 nM, 对目标DNA序列的检出限为0.1 fM, 并具有良好的灵敏度和选择性.

3　DNA步行器在活细胞成像领域的应用

基于纳米颗粒负载DNA组件构建的3D DNA步行器, 具有良好的生物相容性以及无需转染剂进入细胞的能力[24,98,99], 这种独特的优势促进了DNA步行器在细胞分析和成像中的应用. DNA步行器用于细胞内功能生物分子检测时, 启动后需借助驱动力维持其持续运行, 由于细胞的限域特征, 使驱动力选择成为影响DNA步行器设计的关键因素. 本节对基于不同驱动力驱动的DNA步行器在细胞成像领域的应用进行了归类评述.

3.1　DNAzyme驱动的DNA步行器

DNAzyme是一类具有催化功能且需要依赖辅因子发挥催化作用的单链DNA分子[100,101]. DNAzyme需要在Mg^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+}等金属离子的辅助下驱动DNA步行器的自主运行[102], 是一种经典的驱动力, DNAzyme驱动的DNA步行器又被称为DNAzyme步行器.

Le课题组[8]报道了一种用于活细胞成像的DNAzyme步行器. 如图15所示, 该步行器入胞后, 目标物miRNA与封闭链特异性结合, 释放出自由的行走链以

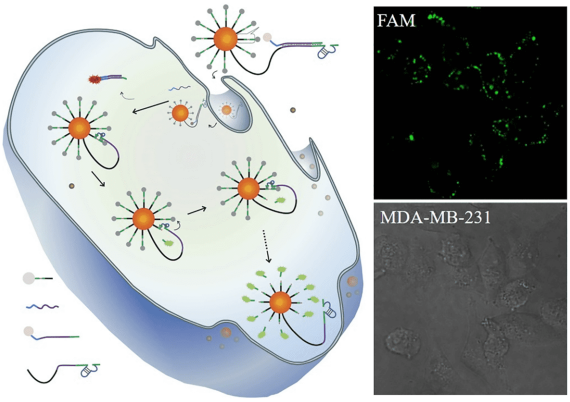


图 15　外源性Mn^{2+}特异性的DNAzyme步行器用于细胞内miRNA的成像[8] (网络版彩图)

Figure 15　Exogenous Mn^{2+} specific DNAzyme walker for intracellular miRNA imaging [8] (color online).

启动步行器, DNAzyme在外加Mn^{2+}的辅助下驱动DNA步行器的持续运行, 可通过活细胞成像考察DNAzyme步行器的运行情况. 近年来, 随着对DNAzyme认识的进一步深入, 外源性辅因子(如Mn^{2+}、Zn^{2+})特异性的DNAzyme步行器[103~107]在活细胞成像领域得到了一定的应用. 这种通过与活细胞共孵育引入金属辅因子的策略, 虽然能够维持DNAzyme步行器的持

续运行，但与金属离子共孵育的过程不仅增加了实验操作的复杂性，也会影响细胞的生理状态. 因此需要探寻有效的辅因子递送策略以实现DNAzyme步行器的自主化运行.

Wei课题组[108]报道了一种二氧化锰(MnO_2)纳米片介导的DNAzyme步行器用于细胞内端粒酶活性分析(图16). 该研究中，MnO_2纳米片不仅作为端粒酶引物的递送载体，在细胞内的还原产物Mn^{2+}亦作为DNAzyme的辅因子，共同驱动DNAzyme步行器的运行.

为使细胞内DNAzyme步行器高效运行，必须添加外源性金属离子(如Mn^{2+}和Zn^{2+})或通过其他方式供应辅因子，导致DNA步行器的设计复杂化. 研究发现，Na^+作为细胞质中最丰富的金属离子之一，其在活细胞内能够被DNAzyme特异性响应，可被用作DNAzyme步行器运行的辅因子[109,110]，而无需外部添加. Chen等[111]构建了Na^+特异性的DNAzyme步行器，通过同时检测细胞内的miRNA-21和miRNA-205来区分非小细胞肺癌的细胞亚型(图17). 该DNAzyme步行器由细胞内的Na^+提供动力，避免了添加外源辅因子的需求. 通过改变识别结构域，内源性Na^+特异性的DNAzyme步行器可以扩展到细胞内其他功能生物分子的成像应用.

3.2 蛋白酶驱动的DNA步行器

蛋白酶(如核酸外切酶、核酸内切酶)是构建DNA步行器常用的驱动力，通过切割特定的核酸底物驱动DNA步行器的运行，具有特异性强、效率高的优势[22,112,113]. 由于蛋白酶发挥活性的条件苛刻且其本身难以被递送到细胞中，蛋白酶驱动的DNA步行器在检测细胞内生物分子的应用上具有一定的局限性.

Zhu课题组[114]报道了一种双酶驱动的DNA步行器用于细胞内miRNA的检测和成像(图18). 目标物miRNA作为DNA步行器的行走链在两种酶的协同催化作用下自主行走. 通过该策略可以实现细胞内低表达的miRNA的成像，并且有望扩展到其他功能生物分子的检测中. 将蛋白酶递送进细胞之前需用多聚甲醛将细胞固定，难以实现活细胞内相关生物分子的实时动态成像.

Jiang课题组[115]利用内源性蛋白酶APE1作为驱动力构建了细胞内运行的DNA步行器用于尿嘧啶DNA

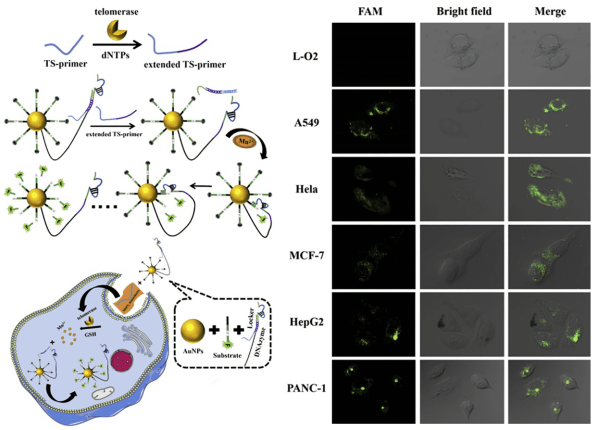


图 16 MnO_2纳米片介导的DNAzyme步行器用于细胞内端粒酶活性分析[108] (网络版彩图)

Figure 16 MnO_2 nanosheet-mediated DNAzyme walker for intracellular telomerase activity analysis [108] (color online).

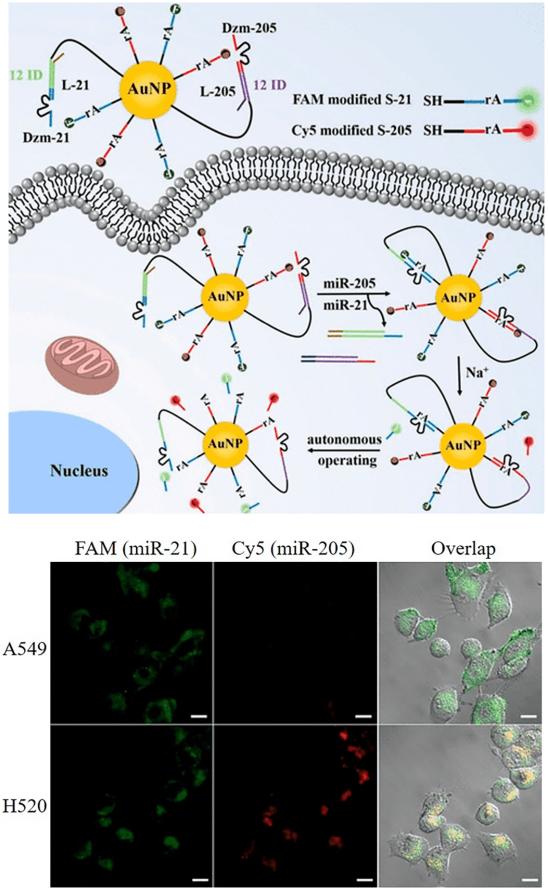


图 17 内源性Na^+特异性的DNAzyme步行器用于细胞内两种miRNA的同时成像[111] (网络版彩图)

Figure 17 Endogenous Na^+ specific DNAzyme walker for simultaneous imaging of two miRNAs in living cells [111] (color online).

糖基化酶(UDG)[116,117]活性的成像分析(图19). 这种以内源性酶为驱动力设计的DNA步行器, 可以避免外源性蛋白酶或其他物质的添加对细胞状态产生的影响.

3.3　催化发夹组装驱动的DNA步行器

催化发夹组装(CHA)作为一种无酶的等温扩增技术, 已广泛用于各种核酸的灵敏检测, 其中DNA发夹可以被特定的核酸序列激活并通过链杂交过程形成稳定的双链体[23,118~120]. 在该反应过程中, 核酸序列充当催化剂, 被释放并重新触发下一个反应周期, 不会被消耗.

人嘌呤/嘧啶内切核酸酶1 (APE1)是一种必需的DNA修复蛋白, 参与维持基因组完整性和保真度. 它通过切割与AP位点相邻的DNA在碱基移除修复通路(BER)中起关键作用[121,122]. APE1活性成像对于了解细胞复杂环境中的BER途径以及筛选BER候选药物至关重要. Lv等[123]报道了基于CHA反应的双足DNA步行器用于细胞内APE1的高灵敏荧光成像(图20). APE1切割DNA底物获得双足DNA行走链, 通过发卡H1和H2发生的CHA反应驱动DNA步行器的运行, 以实现APE1酶活性的灵敏分析.

Xu课题组[124]以miRNA-21为模型, 通过在金纳米粒子表面上组装两种FAM标记的发夹DNA (H1和H2), 开发了一种基于局域型催化发夹组装(LCHA)的DNA步行器用于miRNA-21的特异性和灵敏性检测(图21). 该DNA步行器极大地提高了H1和H2的局部浓度, 从而可获得更快的反应速度和更高的效率. 特别的, 由

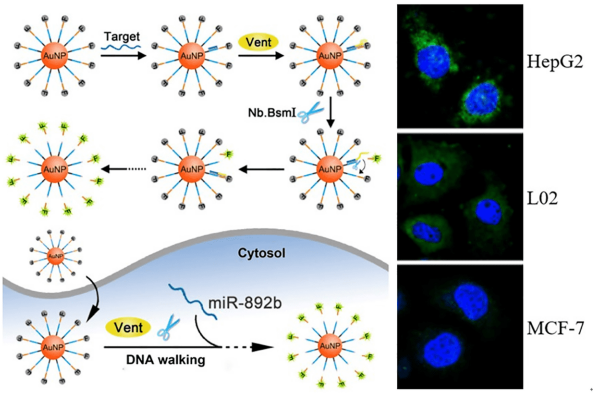


图 18　外源性双酶驱动的DNA步行器用于细胞内miRNA的成像[114] (网络版彩图)

Figure 18　Exogenous dual-enzyme-powered DNA walker for intracellular miRNA imaging [114] (color online).

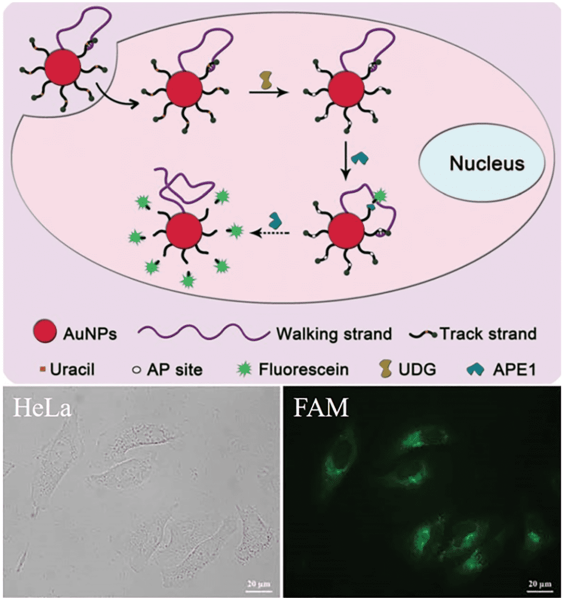


图 19　内源性酶驱动的DNA步行器用于细胞内UDG活性分析[115] (网络版彩图)

Figure 19　Endogenous enzyme-powered DNA walker for intracellular UDG activity analysis [115] (color online).

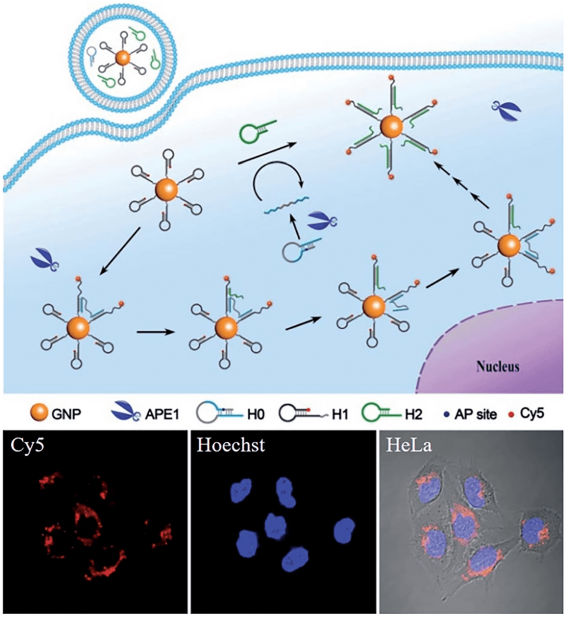


图 20　催化发夹组装驱动的双足DNA步行器用于细胞内APE1酶活性分析[123] (网络版彩图)

Figure 20　Catalytic hairpin assembly-powered bipedal DNA walker for intracellular APE1 enzyme activity analysis [123] (color online).

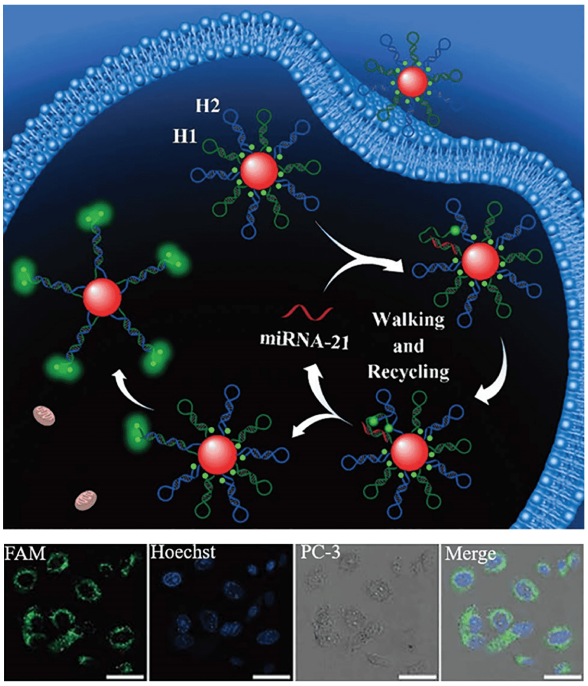


图 21 催化发夹组装驱动的DNA步行器用于细胞内miRNA成像[124] (网络版彩图)

Figure 21 Catalytic hairpin assembly-powered DNA walker for intracellular miRNA imaging [124] (color online).

于无酶和自驱动的特性，催化组装驱动的DNA步行器非常适合活细胞中功能生物分子的实时原位分析并得到广泛的关注[38,124,125].

3.4 熵驱动的DNA步行器

与催化发夹组装(CHA)[124]相比，Zhang课题组[126]在2007年的工作中引入了熵驱动的催化反应，运用一系列单链线性DNA分子通过toehold辅助的分支迁移在催化环路中发挥多种作用. 该设计比基于发夹的设计实质上更简单、更稳定，没有复杂的二级结构或环，也不会因亚稳态发夹结构之间的相互作用产生高背景泄漏. Yin课题组[127]通过简单的DNA杂交设计了一个熵驱动的DNA步行器(图22). 该步行器可实现自动渐进式行走同时释放信号，可在活细胞中执行miRNA成像的特定功能. 这类熵驱动的DNA步行器与基于蛋白酶/DNAzyme的步行器不同，它在移动时不需特异性切割DNA底物，通过简单的DNA杂交驱动步行器的运行，实现信号的放大和目标物的灵敏检测.

3.5 ATP驱动的DNA步行器

细胞步行器设计的关键在于探索合适的驱动力，以简单有效的方式为DNA步行器在细胞内的运行提供动力. ATP是大多数细胞过程的主要能量来源，在细胞中普遍存在. Yin课题组[128]通过耦合ATP适体设计了ATP驱动的DNA步行器，通过在其细胞内的自主运行执行miRNA检测的任务(图23). 利用内源性的ATP

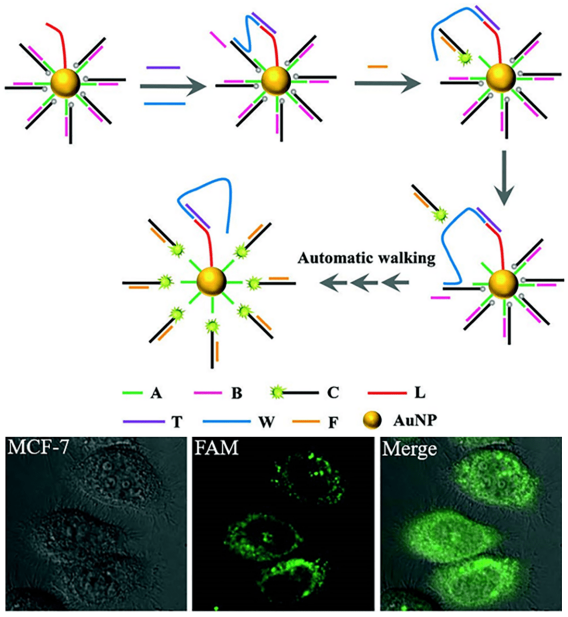


图 22 熵驱动的DNA步行器用于细胞内miRNA成像[127] (网络版彩图)

Figure 22 Entropy-powered DNA walker for intracellular miRNA imaging [127] (color online).

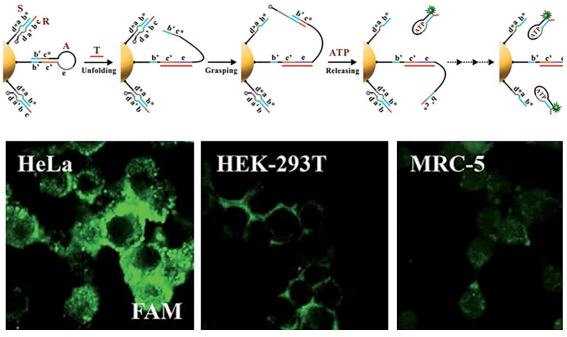


图 23 ATP驱动的DNA步行器用于细胞内miRNA成像[128] (网络版彩图)

Figure 23 ATP-powered DNA walker for intracellular miRNA imaging [128] (color online).

与ATP适体结合形成ATP/适体复合物，不断释放自由的行走链，重复运行，产生放大的信号以检测低丰度miRNA. 该DNA步行器利用细胞内普遍存在的ATP作为驱动力, 不需外加驱动力即可完成细胞内的自主运行.

4　总结与展望

DNA步行器设计灵活，结构稳定，运行具有自主性、可控性和持续性，在核酸、蛋白质、真菌毒素及其他分子等生物标志物的检测中具有广阔的应用前景. 尤其在各种内源性物质的协助下可完成活细胞内DNA步行器的自主运行，使活细胞内痕量分析物的可视化检测得以实现，为疾病的早期诊断提供了一种潜在的分析工具. 然而，目前已报道的DNA步行器的运行效率远低于天然分子机器，在活体成像应用中仍然面临诸多挑战: (1) DNA步行器的运行需要借助额外的“燃料”组件，各组件难以同步输送，这可能影响反应的动力学并增加信号的错误率; (2) 载体材料不能完全代替生物体内的物质，具有一定的生物毒性; (3) DNA步行器的重复利用率低，当轨道链耗尽之后整个DNA步行器便成为废弃机器, 不能重复利用; (4) 一个靶标只能激活一条行走DNA链的步进, DNA步行器的运行效率偏低，不能满足对某些反应的快速检测; (5) 只能模拟天然分子机器的行走功能，不能发挥其他的生物功能. 总的来说，虽然DNA步行器在生物传感和活细胞成像领域取得了显著的进展，但距离可媲美天然分子机器的生物功能还有很长的路要走，仍然需要各国科研人员的不懈努力.

参考文献

1 Hunter CA. *J Mol Biol*, 1993, 230: 1025–1054
2 Seeman NC. *Nature*, 2003, 421: 427–431
3 Seeman NC, Sleiman HF. *Nat Rev Mater*, 2018, 3: 17068
4 Niemeyer CM. *Nano Today*, 2007, 2: 42–52
5 Lu CH, Willner B, Willner I. *ACS Nano*, 2013, 7: 8320–8332
6 Bath J, Turberfield AJ. *Nat Nanotech*, 2007, 2: 275–284
7 Chen J, Zuehlke A, Deng B, Peng H, Hou X, Zhang H. *Anal Chem*, 2017, 89: 12888–12895
8 Peng H, Li XF, Zhang H, Le XC. *Nat Commun*, 2017, 8: 14378
9 Xu X, Wang L, Li K, Huang Q, Jiang W. *Anal Chem*, 2018, 90: 3521–3530
10 Shimron S, Cecconello A, Lu CH, Willner I. *Nano Lett*, 2013, 13: 3791–3795
11 Yang W, Shen Y, Zhang D, Li C, Yuan R, Xu W. *Anal Chem*, 2019, 91: 7782–7789
12 Zhang P, Lin Z, Zhuo Y, Yuan R, Chai Y. *Anal Chem*, 2017, 89: 1338–1345
13 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
14 Yan H, Zhang X, Shen Z, Seeman NC. *Nature*, 2002, 415: 62–65
15 Ding B, Seeman NC. *Science*, 2006, 314: 1583–1585
16 Buranachai C, McKinney SA, Ha T. *Nano Lett*, 2006, 6: 496–500
17 Wang ZG, Elbaz J, Willner I. *Nano Lett*, 2011, 11: 304–309
18 Nie Y, Jiang J, Peng K, Chai Y, Yuan R. *Biosens Bioelectron*, 2021, 175: 112848
19 You M, Huang F, Chen Z, Wang RW, Tan W. *ACS Nano*, 2012, 6: 7935–7941
20 Tomov TE, Tsukanov R, Liber M, Masoud R, Plavner N, Nir E. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 11935–11941
21 Zhu J, Gan H, Wu J, Ju H. *Anal Chem*, 2018, 90: 5503–5508
22 Yang X, Tang Y, Mason SD, Chen J, Li F. *ACS Nano*, 2016, 10: 2324–2330
23 Jung C, Allen PB, Ellington AD. *Nat Nanotech*, 2016, 11: 157–163
24 Mason SD, Tang Y, Li Y, Xie X, Li F. *TrAC Trends Anal Chem*, 2018, 107: 212–221
25 Tian Y, He Y, Chen Y, Yin P, Mao C. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 4355–4358
26 Arredondo D, Stefanovic D. *Phys Rev E*, 2020, 101: 062101

27 Xiao M, Wang X, Li L, Pei H. *Anal Chem*, 2019, 91: 11253–11258
28 Yang Y, He Y, Deng Z, Li J, Li X, Huang J, Zhong S. *ACS Appl Bio Mater*, 2020, 3: 6310–6318
29 Chai H, Miao P. *Anal Chem*, 2019, 91: 4953–4957
30 Yang J, Dou B, Yuan R, Xiang Y. *Anal Chem*, 2017, 89: 5138–5143
31 Wang D, Vietz C, Schröder T, Acuna G, Lalkens B, Tinnefeld P. *Nano Lett*, 2017, 17: 5368–5374
32 Wickham SFJ, Endo M, Katsuda Y, Hidaka K, Bath J, Sugiyama H, Turberfield AJ. *Nat Nanotech*, 2011, 6: 166–169
33 Xu Z, Liao L, Chai Y, Wang H, Yuan R. *Anal Chem*, 2017, 89: 8282–8287
34 Li Y, Wang GA, Mason SD, Yang X, Yu Z, Tang Y, Li F. *Chem Sci*, 2018, 9: 6434–6439
35 Zheng J, Li N, Li C, Wang X, Liu Y, Mao G, Ji X, He Z. *Biosens Bioelectron*, 2018, 107: 40–46
36 Huang J, Zhu L, Ju H, Lei J. *Anal Chem*, 2019, 91: 6981–6985
37 Zhang Y, Zhang Y, Zhang X, Li Y, He Y, Liu Y, Ju H. *Chem Sci*, 2020, 11: 6289–6296
38 Yang Z, Peng X, Yang P, Zhuo Y, Chai YQ, Liang W, Yuan R. *Chem Sci*, 2020, 11: 8482–8488
39 Hu Y, Chu X. *Nanoscale*, 2021, 13: 1596–1599
40 Jung C, Allen PB, Ellington AD. *ACS Nano*, 2017, 11: 8047–8054
41 Oishi M, Saito K. *ACS Nano*, 2020, 14: 3477–3489
42 Li C, Li X, Wei L, Liu M, Chen Y, Li G. *Chem Sci*, 2015, 6: 4311–4317
43 Fang J, Yuan C, Li J, Li J, Yang T, Guo Y, Wang D, Xue J, Fu WL, Xie G. *Biosens Bioelectron*, 2021, 177: 112981
44 Liu X, Meng F, Sun R, Wang K, Yu Z, Miao P. *Chem Commun*, 2021, 57: 2629–2632
45 Miao P, Tang Y. Anal Chem, 2019, 91: 15187−15192
46 Li W, Wang L, Jiang W. *Chem Commun*, 2017, 53: 5527–5530
47 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
48 Xiong E, Zhen D, Jiang L, Zhou X. *Anal Chem*, 2019, 91: 15317−15324
49 Liu J, Cui M, Zhou H, Yang W. *ACS Sens*, 2017, 2: 1847–1853
50 Yao D, Bhadra S, Xiong E, Liang H, Ellington AD, Jung C. *ACS Nano*, 2020, 14: 4007–4013
51 You M, Chen Y, Zhang X, Liu H, Wang R, Wang K, Williams KR, Tan W. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 2457–2460
52 Bakshi SF, Guz N, Zakharchenko A, Deng H, Tumanov AV, Woodworth CD, Minko S, Kolpashchikov DM, Katz E. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 12117−12120
53 Chen J, Luo Z, Sun C, Huang Z, Zhou C, Yin S, Duan Y, Li Y. *TrAC Trends Anal Chem*, 2019, 120: 115626
54 Hu M, Mao D, Liu X, Ren L, Zhou M, Chen X, Zhu X. *Theranostics*, 2019, 9: 5914–5923
55 Li C, Li H, Jie G. *Microchim Acta*, 2020, 187: 625
56 Guo Z, Li C, Gao M, Han X, Zhang Y, Zhang W, Li W. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 2
57 Zhang Y, Wang L, Luo F, Qiu B, Guo L, Weng Z, Lin Z, Chen G. *Chem Commun*, 2017, 53: 2910–2913
58 Wu N, Wang K, Wang YT, Chen ML, Chen XW, Yang T, Wang JH. *Anal Chem*, 2020, 92: 11111–11118
59 Pang H, Xu X, Jiang W. *Sens Actuat B-Chem*, 2020, 314: 128053
60 Tao F, Fang J, Guo Y, Tao Y, Han X, Hu Y, Wang J, Li L, Jian Y, Xie G. *Anal Biochem*, 2018, 554: 16–22
61 Zheng J, Ji X, Du M, Tian S, He Z. *Nanoscale*, 2018, 10: 17206–17211
62 Yuan C, Fang J, Duan Q, Yan Q, Guo J, Yuan T, Yi G. *Biosens Bioelectron*, 2019, 133: 243–249
63 Zhang L, Zhang Z, Ou X, Wang Y, Yang L, Weng Z, Xie G. *Sens Actuat B-Chem*, 2020, 324: 128719
64 Luo F, Chen F, Xiong Y, Wu Z, Zhang X, Wen W, Wang S. *Anal Chem*, 2021, 93: 4506–4512
65 Liu H, Li L, Wang Q, Duan L, Tang B. *Anal Chem*, 2014, 86: 5487−5493
66 Wang R, Wang L, Zhao H, Jiang W. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 834–839
67 Wang L, Deng R, Li J. *Chem Sci*, 2015, 6: 6777–6782
68 Xu Z, Chang Y, Chai Y, Wang H, Yuan R. *Anal Chem*, 2019, 91: 4883–4888
69 Miao P, Tang Y. *Small*, 2020, 16: 2004518
70 Zhang L, Liu X, Xu X, Zhang N, Jiang W. *Sens Actuat B-Chem*, 2021, 327: 128942
71 Zhang H, Xu X, Jiang W. *Chem Sci*, 2020, 11: 7415–7423

72 Wang C, Han Q, Mo F, Chen M, Xiong Z, Fu Y. *Anal Chem*, 2020, 92: 12145–12151
73 Liao N, Pan MC, Wang L, Yang F, Yuan R, Zhuo Y. *Anal Chem*, 2021, 93: 4051–4058
74 Zhang H, Lai M, Zuehlke A, Peng H, Li XF, Le XC. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 14326–14330
75 Feng C, Wang Z, Chen T, Chen X, Mao D, Zhao J, Li G. *Anal Chem*, 2018, 90: 2810–2815
76 Jiang X, Wang H, Wang H, Zhuo Y, Yuan R, Chai Y. *Anal Chem*, 2017, 89: 4280–4286
77 Ji Y, Zhang L, Zhu L, Lei J, Wu J, Ju H. *Biosens Bioelectron*, 2017, 96: 201–205
78 Li W, Rong Y, Wang J, Li T, Wang Z. *Biosens Bioelectron*, 2020, 169: 112605
79 Zhang L, Kan A, Wang S, Xu X, Zhang N, Jiang W. *Sens Actuat B-Chem*, 2021, 333: 129551
80 He MQ, Wang K, Wang WJ, Yu YL, Wang JH. *Anal Chem*, 2017, 89: 9292–9298
81 Shen Y, Gong J, Li S, Liu C, Zhou L, Sheng J, Xu QX. *Sens Actuat B-Chem*, 2021, 329: 129078
82 Yang Z, Liu M, Li B. *Microchim Acta*, 2020, 187: 678
83 Yang H, Xiao M, Lai W, Wan Y, Li L, Pei H. *Anal Chem*, 2020, 92: 4990–4995
84 Qu X, Wang J, Zhang R, Zhao Y, Li S, Wang Y, Liu S, Huang J, Yu J. *Microchim Acta*, 2020, 187: 193
85 Ye T, Zhang Z, Lu J, Yuan M, Cao H, Yin F, Wu X, Xu F. *Nanoscale*, 2020, 12: 20883–20889
86 Liu X, Li X, Jia L, Cheng G, Leong DT, Xue Q. *Chem Commun*, 2020, 56: 12628–12631
87 Zhang R, Zhang J, Qu X, Li S, Zhao Y, Liu S, Wang Y, Huang J, Yu J. *Analyst*, 2020, 145: 2975–2981
88 Taghdisi SM, Danesh NM, Ramezani M, Emrani AS, Abnous K. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 12504–12509
89 Cai R, Zhang S, Chen L, Li M, Zhang Y, Zhou N. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13: 4905–4914
90 Miao P, Tang Y. *Chem Commun*, 2020, 56: 4982–4985
91 Zhao L, Sun R, He P, Zhang X. *Anal Chem*, 2019, 91: 14773–14779
92 Cai S, Chen M, Liu M, He W, Liu Z, Wu D, Xia Y, Yang H, Chen J. *Biosens Bioelectron*, 2016, 85: 184–189
93 Wei W, Wei M, Yin L, Pu Y, Liu S. *Microchim Acta*, 2018, 185: 494
94 Yang K, Wang H, Ma N, Zeng M, Luo H, He D. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 44546–44553
95 Wang H, Wan K, Zhou Y, He X, He D, Cheng H, Huang J, Jia R, Wang K. *Chem Commun*, 2020, 56: 12949–12952
96 Feng QM, Ma P, Cao QH, Guo YH, Xu JJ. *Chem Commun*, 2020, 56: 269–272
97 Zhou L, Xiong Y, Wang H, Yin A, Zhang X, Li H, Fu Q, Huang P. *Sens Actuat B-Chem*, 2021, 334: 129589
98 Rosi NL, Giljohann DA, Thaxton CS, Lytton-Jean AKR, Han MS, Mirkin CA. *Science*, 2006, 312: 1027–1030
99 Brown AK, Li J, Pavot CMB, Lu Y. *Biochemistry*, 2003, 42: 7152–7161
100 Hu H, Zhou F, Wang B, Chang X, Dai T, Tian R, Wan Y, Wang X, Wang G. *Nanoscale*, 2021, 13: 1863–1868
101 Gong L, Zhao Z, Lv YF, Huan SY, Fu T, Zhang XB, Shen GL, Yu RQ. *Chem Commun*, 2015, 51: 979–995
102 Tang Y, He X, Zhou Z, Tang J, Guo R, Feng X. *Chem Commun*, 2016, 52: 13905–13908
103 Liu C, Hu Y, Pan Q, Yi J, Zhang J, He M, He M, Nie C, Chen T, Chu X. *Chem Commun*, 2020, 56: 3496–3499
104 Yin Y, Chen G, Gong L, Ge K, Pan W, Li N, Machuki JO', Yu Y, Geng D, Dong H, Gao F. *Anal Chem*, 2020, 92: 9247–9256
105 Liu C, Hu Y, Pan Q, Yi J, Zhang J, He M, He M, Chen T, Chu X. *Biosens Bioelectron*, 2019, 136: 31–37
106 Wu Y, Huang J, Yang X, Yang Y, Quan K, Xie N, Li J, Ma C, Wang K. *Anal Chem*, 2017, 89: 8377–8383
107 Yang Y, Huang J, Yang X, He X, Quan K, Xie N, Ou M, Wang K. *Anal Chem*, 2017, 89: 5850–5856
108 Xu C, Zhang F, Wang K, Xu E, Liu Y, Wei W, Liu S. *Sens Actuat B-Chem*, 2019, 298: 126930
109 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
110 Wu Z, Fan H, Satyavolu NSR, Wang WJ, Lake R, Jiang JH, Lu Y. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 8721–8725
111 Chen K, Huang Q, Fu T, Ke G, Zhao Z, Zhang X, Tan W. *Anal Chem*, 2020, 92: 7404–7408
112 Liu JL, Tang ZL, Zhang JQ, Chai YQ, Zhuo Y, Yuan R. *Anal Chem*, 2018, 90: 5298–5305
113 Bath J, Green SJ, Turberfield AJ. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 4358–4361
114 Chen T, Chen Y, Chen H, Zhang F, Zhang Q, Chen G, Zhu X. *Nano Res*, 2019, 12: 1055–1060
115 Xu X, Zhang P, Zhang R, Zhang N, Jiang W. *Chem Commun*, 2019, 55: 6026–6029
116 Yang W. *Cell Res*, 2008, 18: 184–197
117 David SS, Williams SD. *Chem Rev*, 1998, 98: 1221–1262

118 Qing Z, Xu J, Hu J, Zheng J, He L, Zou Z, Yang S, Tan W, Yang R. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 11574–11585
119 Wei Q, Huang J, Li J, Wang J, Yang X, Liu J, Wang K. *Chem Sci*, 2018, 9: 7802–7808
120 Huang DJ, Cao T, Huang ZM, Wu Z, Tang LJ, Jiang JH. *Chem Commun*, 2019, 55: 3899–3902
121 Vascotto C, Fantini D, Romanello M, Cesaratto L, Deganuto M, Leonardi A, Radicella JP, Kelley MR, D'Ambrosio C, Scaloni A, Quadrifoglio F, Tell G. *Mol Cell Biol*, 2009, 29: 1834–1854
122 Tell G, Quadrifoglio F, Tiribelli C, Kelley MR. *Antioxidants Redox Signal*, 2009, 11: 601–619
123 Lv MM, Liu JW, Yu RQ, Jiang JH. *Chem Sci*, 2020, 11: 10361–10366
124 Yang XJ, Cui MR, Li XL, Chen HY, Xu JJ. *Chem Commun*, 2020, 56: 2135–2138
125 Wen ZB, Peng X, Yang ZZ, Zhuo Y, Chai YQ, Liang WB, Yuan R. *Chem Commun*, 2019, 55: 13414–13417
126 Zhang DY, Turberfield AJ, Yurke B, Winfree E. *Science*, 2007, 318: 1121–1125
127 Liang CP, Ma PQ, Liu H, Guo X, Yin BC, Ye BC. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 9077–9081
128 Ma PQ, Liang CP, Zhang HH, Yin BC, Ye BC. *Chem Sci*, 2018, 9: 3299–3304

Application of DNA walker in biosensing and living cell imaging

Liyan Zhang†, Xiaoting Liu†, Yayun Yang, Wei Jiang*

College of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250100
†These authors contributed equally to this work.
**Corresponding author (email: wjiang@sdu.edu.cn)*

Abstract: DNA walkers are a type of self-assembled nanodevices based on the specificity, predictability and programmability of DNA hybridization. The walking components can move autonomously and gradually along the predetermined track under specific external stimuli. These features of autonomous movement and repetitive stepping endow them with excellent signal amplification capability, making the DNA walker show a good application prospect in chemical measurement. This article systematically reviewed the research progress of the DNA walker in the fields of biosensing and living cell imaging.

Keywords: DNA nanomachine, DNA walker, self-assembly, biosensor, living cell imaging

doi: 10.1360/SSC-2021-0053