

# DNA 纳米技术在生物医学上的应用

路亚琼综述,王晴净审校

**【摘要】** 可与多学科交叉发展的纳米技术,对生命医学领域的应用具有重大价值。DNA 不仅是生命的密码,同时因其强大的编码能力和独特的理化性质,用作构建特定的 DNA 纳米结构和功能化的动态机器的基石。文章简单介绍了 DNA 纳米结构的发展,综述了 DNA 纳米技术在生物医学领域内检测诊断、载药治疗和医学仿生的应用,并对该学科的研究前景进行了展望。

**【关键词】** DNA 纳米技术; 检测; 治疗; 生物仿生

**【中图分类号】** R9 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2018)03-0281-04

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2018.03.014

## 0 引 言

纳米技术是在 1~100 nm 尺度范围内的结构材料的基础上,研究其性质和应用的技术。从 20 世纪 80 年代末逐步发展起来后,相继和物理学、化学、生物技术有机结合。纳米材料能够表现出与宏观物体相对独立的运动规律和特殊的理化性质,因此可以构建具有特定功能的纳米结构和器件来解决实际问题,在医学领域有诱人的应用前景。现介绍 DNA 纳米结构在生物医学领域上的三大应用,并对 DNA 纳米技术的未来进行展望。

## 1 DNA 纳米技术在医学上的应用

**1.1 DNA 纳米技术在医学检测方面的应用** DNA 纳米技术为发展单分子水平上的生物传感器提供了新的思路,可作为生物分子探针载体平台的空间可定位骨架。之前的临床研究表明多种新生物标记物(如 microRNA)的含量增加或减少可能导致多种疾病的发生,而且一种疾病往往与多个基因标记物有关。为实现超灵敏和个性化的疾病分子分析,新出现的 DNA 纳米材料为推动超灵敏生物检测领域的发展提供了新的应用方向。最早将 DNA origami 应用到生物检测领域中的是 Yan 课题组,他们将尺寸为 100 nm×70 nm 的矩形折纸作为生物芯片来辅助检测溶液中的 RNA 分子<sup>[1]</sup>。在折纸芯片

特定位置的 3 列订书钉链上伸出 20 个碱基长的寡核苷酸单链作为探针,分别可以和 3 种 microRNA 序列杂交,当和靶向 RNA 分子杂交后, DNA/RNA 双链成为带有位阻效应的 V 型结构,其硬度和高度的增加可通过 AFM 识别。Fan 实验室在“中国地图”折纸的折纸芯片上,将刚性的“V 型探针”改为更加简便的“线性探针”,成功实现了对特定靶向 DNA 的检测<sup>[2]</sup>。除了 DNA 折纸术构建的生物芯片外, DNA 四面体可以在自组装的四条 DNA 单链的顶点处伸出特定的寡核苷酸探针,实现对 DNA、RNA 的超灵敏检测<sup>[3-4]</sup>。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)是最常见的一种人类可遗传变异,同时可以作为疾病诊断的有效标记,所以对 SNP 的检测区分一直备受关注。基于 DNA 折纸平台,不仅可以实现 SNP 的区分,还能通过 AFM 进行可视化检测。Seeman 等<sup>[5]</sup>在矩形折纸芯片上,设计了可读出的包含有 A、T、C、G 4 个核苷酸字母的形状,当单核苷酸错配为 T 的靶向 DNA 存在时,无法和探针 T 完全互补,此时信号分子淬灭,该核苷酸形状 T 消失, AFM 图像可直接读出错配结果。相比之前在均相和界面上的检测方法,该平台可实现多个 SNP 位点的可视化读数<sup>[5]</sup>,在医疗诊断方面的应用性就可以大为加强<sup>[5]</sup>。

DNA 纳米结构尤其是 DNA 折纸可作为纳米尺度的“液晶显示屏”成为信号输出设备,在 AFM 的成像帮助下,实现基因缺损与异常等疾病的高灵敏检测和诊断。除此之外,还可偶联其他分子如纳米金、抗体、核酸适配体等实现对重金属离子、相应蛋白或酶以及配体的检测<sup>[6-7]</sup>。DNA 纳米结构因为其

作者单位:210005 南京,南京军区南京总医院抄纸巷门诊部(路亚琼、王晴净)

通信作者:王晴净, E-mail:932678144@qq.com

构型变化和某些金属离子有关,可以检测铅、镁、锌、汞等多种元素。Mirkin 等<sup>[8]</sup>将在 2 种纳米金颗粒上分别修饰一条互补 DNA 链,其含有 T-T 错配,当溶液中存在汞离子时,2 条 DNA 链可形成稳定的 T-Hg-T 结构而脱离纳米金,其表面失去 DNA 链的保护而聚集沉淀,实现对汞离子的检测。Elezgaray 实验室则利用矩形折纸芯片实现对钾离子的定量检测。在折纸芯片上排布并伸出可以和 G 四联体相连接的探针,当  $K^+$  浓度很富集时,其结构不变,减少钾离子浓度,则 G 四联体构象发生变化,打开为单链进而引发 DNA 杂交反应,根据荧光变化检测钾离子浓度的改变<sup>[9]</sup>。

**1.2 DNA 纳米技术在医学治疗方面的应用** DNA 具有优越的易修饰性,与许多基团如氨基、巯基、羧基、特异的小分子和各种荧光基团等相整合<sup>[10-11]</sup>;作为具有良好生物相容性的三大生物大分子之一,安全无毒副作用。DNA 纳米结构具有多样的编码能力和良好的可设计性,载带药物量大,在体内走向明确;具有良好的渗透性,可传送和定位传递信息,通过细胞表面配体的特异性可定位的在靶向位置缓释药物。这些都使得 DNA 纳米结构具有优越的生物医学应用<sup>[12-17]</sup>。

Fan 课题组利用滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)原理获得一条长单链且具有多个重复单元,以此代替噬菌体单链 M13mp18 作为脚手架链,订书钉链的数目降低为 3 条,即可折叠出 DNA 纳米带结构,合成方便且大大节约了实验成本。在 staple 链上携带免疫核酸 CpG 序列,进入细胞,细胞摄取能力更为高效,免疫活性较之含有 CpG 序列的单、双链 DNA 增幅很大<sup>[18]</sup>。Weizmann 课题组利用相似的设计自组装为 DNA 纳米带结构,载带小分子干扰 RNA 沉默特定基因,同时还可作为细胞中的 pH 报告器<sup>[19]</sup>。Ding 课题组发现 DNA 纳米结构具有增强的肿瘤被动靶向性和在肿瘤区域的长滞留效应,他们将抗癌药物阿霉素(doxorubicin)以嵌入的形式载带在三角形 DNA 折纸内,使其具有大剂量的药物载带和持久的缓慢释放性,展现了 DNA 折纸在药物载带方面突出的治疗功效<sup>[20-21]</sup>。

除了静态的 DNA 纳米结构可以在药物运输、靶向治疗上发挥传统方式难以匹敌的疗效外,可根据需要灵活设计开关状态的动态 DNA 纳米机器更适合于生物治疗领域。Yan 课题组设计了一个以核酸适配体为开关的六边形圆筒结构,当细胞表面的抗原存在时,可与核酸适配体发生高亲和作用结合,

将六边形折纸结构解锁打开,释放空腔内的载带物<sup>[22]</sup>。Church 课题组则设计了三棱的六棱桶状纳米结构,通过细胞膜表面上 2 个不同受体相对应的核酸适体的构象变化人为控制开关,当 DNA 六棱桶进入细胞后,当且仅当 2 个目标受体都存在时,六棱桶才能打开,通过此途径提高纳米结构的选择性,进行对靶标癌细胞的特异性识别,桶内载带的抗体缓释,从而抑制癌细胞的生长<sup>[23]</sup>。DNA 纳米结构载体具有良好的体内稳定性和较强的肿瘤靶向性,在医学治疗中具有广阔的应用前景。

**1.3 DNA 纳米技术在医学仿生方面的应用** 人类的生物系统是复杂且精密的,为了对它的运转方式有更好的了解,科研工作者利用 DNA 纳米技术构造生物仿生系统。首先从较基础的生物分子机器开始构建。DNA 和蛋白质的关系水乳交融,连接方式多种多样,如特殊的 DNA 序列可以识别锌指蛋白并连接<sup>[24]</sup>;修饰有 Ni-NTA 的 DNA 分子可以与带有组氨酸标签的蛋白相结合连接<sup>[25]</sup>;修饰有生物素的 DNA 可以和链霉亲和素通过抗体作用相连接<sup>[26]</sup>;DNA 和多肽可通过 EDC/NHS 反应相连接等<sup>[27]</sup>。其中,生物素和链霉亲和素因其高亲和力的牢固结合而被广泛应用开发。Yan 等<sup>[28]</sup>在 DNA 二维网格结构上设计了若干条修饰有生物素的 DNA 链,实现了链霉亲和素蛋白阵列。Kuzyk 课题组在矩形 DNA 折纸上,排布链霉亲和素的图形<sup>[34]</sup>。核酸适配体(apptamer)和蛋白相互作用中的距离效应也是构建生物仿生系统的研究范围。Yan 课题组将分别和凝血酶 2 个区域结合的 apt-A 和 apt-B 作为研究对象,利用 DNA 纳米结构的可寻址性精确的控制两者之间的间距,进而操纵其与凝血酶相结合的能力<sup>[29]</sup>。这篇报道是基于 DNA 纳米结构来人工模拟并控制生物大分子相互作用的首例。

Turberfield 课题组设计了具有空腔的 DNA 纳米笼,在特定位置的 DNA 链上修饰 tris-NTA,将带有组氨酸标签(His-tag)的蛋白锚定于其上,并与冷冻电子显微镜技术相结合获得目标蛋白质分子的高分辨率图像并解析结构,为生物结构学家梦寐以求的研究提供了新的思路<sup>[30]</sup>。Fan 课题组利用 DNA 纳米技术人工模拟了生物体内常见的双酶体系。在矩形 DNA 折纸上组装葡萄糖氧化酶与辣根过氧化物酶,在折纸上控制两个酶之间的距离,并观察酶联反应的变化,发现两者之间呈反比;之后将矩形折纸的上下两端封闭得到 DNA 纳米圆筒并作为双酶级联生物反应器,与矩形折纸相比,同样

距离下酶联级促的反应活性更高,猜测是“三维领域空间”效应导致<sup>[31]</sup>。自然界中存在微管上向负端“行走”的动力蛋白和向正端“行走”的驱动蛋白(Kinesin-1)来运输细胞内的“货物”,Peterson 课题组构建了三维的螺旋管结构作为它们运输的“货物”,通过控制这 2 种马达蛋白的极性、数目、位置来研究它们的运输特征<sup>[32]</sup>。

研究膜结构和动力学的必须工具是人工脂质双分子层,合成理化性质稳定,尺寸可控的脂质囊泡具有很大的意义,可用于膜蛋白解析,药物递送等过程,应用广泛。Shih 课题组设计尺寸不一的三维 DNA 纳米环形结构作为脂质体生长的模版,合成直径 < 100 nm 且形貌均一的立体囊泡结构<sup>[33]</sup>。Sugiyama 课题组将人工磷脂双分子层作为可变化的基底,在其上铺上十字形状的 DNA 折纸来辅助构建晶格状大分子<sup>[34]</sup>。

生物体的磷脂双分子层中的纳米孔通道从本质上来说是一种离子通道,这种跨膜通道可以调控离子或其他小生物分子的运输,利用 DNA 纳米技术来构建纳米孔材料是医学仿生领域内有价值的内容。Simmel 课题组构建了一端为杆状一端为桶形“盖子”的结构,主干杆状结构可嵌入磷脂双分子层,盖状结构将主干固定于膜上不动。通过单通道电生理学实验设备,对这种复合型纳米孔通道进行电导表征,发现它们与生命中天然存在的通道相似;当 DNA 链穿过通道时,每种核酸分子的电信号特征都不相同,可鉴定不同的 DNA 分子<sup>[35]</sup>。除此之外,DNA 纳米结构孔结构也模拟生物仿生系统检测各种生物分子<sup>[36-43]</sup>。

DNA 纳米结构可以模拟酶联级促反应器和纳米孔通道外,还可与病毒衣壳相结合进入细胞以增强细胞传送力,构建宏观材料水凝胶作为三维细胞培养的网关等多种用途。

## 2 展 望

在多学科相互联系交叉发展的 21 世纪,DNA 纳米技术因其具有寻址性的结构信息,强大的分子载带量和良好的生物兼容性站在了发展的前沿。DNA 纳米结构从简单的几条 DNA 链自组装的 tile 结构发展到立体复杂的 DNA 折纸图案,从间接的凝胶表征到可视化的照片显示,从静态的图形图案到动态的分子机器,DNA 纳米结构越来越复杂,元件越来越精细。

DNA 纳米技术的快速发展,带来了在生物、化

学、医学等领域巨大的应用潜力,在生物学上的研究方向是向智能化进行的,由于精确的可定制性,DNA 纳米结构,可对各种病原微生物、肿瘤标志物、基因变异等各种疾病的相关指标进行早期诊断和灵敏度高的检测,先进的诊断方式至关重要;研究并制备载带有特异性药物的纳米结构载体,在靶向部位定时定量的缓释药物,以解决癌症的可转移性或治疗其他重大疾病;将纳米机器努力做得像天然生命系统一样,按照人类的指令精确可控地完成各种任务和研究,这是其他技术在医学仿生领域所不具备的优势。

虽然 DNA 纳米技术发展很快,但仍处于发展的初期阶段,面临诸多挑战,如 DNA 合成的高成本、更高级结构的设计、体内的安全性评估、细胞的摄取效率等。相信随着科学的发展,DNA 纳米技术从实验室走向临床实践的道路艰辛却光明。

## [参考文献]

- [1] Ke Y, Lindsay S, Chang Y, *et al.* Self-Assembled Water-Soluble Nucleic Acid Probe Tiles for Label-Free RNA Hybridization Assays [J]. *Science*, 2008, 319(5860): 180.
- [2] Zhang Z, Wang Y, Fan C, *et al.* Asymmetric DNA Origami for Spatially Addressable and Index-Free Solution-Phase DNA Chips [J]. *Adv Mater*, 2010, 22(24): 2672-2675.
- [3] Pei H, Lu N, Wen Y, *et al.* A DNA Nanostructure-based Biomolecular Probe Carrier Platform for Electrochemical Biosensing [J]. *Adv Mater*, 2010, 22(42): 4754-4758.
- [4] Pei H, Wan Y, Li J, *et al.* Regenerable electrochemical immunological sensing at DNA nanostructure-decorated gold surfaces [J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(22): 6254-6256.
- [5] Subramanian HKK, Chakraborty B, Sha R, *et al.* The Label-Free Unambiguous Detection and Symbolic Display of Single Nucleotide Polymorphisms on DNA Origami [J]. *Nano Letters*, 2011, 11(2): 910.
- [6] Niemeyer CM, Wacker R, Adler M. Combination of DNA-directed immobilization and immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of self-assembled DNA-protein conjugates [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(16): 90.
- [7] Song S, Wang L, Li J, *et al.* Aptamer-based biosensors [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27(2): 108-117.
- [8] BingLeng, LeiZou, Mirkin CA, *et al.* Colorimetric Detection of Mercuric Ion (Hg<sup>2+</sup>) in Aqueous Media using DNA-Functionalized Gold Nanoparticles [J]. *Angewandte Chemie*, 2007, 119(22): 4171-4174.
- [9] Mendoza O, Mergny JL, Aimé JP, *et al.* G-quadruplexes light up localized DNA circuits [J]. *Nano Letters*, 2015, 16(1).
- [10] Saccà B, Meyer R, Erkelenz M, *et al.* Orthogonal protein decoration of DNA origami [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49(22): 3211-3218.
- [11] Jungmann R, Steinhilber C, Scheible M, *et al.* Single-molecule



- kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami [J]. *Nano Letters*, 2010, 10 (11): 4756-4761.
- [12] Zhang K, Hao L, Hurst SJ, *et al.* Antibody-linked spherical nucleic acids for cellular targeting [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(40): 16488-16491.
- [13] Li J, Pei H, Zhu B, *et al.* Self-Assembled Multivalent DNA Nanostructures for Noninvasive Intracellular Delivery of Immunostimulatory CpG Oligonucleotides [J]. *Acs Nano*, 2011, 5 (11): 8783.
- [14] Hintersteiner M, Auer M. Single-bead, single-molecule, single-cell fluorescence: technologies for drug screening and target validation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1130(1): 1-11.
- [15] Lee H, Lytton-Jean AK, Chen Y, *et al.* Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery [J]. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7(6): 389-393.
- [16] Zhang Q, Jiang Q, Li N, *et al.* DNA origami as an in vivo drug delivery vehicle for cancer therapy [J]. *Acs Nano*, 2014, 8 (7): 6633.
- [17] Schüller VJ, Heidegger S, Sandholzer N, *et al.* Cellular Immunostimulation by CpG-Sequence-Coated DNA Origami Structures [J]. *Acs Nano* 2011, 5(12): 9696-9702.
- [18] Liu B, Ouyang X, Chao J, *et al.* Self-assembly of DNA Origami Using Rolling Circle Amplification Based DNA Nanoribbons [J]. *Chin Jo Chem*, 2014, 32(2): 137-141.
- [19] Chen G, Liu D, He C, *et al.* Enzymatic synthesis of periodic DNA nanoribbons for intracellular pH sensing and gene silencing [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(11): 3844.
- [20] Zhuang X, Ma X, Xue X, *et al.* A Photosensitizer-Loaded DNA Origami Nanosystem for Photodynamic Therapy [J]. *Acs Nano*, 2016, 10(3): 3486.
- [21] Jiang Q, Song C, Nangreave J, *et al.* DNA origami as a carrier for circumvention of drug resistance [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(32): 13396.
- [22] Fu J, Yan H. Controlled drug release by a nanorobot [J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 407.
- [23] Douglas SM, Church GM. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads [J]. *Science*, 2012, 335(6070): pags. 831-834.
- [24] Nakata E, Liew FF, Uwatoko C, *et al.* Zinc-finger proteins for site-specific protein positioning on DNA-origami structures [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51 (10): 2421-2424.
- [25] Shen W, Zhong H, Neff D, *et al.* NTA directed protein nanopatterning on DNA Origami nanoconstructs [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(19): 6660-6661.
- [26] Kuzuya A, Kimura M, Numajiri K, *et al.* Precisely programmed and robust 2D streptavidin nanoarrays by using periodical nanometer-scale wells embedded in DNA origami assembly [J]. *Chembiotech*, 2009, 10(11): 1811-1815.
- [27] Rinker S, Ke Y, Liu Y, *et al.* Self-assembled DNA nanostructures for distance-dependent multivalent ligand-protein binding [J]. *Nature Nanotechnology*, 2008, 3 (7): 418-422.
- [28] Yan H, Park SH, Finkelstein G, *et al.* DNA-Templated Self-Assembly of Protein Arrays and Highly Conductive Nanowires [J]. *Science*, 2003, 301(5641): 1882.
- [29] Rinker S, Ke Y, Liu Y, *et al.* Self-assembled DNA nanostructures for distance-dependent multivalent ligand-protein binding [J]. *Nat Nanotechnol*, 2008, 3(7): 418-422.
- [30] Selmi DN, Adamson RJ, Attrill H, *et al.* DNA-Templated Protein Arrays for Single-Molecule Imaging [J]. *Nano Letters*, 2011, 11 (2): 657.
- [31] Fu Y, Zeng D, Chao J, *et al.* Single-Step Rapid Assembly of DNA Origami Nanostructures for Addressable Nanoscale Bioreactors [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135 (2): 696.
- [32] Derr ND, Goodman BS, Jungmann R, *et al.* Tug-of-war in motor protein ensembles revealed with a programmable DNA origami scaffold [J]. *Science*, 2012, 338(6107): 662.
- [33] Yang Y, Wang J, Hideki S, *et al.* Self-assembly of size-controlled liposomes on DNA nanotemplates [J]. *Nat Chem*, 2016, 8(5): 476.
- [34] Suzuki Y, Endo M, Sugiyama H. Lipid-bilayer-assisted two-dimensional self-assembly of DNA origami nanostructures [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8052.
- [35] Langecker M, Arnaut V, Martin TG, *et al.* Synthetic lipid membrane channels formed by designed DNA nanostructures [J]. *Science*, 2012, 338(6109): 932-936.
- [36] Kerstin G, Li CY, Maria R, *et al.* Large-Conductance Transmembrane Porin Made from DNA Origami [J]. *Acs Nano*, 2016, 10(9): 8207-8214.
- [37] Hernándezainsa S, Keyser UF. DNA origami nanopores: an emerging tool in biomedicine [J]. *Nanomedicine*, 2016, 8(10): 1551-1554.
- [38] Hernándezainsa S, Bell NA, Thacker VV, *et al.* DNA origami nanopores for controlling DNA translocation [J]. *Acs Nano*, 2013, 7(7): 6024-6030.
- [39] Bell NA, Engst CR, Ablay M, *et al.* DNA origami nanopores [J]. *Nano Letters*, 2013, 12(1): 512-517.
- [40] Wei R, Martin TG, Rant U, *et al.* DNA origami gatekeepers for solid-state nanopores [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51 (20): 4864.
- [41] Burns JR, Stulz E, Howorka S. Self-Assembled DNA Nanopores That Span Lipid Bilayers [J]. *Nano Letters*, 2013, 13 (6): 2351.
- [42] Hernándezainsa S, Misiunas K, Thacker VV, *et al.* Voltage-dependent properties of DNA origami nanopores [J]. *Nano Letters*, 2014, 14(3): 1270-1274.
- [43] Hou X, Guo W, Jiang L. Biomimetic smart nanopores and nanochannels [J]. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(5): 2385-2401.

(收稿日期:2017-08-23; 修回日期:2017-10-24)

(责任编辑:左琦)