

# 核酸功能化纳米探针在细胞荧光成像中的应用

郑爱仙, 张晓龙, 刘小龙\*

(福建省孟超肝胆技术联合创新重点实验室, 福建医科大学 孟超肝胆医院, 福建 福州 350025)

**摘要:**核酸是携带遗传信息的物质,既存在于自然界中也能够通过成熟技术人工合成。通过体外筛选技术还可以筛选出具有特殊功能的核酸序列,例如核酸适体和脱氧核酶。核酸通过沃森-克里克碱基互补配对原则进行杂交,具有很强的专一性。无论是通过序列设计还是体外筛选,核酸探针在生物标志物的分析与成像应用方面都发挥着重要作用。纳米材料辅助构建核酸功能化纳米探针,可以保护负载的核酸探针不被核酸酶降解,并且无需转染试剂就能进入细胞,在细胞荧光成像应用上具有很大优势。为解决细胞内有些生物标志物含量低、难于检测的问题,目前已构建多种适用于细胞水平的成像信号放大方法来实现对低丰度生物标志物的高灵敏成像。本文主要综述了核酸功能化纳米探针在细胞荧光成像中的应用进展,包括反义寡核苷酸功能化纳米探针、核酸适体功能化纳米探针、脱氧核酶功能化纳米探针等,同时介绍了他们在成像信号放大中的应用。

**关键词:**核酸; 纳米探针; 反义寡核苷酸; 核酸适体; 脱氧核酶; 荧光成像

**中图分类号:** O657    **文献标识码:** A    **doi:** 10.3788/CO.20181103.0363

## Application in nucleic acid functionalized nanoprobe in cellular fluorescence imaging

ZHENG Ai-xian, ZHANG Xiao-long, LIU Xiao-long\*

(The United Innovation of Mengchao Hepatobiliary Technology Key  
Laboratory of Fujian Province, Mengchao Hepatobiliary Hospital of  
Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China)

\* Corresponding author, E-mail: xiaoloong.liu@gmail.com

**Abstract:** Nucleic acid is a substance that carries genetic information. It exists either in nature or can be synthesized by established techniques. Nucleic acid sequences with special functions, such as aptamers and DNazymes, can also be selected using in vitro techniques. Nucleic acids hybridize according to the principle of Watson-Crick base pairing, and have strong specificity. Whether through sequence design or in vitro screening, nucleic acid probes play an important role in the analysis and imaging applications of biomarkers. In addition, nanomaterials can be used to construct nucleic acid functionalized nanoprobes, which can protect the loaded nucleic acids from being degraded by nucleases and can enter cells without the aid of the transfection reagents. Therefore, nanomaterials have great advantages in the application of cell fluorescence imaging. In order to solve the problem of low intracellular biomarker content and thus difficult to detect, a variety of ima-

收稿日期: 2018-01-26; 修订日期: 2018-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 21705022, No. 21605021, No. 61575044)

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 21705022, No. 21605021, No. 61575044)

ging signal amplification methods suitable for the cellular level have been developed to achieve highly sensitive imaging of low-abundance biomarkers. In this paper, the application of nucleic acid functionalized nanoprobe in cellular fluorescence imaging, including antisense oligonucleotide functionalized nanoprobe, aptamer functionalized nanoprobe and DNAzyme functionalized nanoprobe and that in imaging signal amplification are reviewed.

**Key words:** nucleic acid; nanoprobe; antisense oligonucleotide; aptamer; DNAzyme; fluorescence imaging

## 1 引言

核酸是携带遗传信息的物质,可分为脱氧核糖核酸(DNA)与核糖核酸(RNA)。DNA是遗传信息储存、复制和传递的重要基础, RNA则在蛋白质合成过程中起着非常重要的作用。DNA能够通过沃森-克里克碱基互补配对原则进行杂交,两条DNA反向平行绕成双螺旋结构。碱基互补配对具有专一性,碱基A与T配对形成两个氢键,碱基G与C配对形成3个氢键。DNA与RNA也可以通过碱基互补配对原则进行杂交,只是RNA中的U取代了T,与A进行碱基配对。核酸既是自然界中广泛存在的物质,也能够通过成熟的人工技术合成。由于碱基互补配对的专一性,完全互补的两条核酸链能够进行稳定杂交,碱基错配的两条核酸链进行杂交时,其稳定性明显降低。核酸的这种特征使其能够用于构建各种核酸探针,从而实现疾病相关核酸分子的生物分析与成像研究。

此外,通过体外筛选技术还可以筛选出具有特殊功能的核酸序列,例如核酸适体和脱氧核酶。核酸适体能够与蛋白质、小分子、金属离子、甚至细胞等目标物质进行高亲和性和高特异性的结合。脱氧核酶能够催化各种化学与生物反应,包括切割核酸底物、催化连接核酸等。这些功能性的核酸在生化分析与临床诊断中发挥着重要作用<sup>[1-5]</sup>。近年来研究发现,核酸分子也存在一些缺点,例如生理条件下稳定性较低、容易被核酸酶降解、细胞膜通透性较差等。

纳米材料是指至少有一维尺寸处于纳米级别(0.1~100 nm)或者以它们为基本原件构成的材料。在纳米尺寸下,材料具有一些独特的性质,如表面效应、体积效应、量子尺寸效应、介电限域效

应、量子隧道效应等。随着近年来纳米技术的飞快发展,纳米材料已被广泛应用于生物标志物检测、药物筛选与输送、临床诊断与治疗等方面。氧化石墨烯、金纳米颗粒、碳纳米管等纳米材料对荧光染料具有很好的淬灭作用,金属纳米簇、无机量子点、碳量子点等纳米材料具有独特的荧光性质,可用于辅助构建荧光成像探针,从而进行生物检测与成像分析。核酸探针与纳米材料相结合可实现细胞内相关生物标志物的可视化荧光成像分析,把核酸探针的特异性识别事件转换成可观察的荧光信号。而且,纳米材料能够保护负载的核酸探针不被核酸酶降解,并且无需转染试剂就能运载核酸探针进入细胞,在细胞荧光成像应用上具有很大优势<sup>[6-9]</sup>。

本文主要讨论核酸功能化纳米探针在细胞荧光成像方面的应用,包括反义寡核苷酸功能化纳米探针、核酸适体功能化纳米探针和脱氧核酶功能化纳米探针。其它一些核酸功能化纳米探针也可以用于细胞荧光成像分析。例如,利用端粒酶引物构建核酸纳米探针,实现癌细胞内端粒酶的特异性荧光成像;利用纳米材料负载质粒,通过基因表达荧光蛋白来实现细胞成像。本综述主要讨论反义寡核苷酸功能化纳米探针、核酸适体功能化纳米探针以及脱氧核酶功能化纳米探针在细胞荧光成像应用方面的研究进展。

## 2 核酸探针的设计原理

分子信标<sup>[10]</sup>是比较经典的一种核酸探针,由能够绕成茎-环结构的核酸序列组成,末端分别标记荧光基团和淬灭基团。两种基团互相靠近,发生荧光共振能量转移(FRET)使得荧光基团的荧光被淬灭。当目标核酸与环部序列互补使得两种基团分隔开时,荧光基团的荧光得到恢复,其作用

原理见图1(a)。除了分子信标,核酸序列还可以用于构建其他基于染料荧光淬灭与恢复的线型核酸探针。如图1(b)所示,当目标核酸不存在时,分别修饰有荧光基团和淬灭基团的两条核酸链互相靠近,荧光基团的荧光被淬灭。当目标核酸存在时,它能够取代修饰有荧光基团或淬灭基团的核酸链,使得荧光基团和淬灭基团分开,体系的荧光得到恢复。对于核酸探针,荧光恢复程度与目标核酸的含量相关,可实现对目标核酸的特异性信号响应。

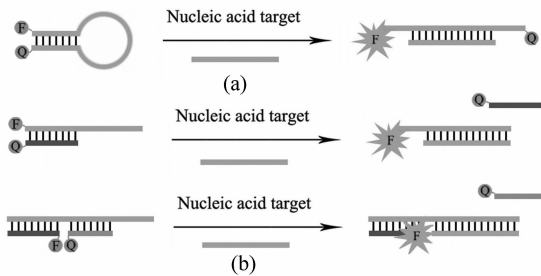


图1 (a)分子信标响应原理;(b)线型核酸探针响应原理

Fig. 1 (a) Response principle of molecular beacons; (b) Response principle of linear nucleic acid probe

基于淬灭基团构建的核酸探针,其荧光基团的荧光往往不能被完全淬灭,使得信噪比和灵敏度受到一定限制。为提高荧光淬灭效率,从而提高核酸探针应用的灵敏度,金纳米颗粒、氧化石墨烯、碳纳米管、聚多巴胺纳米颗粒等纳米材料可以取代原先的淬灭基团,用于构建核酸探针<sup>[11-13]</sup>。荧光染料标记的核酸探针可以通过共价修饰或者非共价作用修饰于纳米材料表面,此时染料的荧光被淬灭。当目标分子存在时,核酸探针与目标分子结合并从纳米材料表面脱落,染料的荧光得到恢复。此外,无机量子点、金属纳米簇、碳量子点等荧光纳米材料也可以代替常规的荧光染料分子来构建荧光核酸探针<sup>[14-15]</sup>。这些纳米荧光材料具有光化学稳定性高、抗光漂白能力强、荧光寿命长等优点。

荧光染料标记的核酸探针,包括基于FRET的线型核酸探针、分子信标等,可用于细胞内核酸的可视化荧光成像研究,把核酸探针的特异性识别事件转换成可观察的荧光信号<sup>[16]</sup>。但是,把核

酸探针传输到细胞内面临着较大挑战,一般需要脂质体等转染试剂的辅助。而且核酸探针在细胞内容易降解从而导致高的背景信号,使其不能与核酸识别事件区分开来。近年来核酸与纳米材料相互作用的研究为核酸探针的荧光成像应用提供了新的机会。纳米材料与核酸探针相结合,可以保护负载的核酸探针不被核酸酶降解,并且无需转染试剂就能进入细胞,在细胞荧光成像应用上具有很大优势。

### 3 反义寡核苷酸功能化纳米探针

天然的反义寡核苷酸是一类序列较短的能够与基因DNA正义链或信使RNA(mRNA)等核酸通过沃森-克里克碱基互补配对原则进行特异性结合的多聚寡核苷酸,能够通过不同机制影响基因表达。反义寡核苷酸也可以通过人工合成得到,包括反义RNA和反义DNA。反义寡核苷酸也可以参与构建核酸纳米探针,从而实现细胞内mRNA、小分子RNA(microRNA/miRNA)等核酸分子的生物分析与成像研究<sup>[17]</sup>。

例如,Mirkin课题组利用纳米金独特的光学性质构建了核酸功能化纳米探针,实现细胞内生存素相关mRNA的可视化成像分析(如图2(a)所示)。核酸探针包含能够特异性识别生存素相关mRNA的反义寡核苷酸,通过金-硫键共价修饰于纳米金表面。纳米金对荧光染料分子具有很高的荧光淬灭效率,可以淬灭核酸探针上标记的荧光染料的荧光,使得整个纳米探针处于荧光淬灭状态。目标mRNA存在时,会与核酸探针上的反义寡核苷酸作用,使得修饰有荧光染料的核酸探针离开纳米金表面,荧光得到恢复,通过共聚焦荧光显微镜可以观察到明显的荧光信号<sup>[18]</sup>。这种核酸功能化纳米探针无需转染试剂就能被细胞摄取,并且能够保护核酸探针使其不受核酸酶降解。与单纯的核酸探针相比,核酸纳米探针的非特异性荧光信号也会小很多,更适合用于细胞内核酸的可视化成像分析。

此外,氧化石墨烯、碳纳米管、聚多巴胺纳米颗粒等纳米材料 also 具有很高的荧光淬灭能力,可用于构建核酸功能化纳米探针,从而实现细胞内

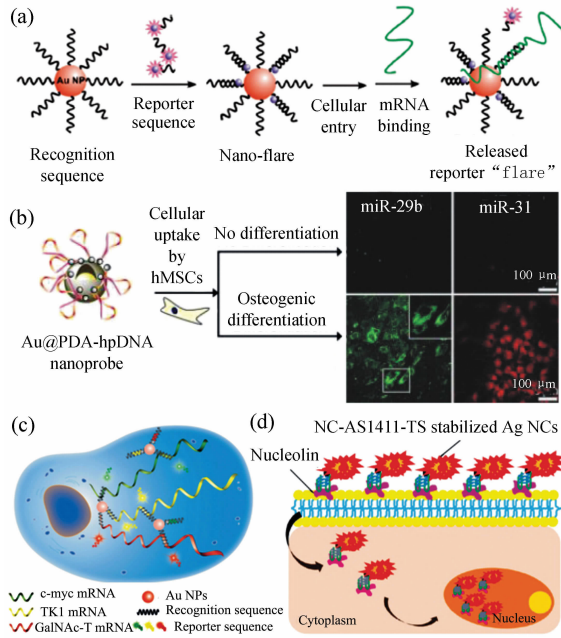


图 2 (a) 纳米金辅助构建的核酸纳米探针用于细胞内 mRNA 成像<sup>[18]</sup>; (b) 聚多巴胺辅助构建的核酸纳米探针用于成像细胞分化相关的 miRNA<sup>[19]</sup>; (c) 多色核酸纳米探针用于活细胞内肿瘤相关 mRNA 成像<sup>[20]</sup>; (d) 核酸作为模板合成具有荧光性质的金纳米簇并用于细胞成像<sup>[21]</sup>

Fig. 2 (a) AuNPs-based nucleic acid nanoprobe for application in intracellular mRNA imaging<sup>[18]</sup>; (b) polydopamine-based nucleic acid nanoprobe for the imaging of miRNAs in living human mesenchymal stem cells<sup>[19]</sup>; (c) a multicolor nanoprobe for imaging of tumor-related mRNAs in living cells<sup>[20]</sup>; (d) nucleic acid based template for the synthesis of fluorescent gold nanoclusters and their application in cell imaging<sup>[21]</sup>

目标核酸的荧光成像分析(如图 2(b)所示)。荧光染料标记的单链核酸探针可以通过静电作用或者  $\pi$ - $\pi$  堆积作用吸附于这些纳米材料表面,使得染料荧光处于淬灭状态。当目标核酸存在时,染料标记的单链核酸能够与目标核酸相互作用,使其与纳米材料的作用减弱并从纳米材料表面脱落下来,体系荧光得到恢复。这种荧光增强型的核酸探针响应机制也适用于细胞内核酸的荧光成像分析<sup>[19]</sup>。

值得一提的是,纳米材料对多种荧光染料都

具有很强的荧光淬灭能力。所以,纳米材料能够同时修饰不同染料标记的核酸探针,从而实现同时对多种目标分子的同时荧光成像分析。例如, Tang 课题组利用纳米金辅助构建一种可用于三通道荧光成像的核酸纳米探针(如图 2(c)所示)。修饰于纳米金表面的 3 种核酸探针分别修饰罗丹明染料 Rh110、花菁染料 Cy3 和 Cy5,能够识别不同目标核酸。由于染料分子靠近纳米金表面,其荧光都处于淬灭状态。只有当核酸探针对应的目标分子存在时,其修饰的染料分子的荧光才会恢复。该工作可实现细胞内 c-myc mRNA、TK1 mRNA 和 GalNAc-T mRNA 等肿瘤相关 mRNA 的同时成像分析<sup>[20]</sup>。

此外,无机量子点、金属纳米簇、碳量子点等荧光纳米材料具有独特的光学性质,也可以代替常规的荧光染料分子来构建荧光成像探针。例如,核酸功能化的碲化镉量子点(CdTe QDs)可以通过核酸连接到金纳米颗粒表面,由于两者间的 FRET 作用,量子点的荧光处于淬灭状态。当目标核酸存在时,通过核酸杂交使得量子点远离金纳米颗粒,其荧光恢复<sup>[22]</sup>。该类型的核酸纳米探针也可以用于细胞内目标物质的成像分析。特殊核酸序列也可以直接作为模板合成具有荧光性质的纳米材料,核酸序列设计比较灵活,还可以在其末端添加具有其他功能的核酸序列。例如, Zhu 课题组利用富含胞嘧啶的核酸序列作为模板合成具有荧光性质的银簇(如图 2(d)所示),并且在模板序列的末端添加核酸适体序列,从而实现特定细胞类型的荧光成像分析<sup>[21]</sup>。

总的来说,利用纳米材料辅助构建核酸纳米探针能够提高核酸探针传输进细胞的能力、能够抵抗细胞内核酸酶的降解、能够降低成像背景等,在细胞内特定核酸荧光成像方面已有广泛研究。但是,基于单一荧光强度检测的成像方法容易受到探针局部分布以及光源和检测器漂移等的影响。而且热力学平衡、核酸酶降解、蛋白质结合、谷胱甘肽竞争结合等过程会使单染料标记的核酸探针从纳米材料表面脱落,产生假阳性信号,从而降低成像灵敏度<sup>[23]</sup>。

为实现细胞内目标核酸的高特异性成像分析并解决现有核酸探针存在的容易产生假阳性的问

题, Wang 课题组构建了一种新型的修饰两种荧光基团的核酸纳米探针, 通过 FRET 原理实现活细胞内特定 mRNA 的比率荧光成像<sup>[23]</sup>。如图 3 所示, 纳米金修饰一条核酸识别链, 与另一条末端分别修饰供体(羟基荧光素, FAM)和受体(羧基四甲基罗丹明, TAMRA)的发夹型核酸探针杂交。当目标核酸不存在时, 发夹型核酸探针的发夹结构被打开, 其末端修饰的供体与受体处于分离状态, 导致 FRET 效率比较低, 只有供体的荧光能够被检测到。当目标核酸存在时, 发夹型核酸探针能够逐渐被目标核酸替换, 并从识别链上分离出来从而形成发夹结构。此时, 供体与受体离得很近, 能够产生高效的 FRET, 使得受体的荧光能够被检测到。FRET 比率荧光成像就是同时记录供体和受体的荧光发射强度, 通过两种波长处的荧光强度的比率变化实现对目标分析物的精确分析。因此, 通过计算受体与供体的荧光强度比率变化可实现对目标核酸的定量分析。

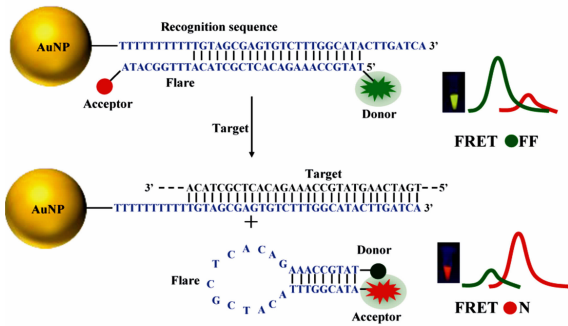


图3 基于 FRET 的纳米探针用于细胞内 mRNA 检测;降低假阳性信号并使系统波动影响最小化<sup>[23]</sup>

Fig. 3 FRET nanoprobes for intracellular mRNA detection; avoiding false positive signals and minimizing effects of system fluctuations<sup>[23]</sup>

传统的核酸探针一般是基于一对一的信号响应机制进行设计, 单个目标分析物只能活化单个探针来产生信号。虽然这些核酸探针能够用于分析高丰度的目标分析物, 但是在直接成像活细胞内低丰度目标分析物时仍面临挑战, 因为其相对低的灵敏度和不充足的信噪比。为实现活细胞内低丰度目标核酸的分析检测, 构建的核酸探针要对目标分析物具有特异性响应功能, 并且要具有

较高的响应灵敏度。虽然已有许多生物酶辅助信号放大的分析方法可用于细胞外或固定细胞中核酸的分析检测, 但这类方法大多不适合直接用于活细胞内目标核酸的成像分析。为提高成像灵敏度, 已有研究者把核酸纳米探针与一些基于脱氧核酶或者基于核酸之间自组装的信号放大方法相结合来实现成像信号放大<sup>[24-25]</sup>。

例如, Ma 课题组构建了一种基于纳米材料组装的成像探针, 用于活细胞内癌症相关 miRNA 的信号放大成像(如图 4(a)所示)。该成像探针包含纳米金以及通过 DNA 连接到纳米金表面的量子点, 由于纳米金的荧光淬灭作用, 量子点的荧光

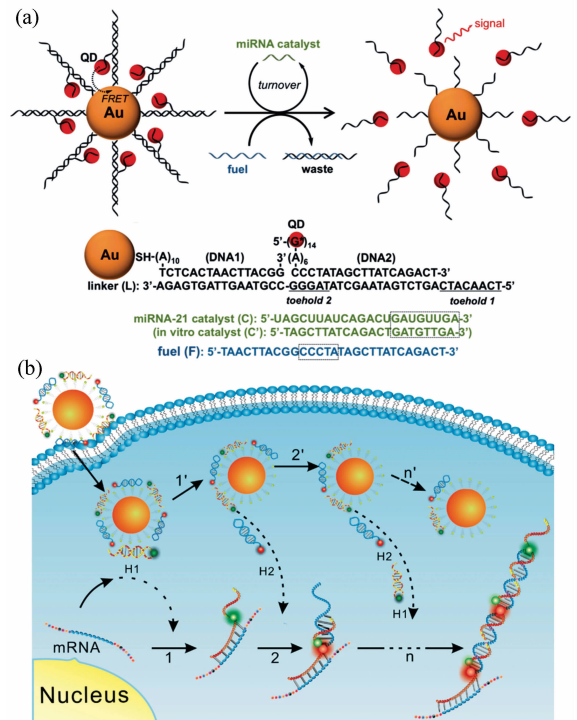


图4 (a)核酸纳米探针用于活细胞内 miRNA 的催化性分子成像<sup>[22]</sup>; (b)细胞内杂交链反应用于放大检测 mRNA<sup>[26]</sup>

Fig. 4 (a) Catalytic molecular imaging of miRNA in living cells by nucleic acid nanoprobe<sup>[22]</sup>; (b) intracellular hybridization chain reaction for the amplification detection of mRNA<sup>[26]</sup>

被淬灭。当目标 miRNA 存在时, 单个 miRNA 分子能够在染料 DNA 链的辅助下催化解组装多个量子点, 获得显著放大的量子点光致发光信号从而实现目标 miRNA 的成像分析。这个过程主

要是基于热力学驱动熵增加过程。与传统的成像探针不同,目标 miRNA 能够作为催化剂重复打开 DNA 连接链,获得较高的成像灵敏度。与传统的成像探针相比,这种具有信号放大效果的核酸纳米探针可以提高 3 个数量级的成像灵敏度,通过活细胞中 miRNA 的成像分析可以温和准确地区分癌细胞和正常细胞<sup>[22]</sup>。

除了基于熵驱动催化的成像信号放大方法,还有基于杂交链反应(HCR)、催化性发夹组装等核酸自组装的成像信号放大方法。HCR 是研究比较多的一种成像信号放大方法,通过目标分子引发两种发夹核酸探针进行交替杂交反应并形成一长串带缺口的双链 DNA 结构,由此诱导产生检测信号<sup>[27]</sup>。例如, Jiang 课题组构建了一种基于静电作用的 DNA 组装体,通过 HCR 实现活细胞内 mRNA 的超灵敏成像(如图 4(b)所示)。DNA 组装体包含纳米金核、阳离子多肽夹层、以及通过静电组装的染料分子标记的发夹型 DNA 外层。发夹型 DNA 有两种,分别标记荧光供体(FAM)和荧光受体(TMR)。纳米金核不仅能够作为模板用于阳离子多肽的自组装,也能够淬灭核酸探针上标记的荧光染料的荧光。该纳米组装体能够高效传输进入细胞,而且表面静电吸附的发夹型 DNA 能够由目标 mRNA 引发,通过 HCR 由纳米组装体中脱离出来。同时,两种发夹 DNA 的交替杂交使得荧光供体和受体互相靠近,基于 FRET 的信号被活化。由于一个目标 mRNA 就能催化多个发夹 DNA 进行交替杂交并且活化多份荧光信号,所以该方法能够实现活细胞内 mRNA 的超灵敏荧光成像。该方法检测限可达到皮摩尔水平<sup>[26]</sup>。此外,脱氧核酶也能够用于辅助荧光成像信号放大,这部分将在脱氧核酶功能化纳米探针部分进行介绍。

#### 4 核酸适体功能化纳米探针

核酸适体是由指数富集的配基系统进化技术(SELEX)从随机序列库中筛选出来的一条能够与目标分子高特异性结合的单链 DNA 或 RNA 分子<sup>[28-30]</sup>,其筛选过程如图 5 所示。核酸适体能够折叠成特殊的二级或三级结构从而识别目标分

子,其目标分子可以是金属离子、小分子、蛋白质、甚至是整个细胞。与常用的识别元件抗体相比,核酸适体具有诸多优点,包括尺寸小、变性可逆、容易修饰、热稳定性好、无免疫原性等。

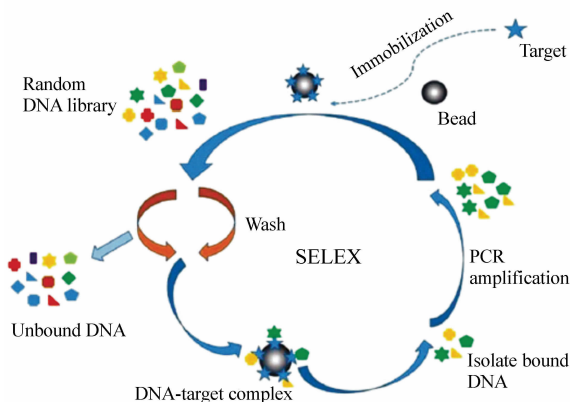


图 5 核酸适体筛选过程<sup>[28]</sup>

Fig. 5 Schematic presentation of aptamer selection process<sup>[28]</sup>

核酸适体是特殊序列的核酸,可用于构建各种对目标分析物具有特异性响应功能的核酸探针。图 6 显示的是不同核酸适体探针的响应原理图<sup>[31]</sup>。核酸适体信标与分子信标类似,是由能够绕成茎-环结构的包含核酸适体序列的核酸组成,其末端分别标记荧光基团和淬灭基团,两种基团互相靠近从而发生 FRET,荧光基团的荧光处于淬灭状态。当目标分子存在时,核酸适体会与其作用引起构象变化,此时荧光基团和淬灭基团分开,荧光基团的荧光得到恢复。核酸适体可以一半参与构建核酸适体信标,另一半不做任何标记。当目标分子存在时,两部分核酸适体一起与目标分子作用,核酸适体信标的发夹结构被打开,体系荧光得到恢复(图 6A)。核酸适体也可以完全参与构建核酸适体信标,目标分子存在时直接与核酸适体信标作用,引起核酸适体构象变化,从而使荧光基团和淬灭基团分离,体系荧光得到恢复(图 6B)。核酸适体探针与目标分子结合时一般会有一定的空间构象,其 5' 端和 3' 端会互相靠近,所以核酸适体探针也可以完全不改变序列,只在末端修饰荧光基团和淬灭基团,当目标分子存在时,核酸适体会绕成特殊构象,使得两种基团互相靠近,体系的荧光发生改变(图 6C)。核酸适体

也可以用于构建线型核酸探针, 例如核酸适体延长序列后与分别标记淬灭基团和荧光基团的两条核酸链杂交。当目标分子与核酸适体结合时, 会使其中一条链脱落, 体系荧光得到恢复(图 6D)。

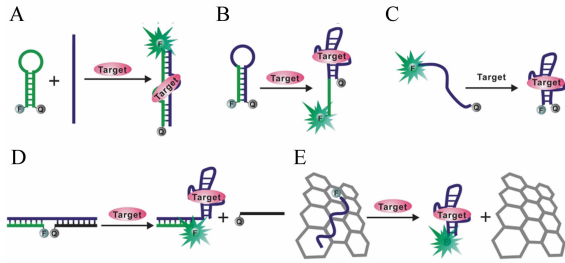


图 6 不同核酸适体探针的响应原理<sup>[31]</sup>

Fig. 6 Response principle of different aptamer probes<sup>[31]</sup>

此外, 核酸适体也可以与纳米金、氧化石墨烯、碳纳米管、聚多巴胺纳米颗粒等具有淬灭效果的纳米材料相结合来构建核酸适体探针(图 6E)。当目标分子存在时, 核酸适体与目标分子结合形成特殊构象的复合体并从纳米材料表面脱落, 体系荧光得到恢复。同时, 无机量子点、金属纳米簇、碳量子点等荧光纳米材料也可以代替常规的荧光染料分子来构建核酸适体探针。纳米材料与核酸适体探针相结合, 同样可以保护负载的核酸适体探针不被核酸酶降解, 并且无需转染试剂就能进入细胞。

近年来, 核酸适体已被广泛应用于癌症识别、诊断、药物传输与治疗等方面<sup>[32-36]</sup>。例如, Tan 课题组利用金纳米棒辅助构建核酸适体探针并用于癌细胞特异性响应的荧光成像与治疗(如图 7(a)所示)。核酸适体 *sgc8* 能够特异性识别细胞膜蛋白酪氨酸激酶 7 (PTK7), 该蛋白过表达于癌细胞 CCRF-CEM (急性淋巴细胞白血病 T 细胞)。把 *sgc8* 核酸适体设计成发夹结构, 一端修饰巯基, 另一端修饰 FAM 荧光染料或者二氢吡啶 e6 (Ce6) 光敏剂。该核酸适体探针通过金硫键修饰于金纳米棒表面, 此时荧光染料或光敏剂靠近金纳米棒表面, 染料的荧光处于淬灭状态。当癌细胞表面过表达的目标蛋白存在时, 核酸适体与其结合后构象会发生变化, 使得荧光染料或光敏剂远离金纳米棒表面, 其荧光得到恢复; 并且用不同细胞研究了核酸适体的特异性响应情况, 包括目标癌细胞 CCRF-CEM 和作为对照的 Ramos 细胞(急性淋

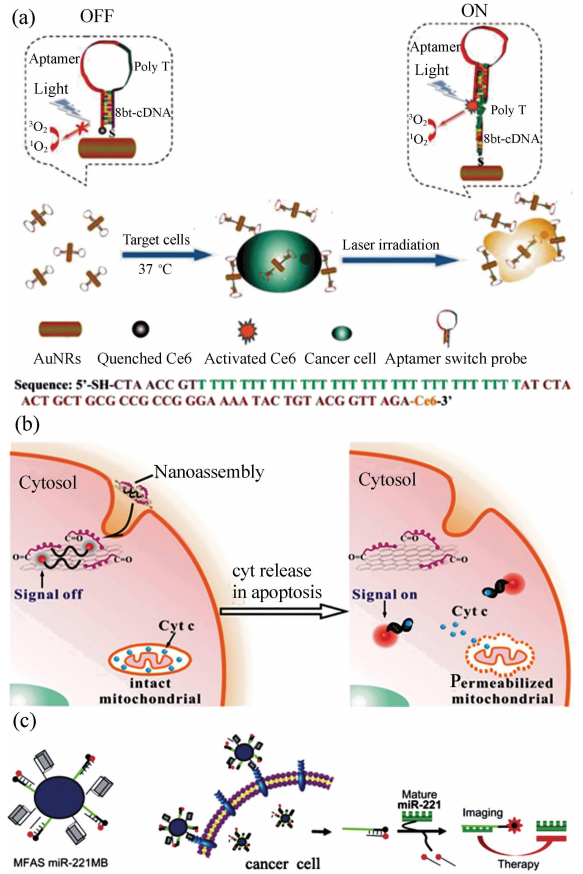


图 7 (a) 金纳米棒辅助构建的核酸适体探针用于癌细胞特异性的成像与治疗<sup>[37]</sup>; (b) 核酸适体功能化纳米探针用于线粒体释放的细胞色素 C 的荧光成像<sup>[38]</sup>; (c) ASI411 核酸适体与反义寡核苷酸同时功能化的纳米颗粒用于癌细胞内 microRNA-221 荧光成像<sup>[39]</sup>

Fig. 7 (a) Gold nanorods based aptamer switch probes for cancer cell specific imaging and treatment<sup>[37]</sup>; (b) fluorescence imaging of cytochrome c released from mitochondria using aptameric nanoprobe<sup>[38]</sup>; (c) fluorescence imaging of microRNA-221 in cancer cells by using nucleolin aptamer and antisense oligonucleotides functionalized nanoparticles<sup>[39]</sup>

巴细胞白血病 B 细胞)。从流式细胞实验结果可以发现, 目标 CCRF-CEM 细胞可以检测到很强的荧光信号, 而 Ramos 细胞的荧光信号很弱; 作者还用其他核酸序列取代核酸适体进行研究, 发现不管是目标癌细胞还是作为参照的 Ramos 细胞, 它们的荧光信号都很弱。这些结果可以说明, 核

酸适体功能化纳米探针可以通过核酸适体对癌细胞膜表面过表达目标蛋白的特异性响应来实现对癌细胞的特异性荧光成像<sup>[37]</sup>。

核酸适体不仅能够用于特异性识别细胞膜表面过表达的目标分子,也能够用于特异性识别细胞内部的目标分子,从而实现特异性荧光成像。例如, Li 课题组利用核酸适体与氧化石墨烯构建了一种核酸适体纳米传感器并用于凋亡细胞中线粒体释放的细胞色素 C 的荧光成像研究(如图 7(b)所示)。作者把荧光染料修饰的能够特异性识别细胞色素 C 的核酸适体组装于聚乙二醇修饰的氧化石墨烯上。由于氧化石墨烯对荧光染料具有很高的荧光淬灭效率,所以整个纳米组装体的荧光信号很弱。聚乙二醇修饰的目的是使纳米组装体被肿瘤细胞吞噬后进入细胞质但不会进入线粒体。纳米组装体与细胞色素 C 的空间分离会使背景荧光信号更低。细胞色素 C 是细胞凋亡的主要介质,细胞凋亡会使线粒体释放出细胞色素 C。此时,纳米组装体上的核酸适体会与细胞色素 C 作用,从而从氧化石墨烯上脱落下来,核酸适体修饰的荧光染料的荧光得到恢复。该成像探针能够直接成像细胞内细胞色素 C 的迁移事件<sup>[38]</sup>。此外,核酸适体功能化纳米探针也可以用于细胞内其他目标分析物的成像分析。核酸适体本身是特殊序列的核酸,不同序列的核酸适体能够识别不同的目标分子。简单改变核酸序列,构建的核酸适体功能化纳米探针就能够用于其他目标分子的成像研究。

核酸适体不仅能够用于构建生物标志物特异性响应的成像探针,也能够单纯作为癌细胞靶向探针,通过核酸适体与癌细胞过表达的生物分子的特异性结合来提高核酸适体功能化纳米探针在癌细胞中的富集,从而减小核酸纳米探针的使用剂量并减小其对正常细胞的影响。例如, Kim 课题组构建了一种 AS1411 核酸适体与反义寡核苷酸同时功能化的核酸纳米探针并用于癌细胞内 miR-221 的特异性荧光成像(如图 7C 所示)。AS1411 核酸适体能够特异性识别核仁蛋白,使得核酸适体功能化纳米探针能够靶向传输到高表达核仁蛋白的癌细胞中。当癌细胞过表达 miR-221 时,反义寡核苷酸链能够与其作用使得探针上标记

的荧光基团和淬灭基团分开,荧光基团的荧光得到恢复,从而实现对目标 miR-221 的荧光成像分析<sup>[39]</sup>。作者考察了 15 种癌细胞,包括 U-87MG(胶质母细胞瘤)、PC-12(肾上腺/嗜酸性细胞瘤)、F11(神经母细胞瘤)、C6(星形细胞瘤)、HepG-2(肝细胞瘤)、SK-Hep-1(肝细胞瘤)、Caco-2(结肠腺癌)、CT-26(结肠腺癌)、TPC-1(乳头状甲状腺癌)、NPA(乳头状甲状腺癌)、U-20S(成骨肉瘤)、HeLa(宫颈癌)、A549(非小细胞肺癌)、PC-3(前列腺癌)和 F9(睾丸畸胎瘤),以及 6 种正常细胞,包括 MSC(间充质干细胞)、F3(神经元干细胞)、CHO(卵巢细胞)、293(肾上皮细胞)、L132(肺上皮细胞)和 TM-4(Sertoli 细胞)。这些细胞分别加核酸纳米探针后在 4 °C 孵育 30 min。结果发现,其中的 13 种癌细胞能够观察到很强的荧光信号,但是 6 种健康细胞观察不到明显的荧光信号。如果把核酸适体上的 G 碱基替换成 C 碱基,那么不管癌细胞还是正常细胞,都观察不到明显的荧光信号。这些结果说明核酸适体功能化纳米探针能够通过核酸适体靶向传输到许多不同的癌细胞中,从而提高成像特异性。总的来说,核酸适体功能化纳米探针不仅能够用于核酸适体特异性识别的目标分子的荧光成像分析,也能够单纯作为癌细胞靶向探针,提高核酸适体功能化纳米探针在癌细胞内的富集,并实现癌细胞内其他目标分析物的荧光成像分析。

## 5 脱氧核酶功能化纳米探针

脱氧核酶也是一类通过体外筛选技术得到的功能性核酸分子。它们能够催化各种不同类型的化学和生物反应,包括切割核酸底物、核酸连接、核酸修饰和卟啉金属化等,在荧光成像上也有重要应用<sup>[40-41]</sup>。本文主要介绍能够催化切割核糖核苷酸磷酸二酯骨架的脱氧核酶。这种脱氧核酶的主体是一条单链核酸链,能够折叠成复杂的二级或三级结构,以金属离子等作为辅因子<sup>[42]</sup>。金属离子在许多催化过程中起着至关重要的作用,也是许多具有催化活性的脱氧核酶的重要组成部分。只有作为辅因子的金属离子存在时,脱氧核酶才具有催化活性。脱氧核酶是从大约  $10^{15}$  条不

同核酸序列中筛选出来的,能够在一定浓度范围内与辅因子特异性结合(如图8(a)所示)。能够作为辅因子的离子有  $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $UO_2^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ce^{3+}$ 、 $Ln^{3+}$ 、 $Ag^{+}$  等。

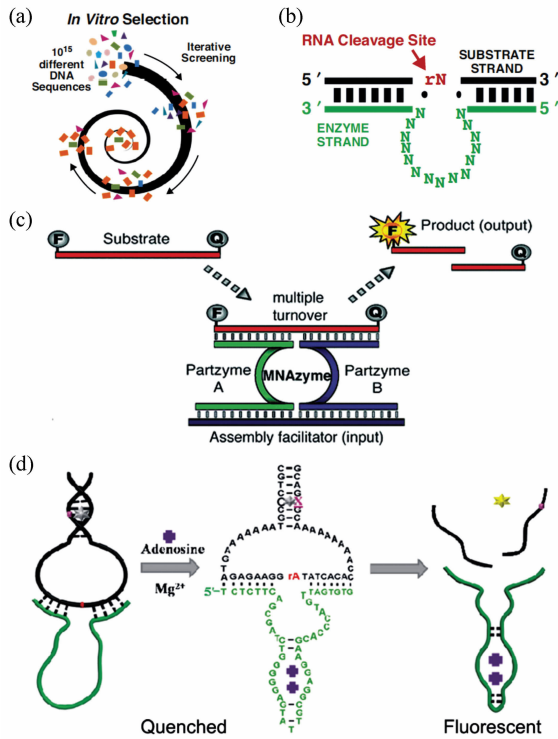


图8 (a)脱氧核酶体外筛选过程;(b)脱氧核酶的结构与切割位点<sup>[42]</sup>;(c)目标核酸诱导活性脱氧核酶的形成<sup>[43]</sup>;(d)核酸适体与目标分子结合诱导活性脱氧核酶的形成<sup>[44]</sup>

Fig. 8 (a) Schematic presentation of DNAzyme selection process; (b) structure of DNAzyme and the RNA cleavage site<sup>[42]</sup>; (c) target nucleic acid induced the formation of an active DNAzyme<sup>[43]</sup>; (d) binding of aptamer to target molecule induced the formation of an active DNAzyme<sup>[44]</sup>

脱氧核酶主要由3部分组成,活性位点、结合臂和酶催化区域(如图8(b)所示)。在不影响脱氧核酶功能的情况下,两个结合臂区域以及其他非必须的核酸序列可以进行修改或修饰,使得脱氧核酶可用于辅因子或其他目标分子特异性响应的分析与成像研究。如图8(c)所示,可以把脱氧核酶序列分割成两部分,它们分别包含一部分结

合臂和一部分酶催化区域。只有当目标核酸存在时,通过核酸杂交才可以把酶催化区域组装起来,当辅因子存在时进一步切割核酸底物来产生可检测信号<sup>[43]</sup>。脱氧核酶也可以在序列中间直接添加一段具有识别功能的核酸序列来构建脱氧核酶探针。如图8(d)所示,可以在脱氧核酶中间添加核酸适体,当目标分子不存在时,脱氧核酶被分隔成没有催化活性的两段,不能切割核酸底物。当目标分子存在时,核酸适体与其结合引起构象变化,使得两段脱氧核酶连在一起。当辅因子存在时,脱氧核酶被活化,可以切割核酸底物并产生可检测信号<sup>[44]</sup>。脱氧核酶的主体是特殊序列的核酸,也可以通过部分杂交脱氧核酶序列来抑制其催化活性。当目标分子存在时,脱氧核酶序列完全游离出来,辅因子存在时其催化活性得到恢复。这些设计可用于构建各种脱氧核酶探针。

此外,脱氧核酶具有合成费用低、化学稳定性高、容易进行化学修饰等优点,也可以与荧光染料、纳米材料等一起构建各种荧光成像纳米探针。纳米材料与脱氧核酶探针相结合,同样可以保护负载的脱氧核酶探针不被核酸酶降解,并且无需转染试剂就能进入细胞。脱氧核酶对其辅因子具有特异性识别能力,所以脱氧核酶功能化纳米探针可用于其对应辅因子的特异性荧光成像分析。由于纳米材料对多种荧光染料都具有很强的荧光淬灭能力。所以,纳米材料可以同时修饰不同染料标记的不同脱氧核酶探针,从而实现多种辅因子的同时荧光成像分析。例如,Tang课题组利用纳米金辅助构建脱氧核酶功能化纳米探针(如图9(a)所示),实现细胞内  $Zn^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  的同时成像分析。活细胞内的  $Zn^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  在调节细胞生物功能方面起着非常重要的作用。这些金属离子又可以作为脱氧核酶的辅因子并使其具有催化活性。作者把  $Zn^{2+}$  特异性的脱氧核酶( $Zn$ -Enz)和  $Cu^{2+}$  特异性的脱氧核酶( $Cu$ -Enz)分别与其底物链杂交并通过金-硫键修饰于纳米金表面。两种底物链分别标记荧光基团(FAM或Cy5)和淬灭基团(BHQ-1或BHQ-2)。两种荧光基团的荧光能够同时被纳米金和对应的淬灭基团淬灭。当核酸纳米探针传输进入细胞,细胞内的目标  $Zn^{2+}$  或  $Cu^{2+}$  存在时,对应的脱氧核酶能够被活化进而切

割核酸底物,包含荧光基团的短核酸链会游离出来,其荧光得到恢复。FAM 染料荧光恢复情况与  $Zn^{2+}$  浓度相关,Cy5 染料荧光恢复情况与  $Cu^{2+}$  浓度相关,从而实现活细胞内  $Zn^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  同时荧光成像分析<sup>[45]</sup>。

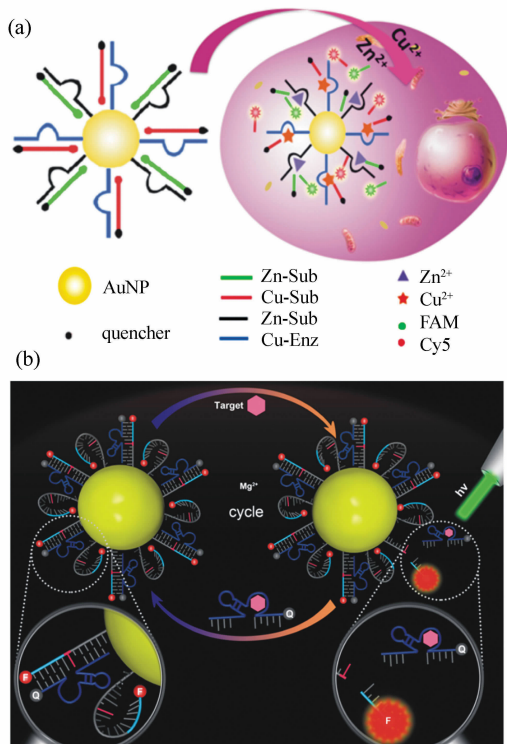


图 9 (a) 活细胞内基于脱氧核酶功能化纳米金的  $Zn^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  同时荧光成像研究<sup>[45]</sup>; (b) 核酸适体功能化的脱氧核酶与纳米金结合用于活细胞内目标分子的放大荧光成像<sup>[46]</sup>

Fig. 9 (a) Simultaneous fluorescence imaging of  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  in living cells based on DNAzyme modified gold nanoparticle<sup>[45]</sup>; (b) aptazyme-gold nanoparticle sensor for amplified molecular probing in living cells<sup>[46]</sup>

前面已经介绍到通过核酸杂交或者核酸适体与目标分子结合可以诱导有活性的脱氧核酶形成,所以脱氧核酶辅助构建的核酸纳米探针也可以用于核酸或其他目标分子的成像分析。由于脱氧核酶切割核酸底物后,核酸底物会断成两半,结合力减弱,使得活性脱氧核酶能够游离出来继续进行下一轮的切割。通过巧妙设计,脱氧核酶功能化纳米探针用于其他目标分子分析时,可以达

到成像信号放大的效果。例如,Wang 课题组利用核酸适体功能化的脱氧核酶与纳米金相结合来实现活细胞内目标分子的荧光成像信号放大(如图 9(b)所示)。作者选用的是三磷酸腺苷(ATP)的核酸适体和  $Mg^{2+}$  特异性响应的脱氧核酶。把核酸适体和脱氧核酶设计在一条序列里,只有当核酸适体与目标分子结合形成特殊构象后,脱氧核酶才能够被活化。这条核酸适体/脱氧核酶序列在 5' 端标记淬灭基团,与 3' 端标记荧光基团的底物链杂交后修饰于纳米金表面。当目标 ATP 不存在时,脱氧核酶没有催化活性,荧光基团的荧光同时被纳米金和淬灭基团淬灭。当脱氧核酶功能化纳米探针被细胞摄取后,核酸适体能够与细胞内的 ATP 结合形成特殊构象,从而活化脱氧核酶使其在辅因子存在时具有催化活性。活化的脱氧核酶能够切割底物链,释放出荧光团标记的核酸片段,使其荧光得到恢复。此时,该脱氧核酶能够游离出来与纳米金表面的另一条底物链结合并切割底物链。在切割循环过程中,少量的 ATP 就能诱导切割纳米金表面荧光基团标记的许多底物链,获得放大的荧光信号,从而实现目标 ATP 的成像信号放大分析<sup>[46]</sup>。核酸适体能够特异性响应离子、小分子、蛋白等各种目标分子,所以脱氧核酶功能化纳米探针与核酸适体相结合有望用于许多生物标志物的荧光成像分析。

脱氧核酶功能化纳米探针也能够用于核酸分子的荧光成像信号放大分析。例如,Le 课题组构建了一种脱氧核酶功能化纳米探针,利用活细胞内的 miRNA 活化脱氧核酶使其循环切割底物链,得到放大的荧光信号,从而实现目标 miRNA 的荧光成像信号放大分析(如图 10(a)所示)。作者选用纳米金作为载体和淬灭剂,其表面修饰底物链和被锁链抑制活性的脱氧核酶探针,锁链末端标记 Cy5 荧光基团,底物链末端标记 FAM 荧光基团。锁链可以设计成能特异性响应细胞内目标分子的探针,这里选择的是 miRNA。当脱氧核酶被抑制活性时,Cy5 和 FAM 的荧光都被纳米金淬灭。当脱氧核酶功能化纳米探针被细胞摄取后,细胞内的 miRNA 能够通过链置换作用与锁链杂交,使得脱氧核酶链游离出来与纳米金表面的底物链结合。辅因子存在时,脱氧核酶能够切割底

物链并释放出 FAM 标记的核酸片段。此时,脱氧核酶能够游离出来与下一条底物链结合并切割底物链,该反应能够沿着纳米金自发的持续进行。每进行一次底物链切割时,都伴随着释放出一个荧光染料标记的核酸片段,由于荧光染料远离了纳米金,其荧光得到恢复。通过检测荧光信号,可实现对目标 miRNA 的信号放大荧光成像分析<sup>[47]</sup>。

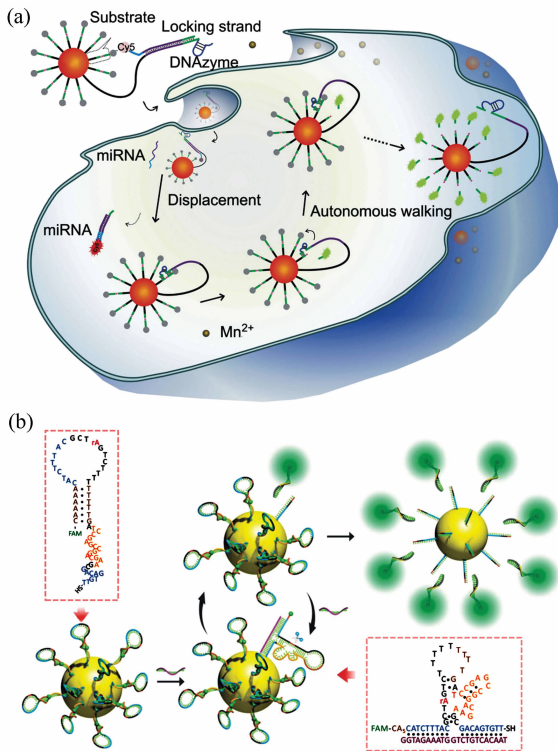


图 10 (a)活细胞内 miRNA 触发脱氧核酶活化<sup>[47]</sup>;  
(b)纳米金-发夹型脱氧核酶探针用于活细胞  
内 miRNA 成像信号放大<sup>[48]</sup>

Fig. 10 (a) MicroRNA-initiated DNzyme activation in living cells<sup>[47]</sup>; (b) AuNP-based hairpin-DNzyme probe for amplification detection of miRNA in living cells<sup>[48]</sup>

脱氧核酶功能化纳米探针用于目标分子荧光成像信号放大分析时,不仅可以通过目标分子活化的脱氧核酶循环切割底物链来实现荧光信号放大,也可以通过目标分子循环活化脱氧核酶来获得信号放大效果。例如,Wang 课题组利用发夹型脱氧核酶和纳米金构建了一种成像纳米探针并用于活细胞内 miRNA 的荧光成像信号放大研究。

当目标分子不存在时,脱氧核酶通过形成发夹结构来抑制其催化活性。探针的一端标记荧光染料,另一端通过金-硫键修饰于纳米金表面,此时荧光染料的荧光处于淬灭状态。当脱氧核酶功能化纳米探针传输进细胞时,细胞内的目标 miRNA 能够与脱氧核酶探针杂交并打开其发夹结构。此时,脱氧核酶的酶催化区域完全游离出来,当辅因子  $Mg^{2+}$  存在时,脱氧核酶能够切割同一条链上的酶切位点,把脱氧核酶探针分成两段。切割后,这两段核酸片段与目标 miRNA 的杂交变得相对不稳定,从而与目标 miRNA 分开。荧光染料标记的那条核酸片段就会从纳米金表面脱落,其荧光得到恢复。此外,目标 miRNA 也能够释放出来,与另一个发夹型脱氧核酶探针相结合从而引发新一轮的荧光信号产生。这种目标分子循环的信号放大过程能够显著增强荧光信号,从而实现对目标 miRNA 的高灵敏成像分析<sup>[48]</sup>。

脱氧核酶不仅可以以细胞内现有的金属离子作为辅因子,也可以通过纳米材料传输辅因子进入细胞。例如,氧化锌纳米颗粒、二氧化锰纳米片等纳米材料不仅可以作为脱氧核酶探针的载体,辅助脱氧核酶探针传输进入细胞。这些纳米材料进入细胞后还可以降解产生  $Zn^{2+}$  或  $Mn^{2+}$  等辅因子,从而使脱氧核酶发挥作用<sup>[49-50]</sup>。总的来说,脱氧核酶功能化纳米探针不仅能够用于细胞内对应辅因子的特异性成像分析,还可以通过成像信号放大实现对核酸或其他目标分子的高灵敏荧光成像分析。

## 6 结束语

本综述主要讨论核酸功能化纳米探针在细胞荧光成像方面的应用,主要包括反义寡核苷酸功能化纳米探针、核酸适体功能化纳米探针以及脱氧核酶功能化纳米探针,同时介绍了这些核酸功能化纳米探针在成像信号放大分析中的应用。反义寡核苷酸功能化纳米探针可用于活细胞内 mRNA、miRNA 等核酸分子的荧光成像分析。此外,为解决细胞内低含量目标核酸难以监测的问题,核酸纳米探针还可以与一些基于脱氧核酶或者核酸之间自组装的成像信号放大方法相结合来提高

成像灵敏度。核酸适体功能化纳米探针不仅能够用于核酸适体特异性识别的目标分子的荧光成像分析,也能够单纯作为癌细胞靶向探针,提高核酸适体功能化纳米探针在癌细胞中的富集。脱氧核酶功能化纳米探针不仅能够用于其对应辅因子的特异性荧光成像分析,也可以与反义寡核苷酸或核酸适体相结合,通过成像信号放大实现对核酸或其他目标分子的高灵敏荧光成像分析。

总的来说,核酸功能化纳米探针能够用于各种生物标志物的荧光分析与成像研究。然而,细

胞内许多生物标志物的含量很低,并且是动态变化的。此外,各种疾病的发生发展,往往是多种生物标志物同时起作用的结果。目前已发展的核酸功能化纳米探针用于细胞内生物标志物的成像分析时,仍存在着选择性较差、灵敏度较低的问题。而且,能够同时检测多种生物标志物的核酸功能化纳米探针也仍然有限。在未来,核酸功能化纳米探针希望能够继续完善和发展,从而实现癌症相关标志物的高灵敏、高特异性荧光成像分析,并在癌症早期诊断和预后监测中发挥作用。

### 参考文献:

- [1] TORABI S F, LU Y. Functional DNA nanomaterials for sensing and imaging in living cells[J]. *Curr. Opin Biotechnol.*, 2014, 28:88-95.
- [2] LI J, MO L, LU C H, *et al.*. Functional nucleic acid-based hydrogels for bioanalytical and biomedical applications[J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2016, 45(5):1410-1431.
- [3] LIANG H, ZHANG X B, LV Y, *et al.*. Functional DNA-containing nanomaterials: cellular applications in biosensing, imaging, and targeted therapy[J]. *Acc Chem. Res.*, 2014, 47(6):1891-1901.
- [4] MIAO P, TANG Y, WANG B, *et al.*. Near-infrared Ag<sub>2</sub>S quantum dots-based DNA logic gate platform for miRNA diagnostics [J]. *Anal. Chem.*, 2016, 88(15):7567-7573.
- [5] CHENG W, YAN W, MIAO P. TNF- $\alpha$  responsive DNA star trigon formation from four hairpin probes and the analytical application[J]. *Sci. China. Chem.*, 2017, 60(3):405-409.
- [6] CHAKRABORTY K, VEETIL A T, JAFFREY S R, *et al.*. Nucleic acid-based nanodevices in biological imaging[J]. *Annu. Rev. Biochem.*, 2016, 85(1):349-373.
- [7] LI J, CHENG F, HUANG H, *et al.*. Nanomaterial-based activatable imaging probes: from design to biological applications [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44(21):7855-7880.
- [8] LUBY B M, CHARRON D M, MACLAUGHLIN C M, *et al.*. Activatable fluorescence: from small molecule to nanoparticle [J]. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2016, 113:97-121.
- [9] HU R, ZHANG X B, KONG R M, *et al.*. Nucleic acid-functionalized nanomaterials for bioimaging applications[J]. *J. Mater. Chem.*, 2011, 21(41):16323-16334.
- [10] ZHENG J, YANG R H, SHI M L, *et al.*. Rationally designed molecular beacons for bioanalytical and biomedical applications[J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44(10):3036-3055.
- [11] FARRERA C, ANDON F T, FELIU N. Carbon nanotubes as optical sensors in biomedicine [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(11):10637-10643.
- [12] ZHU X, LIU Y, LI P, *et al.*. Applications of graphene and its derivatives in intracellular biosensing and bioimaging[J]. *Analyst*, 2016, 141(15):4541-4553.
- [13] PENG H Y, TANG H, JIANG J H. Recent progress in gold nanoparticle-based biosensing and cellular imaging[J]. *Sci. China Chem.*, 2016, 59(7):783-793.
- [14] HILDEBRANDT N, SPILLMANN C M, ALGAR W R, *et al.*. Energy transfer with semiconductor quantum dot bioconjugates: a versatile platform for biosensing, energy harvesting, and other developing applications[J]. *Chem. Rev.*, 2017, 117(2):536-711.
- [15] ZHANG C, DING C, XIANG D, *et al.*. DNA functionalized fluorescent quantum dots for bioanalytical applications[J]. *Chinese J. Chem.*, 2016, 34(3):317-325.
- [16] SANTANGELO P J. Molecular beacons and related probes for intracellular RNA imaging[J]. *WIREs Nanomedicine and*

*Nanobiotechnology*,2010,2(1):11-19.

- [17] 杨立敏,刘波,李娜,等. 纳米荧光探针用于核酸分子的检测及成像研究[J]. 化学学报,2017,75:1047-1060.  
YANG L M,LIU B,LI N,*et al.*. Fluorescent nanoprobe for detection and imaging of nucleic acid molecules[J]. *Acta Chim. Sinica*,2017,75:1047-1060. (in Chinese)
- [18] SEFEROS D S,GILJOHANN D A,HILL H D,*et al.*. Nano-flares: probes for transfection and mRNA detection in living cells[J]. *J. Am. Chem. Soc.*,2007,129(50):15477-15479.
- [19] CHOI C K K,LI J M,WEI K C,*et al.*. A gold@ polydopamine core-shell nanoprobe for long-term intracellular detection of microRNAs in differentiating stem cells[J]. *Methods Mol. Biol.*,2017,1570:155-164.
- [20] LI N,CHANG C,PAN W,*et al.*. A multicolor nanoprobe for detection and imaging of tumor-related mRNAs in living cells[J]. *Angew Chem. Int. Ed.*,2012,51(30):7426-7430.
- [21] LI J L,ZHONG X Q,CHENG F F,*et al.*. One-pot synthesis of aptamer-functionalized silver nanoclusters for cell-type-specific imaging[J]. *Anal. Chem.*,2012,84:4140-4146.
- [22] HE X,ZENG T,LI Z,*et al.*. Catalytic molecular imaging of microRNA in living cells by DNA-programmed nanoparticle disassembly[J]. *Angew Chem. Int. Ed.*,2016,55(9):3073-3076.
- [23] YANG Y,HUANG J,YANG X,*et al.*. FRET nanoflares for intracellular mRNA detection; avoiding false positive signals and minimizing effects of system fluctuations[J]. *J. Am. Chem. Soc.*,2015,137(26):8340-8343.
- [24] CHEN J J,TANG L J,CHU X,*et al.*. Enzyme-free, signal-amplified nucleic acid circuits for biosensing and bioimaging analysis [J]. *Analyst*,2017,142(7):3048-3061.
- [25] BI S,YUE S,ZHANG S. Hybridization chain reaction: a versatile molecular tool for biosensing, bioimaging, and biomedicine[J]. *Chem. Soc. Rev.*,2017,46(14):4281-4298.
- [26] WU Z,LIU G Q,YANG X L,*et al.*. Electrostatic nucleic acid nanoassembly enables hybridization chain reaction in living cells for ultrasensitive mRNA Imaging[J]. *J. Am. Chem. Soc.*,2015,137(21):6829-6836.
- [27] YANG D W,TANG Y G,MIAO P. Hybridization chain reaction directed DNA superstructures assembly for biosensing applications[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*,2017,94:1-13.
- [28] MENG H M,LIU H,KUAI H,*et al.*. Aptamer-integrated DNA nanostructures for biosensing, bioimaging and cancer therapy[J]. *Chem. Soc. Rev.*,2016,45(9):2583-2602.
- [29] YANG D,TANG Y,GUO Z,*et al.*. Proximity aptasensor for protein detection based on an enzyme-free amplification strategy[J]. *Mol. Bio. Syst.*,2017,13:1936-1939.
- [30] 靳贵晓,李娟,杨黄浩. 核酸适体的筛选及其在生物医学领域的研究进展[J]. 福州大学学报,2016,44(6):919-934.  
JIN G X,LI J,YANG H H. Research progress of aptamer screening and its application in biomedicine[J]. *Journal of Fuzhou University*,2016,44(6):919-934. (in Chinese)
- [31] ZHANG H,LI F,DEVER B,*et al.*. DNA-mediated homogeneous binding assays for nucleic acids and proteins[J]. *Chem. Rev.*,2013,113(4):2812-2841.
- [32] XING H,WONG N Y,XIANG Y,*et al.*. DNA aptamer functionalized nanomaterials for intracellular analysis, cancer cell imaging and drug delivery[J]. *Curr. Opin. Chem. Biol.*,2012,16:429-435.
- [33] SUN H G,TAN W H,ZU Y L. Aptamers: versatile molecular recognition probes for cancer detection[J]. *Analyst*,2016,141(2):403-415.
- [34] LU D,HE L,ZHANG G,*et al.*. Aptamer-assembled nanomaterials for fluorescent sensing and imaging[J]. *Nanophotonics*,2017,6(1):109-121.
- [35] DONG J T,ZHAO M P. In-vivo fluorescence imaging of adenosine 5'-triphosphate[J]. *Trends in Analytical Chemistry*,2016,80:190-203.
- [36] 黄子珂,刘超,付强强,等. 核酸适配体荧光探针在生化分析和生物成像中的研究进展[J]. 应用化学,2018,35(1):28-39.  
HUANG Z K,LIU CH,FU Q Q,*et al.*. Aptamer-based fluorescence probe for bioanalysis and bioimaging[J]. *Chinese*

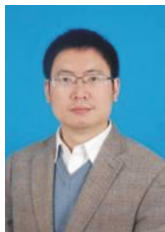
*Journal of Applied Chemistry*, 2018, 35(1):28-39. (in Chinese)

- [37] WANG J, ZHU G, YOU M, *et al.*. Assembly of aptamer on gold switch nanorods probes for and photosensitizer targeted photothermal and photodynamic cancer therapy[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(6):5070-5077.
- [38] CHEN T T, TIAN X, LIU C L, *et al.*. Fluorescence activation imaging of cytochrome c released from mitochondria using aptameric nanosensor[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, 137(2):982-989.
- [39] KIM J K, CHOI K J, LEE M, *et al.*. Molecular imaging of a cancer-targeting theragnostics probe using a nucleolin aptamer- and microRNA-221 molecular beacon-conjugated nanoparticle[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(1):207-217.
- [40] LIU J, CAO Z, LU Y. Functional nucleic acid sensors[J]. *Chem. Rev.*, 2009, 109:1948-1998.
- [41] ZHOU W H, LIU J W. Multi-metal-dependent nucleic acid enzymes[J]. *Metallomics*, 2018, 10(11):30-48.
- [42] MCGHEE C E, LOH K Y, LU Y. DNAzyme sensors for detection of metal ions in the environment and imaging them in living cells[J]. *Curr. Opin Biotechnol.*, 2017, 45:191-201.
- [43] MOKANY E, BONE S M, YOUNG P E, *et al.*. MNazymes, a versatile new class of nucleic acid enzymes that can function as biosensors and molecular switches[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132(3):1051-1059.
- [44] SONG P, XIANG Y, XING H, *et al.*. Label-free catalytic and molecular beacon containing an abasic site for sensitive fluorescent detection of small inorganic and organic molecules[J]. *Anal. Chem.*, 2012, 84(6):2916-2922.
- [45] LI L, FENG J, FAN Y, *et al.*. Simultaneous imaging of  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  in living cells based on DNAzyme modified gold nanoparticle[J]. *Anal. Chem.*, 2015, 87(9):4829-4835.
- [46] YANG Y, HUANG J, YANG X, *et al.*. Aptazyme-gold nanoparticle sensor for amplified molecular probing in living cells [J]. *Anal. Chem.*, 2016, 88(11):5981-5987.
- [47] PENG H Y, LI X F, ZHANG H Q, *et al.*. A microRNA-initiated DNAzyme motor operating in living cells[J]. *Nat. Commun.*, 2017, 8:14378.
- [48] YANG Y, HUANG J, YANG X, *et al.*. Gold nanoparticle based hairpin-locked-DNAzyme probe for amplified miRNA imaging in living cells[J]. *Anal. Chem.*, 2017, 89(11):5850-5856.
- [49] CHEN F, BAI M, CAO K, *et al.*. Fabricating  $MnO_2$  nanozymes as intracellular catalytic DNA circuit generators for versatile imaging of base-excision repair in living cells[J]. *Adv. Funct. Mater.*, 2017, 27(45):1702748.
- [50] HE D G, HE X, YANG X, *et al.*. A smart  $ZnO@$  polydopamine-nucleic acid nanosystem for ultrasensitive live cell mRNA imaging by the target-triggered intracellular self-assembly of active DNAzyme nanostructures[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(4):2832-2840.

#### 作者简介:



郑爱仙(1987—),女,福建福州人,博士,助理研究员,2009年、2014年于福州大学分别获得学士、博士学位,主要从事生物标志物的荧光分析与成像方面的研究。E-mail: zax040500273@126.com



刘小龙(1980—),男,四川射洪人,博士,研究员,2003年、2008年于西安交通大学分别获得学士、博士学位,主要从事肿瘤早期诊断新技术与新方法方面的基础与临床转化方面的研究。E-mail: xiaoloong.liu@gmail.com