

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-015

## 核酸生物传感

姚林欣, 宋璐, 李敏, 左小磊

(上海交通大学医学院附属仁济医院, 分子医学研究院, 上海 200127)

**摘要:** 脱氧核糖核酸 (DNA) 分子在生命体内发挥储存和传递遗传信息的生物学功能, 在体外, 它还可以作为一种可编程的分子自组装纳米材料。基于 DNA 双螺旋模型和碱基互补配对原则, 研究人员开发了多种 DNA 自组装技术并以此构建了尺寸、形貌可控以及具有动态响应特性的二维和三维纳米结构。鉴于 DNA 纳米结构具有可控的尺寸、精确的寻址能力、可定制的生物功能、良好的生物相容性等特点, 其已被广泛用于生物传感、生物成像、组织工程、药物递送等分子生物学研究领域。本文概述了利用 DNA 自组装技术构建的二维和三维 DNA 纳米结构, 并分类讨论了 DNA 链置换驱动以及环境刺激驱动的 DNA 纳米结构动态变构, 重点介绍了 DNA 纳米结构的生物传感应用, 最后展望了基于 DNA 自组装技术构建的生物传感器的发展前景与面临挑战, 包括提高 DNA 纳米结构的合成效率和稳定性、开发体内动态监测技术、建立多重检测与快速诊断方法以及探索与 CRISPR 技术联用的新发展方向。

**关键词:** DNA 自组装技术; 2D DNA 纳米结构; 3D DNA 纳米结构; 动态 DNA 纳米结构; 生物传感; 生物标志物

中图分类号: Q71 文献标志码: A

## Nucleic acid biosensing

YAO Linxin, SONG Lu, LI Min, ZUO Xiaolei

(Institute of Molecular Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China)

**Abstract:** Deoxyribonucleic acid (DNA) molecules store and transmit genetic information in all living organisms and some viruses. *In vitro*, it can be utilized as a programmable and versatile molecular self-assembling building block to construct functional materials. On the basis of the DNA double helix model and the specific rules of base complementary pairing, where adenine (A) with thymine (T) and cytosine (C) with guanine (G), researchers have developed various DNA self-assembly techniques over the past few decades, including DNA tiling arrays such as DNA origami and laterally developed single strand tiling. These technologies have been employed to construct a variety of two- or three-dimensional nanoscale structures and devices with controllable sizes and morphologies, as well as

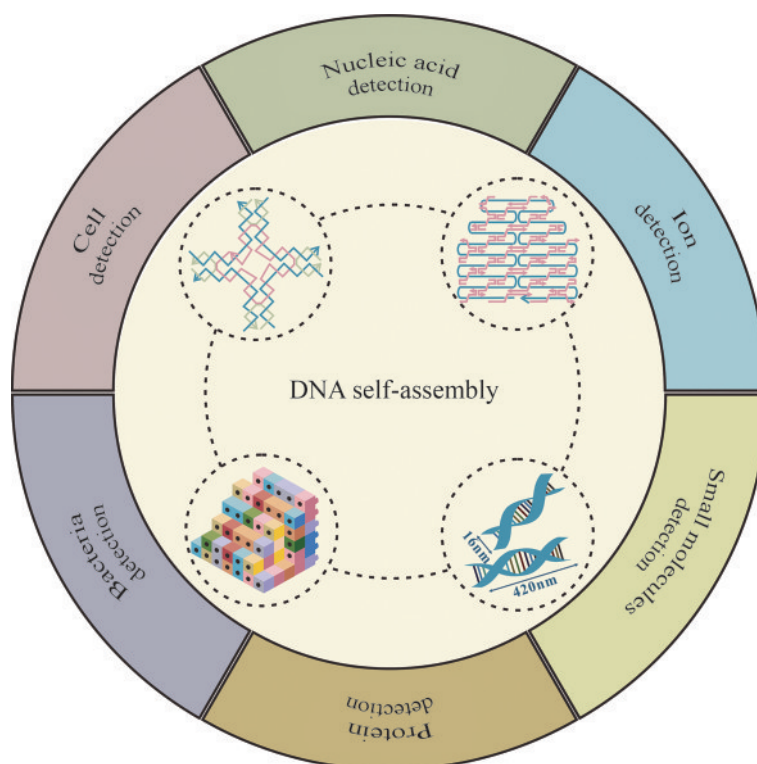
收稿日期: 2025-03-13 修回日期: 2025-04-15

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFF1200300, 2020YFA0909000); 国家自然科学基金 (22025404, T2188102); 上海市自然科学基金 (23ZR1438700, 24ZR1445200); 上海市高水平大学创新研究团队 (SHSMU-ZLCX20212602); 上海市卫生健康委员会资助项目 (2022JC027); 国家资助博士后研究人员计划 (GZB20230436)

引用本文: 姚林欣, 宋璐, 李敏, 左小磊. 核酸生物传感[J]. 合成生物学, 2026, 7(1): 66-92

Citation: YAO Linxin, SONG Lu, LI Min, ZUO Xiaolei. Nucleic acid biosensing[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7(1): 66-92

dynamic response properties to external environmental stimulus. Researchers have continually demonstrated the exceptional construction capabilities of DNA molecules and have constructed a variety of DNA nanostructures: from simple four-arm nucleic acid junction to origami arrays up to 2~3 microns in size, from two-dimensional planar shapes to three-dimensional complex and twisted structures, and from simple nano-tweezers to command-executing DNA walkers. Due to the unparalleled programmability, precise addressability, editable biological functions, tissue permeability and inherent biocompatibility of DNA nanostructures, they have hold significant potentials in molecular biology research such as biosensing, bioimaging, tissue engineering, and drug delivery. In this review, first, we summarize the construction of two- and three-dimensional DNA nanostructures using various DNA self-assembly technologies. Then, the dynamic transformation of DNA nanostructures driven by two distinct types of driving forces have been categorized and discussed. Finally, the prospects of biosensors based on DNA self-assembly technologies, as well as challenges in this field including enhancing the efficiency and stability of synthesized structures, advancing dynamic monitoring technology *in vivo*, establishing multiplex and rapid detection methods, and exploring new directions for integration with CRISPR technology, have been explored.



**Keywords:** DNA self-assembly; 2D DNA nanostructure; 3D DNA nanostructure; dynamic DNA nanostructure; biosensing; biomarkers

DNA 分子不仅可以作为储存和传递遗传信息的载体，还可以作为一种天然的建筑材料构建纳米尺度的复杂结构。自 20 世纪 80 年代纳德里安·西曼 (Nadrian Seeman)<sup>[1]</sup> 首次在体外合成固定四臂结结构以来，DNA 自组装技术在近 40 年的时

里取得了显著进展。基于 Watson-Crick 碱基配对的高度可编程性，tile 自组装技术突破了 DNA 纳米结构的一维空间限制<sup>[2]</sup>；随后，DNA 折纸技术以更简单的程序设计出更复杂的图形<sup>[3]</sup>；单链模块组装 (single strand tile, SST) 策略<sup>[4]</sup>、“元 DNA”

(meta-DNA) 策略<sup>[5]</sup>、计算机辅助建模和算法设计等技术使DNA纳米结构的几何参数(如尺寸和形状)得以更加精确地预测和扩展,可在原子级精度水平上实现二维及三维复杂纳米结构的构建,图1展示了几种DNA自组装技术的发展以及典型DNA纳米结构。基于这些自组装技术,研究人员已开发出多样的动态DNA纳米结构,如DNA纳米镊子、DNA步行器、DNA纳米时钟等,在材料科学、生物传感、医学诊疗等方面展现出重要的应用价值。

生物传感器通过生物识别元件与待测物质的特异性相互作用,将识别信号转为光学或电学信号,实现分子水平的快速检测。基于DNA纳米结构的传感器首先采用适配体或者特定的序列如富C<sup>[18]</sup>、富G<sup>[19]</sup>序列作为识别靶标的特异性探针,靶标诱导DNA纳米结构发生动态变化进而触发其上所锚定的荧光、蛋白质等功能性元件产生可检测的光、电等信号;这些信号经电化学工作站、荧光光谱仪等读出设备能够转换为可定量分析的

数字或图像信号。

本综述首先从二维和三维DNA纳米结构两方面概述了DNA自组装技术的发展和應用,然后讨论了利用DNA自组装技术所构建的动态DNA纳米结构;重点综述了各类DNA纳米结构针对核酸、离子、小分子、蛋白质、细胞和细菌6种不同靶标的传感;最后展望了DNA纳米结构在生物传感领域的应用前景和发展方向。

## 1 DNA自组装技术

基于Watson-Crick碱基互补配对的精确性,DNA分子可以作为基础单元通过自组装形成各种复杂的纳米结构。目前主要的DNA自组装技术包括tile自组装、DNA折纸自组装、单链模块组装和meta-DNA组装策略。本章节将重点阐述基于上述DNA组装技术所构建的各类2D和3D DNA静态纳米结构。

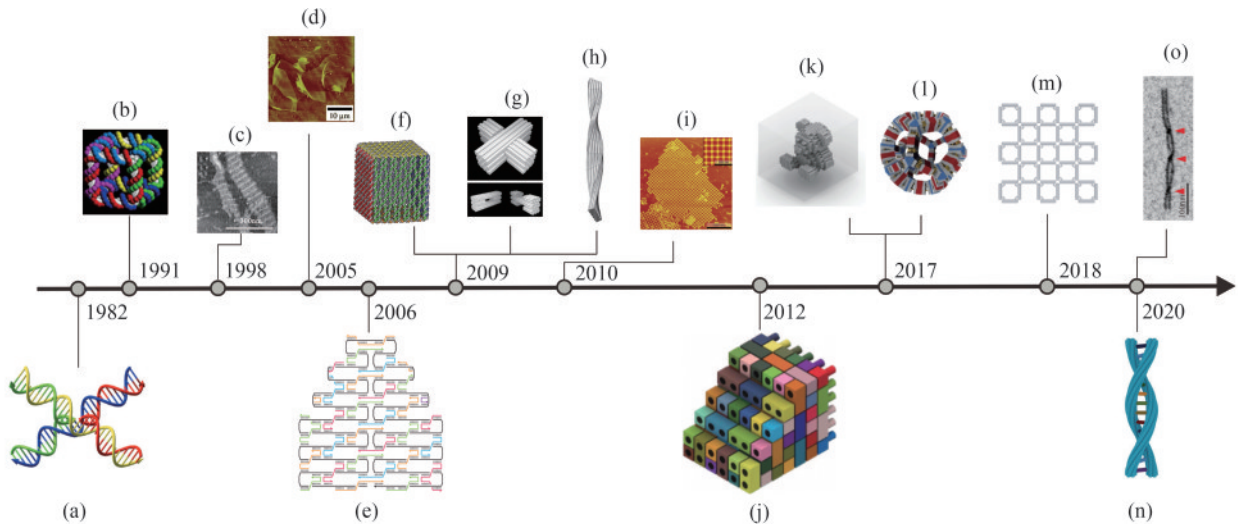


图1 DNA自组装技术发展史<sup>[1, 3-17]</sup>

(a) tile组装技术DNA纳米技术的起源,四臂结<sup>[1, 6]</sup>; (b) 第1个3D DNA纳米结构<sup>[7]</sup>; (c) 第1个2D周期性DNA晶格<sup>[8]</sup>; (d) 突破毫米尺度的2D晶格<sup>[9]</sup>; (e) DNA折纸自组装技术<sup>[3]</sup>; (f) 3D空心折纸盒<sup>[10]</sup>; (g) 多层折纸堆叠构建立体结构<sup>[11]</sup>; (h) 3D扭曲折纸<sup>[12]</sup>; (i) 以折纸作为tile构建的二维阵列<sup>[13]</sup>; (j) 单链模块组装技术<sup>[4]</sup>; (k) 3D泰迪熊<sup>[14]</sup>; (l) V形折纸构建的高达千道尔顿的十二面体结构<sup>[15]</sup>; (m) “框架核酸”概念的提出<sup>[16-17]</sup>; (n) Meta-DNA组装技术<sup>[5]</sup>; (o) 右旋dsM-DNA<sup>[5]</sup>

Fig. 1 History of the development of DNA self-assembly technology<sup>[1, 3-17]</sup>

(a) Four-arm junction, origins of DNA nanotechnology<sup>[1, 6]</sup>; (b) The first 3D DNA nanostructure<sup>[7]</sup>; (c) The first 2D periodic DNA lattices<sup>[8]</sup>; (d) The 2D lattices breaking through the millimeter scale<sup>[9]</sup>; (e) DNA origami self-assembly technique<sup>[3]</sup>; (f) 3D hollow origami box<sup>[10]</sup>; (g) Three-dimensional structures built by multi-layer origami stack<sup>[11]</sup>; (h) 3D twisted origami<sup>[12]</sup>; (i) Two-dimensional arrays constructed using origami as a tile<sup>[13]</sup>; (j) Single strand tiles assembly technique<sup>[4]</sup>; (k) 3D Teddy bear<sup>[14]</sup>; (l) Gigadalton-scale dodecahedron built by V-brick<sup>[15]</sup>; (m) The proposal of the concept of framework nucleic acids (FNAs)<sup>[16-17]</sup>; (n) Meta-DNA assembly technique<sup>[5]</sup>; (o) Right-handed dsM-DNA<sup>[5]</sup>

## 1.1 2D DNA纳米结构

1982年, Seeman等<sup>[1]</sup>通过固定化学计量比的方式混合4种人工合成的单链DNA, 在体外成功构建出一个具有非对称分支的固定Holliday连接体(四臂交叉)。受此结构启发, 研究团队开发出了三/五/六/八/十二臂结等衍生结构<sup>[20-22]</sup>。为了解决多臂结柔性大导致的组装产物结构不确定问题, Seeman团队<sup>[2]</sup>对改进了四臂结, 将两股双螺旋结构并列排布, 并在内部引入两个交叉(crossover)结构单元以连接两股双链, 开发了新的刚性tile, 称为DX (DNA double crossover) [图2(a)]。1998年, Winfree等通过将两个DX tile的黏性末端错位相接, 组装出了具有两种不同拓扑结构的二维网格, 并使用原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)首次证实了产物的存在<sup>[8]</sup>。随后, 研究人员陆续开发出多种DX变体, 如使用多个交叉结构单元将更多的DNA双链捆绑在一起的TX (triple crossover)<sup>[29]</sup>、PX (paranemic crossover)、6HB (six-helix bundles)<sup>[30]</sup>以及基于四臂结和DX的4×4 tile<sup>[31]</sup>、6×4 tile和N角星(N-point-star)<sup>[9, 32-33]</sup>, 这些变体能够通过黏性末端连接等方式进一步构建二维乃至三维纳米结构[图2(a)]。

然而, tile自组装具有设计步骤烦琐、反应计量需精确控制、产物复杂度低、可寻址面积受限等缺点。为了克服上述缺点, 2006年Rothemund<sup>[3]</sup>开发了DNA折纸技术, 该技术使用数百条“订书钉”短链(staple strand)将一条长的单链DNA(scaffold DNA)折叠成确定的形状, 如正方形、三角形、笑脸和五角星等, 得到的DNA纳米结构尺寸约为100 nm [图2(b)]。随后, 为了在二维平面结构中创造曲率, Yan课题组<sup>[25]</sup>通过调控相邻DNA螺旋交叉的距离, 构建了二维DNA同心圆和圆角方形结构, 该研究进一步展示了DNA纳米技术在构建复杂几何形状方面的潜力[图2(c), 右]。随着折纸技术的发展, 研究人员合成了不对称的2D DNA纳米结构, 如尾部形态各异的海豚<sup>[24]</sup>[图2(c), 左]和中国地图<sup>[34]</sup>。为了增加合成图案的多样性, Yan团队<sup>[26]</sup>利用四臂连接作为关节点构建了各种网格结构, 使支架链不再限于1D平行的光栅填充图案, 该设计可以通过改变相邻连接

点之间的碱基对数量来调整网格的大小[图2(d), 上]。Zhang及其同事<sup>[27]</sup>利用多臂连接和长度可变的反向平行DX作为基元, 通过改变臂之间的角度、曲率、长度, 合成了一张极为复杂的花鸟图案[图2(d), 下]。然而, M13支架链长度有限, DNA折纸的尺寸只能局限在0.05 μm<sup>2</sup>范围内。Tikhomirov等<sup>[28]</sup>将DNA折纸与tile自组装相结合, 使用方形折纸作为tile单元组装出约半微米的方形阵列, 通过对阵列上可寻址的订书钉链进行修饰或扩展, 研究人员绘出了大公鸡和蒙娜丽莎的图像[图2(e)]。

单链模块组装技术(SST)是另一种克服骨架链限制的自组装方法。2012年, Yin的团队<sup>[4]</sup>设计了一种由42个碱基组成的单链基序, 该基序通过内部的4个结合域与其他tile杂交, 从而生成更大的分子画布。从画布中选出所需图案对应的单链基序即可完成复杂形状的自组装。他们使用这种方法构建出100多种形状, 如汉字、数字、字母等[图2(f)]。2020年, Yan课题组<sup>[5]</sup>发展出一种亚微米尺度的6HB DNA折纸纳米结构(meta-DNA), 并将其作为tile组装出长度大于5 μm的带状结构。

## 1.2 3D DNA纳米结构

1991年, Seeman课题组<sup>[7]</sup>构建了一种共价闭合的DNA立方体结构[图3(a), 左], 该结构的每个面都由一个单链环状分子弯折构成, 并与邻面单链互补配对, 这是DNA纳米结构领域构建的第1个3D结构。类似地, Goodman<sup>[35]</sup>利用4条不同的三段式单链DNA, 由面及体构建出了一个四面体结构[图3(a), 中]。1994年, Seeman课题组<sup>[36]</sup>又报道了一个截断的八面体结构[图3(a), 右], 该八面体以四臂结作为顶点, 通过邻近臂的黏性末端相互连接形成立体结构。随后, Mao课题组<sup>[37, 39-40]</sup>通过改变三臂、五臂和六臂结的臂长度、角度以及方向, 组装出了更多的DNA三维立体结构[图3(b)]。

随着DNA折纸技术的快速发展, 研究人员利用DNA折纸构建出了更复杂的3D结构。2009年, Shih团队开发了多层折纸技术, 该技术在相邻3个

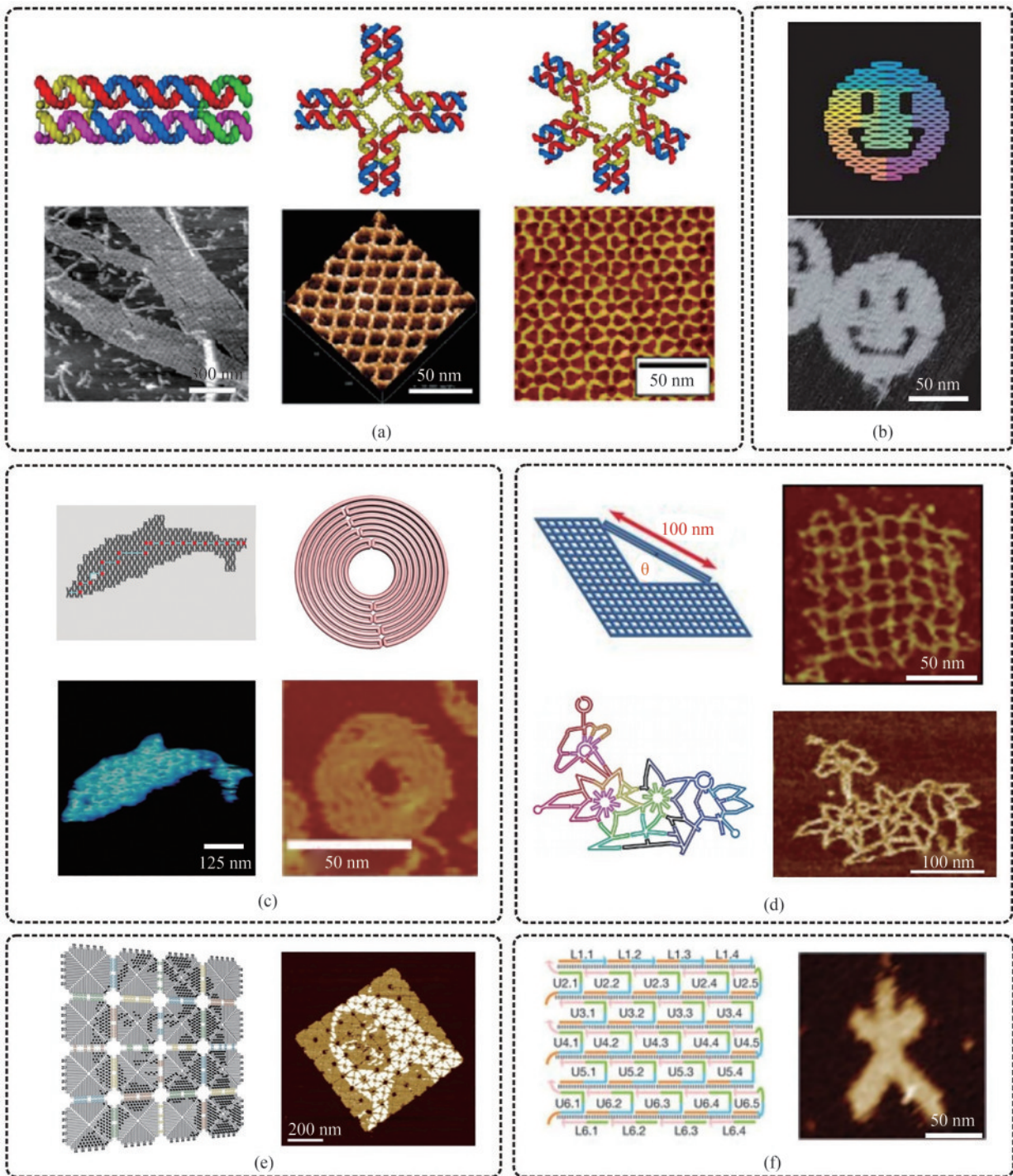


图2 2D DNA 纳米结构<sup>[3-4, 23-28]</sup>

(a) DNA tile: DX (DNA Double Crossover) (左),  $4 \times 4$  tile (中),  $6 \times 4$  tile (右) 以及这些结构所构建的二维阵列图像 (下)<sup>[23]</sup>; (b) 二维 DNA 折纸笑脸<sup>[3]</sup>; (c) 不对称的海豚折纸<sup>[24]</sup> 和具有曲率的同心圆折纸<sup>[25]</sup>; (d) 用四臂连接构建的网格折纸<sup>[26]</sup> 和用多臂连接构建的花鸟图案<sup>[27]</sup>; (e) 以折纸作为tile构建的蒙娜丽莎图像<sup>[28]</sup>; (f) 单链模块自组装技术构建的汉字<sup>[4]</sup>

Fig. 2 2D DNA nanostructures<sup>[3-4, 23-28]</sup>

(a) DNA tile: DX (DNA Double Crossover) (left),  $4 \times 4$  tile (center),  $6 \times 4$  tile (right) and the images of 2D arrays constructed from these structures (bottom)<sup>[23]</sup>; (b) 2D DNA origami smiley face<sup>[3]</sup>; (c) Asymmetric dolphin-like DNA origami<sup>[24]</sup> and concentric circle origami with curvature<sup>[25]</sup>; (d) Grid origami constructed by four-arm junctions<sup>[26]</sup> and bird and flower patterns constructed by multi-arm junctions<sup>[27]</sup>; (e) Mona Lisa image constructed with origami as a tile<sup>[28]</sup>; (f) Synthesized Chinese characters constructed by Single Strand Tile (SST) self-assembly strategy<sup>[4]</sup>

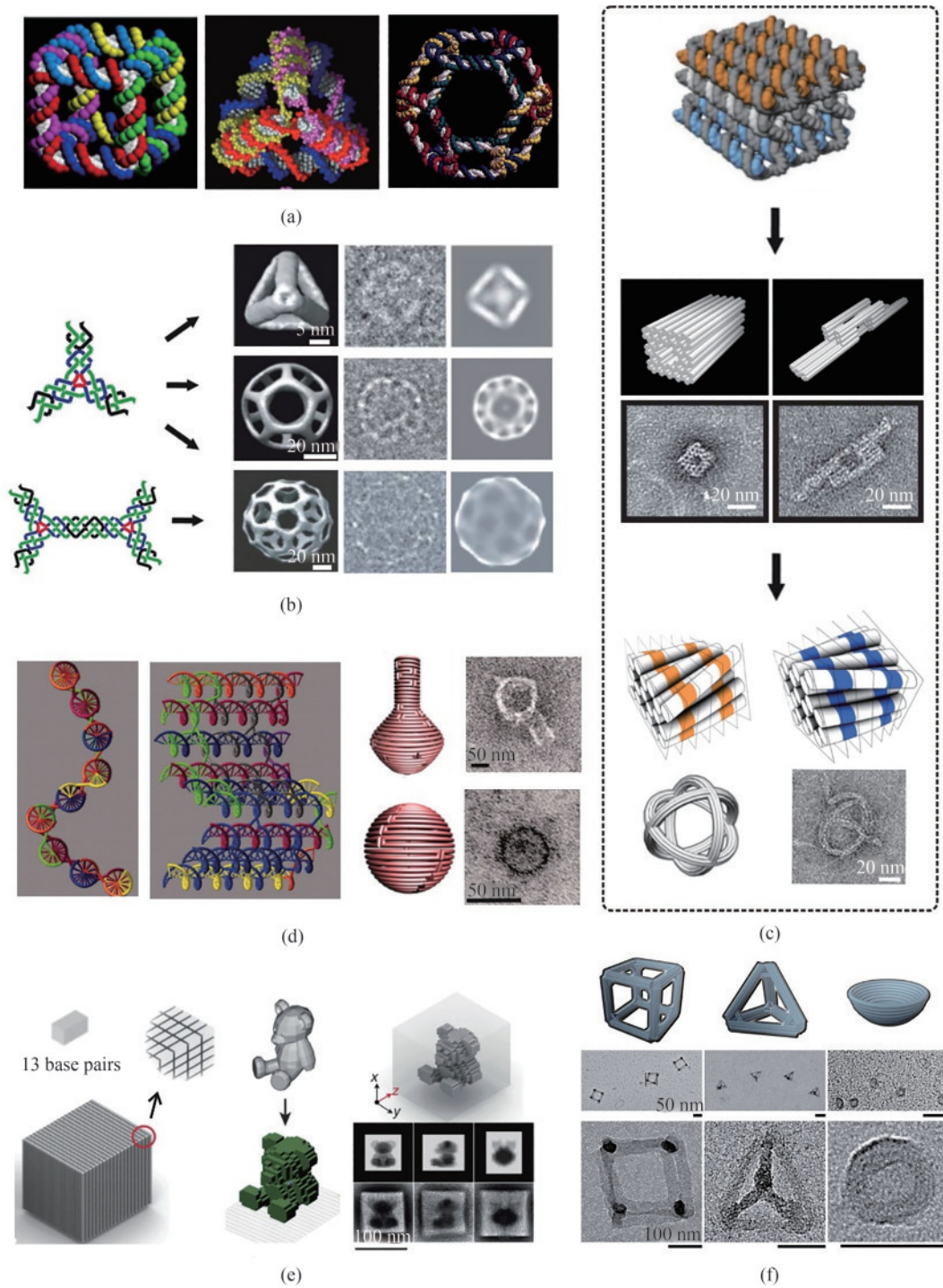


图3 3D DNA 纳米结构 [7, 11-12, 14, 25, 35-38]

(a) DNA 立方体 [7] (左), DNA 四面体 [35] (中), 截断的 DNA 八面体 [36] (右); (b) 利用 *N* 臂结构构建的多面体 [37]; (c) 基于蜂窝状褶皱折纸策略构建的方形螺母和轨道桥 [11] (上), 通过对蜂窝晶格进行碱基对插入和删除而构建的沙滩球 [12] (下); (d) 在不同平面引入二面角 (左), 3D 纳米烧瓶和球壳 (右) [25]; (e) 单链自组装策略合成的 3D 泰迪熊 [14]; (f) 硅化的各种框架核酸 [38]

Fig. 3 3D DNA nanostructures [7, 11-12, 14, 25, 35-38]

(a) DNA cube [7] (left), DNA tetrahedron [35] (center), DNA-truncated octahedron [36] (right); (b) DNA polyhedra constructed by *N*-arms junctions [37]; (c) Square nut and railed bridge built based on honeycomb-pleated DNA origami strategy [11] (top), beachballs constructed by base pair insertions and deletions in the honeycomb lattice [12] (bottom); (d) Introduction of dihedral angles between adjacent planes (left), 3D nanoflask and sphere (right) [25]; (e) Single strand tile self-assembly strategy for synthesizing 3D Teddy bear [14]; (f) Various siliconized framework nucleic acids [38]

DNA螺旋间引入 Holliday 交叉使螺旋平行多层堆叠, 以此为基础, 研究人员构建了一系列尺寸在 10~100 nm 之间并且截面类似蜂窝状晶格的 3D 纳米结构, 例如摩洛哥石、方形螺母、轨道桥<sup>[11]</sup> [图 3(c), 上]。在此基础上, 他们进一步构建了具有精确曲率的 3D 扭曲结构, 如沙滩球或方形齿轮<sup>[12]</sup> [图 3(c), 下]。为了摆脱晶格的束缚来更精细的调控曲率, Yan 实验室<sup>[25]</sup> 利用交叉结构单元以特定的二面角连接多个不同半径的同心圆, 组装出了 3D 单层 DNA 纳米结构, 如球壳、椭圆壳和烧瓶 [图 3(d)]。Högberg 课题组<sup>[41]</sup> 将折纸技术与计算机辅助建模和算法相结合, 基于高度自动化布线算法合成了复杂的史丹福兔子, 并且其模型缩放比例可以任意调节。为了构建更大尺寸的结构, Yin 课题组<sup>[42]</sup> 将具有不同臂间角度的折纸三脚架单体作为 tile, 通过臂间连接组装成各类多面体, 其中六棱柱的边长达 100 nm, 分子量高达 60 MD。进一步地, 该课题组将 SST 组装模块从 2D tile 拓展至 3D brick, 构建出了分子量高达千道尔顿的 3D 泰迪熊和兔子模型<sup>[14]</sup> [图 3(e)]。为了明确 DNA 纳米结构的功能性, 2018 年 Fan 课题组<sup>[16]</sup> 提出了“框架核酸”这一概念, 指出框架核酸是一种近原子级分散的、能够以纳米级精度组织分子或纳米颗粒、物理化学性能异于单链或双链 DNA 的新型核酸 [图 3(f)]。

## 2 动态 DNA 纳米结构

随着 DNA 自组装技术的发展, 研究人员构建了越来越多结构精巧的 DNA 纳米结构并对其进行功能化设计, 使其与刺激-响应模块相结合组装出动态 DNA 纳米结构, 例如 DNA 步行器、DNA 纳米镊子、DNA 纳米时钟和纳米涡轮机等。这些动态纳米结构可对两类刺激产生响应: 一类是基于不同互补链之间结合能的差异; 另一类是环境刺激如离子、电、热、光信号等。本节将重点介绍基于上述两种刺激驱动力的 DNA 纳米结构的动态变构。

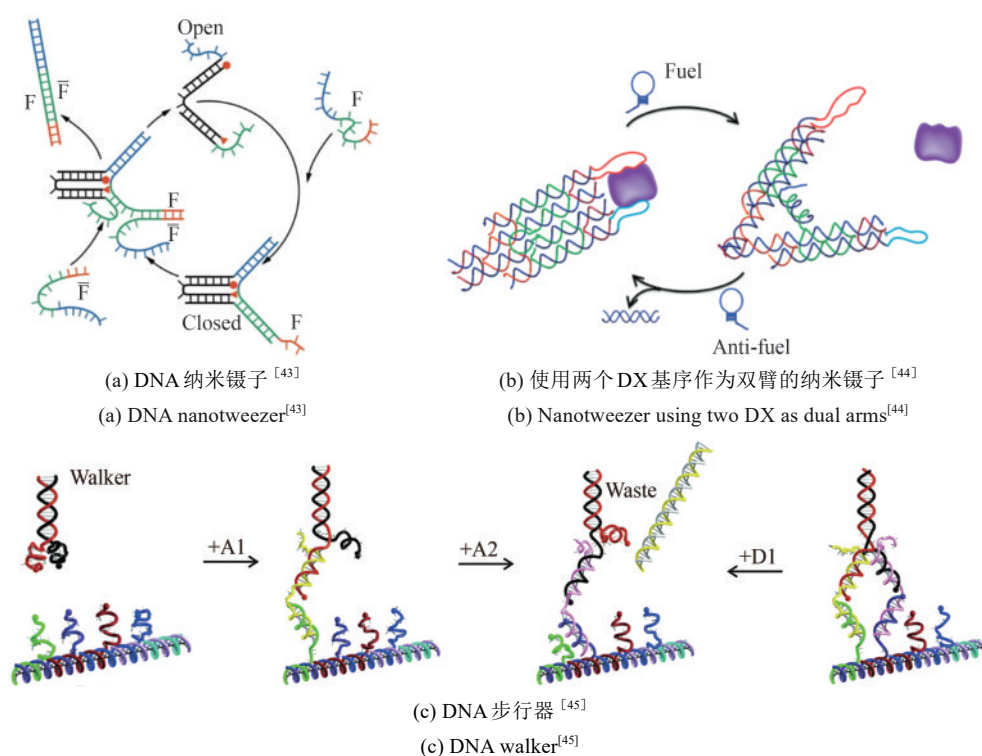
### 2.1 链置换驱动力的动态变构

2000 年 Yurke 等<sup>[43]</sup> 基于 toehold 介导的链置换

反应 (toehold-mediated strand displacement, TMSD) 构建了一个可开合的 DNA 镊子 (DNA tweezer) [图 4(a)]。该纳米镊子由三条单链 DNA 构成, 其中一条单链 DNA 两端修饰有荧光分子和猝灭基团, 并且两端的序列与另外两条单链的一半碱基序列互补配对, 构成镊子的双臂。该单链中间柔性的未配对碱基可发生弯曲, 溶液中添加“燃料链”与两条单链的游离未杂交部位结合后, 镊子随之关闭。此时, 燃料链剩余一小段单链 DNA (toehold), 可与具有更大结合能的互补链杂交, 燃料链从 DNA 镊子中被置换出来从而驱动 DNA 镊子的再次打开。在上述过程中镊子的开合介导了荧光基团的发光和猝灭。为了提高 DNA 镊子的刚性并且更好地控制镊子两臂之间的距离, Zhou 等<sup>[44]</sup> 用 Holliday 结连接的两个 DX 基序替代镊子中 DNA 双螺旋臂, 并在镊子内部引入了茎环结构, 通过加入和置换燃料链驱动茎环与双螺旋结构的相互转换, 从而驱动纳米镊子的开合 [图 4(b)]。除了荧光基团, 镊子末端还可偶联酶与辅因子<sup>[46]</sup> 或级联酶分子<sup>[47]</sup>。基于 DNA 链置换反应, 研究人员还开发了 DNA 步行器。DNA 步行器是一种能够沿特定方向长距离移动的动态 DNA 纳米结构。Shin 和 Pierce<sup>[45]</sup> 模拟驱动蛋白设计了一种双足 DNA 步行器。该步行器以燃料链作为桥梁与双链 DNA 轨道上伸出的 4 条单链分支连接。在该体系中引入燃料解离链来介导链置换反应能够驱动步行器的单链脚脱离轨道链并继续向前移动 [图 4(c)]。

### 2.2 环境刺激驱动力的动态变构

除了由链置换提供驱动力, DNA 纳米结构还可由环境刺激因素驱动其实现纳米尺度的运动。例如, DNA 步行器可利用酶蛋白驱动或利用环境中的  $Mg^{2+}$  驱动进行更快速的移动<sup>[48-49]</sup>。Cheng 等<sup>[50]</sup> 利用酶蛋白驱动 DNA 步行器沿三维轨道运动, 他们将步行器与轨道链固定在纳米金颗粒 (AuNP) 表面形成球形核酸, 借助核酸内切酶驱动步行器在 3D 轨道上行走 [图 5(a)]。Xin 等<sup>[51]</sup> 设计了一种可以定向和可逆 360° 旋转的等离子体纳米时钟, 在该设计中,  $Mg^{2+}$  能够激活 DNAzyme 对 RNA 的切割作用并驱动纳米时钟的自主旋转

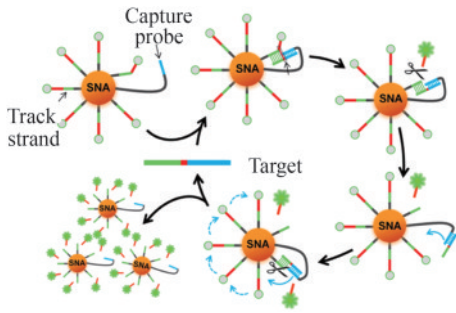
图4 链置换驱动的动态变构<sup>[43-45]</sup>Fig. 4 Dynamic configurations of DNA driven by strand displacement<sup>[43-45]</sup>

[图5(b)]。环境中的 $H^+$ 可驱动含 i-motif 结构单元的分子机器发生动态变构<sup>[55]</sup>。弱酸条件下，序列中半质子化的 C-C 碱基对嵌入反平行双链将其折叠成 i-motif 四链体结构<sup>[52]</sup>，在中性或碱性条件下碱基对则发生解离<sup>[18, 56]</sup> [图5(c)]。因此，该结构可用于构建 pH 驱动分子机器。Liu 等<sup>[53]</sup> 将 Cy3 和 Cy5 对修饰在 i-motif 上，随后将其与胆固醇修饰的四面体框架核酸 (tetrahedral DNA framework, TDF) 进行整合，利用 TDF 可被细胞内化的特性，进一步研究了由囊泡内弱酸环境驱动 TDF 变构产生荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 现象 [图5(e)]。金属离子也是 DNA 分子机器变构的重要驱动因素。富含鸟嘌呤 (G) 的核酸序列在金属离子的存在下，4 个 G 碱基两两之间形成氢键围成正方形片层，通过  $\pi-\pi$  堆积进而形成 G-四链体结构 (G-quadruplex, G4)<sup>[19, 52]</sup> [图5(d)]。Ueyama 等<sup>[57]</sup> 利用这一机理设计了一种分子马达，他们在富含 G 碱基的核酸序列两端修饰了荧光团和猝灭剂，加入  $K^+$  后，无规则卷曲的核酸序列转变为 G4 结构，促使荧光团和猝灭基团彼此靠近发生猝灭。此外，光也可诱导 DNA 纳

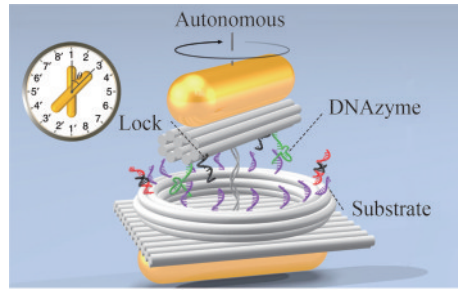
米结构发生构象变化。Kuzyk 等<sup>[54]</sup> 基于偶氮苯暴露于紫外光中会发生异构化的原理，设计了一个全光学控制的等离子体纳米系统。两个相连且角度可调的折纸束分别伸出两个分支，一个分支含偶氮苯修饰的寡核苷酸 (azo-ODN 1)，另一分支为互补链 azo-ODN 2。可见光条件下偶氮苯分子转化为反式，两分支杂交成 Azo-ODN 双链体进而将两个折纸束锁定。紫外照射后，此光响应段打开，使折纸束恢复松弛状态 [图5(f)]。

### 3 生物传感应用

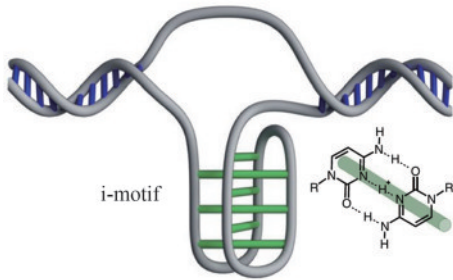
快速而灵敏地检测核酸、生物小分子和细胞等对于疾病诊断、药物设计等领域的发展至关重要。动态 DNA 纳米结构以核酸分子作为特异性识别元件，以各种功能性基团 (如蛋白质、荧光染料等) 作为刺激响应元件，结合多种信号放大策略用于构建灵敏的生物传感器。以下将从核酸、离子、小分子、蛋白质、细胞和细菌 6 种靶标的传感策略论述 DNA 纳米结构在生物传感中的应用。



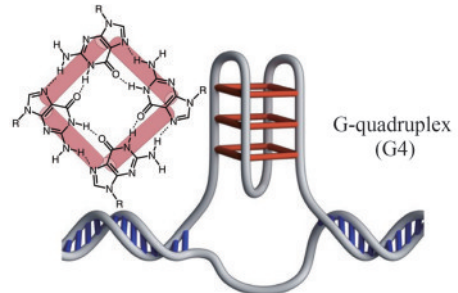
(a) 酶驱动的DNA步行器<sup>[50]</sup>  
 (a) Enzyme-driven DNA walker<sup>[50]</sup>



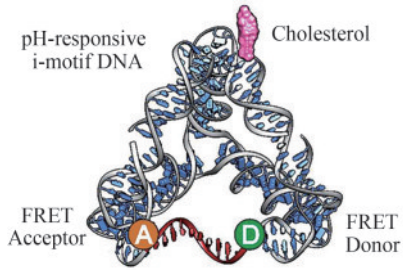
(b) DNA等离子体纳米时钟<sup>[51]</sup>  
 (b) DNA plasmonic nanoclock<sup>[51]</sup>



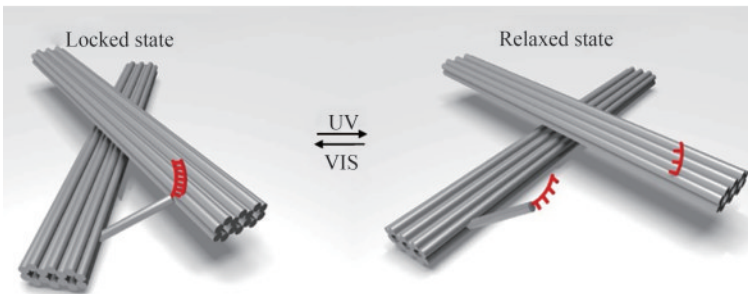
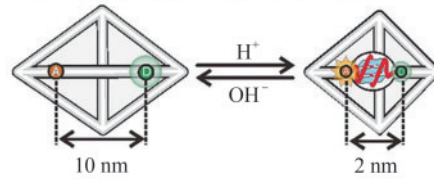
(c) i-motif结构<sup>[52]</sup>  
 (c) i-motif structure<sup>[52]</sup>



(d) G4结构<sup>[52]</sup>  
 (d) G-quadruplex structure<sup>[52]</sup>



(e) 可响应pH的DNA四面体结构<sup>[53]</sup>  
 (e) pH-responsive TDF structure<sup>[53]</sup>



(f) 光诱导的折纸纳米结构构象变化<sup>[54]</sup>  
 (f) Light-induced conformational changes of origami nanostructures<sup>[54]</sup>

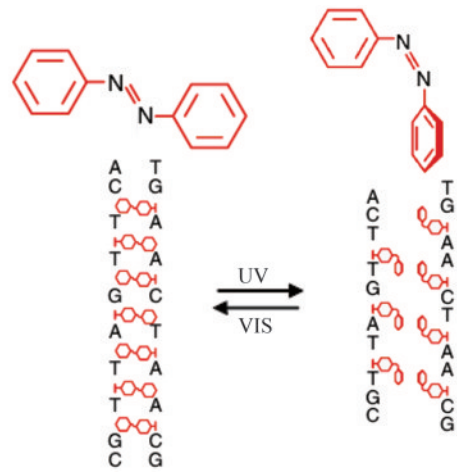


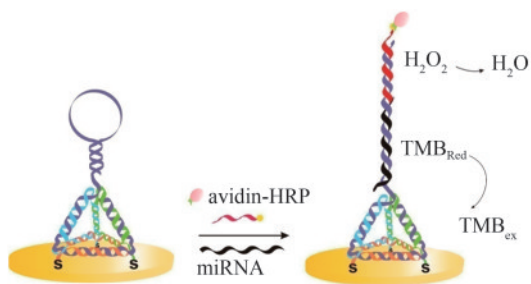
图5 环境刺激驱动的动态变形<sup>[50-54]</sup>  
 Fig. 5 Dynamic deformation of DNA driven by environmental stimuli<sup>[50-54]</sup>

### 3.1 核酸传感

核酸 (DNA 和 RNA) 是生物体内一类重要的大分子, 实现对核酸的灵敏检测对疾病诊断有重要意义<sup>[58]</sup>。血液中循环肿瘤 DNA、细胞质中成熟的 mRNA 或 miRNA、病毒基因组、突变基因等都可作为疾病监测的重要标志物<sup>[59-61]</sup>。

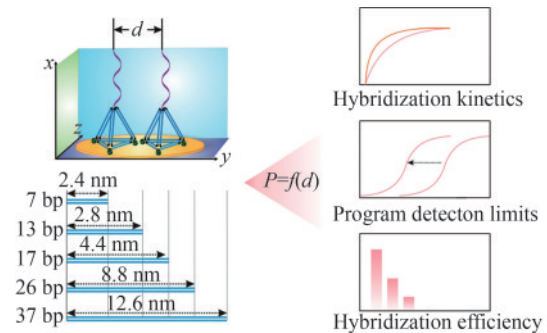
Lin 等<sup>[62]</sup> 开发了一种基于 TDF 的电化学传感器, 通过金-硫键将茎环探针修饰的 TDF 固定于金电极表面。此传感器改善了界面上拥挤效应导致的探针缠绕, 提高了探针对溶液中靶分子的可及性, 可检测 1 fmol/L 的 miRNA-141 [图 6(a)]。类似地, Wang 等<sup>[68]</sup> 利用电极表面的 TDF 探针和酶扩增技术, 在存在 1000 倍过量的未甲基化等位基因的情况下, 实现了低至 1 个甲基化 DNA 分子的鉴定。为了优化 DNA 杂交动力学和热力学, Zuo 课题组<sup>[63]</sup> 提出了一种可编程的“软光刻”策略设计电极界面, 即用不同大小的 TDF (TDF-7、TDF-13、TDF-17、TDF-26 和 TDF-37, 边长分别

为 2.4 nm、4.4 nm、5.8 nm、8.8 nm 和 12.6 nm) 修饰金电极, 实现 DNA 传感器检测限 (limit of detection, LOD) 的可编程调控, 极大提高了传感器的识别效率和检测速度 [图 6(b)]。为了进一步提高检测灵敏度, 研究人员在传感体系中引入了杂交链式反应 (hybridization chain reaction, HCR)、滚环扩增技术 (rolling circle amplification, RCA) 等信号策略。例如 Miao 等<sup>[64]</sup> 将 HCR 引入 TDF 电化学传感器检测 miRNA。在该研究中, TDF 上的发夹结构被靶标 miRNA 打开后可捕获由互补单链 DNA (HCR-H0) 修饰的 AuNP, AuNP 上其他的 HCR-H0 与银纳米颗粒 (AgNP) 上的 HCR-H1 和 H2 发生 HCR 进行信号放大, 该传感器的 LOD 降低至 2 amol/L [图 6(c)]。RCA 是另一种常用的等温扩增技术, Liu 等<sup>[69]</sup> 采用 RCA 和酶促反应双重放大策略对甲基化 DNA 进行了超灵敏检测。甲基化 DNA 与线性锁环探针杂交形成环状锁环探针, 进而与 TDF 上的探针结合启动级联 RCA 反应, 生成的大量 G4 与血红素结合引发酶促反应。此系统



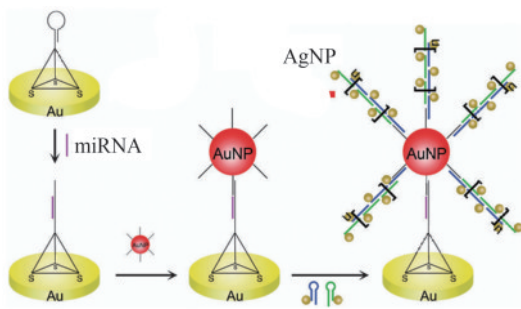
(a) 利用 TDF 探针检测 miRNA-141<sup>[62]</sup>

(a) TDF probes for detection of miRNA-141<sup>[62]</sup>



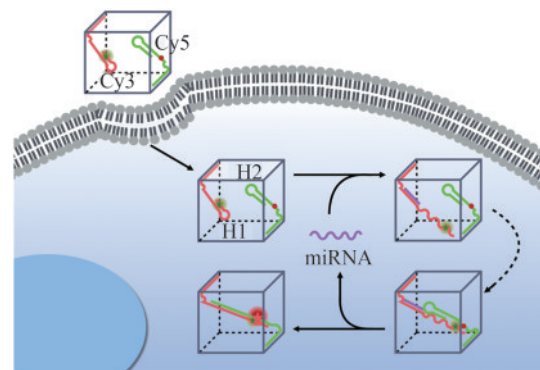
(b) 使用“软光刻”策略设计电化学传感器表面<sup>[63]</sup>

(b) A “soft lithography” approach to engineer the interface of electrochemical sensors<sup>[63]</sup>



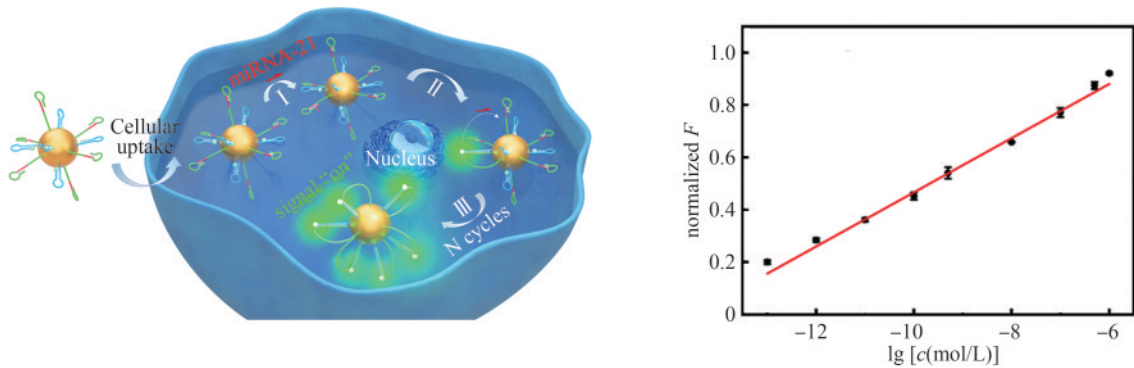
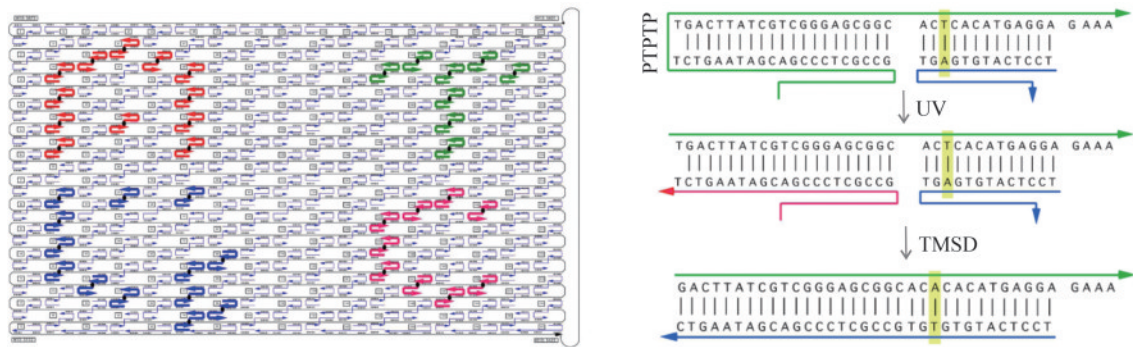
(c) 采用杂交链式反应 HCR 放大策略检测 miRNA<sup>[64]</sup>

(c) Detection of miRNAs using the HCR (Hybridization Chain Reaction) amplification strategy<sup>[64]</sup>



(d) 检测 miRNA 的纳米立方体<sup>[65]</sup>

(d) DNA nanocubes for detection of miRNA<sup>[65]</sup>

(e) 超快双层3D DNA纳米传感器<sup>[66]</sup>(e) Ultrafast dual-layer 3D DNA nanosensor<sup>[66]</sup>(f) 可视化检测单核苷酸多态性SNP的DNA折纸<sup>[67]</sup>(f) DNA origami for visual detection of SNP (Single Nucleotide Polymorphism)<sup>[67]</sup>图6 基于DNA纳米技术的核酸传感<sup>[62-67]</sup>Fig. 6 Nucleic acids sensing based on DNA nanotechnology<sup>[62-67]</sup>

可以实现低至 0.1 fmol/L 甲基化 DNA 的超灵敏检测。

为了实现对细胞、活体等的实时检测及原位成像, 研究人员开发了基于光学技术的DNA纳米传感器。Liu等<sup>[65]</sup>开发了一种具有核酸酶抗性的DNA纳米立方体探针, 用于活细胞中的miRNA的检测。具体来说, 研究人员将FRET对标记在立方体内部的两个亚稳态发夹上, 靶标miRNA可与两个发夹序列互补形成双链, 使FRET对接近发生荧光共振能量转移 [图6(d)]。该设计有效避免了荧光探针受核酸酶消化、蛋白质结合等因素影响而导致的假阳性。为了提高对miRNA的多元检测能力, Wang等<sup>[70]</sup>将多色荧光纳米探针固定在TDF的3个顶点上, 实现了对活细胞中3种肿瘤相关miRNA的同时检测。为了提高检测的速度和灵敏度, Meng等<sup>[66]</sup>设计了一种基于催化发夹组装(catalytic hairpin assembly, CHA)的超快双层3D DNA纳米机器。该机器利用AuNP上外层长发夹

捕获miRNA, 长发夹打开并触发内层多个短发夹依次发生CHA, 短发夹末端修饰的荧光团随之远离AuNP而发出荧光, 从而实现miRNA的检测。同时, miRNA可以脱落继续打开其他的长发夹。该纳米机器在3 min内即可完成检测, LOD低至45.2 amol/L [图6(e)]。此外, 量子点<sup>[71-72]</sup>、上转换纳米粒子<sup>[73]</sup>、氧化石墨烯<sup>[74]</sup>等纳米材料作为荧光猝灭基团或FRET供体也表现出了显著优势, 例如更高的能量传输效率、更长的工作距离以及更低的颜色信号串扰等, 研究人员将上述纳米材料与DNA纳米结构耦合构建的传感器实现了更灵敏、更快速的核酸检测<sup>[75-77]</sup>。

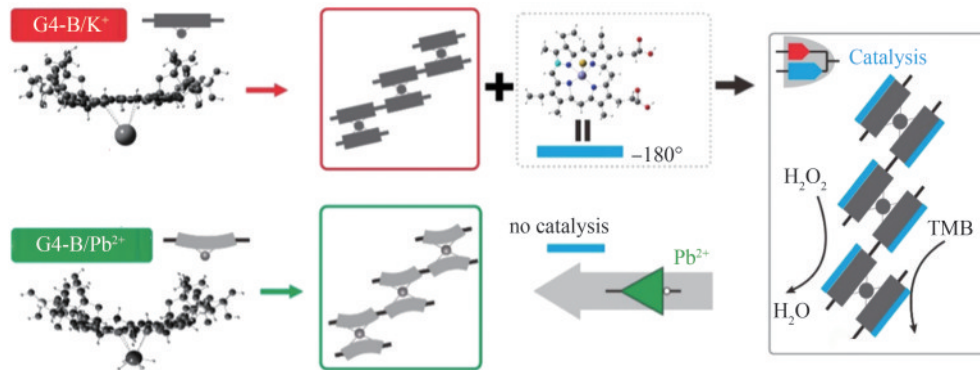
将可探测表面形貌的AFM与具有可寻址性和形状可控性的DNA折纸相结合, 研究人员设计了探测单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的可视化检测体系<sup>[78-79]</sup>。Seeman团队<sup>[67]</sup>设计了一种能够可视化检测SNP的矩形DNA折纸, 在该设计中, 包含不同核苷酸信息的订书钉链呈

现发夹样结构，发夹结构从折纸表面突出从而在AFM下显示出A、T、G、C碱基样图案。经紫外切割后，靶核苷酸片段基于TMSD释放突出链[图6(f)]。由于TMSD具有高度序列依赖性，靶标一旦出现碱基错配，即可终止链置换，因此该设计可以在AFM和计算机辅助下精确读出SNP中包含的碱基信息。为了提高SNP检测灵敏度，Fan课题组<sup>[80]</sup>自组装了一组DNA折纸作为形状ID，在AFM下能够以10 nm (30 bp)的分辨率对人类基因组DNA进行分型<sup>[81]</sup>，利用该方法，研究者实现了乙肝病毒的分型。

### 3.2 离子传感

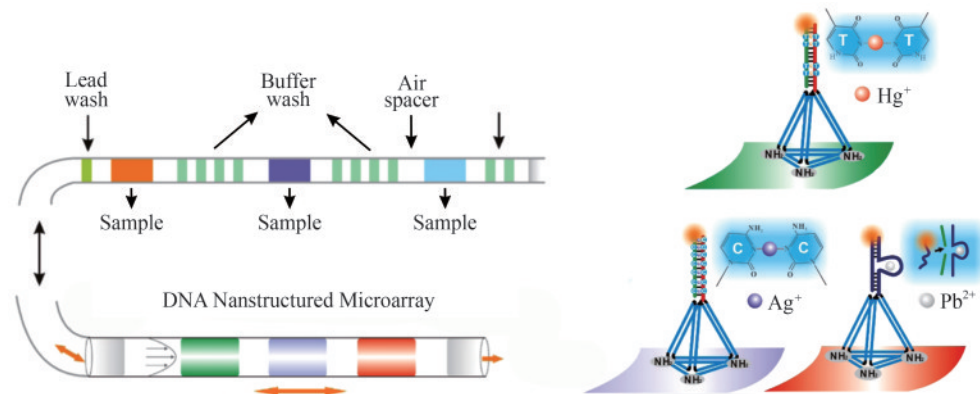
离子在人体中发挥重要的作用，是维持酶的功能、基因表达以及内环境稳定不可或缺的物质<sup>[82-84]</sup>。目前，用于组装金属离子传感器的DNA结构主要包括金属依赖性的G4、DNAzyme和含错配碱基对的T-Hg<sup>2+</sup>-T、C-Ag<sup>+</sup>-C。

富含G碱基的寡核苷酸序列可在金属离子的作用下转变为G4结构。在众多金属阳离子中，Pb<sup>2+</sup>作用下形成的G4结构最稳定<sup>[85-87]</sup>。Zhong等<sup>[88]</sup>基于此原理开发了高灵敏度和特异性检测Pb<sup>2+</sup>的人工酶水凝胶。在该设计中，Pb<sup>2+</sup>取代G4水凝胶中的K<sup>+</sup>能够使G4构象变得更为紧凑，其中的血红素得以释放，导致水凝胶的酶活性丧失。此传感器Pb<sup>2+</sup>的检测限可低至0.32 pmol/L [图7(a)]。为了实现重金属离子Pb<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>和Ag<sup>+</sup>的同时检测，Qu等<sup>[89]</sup>分别将Pb<sup>2+</sup>特异性DNAzyme、富含碱基T或碱基C的寡核苷酸链作为检测探针悬垂在不同TDF的顶点上，TDF有序地组装在三维管状微通道表面，且在管道内采用气泡介导的穿梭反应，大大缩短了检测时间，提高了靶标捕获效率[图7(b)]。为了提高检测的便捷性和实用性，Chen等<sup>[92]</sup>结合横向流动技术制作了可目视检测Hg<sup>2+</sup>的一次性便携试纸条，在该设计中，单链DNA发夹含T末端通过T-Hg<sup>2+</sup>-T与另一条链形成



(a) 检测Pb<sup>2+</sup>的人工酶水凝胶<sup>[88]</sup>

(a) Artificial enzyme hydrogel for detection of Pb<sup>2+</sup><sup>[88]</sup>



(b) 用TDF编码微通道同时检测多种重金属离子<sup>[89]</sup>

(b) Multiple detection of metal ions in TDF-encoded microchannels<sup>[89]</sup>

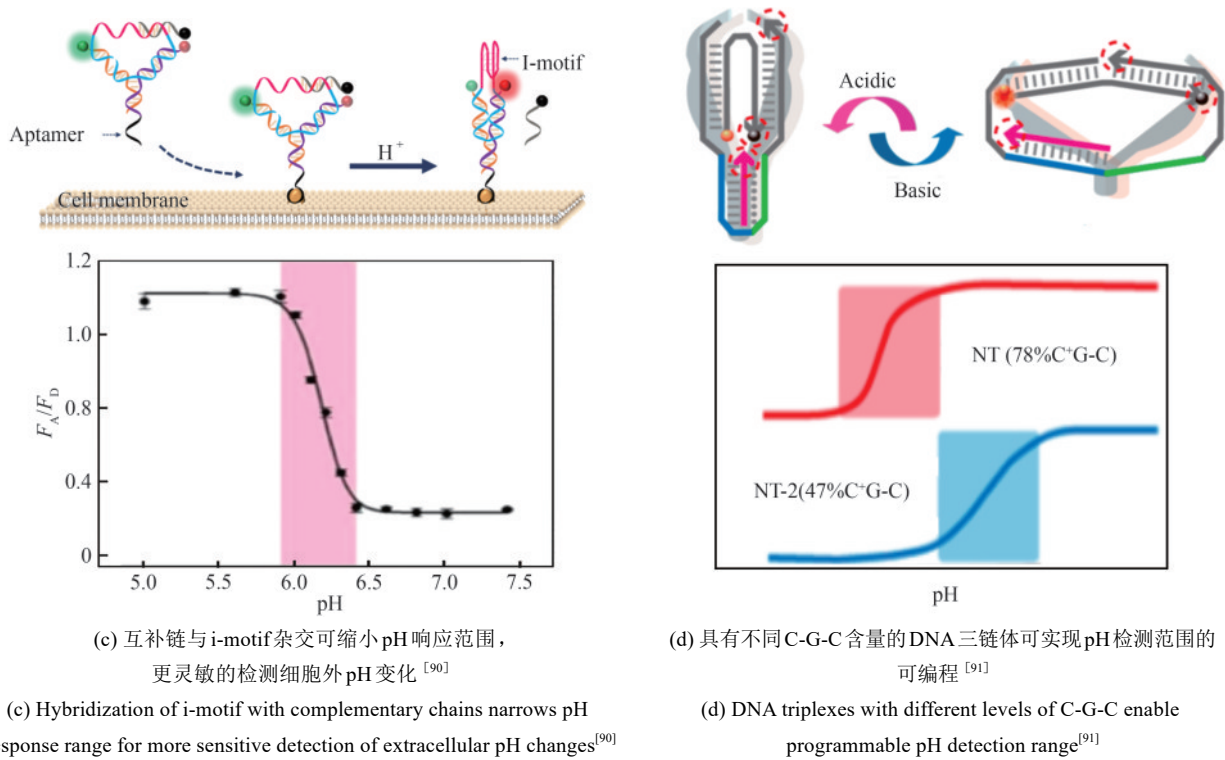


图7 基于DNA纳米技术的离子传感<sup>[88-91]</sup>

Fig. 7 Ion sensing based on DNA nanotechnology<sup>[88-91]</sup>

双链结构后可被核酸外切酶 III 识别，切割生成的单链 DNA 以金纳米颗粒作为示踪剂，进而肉眼即可读出低至 1 pmol/L 的痕量  $Hg^{2+}$ 。

pH 传感器主要依赖于  $H^+$  敏感荧光素和一些含有特定质子化位点的 DNA 二级结构，如 i-motif、三链体、a-motif。FAM 是一种  $H^+$  敏感性染料，可用于 pH 检测，但易出现自猝灭现象<sup>[93-95]</sup>。Weizmann 团队<sup>[96]</sup> 和 Tang 团队<sup>[97]</sup> 分别使用周期性的 DNA 纳米带和大小可编程的 TDF 实现了 FAM 分子的空间分隔，有效防止了染料聚集引起的荧光猝灭，实现了细胞内 pH 的检测。为了探测动物体内深层组织细胞的 pH，Zhao 等<sup>[98]</sup> 利用上转换纳米粒子将能够穿透组织的近红外光转变为紫外光，紫外光可以切割锁定 i-motif 序列的互补链，进而使 i-motif 折叠发出荧光。细胞外 pH 传感对于肿瘤的诊断以及治疗具有重要意义。但经典 i-motif 基序 pH 响应范围较宽泛，缺乏灵敏性<sup>[99-100]</sup>。鉴于此应用需要，Chen 等<sup>[90]</sup> 引入适配体作为癌细胞膜的锚定元件，引入互补链与 i-motif 杂交使 pH 响应范围缩小至 0.5 个单位，从而敏感地捕捉到肿瘤细胞外 pH 的变化 [图 7(c)]。为了实现细胞外 pH 的实时监测，Liu

等<sup>[91]</sup> 将 pH 响应更迅速的 DNA 三链体和 3 种胆固醇嵌入 DNA 纳米镊子中。稳固锚定在细胞表面的纳米镊子通过双链-三链的转换实现开合而产生荧光发射和猝灭效应 [图 7(d)]。该传感器的 pH 窗口可由 C-G-C 含量来调节，检测范围在 6.0~7.7 和 4.4~6.0 之间。为了将 pH 响应区间降至更低水平，Saha 等<sup>[101]</sup> 研发了一种基于 a-motif 和 AuNP 的比色 pH 传感器。在  $pH < 5$  时，a-motif 序列可在毫秒级时间内进行 AH-HA 碱基配对使其从单个右旋螺旋转变成一个双螺旋平行链<sup>[102-104]</sup>。这种结构转换可介导 AuNP 聚集而发生光学特性的变化进而实现对  $H^+$  的检测。此外，通过调控 a-motif 的长度和顺序，可实现对传感器 pH 响应范围 (2~5.5) 的调节。

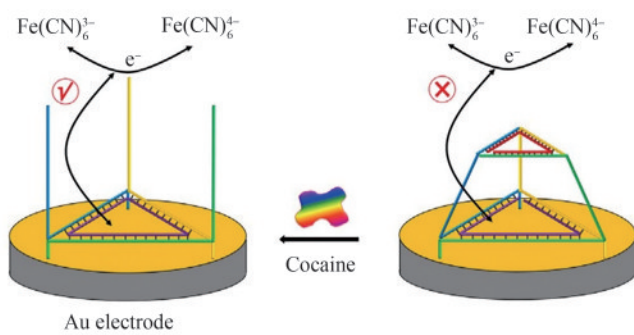
### 3.3 小分子传感

人体中内源性小分子如葡萄糖、ATP 等参与机体重要的生理过程，其含量的变化往往与机体代谢密切相关<sup>[105-106]</sup>。对血液中的某些非内源性小分子如可卡因、乙醇的检测是执法和临床诊断中必不可少的环节。

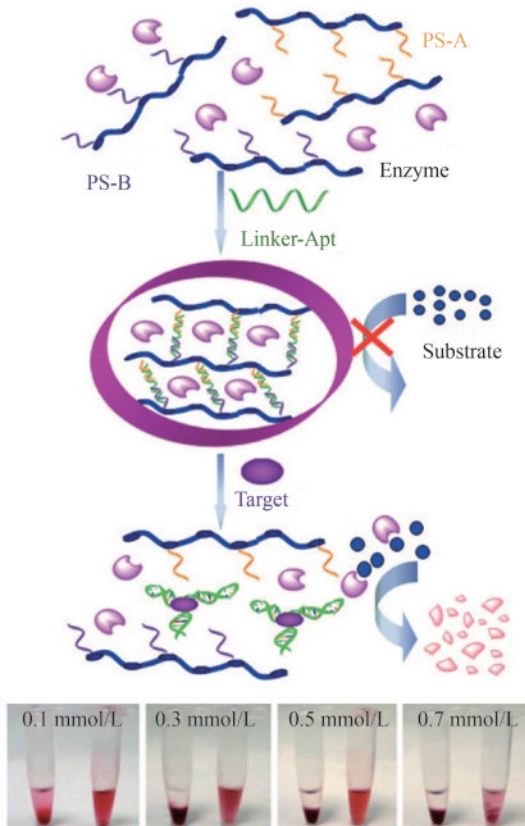
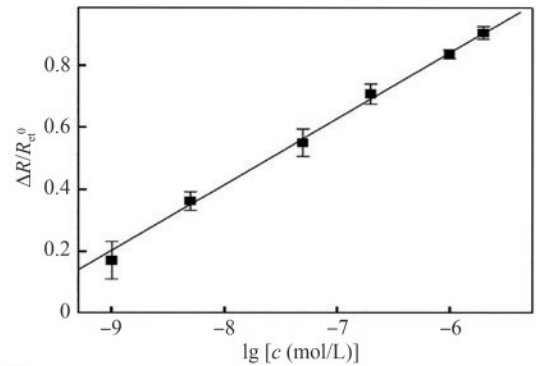
Sheng 等<sup>[107]</sup>设计了一种DNA三角锥台(triangular pyramid frustum, TPF)结构, 其中的组成链包含可卡因的适配体序列, 可卡因与其结合后使TPF坍塌只剩下一个固定于金电极表面的等边三角形, 该结构变化诱使电子指示剂 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 发生电子转移进而产生电化学信号。在该研究中, 可卡因的LOD可低至0.21 nmol/L [图8(a)]。Zhu 等<sup>[108]</sup>开发了一个肉眼可视化检测可卡因的比色传

感平台, 该传感平台由适配体交联形成的水凝胶组装而成, 在可卡因的存在下水凝胶解链触发酶的释放, 10 min内即可观察到颜色变化 [图8(b)]。研究人员以类似的原理采用纳米金颗粒作为指示剂实现了腺苷和葡萄糖的检测, 检测限分别为50  $\mu\text{mol/L}$ 和0.44 mmol/L<sup>[111-112]</sup>。

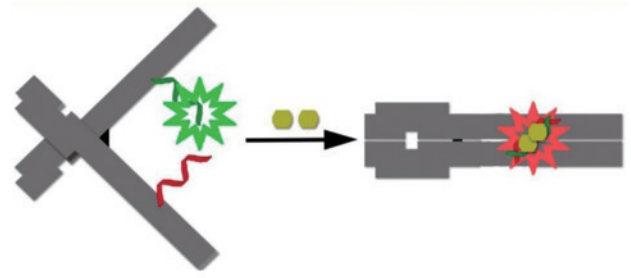
Meng 等<sup>[113]</sup>基于Y形DNA设计了一种DNA树状大分子, 并在其中分别掺入了组氨酸依赖性



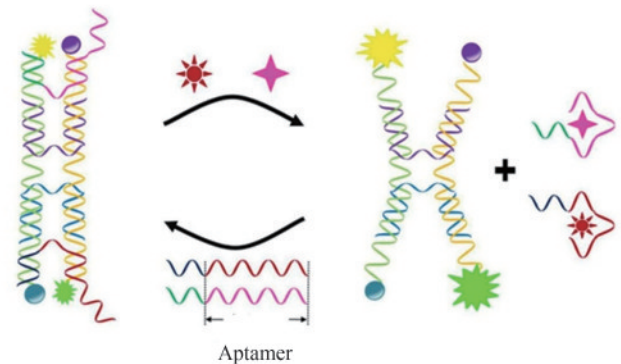
(a) 检测可卡因的TPF<sup>[107]</sup>  
(a) TPF for detection of Cocaine<sup>[107]</sup>



(b) 检测可卡因的人工酶水凝胶<sup>[108]</sup>  
(b) Artificial enzyme hydrogel for detection of Cocaine<sup>[108]</sup>



(c) 检测ATP的DNA纳米镊子<sup>[109]</sup>  
(c) DNA nanotweezer for detection of ATP<sup>[109]</sup>



(d) 同时检测AFB1和OTA的双纳米镊子<sup>[110]</sup>  
(d) Simultaneous detection of AFB1 and OTA by dual DNA nanotweezers<sup>[110]</sup>

图8 基于DNA纳米技术的小分子传感<sup>[107-110]</sup>

Fig. 8 Small molecules sensing based on DNA nanotechnology<sup>[107-110]</sup>

DNAzyme 和 ATP 适配体。当组氨酸或 ATP 存在时, Y 形 DNA 中含有荧光基团的链释放, 猝灭效应消除, 增强的荧光信号可反映组氨酸或 ATP 的浓度。为了降低非特异性荧光导致的检测结果假阴性, Walter 等<sup>[109]</sup>利用 DNA 和 RNA “红绿灯”效应开发了一种检测 ATP 的 DNA 纳米镊子。该设计将花青-苯乙炔染料修饰的 ATP 分离适配体分别组装到 DNA 纳米镊子的两臂, 2 分子 ATP 与其结合后, 纳米镊子关闭, 荧光由绿色转变为红色, 通过计算双色荧光比率和在 AFM 下观察的纳米镊子开合比率可实现 ATP 超灵敏检测 [图 8(c)]。

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 和赭曲霉毒素 A (OTA) 为真菌代谢物, 对人类和动物健康产生严重威胁。Xiong 及其同事<sup>[110]</sup>设计了一种双 DNA 纳米镊子, 实现了对 AFB<sub>1</sub> 和 OTA 的同时检测。在该设计中, 双纳米镊子由 6 条 DNA 链构成, 其中两条链分别包含 AFB<sub>1</sub> 和 OTA 的适配体序列, 各与一个纳米镊子的两臂杂交使两臂锁定, 两臂的荧光基团和猝灭基团靠近发生荧光猝灭。AFB<sub>1</sub> 和 (或) OTA 存在时, 对应的锁定链与之结合从纳米镊子上脱离, 纳米镊子打开而恢复荧光 [图 8(d)]。双纳米镊子上 FRET 对的颜色不同, 因此可以实现两种物质的同时检测。为了提高检测灵敏度, Wang 等<sup>[114]</sup>采用 DNA 步行器和 HCR 双重放大策略检测 OTA, 将检测 OTA 的 LOD 降低至 3.3 fg/mL。

### 3.4 蛋白质传感

蛋白质是生命的功能分子, 执行多种细胞功能如免疫、催化、信息交流、物质运输等<sup>[115-117]</sup>。传统的蛋白质定量方法如 ELISA、蛋白质印迹等灵敏度受限, 检测限常在 ng/mL, 而基于 DNA 纳米结构的生物传感器可显著降低其检测限<sup>[118-120]</sup>。

DNA 纳米结构可对细胞和体液中的酶进行活性和含量测定。Zhou 等<sup>[121]</sup>开发了基于 TDF 的 DNA 甲基转移酶活性检测系统。在该系统中, 由 FRET 对标记的 TDF 作为甲基转移酶的底物经甲基化修饰后, 可被限制性核酸内切酶识别和切割, TDF 结构被破坏导致 FRET 效应关闭。该传感器可检测 0.045 U/mL 的甲基转移酶。Lammertyn 课题组<sup>[122]</sup>利用折纸结构可编程地功能化光纤表面等离子体共振传感器以检测凝血酶含量。该课题组设

计了两种 DNA 折纸, 通过精确调控凝血酶适配体的密度和适配体到传感器表面的距离, 适配体的方向和靶标可及性得到改善 [图 9(a)]。与 TDF 功能化的传感器相比, 基于此折纸结构的传感器分别表现出更宽的线性测量范围和更低的凝血酶检测限, 检测性能显著提升。

血液中的一些蛋白质如前列腺特异性抗原 (prostate specific antigen, PSA) 等作为特异性的癌症标志物常被用于肿瘤筛查、诊断和预后<sup>[126-128]</sup>。传统 ELISA 法蛋白质检测限较高, Yan 及其同事<sup>[123]</sup>在 ELISA 法的基础上, 在抗体与偶联酶之间引入由 RCA 产生的 DNA 纳米带。纳米带上每条订书钉链包含生物素修饰位点, 能够与亲和素-过氧化物酶偶联进行信号放大, 此传感器可检测低至 50 amol/L 的 PSA [图 9(b)]。但抗体存在成本高、稳定性低、制备耗时等缺点<sup>[129-131]</sup>, Taghdisi 等<sup>[132]</sup>利用 PSA 适配体代替抗体与磁珠连接, PSA 可置换出适配体的互补链进而触发 DNA 三棱柱的自组装, 双链特异性染料附着三棱柱后可发出强荧光。无 PSA 时体系内无三棱柱的合成, 溶液呈现弱荧光。该荧光传感器检测 PSA 的检测限为 30 pg/mL。为了进一步提高灵敏度, Hosseini 课题组<sup>[133]</sup>用 PSA 适配体桥连 Y 形 DNA 结构生成水凝胶, 积聚在水凝胶中的银纳米团簇经聚集诱导发射荧光强度增强。当 PSA 存在时, 其与适配体结合, 水凝胶溶解, 荧光强度降低。此传感器的检测限进一步下降至 4.4 pg/mL。

DNA 纳米结构还可用于各类细胞因子及其他疾病相关蛋白的检测。如研究人员利用发夹探针与干扰素- $\gamma$  的识别触发与其他两个荧光标记的发夹探针发生 nHCR, 以此实现信号放大, 将传感器对干扰素- $\gamma$  的检测限降低至 1.2 pmol/L<sup>[134]</sup>。为了检测 C 反应蛋白, Raveendran 等<sup>[124]</sup>构建了一个内部修饰有 C 反应蛋白适配体的同心方形折纸, C 反应蛋白可稳定结合在折纸空腔中, 该折纸通过纳米孔时产生特征电流, 基于这一结构设计的传感器检测 C 反应蛋白的 LOD 为 3 nmol/L [图 9(c)]。

外泌体是一种双层膜性小囊泡, 与人体发育、免疫、组织稳态、癌症等疾病密切相关<sup>[135-136]</sup>。目前对外泌体的检测主要是基于对外泌体表面特异性跨膜蛋白如 CD63 等的识别<sup>[137-139]</sup>。Feng 及其同

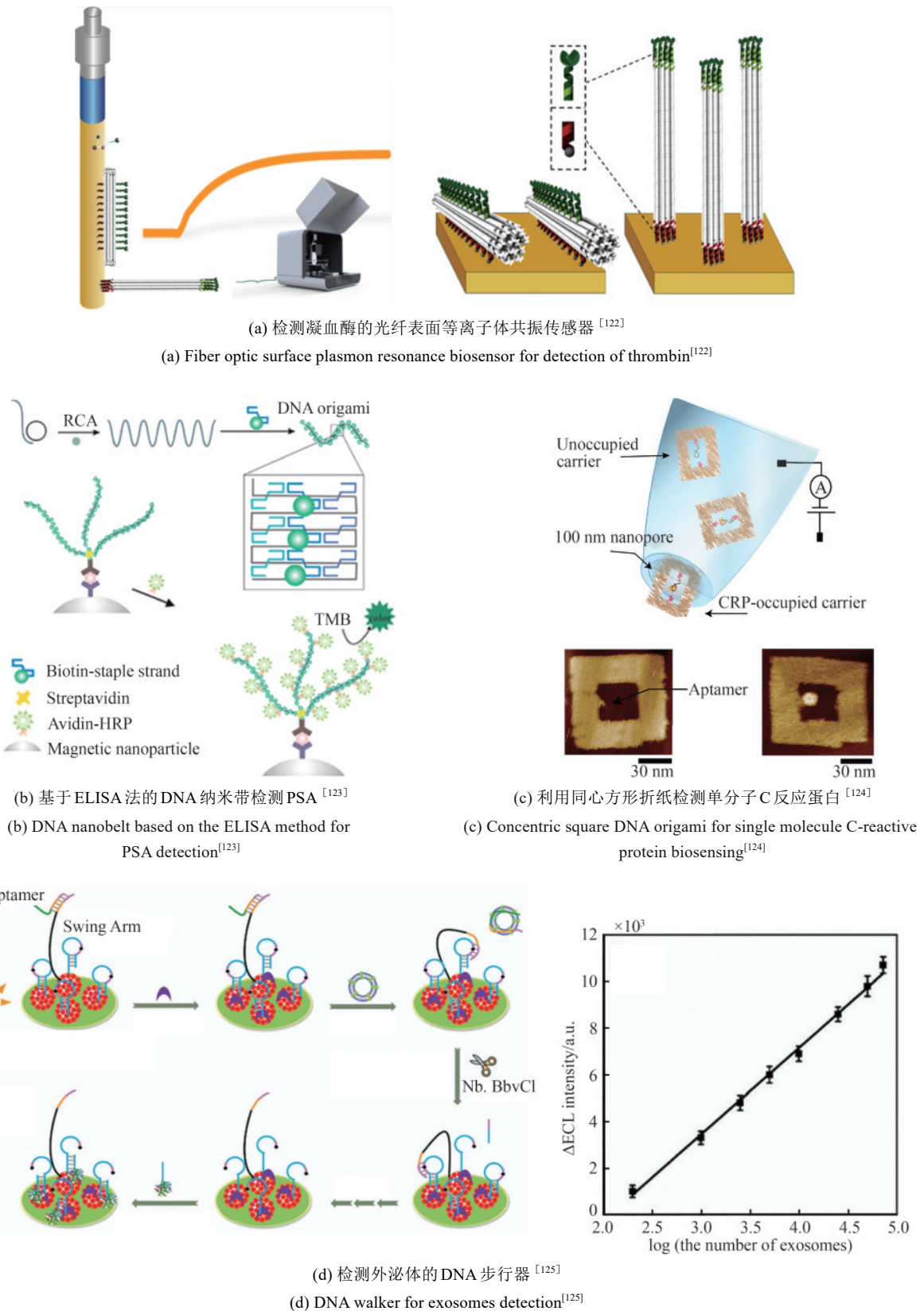


图 9 基于 DNA 纳米技术的蛋白质传感<sup>[122-125]</sup>

Fig. 9 Proteins sensing based on DNA nanotechnology<sup>[122-125]</sup>

事<sup>[125]</sup>在电极表面引入被CD63适配体锁定的步行器和发夹轨道，外泌体与CD63适配体结合后可释放步行器与发夹轨道部分杂交，并被核酸内切酶切割留下大量单链。利用单链探针和酶可对单链进行检测，该传感器的LOD为60个/ $\mu\text{L}$  [图9(d)]。为了提高灵敏度，Zhao等<sup>[140]</sup>将3D DNA步行器与Exo III辅助回收相结合，开发了一种超灵敏的比率式电化学检测方法。此设计包含两种适配体：固定在磁珠上的EpCAM适配体以及与DNAzyme序列连接组成游离步行器的CD63适配体。两条适配体通过外泌体作为桥梁偶联后，在空间上拉近，使DNAzyme能够切割磁珠上的底物链而在3D轨道上行走。通过电化学方法测量DNAzyme酶切释放的单链并辅以外切酶的回收，该方法可检测低至13个/ $\mu\text{L}$ 的外泌体。

### 3.5 细胞传感

循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 是从原发灶或转移性肿瘤上脱落进入血液循环的细胞，其携带原发肿瘤的相关信息，分离和检测这些CTC对原发肿瘤的诊断具有重要意义<sup>[141-143]</sup>。

Zuo课题组<sup>[144]</sup>利用TDF探针和分支HCR策略进行癌细胞检测。该策略通过酶催化反应放大电化学信号，可检测低至4个的MCF-7细胞 [图10(a)]。为了实现最小损伤地释放捕获的CTC以进行下游分析，Song等<sup>[145]</sup>利用发夹式适配体-HCR引发剂构建了DNA水凝胶。此设计利用适配体捕获CTC后，引发剂可以启动下游两种发夹探针发生HCR以组装多孔DNA水凝胶，以此实现对CTC的无损包裹。随后，研究人员在发夹链中设计了ATP的核酸适配体，ATP的引入可以触发对包裹细胞的去凝胶化进而释放细胞，该方法为后续细胞的培养和下游分析提供了新策略 [图10(b)]。Wang等<sup>[146]</sup>利用RCA策略扩增检测信号，其检测系统类似于三明治结构，包被Her2抗体的磁珠捕获CTC后，进一步以CTC为桥梁与EpCAM适配体环组装的伪DNA纳米链烷 (PDN) 构成夹心结构。PDN上另外两个环状DNA作为RCA模板进行指数扩增，与分子信标杂交后发出荧光信号 [图10(c)]。该研究可实现低于10个CTC/mL的检测。

Song课题组<sup>[147]</sup>利用DNA步行器驱动的比率式表面增强拉曼散射 (surface-enhanced Raman scattering, SERS) 构建了一个可信号放大的CTC传感器。步行器是由ROX标记的EpCAM适配体与DNAzyme杂交构成。在该研究中，CTC与适配体结合后，DNAzyme激活并沿GMNP表面上的发夹状单链DNA行走。随后，金磁复合纳米粒子 (GMNP) 上被切割的单链剩余片段可与AuNP表面上另一发夹状单链DNA杂交，由于AuNP表面修饰有拉曼分子，因此可形成含丰富SERS热点的Walker-SERS网络纳米结构，CTC的检测由拉曼分子和ROX的比率式SERS信号读出，此传感器LOD低至1个CTC/mL [图10(d)]。

### 3.6 细菌传感

人体内环境的稳定依赖于外来细菌和共生菌的平衡，传染性病原体感染或者体内菌群失衡都有可能疾病的发生。使用灵敏的手段检测细菌感染是实现快速诊断并指导治疗的前提<sup>[148-150]</sup>。

Leong和Kuan课题组<sup>[151]</sup>基于TDF纳米结构，利用抗大肠杆菌表面脂多糖的抗体1、脂多糖、二茂铁标记的抗体2构建了夹心结构，TDF的空心结构增强了二茂铁电子转移的能力，该传感器的LOD可达1.2 CFU/mL。随后，该课题组又将此模型用于肺炎链球菌裂解物的检测，LOD为0.093 CFU/mL<sup>[152]</sup> [图11(a)]。但这种方法直接检测的物质是体系中 (裂解细菌和活菌) 所有的脂多糖，不能精确反映活菌的数量。鉴于此，Wei等<sup>[156]</sup>基于适配体和CRISPR/Cas系统设计了针对活金葡菌的传感器。具体来说，金黄色葡萄球菌与锁定链竞争性结合适配体从而释放锁定链，该链进一步与sgRNA、Cas14a1蛋白构成三元体切割报告基因，从而产生荧光强度变化。该传感器可检测400 CFU/mL的活金黄色葡萄球菌。为了提高灵敏度，Zhang等<sup>[153]</sup>构建了一个可触发CRISPR/Cas12a活性的球形核酸，利用poly T-CuNP进行信号放大。他们将包含金黄色葡萄球菌适配体序列和PAM序列的寡核苷酸链连接在AuNP上形成球形核酸，通过金黄色葡萄球菌桥连同样修饰有适配体的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 。磁分离后，在crRNA的

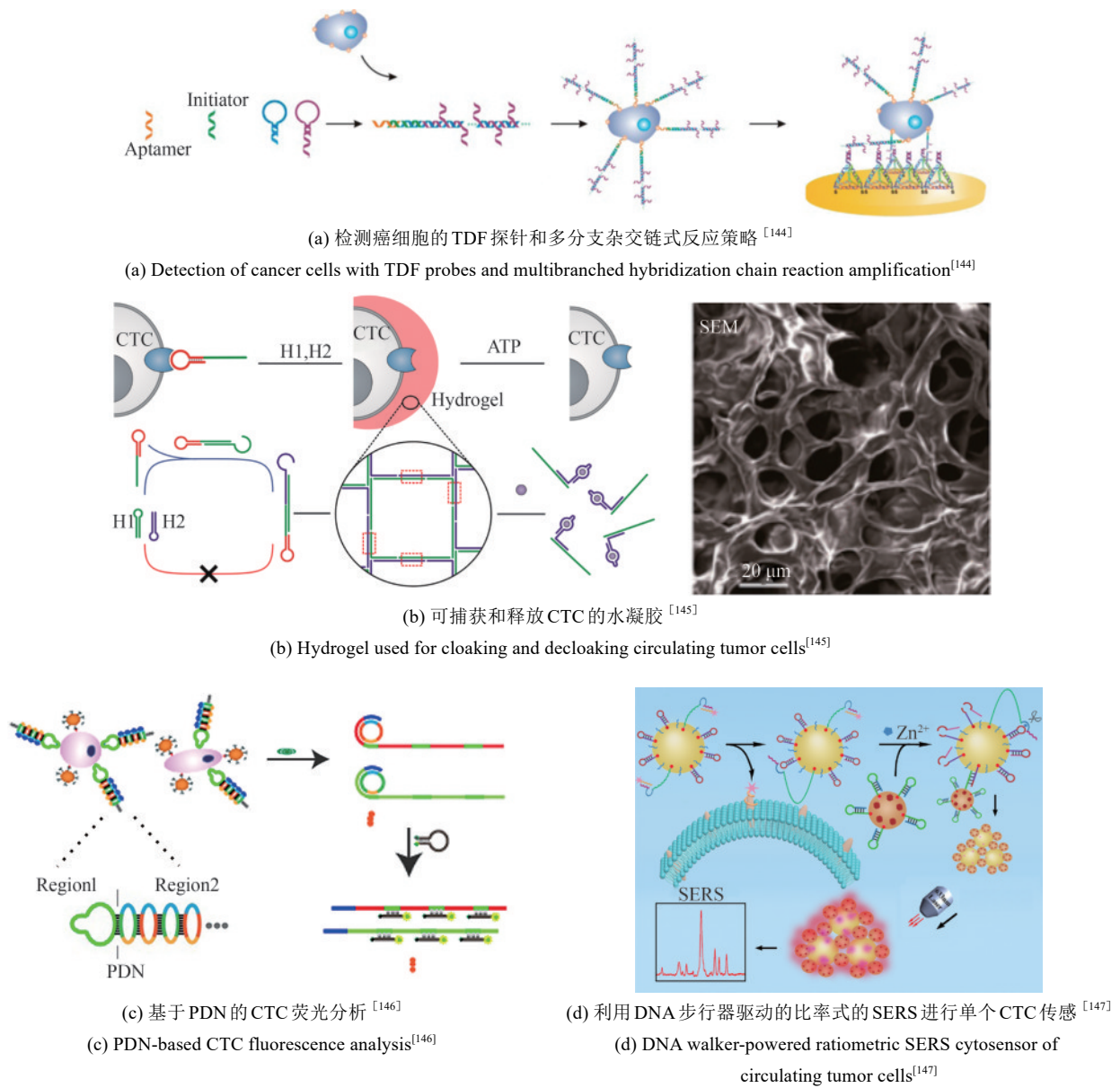
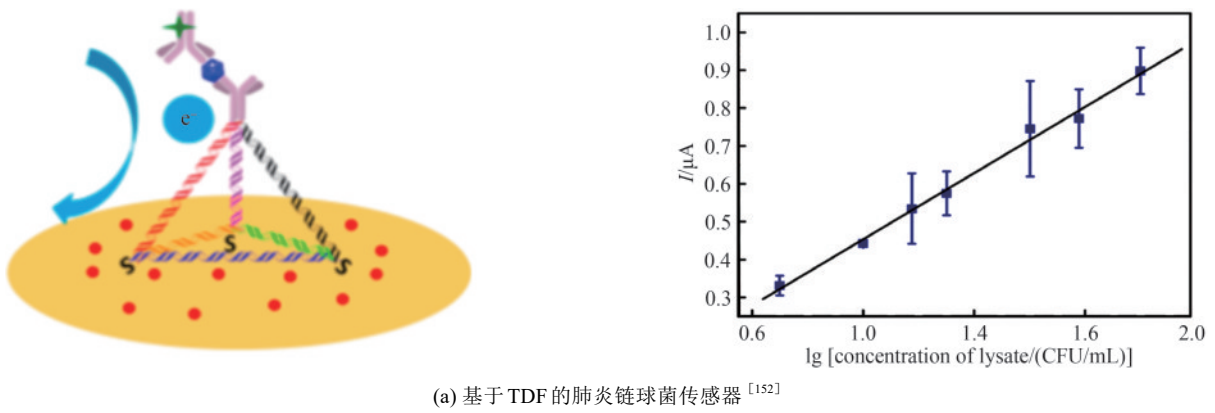
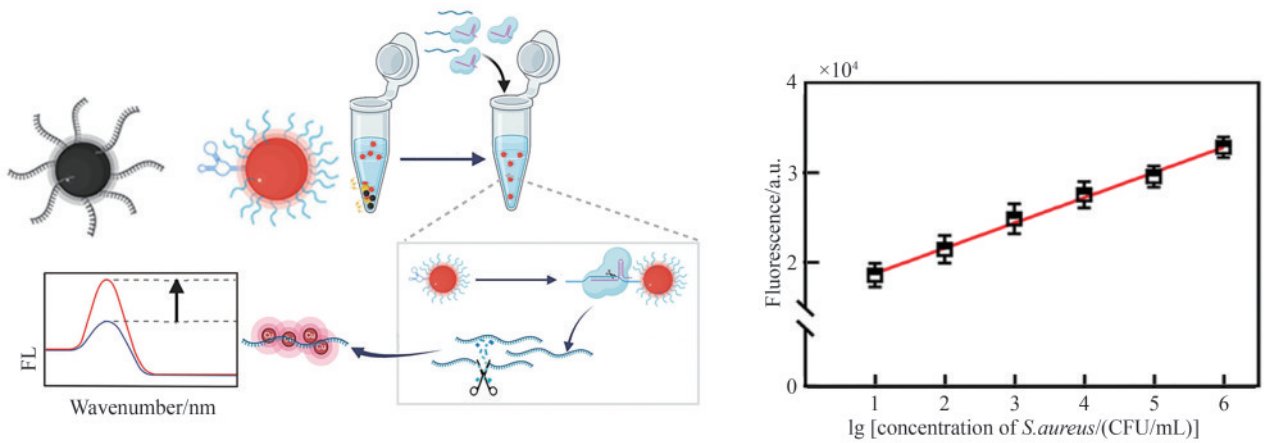


图10 基于DNA纳米技术的细胞传感<sup>[144-147]</sup>

Fig. 10 Cells sensing based on DNA nanotechnology<sup>[144-147]</sup>

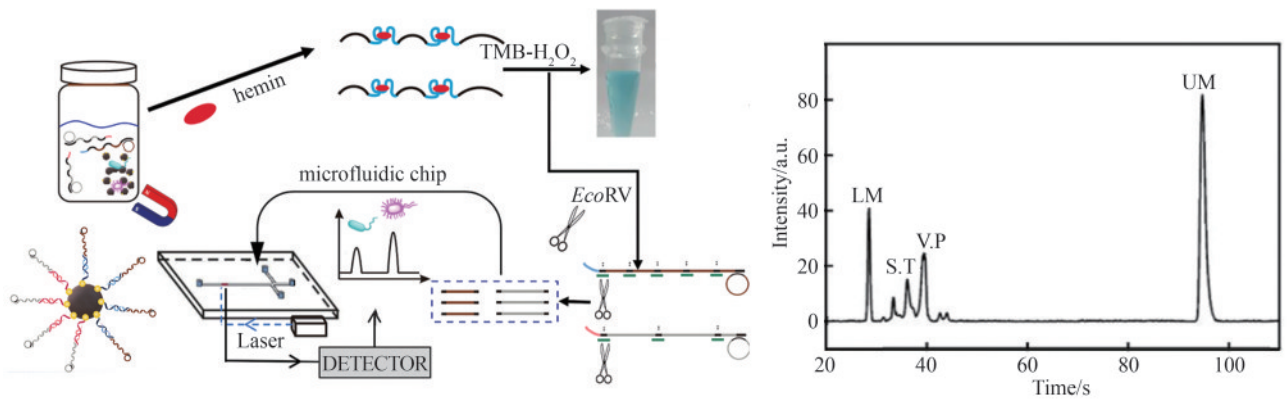


(a) *Streptococcus pneumoniae* biosensor based on TDF<sup>[152]</sup>



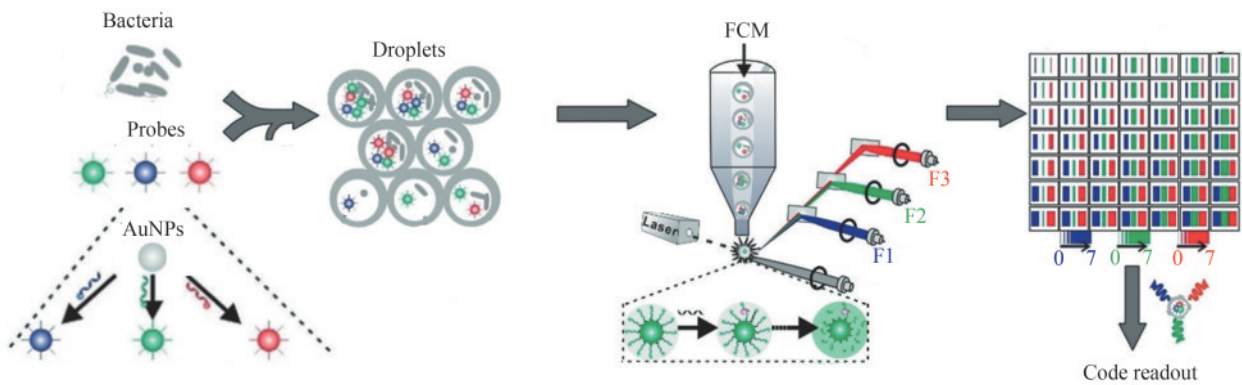
(b) 利用球形核酸激活的CRISPR/Cas12a系统和poly T-CuNP检测金黄色葡萄球菌<sup>[153]</sup>

(b) Sensitive detection of *Staphylococcus aureus* by spherical nucleic acid triggered CRISPR/Cas12a and poly T-CuNP<sup>[153]</sup>



(c) 基于酶比色法对两种细菌同时快速分析<sup>[154]</sup>

(c) Simultaneous determination of different bacteria based on colorimetric enzyme assay<sup>[154]</sup>



(d) 超高通量多重细菌传感器<sup>[155]</sup>

(d) Super-multiplexed, high-throughput bacterial sensor<sup>[155]</sup>

图 11 基于DNA纳米技术的细菌传感<sup>[152-155]</sup>

Fig. 11 Bacteria sensing based on DNA nanotechnology<sup>[152-155]</sup>

引导下，剩余的球形核酸可激活Cas12a的切割活性降解 poly-T40，使 Poly T-CuNP 报告分子荧光强度下降，该研究的LOD低至3 CFU/mL [图 11(b)]。

肉眼可视化的比色传感平台可对细菌进行快

速定性或半定量分析。Sun等<sup>[157]</sup>设计了一种酶比色传感器检测副溶血弧菌，在该设计中，细菌能够置换球形核酸上与适配体部分杂交的G4使其游离，进而与血红素结合显示酶活性以进行比色测

定, 该传感器的LOD为10 CFU/mL。为了缩短检测时间, Yu等<sup>[154]</sup>预先将G4进行RCA以获得可使显影信号放大的长链DNA, 用于对鼠伤寒沙门氏菌(*S.t.*)和副溶血性弧菌(*V.p.*)的定性测量, 100 CFU/mL的细菌引起的变化可以即刻用肉眼观察到。进一步地, 他们通过在长链DNA中设计不同的限制位点, 实现了*S.t.*和*V.p.*的同时定量, 该设计可在3 min内实现低至32 CFU/mL的*S.t.*和30 CFU/mL的*V.p.*的检测[图11(c)]。为了实现对细菌快速而灵敏的检测, Pei课题组<sup>[158]</sup>在检测体系中引入了DNA步行器, 此传感器可在15 min内完成快速检测, 检测限低至1 CFU/mL。为了实现高通量多重细菌的快速检测, 该课题组进一步将随机DNA步行器与微流控技术相结合, 构建了一个SDwalker-Drop平台<sup>[155]</sup>。他们通过构建颜色编码条形码和强度编码条形码, 实现了对20种细菌的同时检测[图11(d)]。

## 4 挑战与展望

近年来, 基于DNA纳米结构的生物传感得到了广泛关注, 国际国内多个课题组设计了各类巧妙的传感策略以提高靶标检测的速率和灵敏度。以DNA纳米结构为基础设计的生物传感器具有以下三个优势:

第一, DNA纳米结构具有可编程性, 通过设计各类具有结构刚性和可控尺寸的框架核酸可以精确控制探针的空间排列和方向, 显著降低探针与靶标结合后的空间位阻效应, 提高对靶标的识别能力。

第二, 由于DNA纳米结构能够精确调控探针的数目及空间分布, 因此基于DNA纳米结构构建的生物传感器能够在单分子水平上深入研究分子间相互作用的机制。

第三, DNA纳米结构的可寻址性赋予其对探针和信号分子的精确控制能力, 能够实现对传感信号的精准放大。

然而, 目前DNA纳米结构应用于生物传感领域时也存在一定的限制:

第一, 功能性DNA纳米结构的合成成本较高, 复杂的DNA纳米结构产量低且结构不稳定,

因此急需优化合成策略提高组装产率, 并在维持DNA结构精准性的前提下提升DNA纳米结构的强度。目前已有科学家将二氧化硅矿化技术引入DNA纳米结构的制备和修饰中, 使DNA纳米结构的力学性能得到提升<sup>[38]</sup>。

第二, 许多传感器在实验室条件下具有优异的传感性能, 但进入真实的生物样本中其可行性和灵敏度无法达到相同水平。对此, 合成和筛选有效的功能探针, 构建更加稳定、对离子强度、温度、核酸酶具有抵抗性的DNA纳米结构以最大限度的保护探针是一种有效的方法。一些研究小组利用紫外线诱导环嘧啶二聚体交联<sup>[159]</sup>或者引入DNA连接酶对DNA结构上的断点进行可控连接<sup>[160]</sup>等方式增加DNA纳米结构的酶降解稳定性。此外, 通过将DNA纳米结构与其他纳米材料相如AuNP、GO、QD结合也可避免因体液中酶降解或其他分子的干扰而产生的假阳性信号。

第三, 一些疾病的检测需要体内动态连续监测, 目前DNA纳米传感器几乎都是体外检测, 如何实现传感器在生物体内稳定存在并发挥传感功能是一大挑战。为了应对这一挑战, 有研究团队开发了新的体内外信号转换方法如近红外照射来绕开体内传感这一技术难题<sup>[98]</sup>。

第四, 疾病的检测需要多种标志物联合诊断, 设计能够同时靶向和检测不同靶标的纳米传感器仍然具有局限性, 有研究将多种荧光探针与TDF顶点连接以实现同时对不同靶标的同时检测, 但这种方法受限于有限的荧光染料的荧光光谱重叠问题。因此, 目前亟需开发具有多种靶标同时检测能力的生物传感器。

第五, 对一些物质的初筛和现场检测的需求也催生着便携式、即时检测的生物传感器的出现。目前, 一些课题组采用了横流技术和微流控芯片技术对这一挑战做出了初步应对<sup>[92, 155]</sup>。另外, CRISPR/Cas系统具有核酸靶向性、可编程性、高灵敏度等特点, 是生物工程和基因工程领域的新兴强大工具, 为构建生物传感器提供了新的发展方向。将CRISPR/Cas系统引入到DNA纳米结构不仅可以提高传感器的靶标识别特异性<sup>[161]</sup>, 还可以实现有效的信号放大, 极大提高了传感器的检测灵敏度和检测速度<sup>[162-163]</sup>。

随着DNA纳米技术和合成生物学领域的不断发展,研究人员将构建出更灵敏、更实用的生物传感平台,为科学问题和技术挑战提供行之有效的解决方案。

### 参 考 文 献

- [1] SEEMAN N C, KALLENBACH N R. Design of immobile nucleic acid junctions[J]. *Biophysical Journal*, 1983, 44(2): 201-209.
- [2] FU T J, SEEMAN N C. DNA double-crossover molecules[J]. *Biochemistry*, 1993, 32(13): 3211-3220.
- [3] ROTHMUND P W K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns[J]. *Nature*, 2006, 440(7082): 297-302.
- [4] WEI B, DAI M J, YIN P. Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles[J]. *Nature*, 2012, 485(7400): 623-626.
- [5] YAO G, ZHANG F, WANG F, et al. Meta-DNA structures[J]. *Nature Chemistry*, 2020, 12(11): 1067-1075.
- [6] PINHEIRO A V, HAN D R, SHIH W M, et al. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology[J]. *Nature Nanotechnology*, 2011, 6(12): 763-772.
- [7] CHEN J, SEEMAN N C. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube[J]. *Nature*, 1991, 350(6319): 631-633.
- [8] WINFREE E, LIU F R, WENZLER L A, et al. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals[J]. *Nature*, 1998, 394(6693): 539-544.
- [9] HE Y, TIAN Y, CHEN Y, et al. Sequence symmetry as a tool for designing DNA nanostructures[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(41): 6694-6696.
- [10] ANDERSEN E S, DONG M D, NIELSEN M M, et al. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid[J]. *Nature*, 2009, 459(7243): 73-76.
- [11] DOUGLAS S M, DIETZ H, LIEDL T, et al. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes[J]. *Nature*, 2009, 459(7245): 414-418.
- [12] DIETZ H, DOUGLAS S M, SHIH W M. Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes[J]. *Science*, 2009, 325(5941): 725-730.
- [13] LIU W Y, ZHONG H, WANG R S, et al. Crystalline two-dimensional DNA-origami arrays[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(1): 264-267.
- [14] ONG L L, HANIKEL N, YAGHI O K, et al. Programmable self-assembly of three-dimensional nanostructures from 10,000 unique components[J]. *Nature*, 2017, 552(7683): 72-77.
- [15] WAGENBAUER K F, SIGL C, DIETZ H. Gigadalton-scale shape-programmable DNA assemblies[J]. *Nature*, 2017, 552(7683): 78-83.
- [16] GE Z L, GU H Z, LI Q, et al. Concept and development of framework nucleic acids[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(51): 17808-17819.
- [17] LIU Y J, DAI Z Z, XIE X D, et al. Spacer-programmed two-dimensional DNA origami assembly[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146(8): 5461-5469.
- [18] GEHRING K, LEROY J L, GUÉRON M. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs[J]. *Nature*, 1993, 363(6429): 561-565.
- [19] DHAMODHARAN V, PRADEEPKUMAR P I. Specific recognition of promoter G-quadruplex DNAs by small molecule ligands and light-up probes[J]. *ACS Chemical Biology*, 2019, 14(10): 2102-2114.
- [20] MA R I, KALLENBACH N R, SHEARDY R D, et al. Three-arm nucleic acid junctions are flexible[J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14(24): 9745-9753.
- [21] WANG Y L, MUELLER J E, KEMPER B, et al. Assembly and characterization of five-arm and six-arm DNA branched junctions[J]. *Biochemistry*, 1991, 30(23): 5667-5674.
- [22] WANG X, SEEMAN N C. Assembly and characterization of 8-arm and 12-arm DNA branched junctions[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(26): 8169-8176.
- [23] ZHANG F, NANGREAVE J, LIU Y, et al. Structural DNA nanotechnology: state of the art and future perspective[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(32): 11198-11211.
- [24] ANDERSEN E S, DONG M D, NIELSEN M M, et al. DNA origami design of dolphin-shaped structures with flexible tails [J]. *ACS Nano*, 2008, 2(6): 1213-1218.
- [25] HAN D R, PAL S, NANGREAVE J, et al. DNA origami with complex curvatures in three-dimensional space[J]. *Science*, 2011, 332(6027): 342-346.
- [26] HAN D R, PAL S, YANG Y, et al. DNA gridiron nanostructures based on four-arm junctions[J]. *Science*, 2013, 339(6126): 1412-1415.
- [27] ZHANG F, JIANG S X, WU S Y, et al. Complex wireframe DNA origami nanostructures with multi-arm junction vertices [J]. *Nature Nanotechnology*, 2015, 10(9): 779-784.
- [28] TIKHOMIROV G, PETERSEN P, QIAN L L. Fractal assembly of micrometre-scale DNA origami arrays with arbitrary patterns[J]. *Nature*, 2017, 552(7683): 67-71.
- [29] LABEAN T H, YAN H, KOPATSCH J, et al. Construction, analysis, ligation, and self-assembly of DNA triple crossover complexes[J]. *Journal of the American Chemical Society*,

- 2000, 122(9): 1848-1860.
- [30] MATHIEU F, LIAO S P, KOPATSCH J, et al. Six-helix bundles designed from DNA[J]. *Nano Letters*, 2005, 5(4): 661-665.
- [31] YAN H, PARK S H, FINKELSTEIN G, et al. DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires[J]. *Science*, 2003, 301(5641): 1882-1884.
- [32] HE Y, CHEN Y, LIU H P, et al. Self-assembly of hexagonal DNA two-dimensional (2D) arrays[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(35): 12202-12203.
- [33] HE Y, TIAN Y, RIBBE A E, et al. Highly connected two-dimensional crystals of DNA six-point-stars[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(50): 15978-15979.
- [34] QIAN L L, WANG Y, ZHANG Z, et al. Analogic China map constructed by DNA[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(24): 2973-2976.
- [35] GOODMAN R P, SCHAAP I A T, TARDIN C F, et al. Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication[J]. *Science*, 2005, 310(5754): 1661-1665.
- [36] ZHANG Y W, SEEMAN N C. Construction of a DNA-truncated octahedron[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(5): 1661-1669.
- [37] HE Y, YE T, SU M, et al. Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra[J]. *Nature*, 2008, 452(7184): 198-201.
- [38] LIU X G, ZHANG F, JING X X, et al. Complex silica composite nanomaterials templated with DNA origami[J]. *Nature*, 2018, 559(7715): 593-598.
- [39] ZHANG C, SU M, HE Y, et al. Conformational flexibility facilitates self-assembly of complex DNA nanostructures[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(31): 10665-10669.
- [40] LI Y L, TIAN C, LIU Z Y, et al. Structural transformation: assembly of an otherwise inaccessible DNA nanocage[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(20): 5990-5993.
- [41] BENSON E, MOHAMMED A, GARDELL J, et al. DNA rendering of polyhedral meshes at the nanoscale[J]. *Nature*, 2015, 523(7561): 441-444.
- [42] IINUMA R, KE Y G, JUNGMANN R, et al. Polyhedra self-assembled from DNA tripods and characterized with 3D DNA-PAINT[J]. *Science*, 2014, 344(6179): 65-69.
- [43] YURKE B, TURBERFIELD A J, MILLS A P, et al. A DNA-fuelled molecular machine made of DNA[J]. *Nature*, 2000, 406(6796): 605-608.
- [44] ZHOU C, YANG Z Q, LIU D S. Reversible regulation of protein binding affinity by a DNA machine[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(3): 1416-1418.
- [45] SHIN J S, PIERCE N A. A synthetic DNA walker for molecular transport[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(35): 10834-10835.
- [46] LIU M H, FU J L, HEJESEN C, et al. A DNA tweezer-actuated enzyme nanoreactor[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2127.
- [47] KOU B B, CHAI Y Q, YUAN Y L, et al. Dynamical regulation of enzyme cascade amplification by a regenerated DNA nanotweezer for ultrasensitive electrochemical DNA detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(18): 10701-10706.
- [48] CHA T G, PAN J, CHEN H R, et al. A synthetic DNA motor that transports nanoparticles along carbon nanotubes[J]. *Nature Nanotechnology*, 2014, 9(1): 39-43.
- [49] BAZRAFSHAN A, MEYER T A, SU H Q, et al. Tunable DNA origami motors translocate ballistically over  $\mu\text{m}$  distances at nm/s speeds[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(24): 9514-9521.
- [50] CHENG X Y, BAO Y F, LIANG S, et al. Flap endonuclease I-assisted DNA walkers for sensitively and specifically sensing ctDNAs[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(27): 9593-9601.
- [51] XIN L, ZHOU C, DUAN X Y, et al. A rotary plasmonic nanoclock[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 5394.
- [52] ZERAATI M, LANGLEY D B, SCHOFIELD P, et al. I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells[J]. *Nature Chemistry*, 2018, 10(6): 631-637.
- [53] LIU J B, JING X X, LIU M M, et al. Mechano-fluorescence actuation in single synaptic vesicles with a DNA framework nanomachine[J]. *Science Robotics*, 2022, 7(73): eabq5151.
- [54] KUZYK A, YANG Y Y, DUAN X Y, et al. A light-driven three-dimensional plasmonic nanosystem that translates molecular motion into reversible chiroptical function[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10591.
- [55] DONG Y C, YANG Z Q, LIU D S. DNA nanotechnology based on i-motif structures[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2014, 47(6): 1853-1860.
- [56] CHEN C, LI M, XING Y Z, et al. Study of pH-induced folding and unfolding kinetics of the DNA i-motif by stopped-flow circular dichroism[J]. *Langmuir*, 2012, 28(51): 17743-17748.
- [57] UEYAMA H, TAKAGI M, TAKENAKA S. A novel potassium sensing in aqueous media with a synthetic oligonucleotide derivative. Fluorescence resonance energy transfer associated with Guanine quartet-potassium ion complex formation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(48): 14286-14287.
- [58] HELLER M J. DNA microarray technology: devices, systems, and applications[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*,

- 2002, 4: 129-153.
- [59] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [60] LI M, YIN F F, SONG L, et al. Nucleic acid tests for clinical translation[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(17): 10469-10558.
- [61] CHEN Y J, GROVES B, MUSCAT R A, et al. DNA nanotechnology from the test tube to the cell[J]. *Nature Nanotechnology*, 2015, 10(9): 748-760.
- [62] LIN M H, WEN Y L, LI L Y, et al. Target-responsive, DNA nanostructure-based E-DNA sensor for microRNA analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(5): 2285-2288.
- [63] LIN M H, WANG J J, ZHOU G B, et al. Programmable engineering of a biosensing interface with tetrahedral DNA nanostructures for ultrasensitive DNA detection[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(7): 2151-2155.
- [64] MIAO P, TANG Y G, YIN J. microRNA detection based on analyte triggered nanoparticle localization on a tetrahedral DNA modified electrode followed by hybridization chain reaction dual amplification[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(86): 15629-15632.
- [65] LIU L, RONG Q M, KE G L, et al. Efficient and reliable microRNA imaging in living cells *via* a FRET-based localized hairpin-DNA cascade amplifier[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(5): 3675-3680.
- [66] MENG R, ZHANG X L, LIU J L, et al. Dual-layer 3D DNA nanostructure: the next generation of ultrafast DNA nanomachine for microRNA sensing and intracellular imaging [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 237: 115517.
- [67] SUBRAMANIAN H K K, CHAKRABORTY B, SHA R J, et al. The label-free unambiguous detection and symbolic display of single nucleotide polymorphisms on DNA origami [J]. *Nano Letters*, 2011, 11(2): 910-913.
- [68] WANG X Y, CHEN F, ZHANG D X, et al. Single copy-sensitive electrochemical assay for circulating methylated DNA in clinical samples with ultrahigh specificity based on a sequential discrimination-amplification strategy[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(7): 4764-4770.
- [69] LIU H M, LUO J, FANG L C, et al. An electrochemical strategy with tetrahedron rolling circle amplification for ultrasensitive detection of DNA methylation[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 121: 47-53.
- [70] WANG S, XIA M C, LIU J, et al. Simultaneous imaging of three tumor-related mRNAs in living cells with a DNA tetrahedron-based multicolor nanoprobe[J]. *ACS Sensors*, 2017, 2(6): 735-739.
- [71] ZHANG P, LI Z Y, WANG H J, et al. DNA nanomachine-based regenerated sensing platform: a novel electrochemiluminescence resonance energy transfer strategy for ultra-high sensitive detection of microRNA from cancer cells[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(6): 2310-2316.
- [72] QIU X, HILDEBRANDT N. Rapid and multiplexed microRNA diagnostic assay using quantum dot-based Förster resonance energy transfer[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(8): 8449-8457.
- [73] TSANG M K, YE W W, WANG G J, et al. Ultrasensitive detection of Ebola virus oligonucleotide based on upconversion nanoprobe/nanoporous membrane system[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(1): 598-605.
- [74] LIU F, CHOI J Y, SEO T S. Graphene oxide arrays for detecting specific DNA hybridization by fluorescence resonance energy transfer[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25(10): 2361-2365.
- [75] RESCH-GENGER U, GRABOLLE M, CAVALIERE-JARICOT S, et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(9): 763-775.
- [76] SAPSFORD K E, BERTI L, MEDINTZ I L. Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: beyond traditional donor-acceptor combinations[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45(28): 4562-4589.
- [77] LI J M, ZHAO M X, SU H, et al. Multifunctional quantum-dot-based siRNA delivery for HPV18 E6 gene silence and intracellular imaging[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(31): 7978-7987.
- [78] ANDO T. High-speed AFM imaging[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2014, 28: 63-68.
- [79] FU W Y, ZHANG W. Hybrid AFM for nanoscale physicochemical characterization: recent development and emerging applications[J]. *Small*, 2017, 13(11): 1603525.
- [80] LIU K, PAN D, WEN Y Q, et al. Identifying the genotypes of hepatitis B virus (HBV) with DNA origami label[J]. *Small*, 2018, 14(6): 1701718.
- [81] ZHANG H L, CHAO J, PAN D, et al. DNA origami-based shape IDs for single-molecule nanomechanical genotyping[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14738.
- [82] MUKHERJEE S, GHOSH R N, MAXFIELD F R. Endocytosis [J]. *Physiological Reviews*, 1997, 77(3): 759-803.
- [83] MONTESANO R, ROTH J, ROBERT A, et al. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins[J]. *Nature*, 1982, 296(5858): 651-653.
- [84] SHI W, CHANCE M R. Metallomics and metalloproteomics [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(19): 3040-3048.
- [85] HUANG Y F, YAN J, FANG Z Z, et al. Highly sensitive and

- selective optical detection of lead(II) using a label-free fluorescent aptasensor[J]. RSC Advances, 2016, 6(93): 90300-90304.
- [86] KOTCH F W, FETTINGER J C, DAVIS J T. A lead-filled G-quadruplex: insight into the G-quartet's selectivity for Pb<sup>2+</sup> over K<sup>+</sup>[J]. Organic Letters, 2000, 2(21): 3277-3280.
- [87] LI T, WANG E K, DONG S J. Potassium-lead-switched G-quadruplexes: a new class of DNA logic gates[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(42): 15082-15083.
- [88] ZHONG R B, XIAO M S, ZHU C F, et al. Logic catalytic interconversion of G-molecular hydrogel[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(5): 4512-4518.
- [89] QU X M, YANG F, CHEN H, et al. Bubble-mediated ultrasensitive multiplex detection of metal ions in three-dimensional DNA nanostructure-encoded microchannels[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(19): 16026-16034.
- [90] CHEN B, WANG Y T, MA W J, et al. A mimosa-inspired cell-surface-anchored ratiometric DNA nanosensor for high-resolution and sensitive response of target tumor extracellular pH[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(22): 15104-15111.
- [91] LIU L, DOU C X, LIU J W, et al. Cell surface-anchored DNA nanomachine for dynamically tunable sensing and imaging of extracellular pH[J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(19): 11198-11202.
- [92] CHEN J H, ZHOU S G, WEN J L. Disposable strip biosensor for visual detection of Hg<sup>2+</sup> based on Hg<sup>2+</sup>-triggered toehold binding and exonuclease III-assisted signal amplification[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(6): 3108-3114.
- [93] LANZ E, GREGOR M, SLAVÍK J, et al. Use of FITC as a fluorescent probe for intracellular pH measurement[J]. Journal of Fluorescence, 1997, 7(4): 317-319.
- [94] MORDON S, DEVOISSELLE J M, MAUNOURY V. *In vivo* pH measurement and imaging of tumor tissue using a pH-sensitive fluorescent probe (5,6-carboxyfluorescein): instrumental and experimental studies[J]. Photochemistry and Photobiology, 1994, 60(3): 274-279.
- [95] BAE W, YOON T Y, JEONG C. Direct evaluation of self-quenching behavior of fluorophores at high concentrations using an evanescent field[J]. PLoS One, 2021, 16(2): e0247326.
- [96] CHEN G, LIU D, HE C B, et al. Enzymatic synthesis of periodic DNA nanoribbons for intracellular pH sensing and gene silencing[J]. Journal of the American Chemical Society, 2015, 137(11): 3844-3851.
- [97] LI N, WANG M M, GAO X N, et al. A DNA tetrahedron nanoprobe with controlled distance of dyes for multiple detection in living cells and *in vivo*[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(12): 6670-6677.
- [98] ZHAO J, LI Y H, YU M M, et al. Time-resolved activation of pH sensing and imaging *in vivo* by a remotely controllable DNA nanomachine[J]. Nano Letters, 2020, 20(2): 874-880.
- [99] CARDONE R A, CASAVOLA V, RESHKIN S J. The role of disturbed pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in metastasis [J]. Nature Reviews Cancer, 2005, 5(10): 786-795.
- [100] ANDERSON M, MOSHNIKOVA A, ENGELMAN D M, et al. Probe for the measurement of cell surface pH *in vivo* and *ex vivo*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(29): 8177-8181.
- [101] SAHA S, CHAKRABORTY K, KRISHNAN Y. Tunable, colorimetric DNA-based pH sensors mediated by a-motif formation[J]. Chemical Communications, 2012, 48(19): 2513-2515.
- [102] RICH A, DAVIES D R, CRICK F H C, et al. The molecular structure of polyadenylic acid[J]. Journal of Molecular Biology, 1961, 3(1): 71-IN19.
- [103] FRESCO J R. Polynucleotides II: the X-ray diffraction patterns of solutions of the randomly coiled and helical forms of polyriboadenylic acid[J]. Journal of Molecular Biology, 1959, 1(2): 106-IN3.
- [104] TS' O P O, HELMKAMP G K, SANDER C. Interaction of nucleosides and related compounds with nucleic acids as indicated by the change of helix-coil transition temperature[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1962, 48(4): 686-698.
- [105] LI X X, LIU Y M, LI Y J, et al. High glucose concentration induces endothelial cell proliferation by regulating cyclin-D2-related miR-98[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2016, 20(6): 1159-1169.
- [106] SANG F M, ZHANG X, LIU J, et al. A label-free hairpin aptamer probe for colorimetric detection of adenosine triphosphate based on the anti-aggregation of gold nanoparticles[J]. Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, 217: 122-127.
- [107] SHENG Q L, LIU R X, ZHANG S, et al. Ultrasensitive electrochemical cocaine biosensor based on reversible DNA nanostructure[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 51: 191-194.
- [108] ZHU Z, WU C C, LIU H P, et al. An aptamer cross-linked hydrogel as a colorimetric platform for visual detection[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2010, 49(6): 1052-1056.
- [109] WALTER H K, BAUER J, STEINMEYER J, et al. "DNA origami traffic lights" with a split aptamer sensor for a bicolor

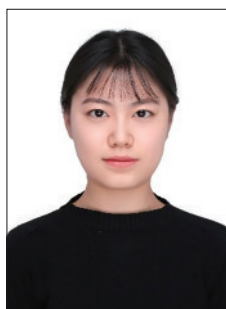
- fluorescence readout[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(4): 2467-2472.
- [110] XIONG Z W, WANG Q, XIE Y J, et al. Simultaneous detection of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in food samples by dual DNA tweezers nanomachine[J]. *Food Chemistry*, 2021, 338: 128122.
- [111] YANG H H, LIU H P, KANG H Z, et al. Engineering target-responsive hydrogels based on aptamer-target interactions[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(20): 6320-6321.
- [112] MA Y L, MAO Y, AN Y, et al. Target-responsive DNA hydrogel for non-enzymatic and visual detection of glucose[J]. *Analyst*, 2018, 143(7): 1679-1684.
- [113] MENG H M, ZHANG X B, LÜ Y F, et al. DNA dendrimer: an efficient nanocarrier of functional nucleic acids for intracellular molecular sensing[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(6): 6171-6181.
- [114] WANG Y H, SONG W, ZHAO H Y, et al. DNA walker-assisted aptasensor for highly sensitive determination of *Ochratoxin A*[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 182: 113171.
- [115] PIN J P, BETTLER B. Organization and functions of mGlu and GABAB receptor complexes[J]. *Nature*, 2016, 540(7631): 60-68.
- [116] JENKINS W J, PETERS T J. Mitochondrial enzyme activities in liver biopsies from patients with alcoholic liver disease[J]. *Gut*, 1978, 19(5): 341-344.
- [117] YAN H, ZHONG G C, XU G W, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus[J]. *eLife*, 2012, 1: e00049.
- [118] LI J R, WANG J, GREWAL Y S, et al. Multiplexed SERS detection of soluble cancer protein biomarkers with gold-silver alloy nanoboxes and nanoyeast single-chain variable fragments [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(17): 10377-10384.
- [119] HORI S S, GAMBHIR S S. Mathematical model identifies blood biomarker-based early cancer detection strategies and limitations[J]. *Science Translational Medicine*, 2011, 3(109): 109ra116.
- [120] CARDOZO K H M, LEBKUCHEN A, OKAI G G, et al. Establishing a mass spectrometry-based system for rapid detection of SARS-CoV-2 in large clinical sample cohorts[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 6201.
- [121] ZHOU X Y, ZHAO M, DUAN X L, et al. Collapse of DNA tetrahedron nanostructure for “off-on” fluorescence detection of DNA methyltransferase activity[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(46): 40087-40093.
- [122] DAEMS D, PFEIFER W, RUTTEN I, et al. Three-dimensional DNA origami as programmable anchoring points for bioreceptors in fiber optic surface plasmon resonance biosensing[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(28): 23539-23547.
- [123] YAN J, HU C Y, WANG P, et al. Novel rolling circle amplification and DNA origami-based DNA belt-involved signal amplification assay for highly sensitive detection of prostate-specific antigen (PSA)[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(22): 20372-20377.
- [124] RAVEENDRAN M, LEE A J, SHARMA R, et al. Rational design of DNA nanostructures for single molecule biosensing [J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4384.
- [125] FENG Q M, MA P, CAO Q H, et al. An aptamer-binding DNA walking machine for sensitive electrochemiluminescence detection of tumor exosomes[J]. *Chemical Communications*, 2020, 56(2): 269-272.
- [126] HOU J, LI X T, XIE K P. Coupled liquid biopsy and bioinformatics for pancreatic cancer early detection and precision prognostication[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1): 34.
- [127] KARAMI P, KHOSHSAFAR H, JOHARI-AHAR M, et al. Colorimetric immunosensor for determination of prostate specific antigen using surface plasmon resonance band of colloidal triangular shape gold nanoparticles[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 222: 117218.
- [128] SELL S. AFP as a marker for liver cell injury: differentiation of tumor growth, hepatotoxicity, and carcinogenesis[J]. *UCLA Forum in Medical Sciences*, 1978, 20: 51-58.
- [129] GHORBANI F, ABBASZADEH H, DOLATABADI J E N, et al. Application of various optical and electrochemical aptasensors for detection of human prostate specific antigen: a review[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 142: 111484.
- [130] SUN Y L, FAN J F, CUI L Y, et al. Fluorometric nanoprobe for simultaneous aptamer-based detection of carcinoembryonic antigen and prostate specific antigen[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186(3): 152.
- [131] CHEN C T, FENG S L, ZHOU M, et al. Development of a structure-switching aptamer-based nanosensor for salicylic acid detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 140: 111342.
- [132] TAGHDISI S M, DANESH N M, NAMEGHI M A, et al. A DNA triangular prism-based fluorescent aptasensor for ultrasensitive detection of prostate-specific antigen[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1120: 36-42.
- [133] AHMADI-SANGACHIN E, MOHAMMADNEJAD J, HOSSEINI M. Fluorescence self-assembled DNA hydrogel for the determination of prostate specific antigen by aggregation induced emission[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023, 303: 123234.

- [134] QIN Y, LI D X, YUAN R, et al. Netlike hybridization chain reaction assembly of DNA nanostructures enables exceptional signal amplification for sensing trace cytokines[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(35): 16362-16367.
- [135] URABE F, KOSAKA N, ITO K, et al. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2020, 318(1): C29-C39.
- [136] THÉRY C, ZITVOGEL L, AMIGORENA S. Exosomes: composition, biogenesis and function[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2002, 2(8): 569-579.
- [137] WANG C C, JIN D, YU Y, et al. A dual antibody-modified nanochannel biosensor for capture and identification of exosomes[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 314: 128056.
- [138] ZHOU Q, RAHIMIAN A, SON K, et al. Development of an aptasensor for electrochemical detection of exosomes[J]. *Methods*, 2016, 97: 88-93.
- [139] ZHANG H X, WANG Z H, ZHANG Q X, et al.  $Ti_3C_2$  MXenes nanosheets catalyzed highly efficient electrogenerated chemiluminescence biosensor for the detection of exosomes[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 124-125: 184-190.
- [140] ZHAO L, SUN R J, HE P, et al. Ultrasensitive detection of exosomes by target-triggered three-dimensional DNA walking machine and exonuclease III-assisted electrochemical ratiometric biosensing[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(22): 14773-14779.
- [141] NAGRATH S, SEQUIST L V, MAHESWARAN S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology[J]. *Nature*, 2007, 450(7173): 1235-1239.
- [142] YOON H J, KIM T H, ZHANG Z, et al. Sensitive capture of circulating tumour cells by functionalized graphene oxide nanosheets[J]. *Nature Nanotechnology*, 2013, 8(10): 735-741.
- [143] ZHAO W A, CUI C H, BOSE S, et al. Bioinspired multivalent DNA network for capture and release of cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(48): 19626-19631.
- [144] ZHOU G B, LIN M H, SONG P, et al. Multivalent capture and detection of cancer cells with DNA nanostructured biosensors and multibranch hybridization chain reaction amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(15): 7843-7848.
- [145] SONG P, YE D K, ZUO X L, et al. DNA hydrogel with aptamer-toehold-based recognition, cloaking, and decloaking of circulating tumor cells for live cell analysis[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(9): 5193-5198.
- [146] WANG J, DONG H Y, ZHOU Y Y, et al. Immunomagnetic antibody plus aptamer pseudo-DNA nanocatenane followed by rolling circle amplification for highly-sensitive CTC detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 122: 239-246.
- [147] XIONG J R, DONG C, ZHANG J J, et al. DNA walker-powered ratiometric SERS cytosensor of circulating tumor cells with single-cell sensitivity[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 213: 114442.
- [148] MORRIS J G, ACHESON D. Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2003, 37(2): 272-280.
- [149] BISHARA J, LEIBOVICI L, GARTMAN-ISRAEL D, et al. Long-term outcome of infective endocarditis: the impact of early surgical intervention[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 33(10): 1636-1643.
- [150] MUSER D M, THORNER A R. Community-acquired pneumonia[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2014, 371(17): 1619-1628.
- [151] GIOVANNI M, SETYAWATI M I, TAY C Y, et al. Electrochemical quantification of *Escherichia coli* with DNA nanostructure[J]. *Advanced Functional Materials*, 2015, 25(25): 3840-3846.
- [152] WANG J P, LEONG M C, LEONG E Z W, et al. Clinically relevant detection of *Streptococcus pneumoniae* with DNA-antibody nanostructures[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(12): 6900-6906.
- [153] ZHANG X Y, SUN R M, ZHENG H R, et al. Amplification-free sensitive detection of *Staphylococcus aureus* by spherical nucleic acid triggered CRISPR/Cas12a and poly T-Cu reporter[J]. *Microchimica Acta*, 2025, 192(2): 76.
- [154] YU J L, WU H H, HE L Y, et al. The universal dual-mode aptasensor for simultaneous determination of different bacteria based on naked eyes and microfluidic-chip together with magnetic DNA encoded probes[J]. *Talanta*, 2021, 225: 122062.
- [155] XIAO M S, ZOU K, LI L, et al. Stochastic DNA walkers in droplets for super-multiplexed bacterial phenotype detection[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(43): 15448-15454.
- [156] WEI Y D, TAO Z Z, WAN L, et al. Aptamer-based Cas14a1 biosensor for amplification-free live pathogenic detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 211: 114282.
- [157] SUN Y H, DUAN N, MA P F, et al. Colorimetric aptasensor based on truncated aptamer and trivalent DNAzyme for *Vibrio parahaemolyticus* determination[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(8): 2313-2320.
- [158] YANG H H, XIAO M S, LAI W, et al. Stochastic DNA dual-walkers for ultrafast colorimetric bacteria detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(7): 4990-4995.
- [159] BROWN T M, FAKIH H H, SALIBA D, et al. Stabilization of

- functional DNA structures with mild photochemical methods [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(4): 2142-2151.
- [160] BAI T X, ZHANG J Y, HUANG K, et al. Reconfiguration of DNA nanostructures induced by enzymatic ligation treatment [J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(14): 8392-8398.
- [161] HANG X M, LIU P F, TIAN S, et al. Rapid and sensitive detection of Ebola RNA in an unamplified sample based on CRISPR-Cas13a and DNA roller machine[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 211: 114393.
- [162] YAO S, LIU Y, DING Y K, et al. Three-dimensional DNA nanomachine biosensor coupled with CRISPR Cas12a cascade amplification for ultrasensitive detection of carcinoembryonic antigen[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 266.
- [163] GUO J R, ZHU Y L, MIAO P. Nano-impact electrochemical biosensing based on a CRISPR-responsive DNA hydrogel[J]. *Nano Letters*, 2023, 23(23): 11099-11104.



**通讯作者:** 左小磊(1980—),男,研究员,博士生导师。研究方向为框架核酸、临床检验诊断、DNA信息存储等。  
E-mail: zuoxiaolei@sjtu.edu.cn



**第一作者:** 姚林欣(2001—),女,硕士研究生。研究方向为框架核酸、临床检验诊断。  
E-mail: ylx888@sjtu.edu.cn