

脱氧核酶在生物检测及基因治疗中的研究进展

范思思, 程进, 冀斌, 高超, 江凯, 刘岩, 宋杰*

上海交通大学电子信息与电气工程学院仪器科学与工程系, 纳米生物医学工程研究所, 上海 200240

* 联系人, E-mail: sjie@sjtu.edu.cn

2018-08-24 收稿, 2018-10-03 修回, 2018-10-09 接受, 2018-11-23 网络版发表

国家自然科学基金优秀青年科学基金(81822024)、国家自然科学基金国际合作项目(11761141006)、国家自然科学基金(21605102)和国家重点研发计划生物安全专项(2017YFC1200904)资助

摘要 脱氧核酶(DNAzyme)是通过体外筛选技术获得的有酶活性的单链DNA分子. 随着越来越多的脱氧核酶被筛选出来, 科学家对其功能性质的研究也逐渐深入. 其中, RNA切割作用作为脱氧核酶最重要的一种特性, 是目前研究热点. 而脱氧核酶发挥RNA切割作用需要辅因子(金属离子、中性分子、细菌等), 因此, 基于此特性, DNAzyme不仅被广泛用于金属离子和生物分子检测, 而且被应用于特异性切割mRNA阻断蛋白的翻译, 从而用于多类临床疾病的治疗. 本文系统总结了DNAzyme在金属离子和生物分子检测以及在基因治疗方面的研究进展, 并对其在动物体内对目标分子的高灵敏度、低浓度特异性检测及发挥切割活性进而达到疾病治疗做出了展望.

关键词 脱氧核酶, RNA 切割作用, 检测, 基因治疗

核酸, 作为生命的基本物质之一, 是遗传信息的主要载体和调控者^[1]. 随着交叉学科发展, 核酸的其他功能也被发现. 即通过特定的指数富集的配基系统进化筛选技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)^[2], 可以得到有特殊功能的核酸分子, 这类核酸称为功能核酸^[3~5]. 功能核酸主要可以分为两大类: (1) 具有特异性识别功能的核酸分子, 能够靶向识别并结合特定的目标物, 这类 DNA 或者 RNA 称为核酸适配体(aptamer); (2) 具有酶活性, 依赖特定的金属离子或者生物小分子进行催化酶切反应, 这类DNA或者RNA称为核酶(DNAzyme/RNAzyme). 根据功能的不同, 可以将脱氧核酶分为七大类: (1) 具有RNA切割活性的RNA切割酶(RNA-cleaving DNAzyme); (2) 具有DNA连接酶活性的DNAzyme; (3) 具有卟啉金属化酶和过氧化酶活性的DNAzyme; (4) 具有DNA水解活性的DNAzyme; (5) 具有DNA激酶活性的DNAzyme; (6)

具有N₂糖基化酶活性的DNAzyme; (7) 具有DNA戴帽活性的DNAzyme. 其中具有RNA切割活性的RNA-cleaving DNAzyme应用最广泛, 它能催化目标mRNA 特定部位的切割, 同时因其具有廉价低毒、易合成易修饰、高稳定性和特异性的优势备受青睐.

目前, 研究最多的能够切割RNA的脱氧核酶主要有: 8-17 DNAzyme(从约 1×10^{14} 个随机序列体外筛选时第8轮循环第17个克隆)和10-23 DNAzyme(从约 1×10^{14} 个随机序列体外筛选时第10轮循环第23个克隆). 其中, 10-23型RNA-cleaving DNAzyme工作原理如图1所示, 底物链与脱氧核酶链在结合区(图示黑色区域)通过碱基互补配对原则结合, 在辅因子存在的情况下, 催化核心结构区(图示红色区域)折叠形成具有催化活性的特定二级结构, DNAzyme被激活, 催化底物链中RNA碱基水解断裂, 从而实现切割靶mRNA分子的功能. 由DNAzyme工作原理可以看出, 其切割反应需要辅因子参与才能实现其催化功能,

引用格式: 范思思, 程进, 冀斌, 等. 脱氧核酶在生物检测及基因治疗中的研究进展. 科学通报, 2019, 64: 1027-1036

Fan S S, Chen J, Ji B, et al. DNAzymes in biological detection and gene therapy (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1027-1036, doi: 10.1360/N972018-00874



图1 (网络版彩色)脱氧核酶工作原理示意图

Figure 1 (Color online) The working mechanism of DNAzyme

辅因子包括金属离子(Pb^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} 等)、中性分子(腺苷、精氨酸、组氨酸、维生素C等)、细菌(大肠杆菌)等,基于此特性,使得DNAzyme可以被用于特异性识别并检测辅酶因子。此外,基于RNA-cleaving DNAzyme对RNA的特定部位进行切割的特性,其被应用于破坏体内细胞和病毒的RNA,具有潜在的治疗作用。人们可以通过DNAzyme特异性定向切割mRNA阻断蛋白的翻译,从而调控蛋白的表达,因此, RNA-cleaving DNAzyme有望成为新型基因治疗的工具酶,从而为抗病毒感染、抗肿瘤等疾病的新基因治疗药物的开发提供新型核酸工具^[6,7]。

1 DNAzyme在检测上的应用

1.1 DNAzyme用于重金属离子检测

痕量的重金属离子如铅、镉、汞等,含量极微即可表现出较大的毒性。且在人体内不能降解,长期积累会引起消化、神经、呼吸和免疫系统的不适,继而导致肠绞痛、贫血和肌肉瘫痪等病症,严重时甚至可以引发中枢神经系统疾病导致死亡^[8,9]。因此,实现对重金属离子快速高灵敏度、实时检测具有十分重要的意义。目前金属离子的检测主要有原子发射光谱法^[10]、荧光分光光度法^[11,12]、紫外-可见吸收光谱法^[13]、电化学法^[14]等。但是这些方法大多依赖昂贵的大型仪器设备,且耗时长,需要专门的技术人员进行操作,使得它们难以适应当前检测工作的需要。因此,开发一种简单、快速、灵敏的重金属离子定性、定量检测技术仍然是当下重要的目标。自1994年Breaker和Joyce^[15]通过SELEX筛选技术得到了一种能够在 Pb^{2+} 存在下对RNA显示切割活性的DNA分子,即DNAzyme以来,科学家相继发现了多种DNAzymes,它们对金属离子有高度的识别特异性,只有在特定金属离子的存在下,才能显示酶活性,且酶活性的大小与金属离子的浓度密切相关。因此, DNAzymes可

以用于检测重金属离子。

天然的DNAzyme一般是D型核酸(D-DNAzyme),在实际样品的检测中易酶解、易与非靶标蛋白和非靶标核酸结合造成脱靶效应,很大程度上限制了DNAzyme的应用。因此,提高DNAzyme的稳定性以及对靶分子的特异性具有重要意义。值得高兴的是,近年来,基于对映异构体概念,科学家设计合成了与天然D-DNAzyme互为镜像异构的L型核酸(L-DNAzyme)^[16,17]。与D-DNAzyme相比, L-DNAzyme生物稳定性高,有望用于构建复杂检测体系,并进一步实现体内检测。

1.1.1 Pb^{2+} DNAzyme

用于检测 Pb^{2+} 的DNAzyme是发现最早的一种可以对RNA切割的DNAzyme,该酶只有在 Pb^{2+} 存在的条件下,才能表现出酶切活性,因此,可以用于检测 Pb^{2+} 。图S1^[18]是一种用于检测 Pb^{2+} 的酶链17E,该链酶17E由催化中心(13个脱氧核糖碱基构成的茎-环结构和单链区域)和两侧的底物识别结构域构成。当含有一个RNA碱基的底物链17S与酶链17E碱基互补配对后,在 Pb^{2+} 的存在下,底物链在RNA碱基处发生断裂。

近年来,已有学者基于 Pb^{2+} DNAzyme设计并改进了 Pb^{2+} 传感器。如图2(a)是Lu课题组^[19]设计的第一代 Pb^{2+} 传感器,其工作原理是:当5'端标记荧光基团的底物链和3'标记猝灭基团的酶链结合时,荧光基团与猝灭基团相互接近,荧光基团荧光猝灭。加入 Pb^{2+} 后,底物链被切割成两段,断裂后的底物链从酶链上解离下来,荧光基团与猝灭基团相互远离,荧光复原,据此可以实现 Pb^{2+} 的定量检测。但是第一代 Pb^{2+} 传感器存在较大的背景荧光干扰和探针的合成难度高等问题,为了解决这些问题, Lu课题组^[20]和张晓兵课题组^[21]相继在此基础上设计了第二代(图2(b))、第三代(图2(c))和基于单链DNAzyme的 Pb^{2+} 传感器(图2(d))^[22]。改进后的 Pb^{2+} 传感器不仅降低了检测体系的复杂性,而且获得了较低的背景荧光。

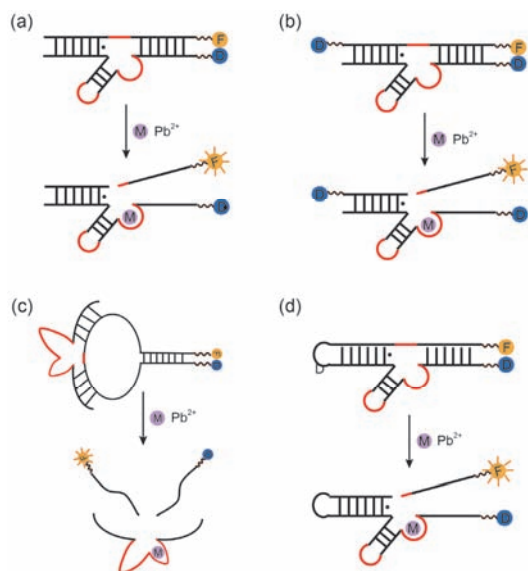


图2 (网络版彩色)基于DNAzyme的 Pb^{2+} 荧光传感器的工作原理。(a) 第一代 Pb^{2+} 传感器^[19];(b) 第二代 Pb^{2+} 传感器^[20];(c) 第三代 Pb^{2+} 传感器^[21];(d) 基于单链DNAzyme的 Pb^{2+} 传感器^[22]

Figure 2 (Color online) Working mechanism of Pb^{2+} sensor on the basis of DNAzyme. (a) The first generation Pb^{2+} sensor^[19]. (b) The second generation Pb^{2+} sensor^[20]. (c) The third generation Pb^{2+} sensor^[21]. (d) The Pb^{2+} sensor based on the single-strand DNAzyme^[22]

1.1.2 Cu^{2+} DNAzyme

Cu^{2+} DNAzyme是一种DNA-cleaving DNAzyme, 其切割作用需要在 Cu^{2+} 的协助才能完成^[23], 因此可以用于检测 Cu^{2+} . 如图3(a)所示, Lu课题组^[24]基于此 Cu^{2+} DNAzyme二级结构构建的 Cu^{2+} 荧光传感器, 如图3(b)所示. 该系统在底物链的5'端和3'端分别标记荧光基团和猝灭基团, 同时在酶链的3'-端标记猝灭基团. 在两个猝灭基团的共同作用之下, 大大降低了传感体系的背景荧光, 同时实现了 Cu^{2+} 的低浓度检测(35 nmol/L). 为了进一步实现 Cu^{2+} 高灵敏度、低探测限检测, Li等人^[25]基于如图3所示的 Cu^{2+} DNAzyme, 对 Cu^{2+} DNAzyme进行重构(图4(a)), 他们将荧光分子/猝灭分子紧密的笼困在分子内的双螺旋结构中, 这种重构的结构不仅使得检测的荧光背景大大降低, 而且实现了对 Cu^{2+} 更低浓度的检测(0.6 nmol/L). 此外, 如图4(b)所示, 为了解决DNAzymes在生物体系中不稳定、易被降解的问题, 张晓兵课题组^[26]根据底物互惠特异性原则, 以特异性识别 Cu^{2+} 的DNAzyme为参照序列, 设计了一种新型 Cu^{2+} 依赖性L-DNAzyme, 用于复杂体系中 Cu^{2+} 的检测. 结果显示, L-DNAzyme具有与D-DNAzyme相似的催化活性, 但在生物基质中显示出更好的生物稳定性, 实现了在细胞内5 nmol/L

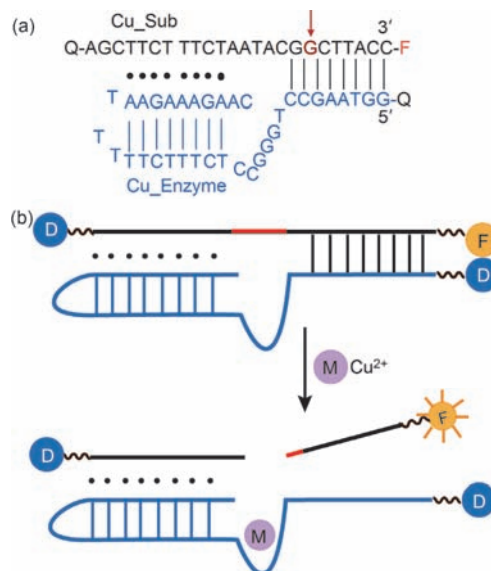


图3 (网络版彩色) Cu^{2+} DNAzyme^[24]. (a) Cu^{2+} DNAzyme的二级结构;(b) 基于DNAzyme的 Cu^{2+} 荧光传感器的工作原理

Figure 3 (Color online) Cu^{2+} DNAzyme^[24]. (a) The secondary structure of the Cu^{2+} DNAzyme. (b) Working mechanism of Cu^{2+} sensor on the basis of DNAzyme

低浓度检测, 并有望用于活体细胞中金属离子的检测.

1.1.3 UO_2^{2+} DNAzyme

同 Pb^{2+} DNAzyme类似, UO_2^{2+} DNAzyme也是一种RNA-cleaving DNAzyme, 其切割作用需要在 UO_2^{2+} 的存在下才能实现^[24]. 如图S2(a)所示, UO_2^{2+} DNAzyme的结构与 Pb^{2+} DNAzyme结构相近, Lu课题组^[24]用荧光基团和猝灭基团对底物链进行双标记, 用猝灭基团对酶链进行单标记(图S2(b)), 构建了高灵敏度、高特异性的 UO_2^{2+} 荧光传感器, 实现了对 UO_2^{2+} 低浓度(45 pmol/L)检测.

1.2 DNAzyme用于其他物质检测

前面说到, DNAzyme的辅助因子既可以是特定的金属离子(Pb^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} 等), 也可以是细菌(大肠杆菌等)或者中性分子(腺苷、精氨酸、组氨酸、维生素C等). 因此, 同样可以构建用于生物样品中目标分子的DNAzyme检测系统.

1.2.1 DNAzyme用于细菌及肿瘤细胞检测

在过去的10年里, Li课题组^[27-30]开发了一种基于“标记荧光的RNA切割酶(RNA-cleaving fluorogenic DNAzyme, RFD)”的检测体系. RFD探针是一段DNA单链, 其中插入1个RNA碱基. RNA碱基两侧的核苷酸分别标记1个荧光基团和猝灭基团. 其检测机理是:

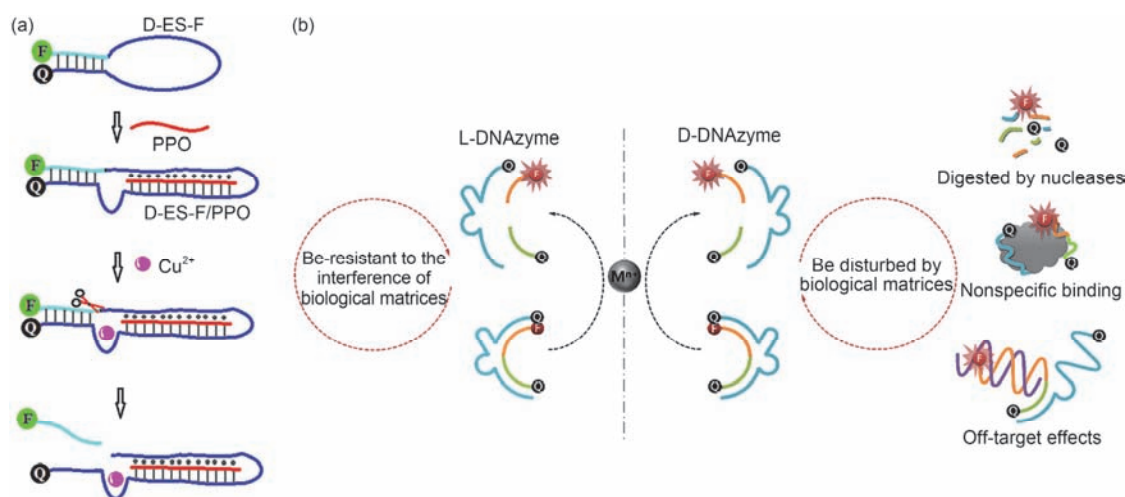


图4 (网络版彩色) Cu^{2+} 检测. (a) 基于原始 Cu^{2+} DNAzyme 重构的 Cu^{2+} 检测体系工作原理^[25]; (b) D-DNAzyme与L-DNAzyme与金属离子作用的机理图^[26]

Figure 4 (Color online) Cu^{2+} detection. (a) The working mechanism of Cu^{2+} fluorescent sensor based on the reconstructed detection system. (b) The working mechanism of D-DNAzyme and L-DNAzyme with metal ions^[26]

当RFD与特定的目标对象结合后, RFD构象转变成具有切割RNA活性的RNA-cleaving构象, 使得荧光基团和猝灭基团分离, 产生荧光信号, 从而用于目标物的定性和定量检测. 近年来, RFDs探针已经被用于实时检测细菌^[31~33]. 如图5所示, Yousefi等人^[34]基于RNA-cleaving DNAzymes构建了荧光探针, 该荧光探针能够特异性识别并结合大肠杆菌, 使DNAzyme形成特定的二级结构, 激活DNAzymes切割活性, 释放荧光基团, 产生荧光信号, 实现了对食物中的大肠杆菌高灵敏度的特异性检测. 另外, RFDs探针还用于特异性识别肿瘤细胞, 与传统的检测方法相比, RFDs探针检测过程简单、耗时短、且特异性高. 如图6所示, Li课题组^[35]构建的RNA-cleaving DNAzymes 荧光探针用于特异性识别乳腺癌细胞MDA-MB-231, 同样, DNAzyme 特异性识别并结合乳腺癌细胞MDA-MB-231, 使DNAzyme形成特定的二级结构, 激活DNAzymes切割活性, 释放荧光基团, 产生荧光信号, 实现了对MDA-MB-231低浓度特异性检测($0.5 \mu\text{g/mL}$). 另外, 结果表明该RNA-cleaving DNAzymes 荧光探针的定向切割作用有望进一步被用于乳腺癌的诊断和治疗.

1.2.2 DNAzyme用于中性分子检测

三磷酸腺苷(ATP)是生物体内组织细胞一切生命活动所需能量的直接来源, 能够储存和传递化学能量, 是细胞内能量的“分子货币”. 其参与包括肌肉收

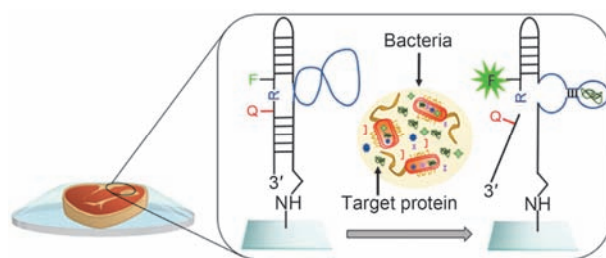


图5 (网络版彩色) 基于RNA-cleaving DNAzymes荧光探针用于检测食物中的大肠杆菌^[34]

Figure 5 (Color online) The mechanism of RNA-cleaving fluorogenic DNAzymes for the detection of live *E. coli* cells^[34]

缩、细胞功能、重要的细胞化合物的合成和降解、膜运输等一系列的生物学过程, 是细胞活性和细胞损伤的一个重要指标. 因此, 实现对ATP的定量检测在生化研究、临床诊断、食品安全控制和环境分析领域都具有重要的意义^[36,37]. 近年来, 科学家通过ATP依赖性DNA连接酶(能够通过3个核苷酸转移步骤封闭多核苷酸中由5'- P_0 和3'-OH末端组成的裂口, 转移步骤涉及连接酶-腺苷酸与DNA-腺苷酸中间体), 构建了对ATP的检测平台. 但是这些检测方法主要存在灵敏度低的缺点. 为了解决这个问题, 科学家利用DNAzymes独特的自剪切活性, 能够催化反应能够历经多圈循环, 从而引发多个基底的剪切反应这一特性, 将DNAzymes引入ATP检测平台, 用以信号循环放大, 提高检测的灵敏度. 如图7所示, Lu等人^[38]

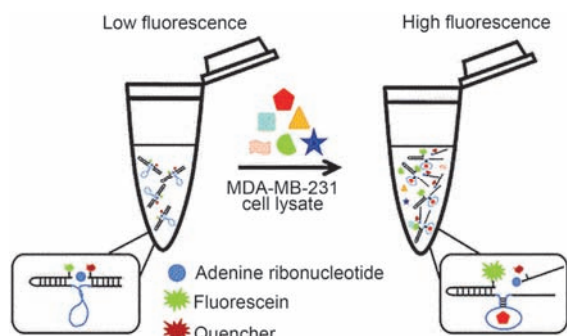


图6 (网络版彩色)基于RNA-cleaving DNAszymes荧光探针用于特异性识别并检测乳腺癌细胞MDA-MB-231的机理图^[35]

Figure 6 (Color online) The mechanism of RNA-cleaving fluorogenic DNAszymes for the recognition and detection of MDA-MB-231 cell lysate^[35]

将辅因子ATP依赖性的酶连接反应和自剪切核酸酶DNAszyme信号放大用于构建ATP检测体系。由于T4 DNA连接酶对辅因子ATP具有高度的特异性，当检测系统中不存在目标分子ATP时，2段独立的DNA片段不能被连接成一条完整的DNAszyme序列，后续的自剪切催化反应就不能发生。因此，此检测体系对ATP的响应具有高度的选择性，同时，连接反应产生的DNAszyme能够循环放大自剪切所产生的电化学信号变化，增强传感系统的灵敏度，使得其对于ATP的检测限达到0.053 nmol/L ($S/N=3$)。

L-组氨酸是一种半必需氨基酸，其具有特殊的生理学作用，比如组氨酸能降低胃液酸度、缓和胃肠

手术时的疼痛、减轻妊娠期呕吐及胃部灼热感、抑制由植物神经紧张而引起的消化道溃疡。此外，组氨酸还常用于心绞痛、心功能不全等疾病的治疗。因此，高灵敏度和高选择性的组氨酸定量检测方法的提出，对于组氨酸相关疾病的诊断与治疗都具有重要意义。基于L-组氨酸依赖性的DNAszyme可实现对L-组氨酸的特异性检测。近年来，为了提高组氨酸定量检测的灵敏度和选择性，科学家们做出了不断努力，俞汝勤课题组^[39]基于L-组氨酸依赖性的DNAszyme和荧光级联催化信标构建了L-组氨酸检测体系，但是由于它缺乏相应的信号放大单元，导致传感器对目标分子检测的灵敏度并没有得到非常显著的提高。如图S3(a)所示，为了进一步放大检测信号，曹忠课题组^[40]提出用核酸切割内切酶N. BstNB I作为检测体系的信号放大单元，使得L-组氨酸依赖性的DNAszyme由于自剪切作用而游离出的DNA片段与固定在电极上的发卡结构DNA发生的杂交与酶切反应得以进行多圈循环，从而产生电化学信号循环放大的效果，以此提高对L-组氨酸检测的灵敏度(图S3(b))。同时，通过降低背景信号也能有效提高检测灵敏度，而通过巧妙的设计引入一种背景抑制剂来暂时关闭体系本身的信号，能够有效降低背景信号，让只有在待测物出现时才释放出信号。例如，罗红群课题组^[41]在检测体系中引入氧化石墨烯(GO)，用以降低检测荧光背景信号，他们利用Klenow Fragment, Exo-聚合酶辅助的

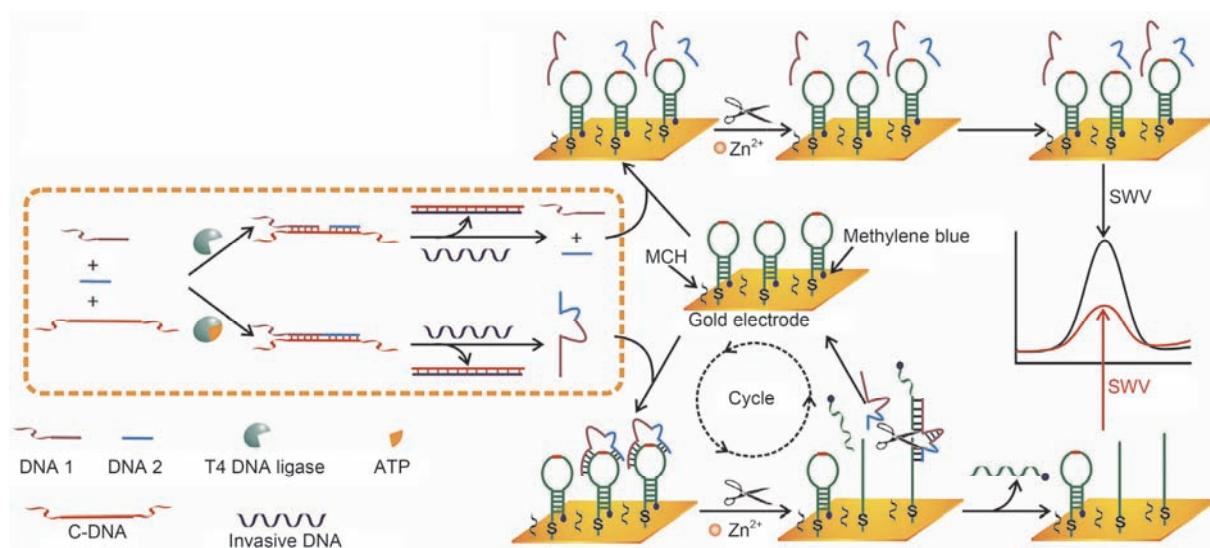


图7 (网络版彩色)基于ATP依赖性的酶连接反应和DNAszyme信号放大构建的ATP检测体系^[38]

Figure 7 (Color online) Schematic illustration of the electrochemical sensing system based on the dual strategy of ATP-dependent enzymatic ligation reaction and self-cleaving DNAszyme-based cyclic amplification^[38]

双重目标循环放大和GO辅助的背景信号降低策略构建了一种DNA传感器用于L-组氨酸的检测. 由于同时采用了信号放大和背景降低策略, 使得该传感器对于L-组氨酸检测的灵敏度达到了1.73 pmol/L(图S3(c)).

2 DNAzyme在基因治疗上的应用

基因治疗是在基因水平上抑制 mRNA的转录和翻译, 使蛋白的表达受到抑制, 从而达到治疗的目的. 具有RNA切割功能的RNA-cleaving DNAzyme能够特异性地切割目标RNA, 阻断蛋白的翻译工作, 达到对蛋白质调控的目的, 因此, RNA-cleaving DNAzyme已经被成功地应用于多类临床疾病的治疗^[42-44]. 继第一个针对抑制 *Bcr-Abl* 癌基因的研究后^[45], DNAzyme作为一类新型生物技术来源药物, 在肿瘤基因治疗领域^[46]的研究中已经凸显出巨大的意义.

事实上, DNAzyme在肿瘤及病原微生物的基因治疗还只活跃在科研阶段, 距离临床应用尚有很长的距离, 其中最突出的就是递送的问题, 即如何选择安全、高效、特异的导向性载体, 将DNAzyme递送至目的基因. 近年来, 纳米医学的兴起为基因治疗带来新的契机. 利用纳米尺寸材料构建药物递送体系能有效地传递基因药物到达肿瘤组织. 纳米药物载体是提高药物生物利用度、增强药物稳定性及提高药物靶向治疗的有效手段. 如图8所示, Tan课题组^[47]将DNAzyme负载在MnO₂纳米片上用于基因治疗, MnO₂纳米片作为Ce6标记的DNAzyme的载体, 不仅可以保护DNAzyme被体内酶消化, 而且可以高效地将DNAzyme递送到细胞质内. 当Ce6-DNAzyme-MnO₂进入体内后, MnO₂被体内的谷胱甘肽还原成Mn²⁺, 得到的Mn²⁺可以进一步作为DNAzyme辅助因子, 使DNAzyme活化. 活化后的DNAzyme能够有效切割目标mRNA, 使基因沉默, 从而用于治疗. 表明将纳米材料与DNAzyme有效结合, 构建的先进递送系统不仅辅助了传统DNAzyme作为基因治疗药物的开发, 还可用于基因的功能及基因突变效应等方面的基础研究.

DNAzyme还可用于抗病毒, 其在抗HIV病毒的研究中报道最早且最多. 在10-23 DNAzyme刚发现后, Santoro和Joyce^[48]就将其首先运用到抗HIV研究中去, 他们分别合成了针对HIV gap/pol, env, vpr, tat

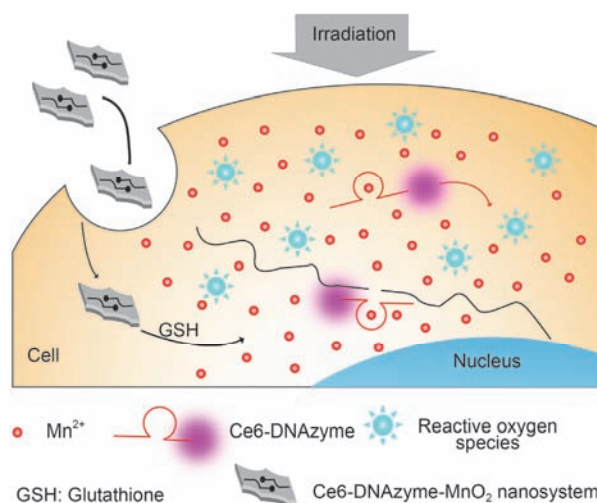


图8 (网络版彩色)Ce6-DNAzyme-MnO₂纳米体系用于基因沉默和光动力治疗机理^[47]

Figure 8 (Color online) Activated mechanism of the Ce6-DNAzyme-MnO₂ nanosystem for gene silencing and PDT^[47]

和nef的DNAzyme. 结果均与预期切割效果相一致. 针对HIV-1病毒基因5'末端顺式激活反应元件(TAR)筛选出许多切割位点用于抑制病毒的复制, Unwalla和Banerjee^[49]以“10-23”DNAzyme为模板, 设计了多种针对HIV病毒TAT和TAT-REVRNA的DNAzyme, 通过筛选发现其中Dz-5970可在模拟生理状态下高效切割靶RNA, 抑制率高达90%, 并且在导入细胞后仍然保持较高活性. 为了进一步提高DNAzyme体导入哺乳动物细胞在活性, Unwalla和Banerjee^[50]借助于鸟嘌呤残基可直接与巨噬细胞表面清道夫受体相互作用的能力, 合成了一种在3'末端包含10个G残基的DNAzyme 5970, 经过这种改造的DNAzyme可不需要载体而被巨噬细胞特异性摄取, 并能够特异性切割HIV-1 TAT/Rev的编码RNA, 从而有效抑制细胞内HIV-1病毒的基因表达. 该实验为DNAzyme应用于活体治疗的实用性提供了方法学依据.

此外, DNAzyme在乙型肝炎病毒^[51]、人呼吸道合胞病毒^[52]等方面均有研究, 且均表现出抑制病毒复制的良好效果.

3 总结和展望

通过DNAzyme高稳定性、可循环催化、易合成、易功能化修饰的优点, 以及可特异性识别金属离子、中性分子、细菌等辅因子的特性, DNAzymes被广泛用于金属离子和生物分子的检测. 但是目前基于

DNAzyme的金属离子和生物分子检测体系的应用还主要集中于实验室条件下,而对于生产生活甚至体内的检测仍受限于诸多生物学机理的阐明和概念的实现.为了使DNAzymes能够更多地应用于真正的实际检测甚至体内检测,还需要在提高检测体系的抗干扰能力及提高DNAzyme在体内的稳定性方面开展更深入的研究工作.

此外,基于DNAzymes的RNA切割作用已经被用

于肿瘤基因治疗领域.但是DNAzymes真正用于人类疾病的防治,仍有很长的路要走,包括DNAzymes如何导入细胞与表达;DNAzymes引入细胞后的稳定性;DNAzymes结构的设计,特别是选择合适长度的侧翼,和底物以及如何提高DNAzymes的活性等方面均有待进一步探索 and 解决.可以借助快速发展的纳米技术,将纳米材料和DNAzyme有效结合构建药物递送体系,从而高效地传递基因药物到达肿瘤组织.

参考文献

- 1 Lander E S, Linton L M, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, 409: 860–921
- 2 Wang R E, Zhang Y, Cai J, et al. Aptamer-based fluorescent biosensors. *Curr Med Chem*, 2011, 18: 4175–4184
- 3 Achenbach J C, Chiuman W, Cruz R P, et al. Dnazymes: From creation *in vitro* to application *in vivo*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2004, 5: 321–336
- 4 Silverman S K. *In vitro* selection, characterization, and application of deoxyribozymes that cleave RNA. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 6151
- 5 Wang F, Lu C H, Willner I. From cascaded catalytic nucleic acids to enzyme-DNA nanostructures: Controlling reactivity, sensing, logic operations, and assembly of complex structures. *Chem Rev*, 2014, 114: 2881–2941
- 6 Sullenger B A, Gilboa E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature*, 2002, 418: 252–258
- 7 Pelosof G, Tel-Vered R, Willner I. Amplified surface plasmon resonance and electrochemical detection of Pb^{2+} ions using the Pb^{2+} -dependent dnzyme and hemin/g-quadruplex as a label. *Anal Chem*, 2012, 84: 3703–3709
- 8 Needleman H. Lead poisoning. *Annu Rev Med*, 2004, 55: 209–222
- 9 Baker A S, Deiters A. Optical control of protein function through unnatural amino acid mutagenesis and other optogenetic approaches. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 1398–1407
- 10 Kumar B N, Venkata Ramana D K, Harinath Y, et al. Separation and preconcentration of Cd(ii), Cu(ii), Ni(ii), and Pb(ii) in water and food samples using amberlite XAD-2 functionalized with 3-(2-nitrophenyl)-1H-1,2,4-triazole-5(4H)-Thione and determination by inductively coupled plasma—Atomic emission spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 11352–11358
- 11 Wegner S V, Okesli A, Chen P, et al. Design of an emission ratiometric biosensor from MerR family proteins: A sensitive and selective sensor for Hg^{2+} . *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 3474–3475
- 12 Peng X, Du J, Fan J, et al. A selective fluorescent sensor for imaging Cd^{2+} in living cells. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 1500–1501
- 13 Vester B, Wengel J. LNA (locked nucleic acid): High-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*, 2004, 43: 13233–13241
- 14 Yang H, Zhou Z, Huang K, et al. Multisignaling optical-electrochemical sensor for Hg^{2+} based on a rhodamine derivative with a ferrocene unit. *Org Lett*, 2007, 9: 4729–4732
- 15 Breaker R R, Joyce G F. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol*, 1994, 1: 223
- 16 Olea C Jr, Horning D P, Joyce G F. Ligand-dependent exponential amplification of a self-replicating 1-RNA enzyme. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 8050–8053
- 17 Lu L M, Zhang X B, Kong R M, et al. A ligation-triggered dnzyme cascade for amplified fluorescence detection of biological small molecules with zero-background signal. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 11686–11691
- 18 Liu X, Tang Y, Wang L, et al. Optical detection of mercury(ii) in aqueous solutions by using conjugated polymers and label-free oligonucleotides. *Adv Mater*, 2007, 19: 1471–1474
- 19 Liu J W, Lu Y. Adenosine-dependent assembly of aptazyme-functionalized gold nanoparticles and its application as a colorimetric biosensor. *Anal Chem*, 2004, 76: 1627–1632
- 20 Liu J, Lu Y. Improving fluorescent dnzyme biosensors by combining inter- and intramolecular quenchers. *Anal Chem*, 2003, 75: 6666–6672
- 21 Zhang X B, Wang Z, Xing H, et al. Catalytic and molecular beacons for amplified detection of metal ions and organic molecules with high sensitivity. *Anal Chem*, 2010, 82: 5005–5011
- 22 Li H, Zhang Q, Cai Y, et al. Single-stranded dnzyme-based Pb^{2+} fluorescent sensor that can work well over a wide temperature range. *Bios Bioelectr*, 2012, 34: 159–164

- 23 Xu W T, Tian J J, Luo Y B, et al. A rapid and visual turn-off sensor for detecting copper (II) ion based on DNAzyme coupled with HCR-based HRP concatemers. *Sci Rep*, 2017, 7: 43362
- 24 Liu J, Lu Y. A dnzyme catalytic beacon sensor for paramagnetic Cu^{2+} ions in aqueous solution with high sensitivity and selectivity. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 9838–9839
- 25 Li H, Huang X X, Kong D M, et al. Ultrasensitive, high temperature and ionic strength variation-tolerant Cu^{2+} fluorescent sensor based on reconstructed Cu^{2+} -dependent dnzyme/substrate complex. *Biosens Bioelectron*, 2013, 42: 225–228
- 26 Cui L, Peng R, Fu T, et al. Biostable l-DNAzyme for sensing of metal ions in biological systems. *Anal Chem*, 2016, 88: 1850–1855
- 27 Liu J W, Lu Y. A colorimetric lead biosensor using DNAzyme-directed assembly of gold nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 6642–6643
- 28 Mei S H J, Liu Z J, Brennan J D, et al. An efficient RNA-cleaving DNA enzyme that synchronizes catalysis with fluorescence signaling. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 412–420
- 29 Kandadai S A, Li Y. Characterization of a catalytically efficient acidic RNA-cleaving deoxyribozyme. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 7164–7175
- 30 Ali M M, Kandadai S A, Li Y. Characterization of ph3dz1—An RNA-cleaving deoxyribozyme with optimal activity at pH 3. *Can J Chem*, 2007, 85: 261–273
- 31 Aguirre S D, Ali M M, Kanda P, et al. Detection of bacteria using fluorogenic dnzymes. *J Vis Exp*, 2012, 3961
- 32 Ali M M, Aguirre S D, Lazim H, et al. Fluorogenic dnzyme probes as bacterial indicators. *Angew Chem*, 2011, 50: 3751–3754
- 33 Zhang W, Feng Q, Chang D, et al. *In vitro* selection of RNA-cleaving dnzymes for bacterial detection. *Methods*, 2016, 106: 66–75
- 34 Yousefi H, Ali M M, Su H M, et al. Sentinel wraps: Real-time monitoring of food contamination by printing dnzyme probes on food packaging. *ACS Nano*, 2018, 12: 3287–3294
- 35 He S, Qu L, Shen Z, et al. Highly specific recognition of breast tumors by an RNA-cleaving fluorogenic dnzyme probe. *Anal Chem*, 2015, 87: 569–577
- 36 Shahsavari K, Hosseini M, Shokri E, et al. A sensitive colorimetric aptasensor with a triple-helix molecular switch based on peroxidase-like activity of a dnzyme for ATP detection. *Anal Methods*, 2017, 9: 4726–4731
- 37 Xu J, Wei C. The aptamer DNA-templated fluorescence silver nanoclusters: ATP detection and preliminary mechanism investigation. *Biosens Bioelectron*, 2017, 87: 422–427
- 38 Lu L, Si J C, Gao Z F, et al. Highly selective and sensitive electrochemical biosensor for atp based on the dual strategy integrating the cofactor-dependent enzymatic ligation reaction with self-cleaving DNAzyme-amplified electrochemical detection. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 14–20
- 39 Kong R M, Zhang X B, Chen Z, et al. Unimolecular catalytic DNA biosensor for amplified detection of l-histidine via an enzymatic recycling cleavage strategy. *Anal Chem*, 2011, 83: 7603–7607
- 40 He J L, Wu P, Zhu S L, et al. Cleaved dnzyme substrate induced enzymatic cascade for the exponential amplified analysis of l-histidine. *Talanta*, 2015, 132: 809–813
- 41 Jiao X X, Nian H Q, Li B. Fabrication of graphene-gold nanocomposites by electrochemical co-reduction. *J Electroanal Chem*, 2013, 691: 83–89
- 42 Baum D A, Silverman S K. Deoxyribozymes: Useful DNA catalysts *in vitro* and *in vivo*. *Cellular Mol Life Sci*, 2008, 65: 2156–2174
- 43 Dass C R, Choong P F, Khachigian L M. DNAzyme technology and cancer therapy: Cleave and let die. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7: 243–251
- 44 Cairns M J, Hopkins T M, Witherington C, et al. The influence of arm length asymmetry and base substitution on the activity of the 10–23 DNA enzyme. *Antis Nucl A*, 2000, 10: 323–332
- 45 Wu Y, Yu L, McMahon R, et al. Inhibition of BCR-ABL oncogene expression by novel deoxyribozymes (DNAzymes). *Hum Gene Ther*, 1999, 10: 2847–2857
- 46 Fan H, Zhang X, Lu Y. Recent advances in DNAzyme-based gene silencing. *Sci China Chem*, 2017, 60: 591–601
- 47 Fan H, Zhao Z, Yan G, et al. A smart DNAzyme- MnO_2 nanosystem for efficient gene silencing. *Angew Chem*, 2015, 54: 4801–4805
- 48 Santoro S W, Joyce G F. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 4262–4266
- 49 Unwalla H, Banerjee A C. Novel mono- and di-DNA-enzymes targeted to cleave TAT or TAT-REV RNA inhibit HIV-1 gene expression. *Antiviral Res*, 2001, 51: 127–139
- 50 Unwalla H, Banerjee A. Inhibition of HIV-1 gene expression by novel macrophage-tropic DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAT/rev RNA. *Biochem J*, 2001, 357: 147–155
- 51 Jing M X, Hong Y, Rao Y F, et al. Inhibition on hepatitis b virus e-gene expression of 10–23 DNAzyme delivered by. *Carbohydr Polym*, 2012, 87: 1342–1347

52 Schubert S. Rna cleaving “10–23” DNazymes with enhanced stability and activity. Nucl Acids Res, 2003, 31: 5982–5992

补充材料

图 S1 Pb^{2+} DNzyme 的二级结构

图 S2 UO_2^{2+} DNzyme

图 S3 基于 L-组氨酸依赖性的 DNzyme 检测体系构建

本文以上补充材料见网络版 csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “脱氧核酶在生物检测及基因治疗中的研究进展”

DNazymes in biological detection and gene therapy

Sisi Fan, Jin Chen, Bin Ji, Chao Gao, Kai Jiang, Yan Liu & Jie Song*

Institute of Nano Biomedicine and Engineering, Department of Instrument Science and Engineering, School of Electronic Information and Electrical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

* Corresponding author, E-mail: sjie@sjtu.edu.cn

Catalytic DNA molecules (DNazymes), produced through the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) process, are synthetic, single-stranded DNA molecules that either have catalytic abilities or can perform specific reactions. Among these DNazymes, RNA-cleaving DNazymes are the ones that can cleave RNAs at specific sites with the help of cofactors. The cofactors contains heavy metal ions (eg., Pb^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+}), small molecules (eg., ATP, L-histidine, Vc), bacteria (eg., *Escherichia coli*) and so on. Based on the particular property, the RNA-cleaving DNazymes are particularly promising for creating methods that can detect a wide variety of targets. For example, scientists have successfully found the Pb^{2+} DNzyme, Cu^{2+} DNzyme, UO_2^{2+} DNzyme and some other specific metal ions.based DNazymes. These DNazymes have a high recognition specificity for the metal ions. Only when the specific metal ions existed, can the catalytic activity be performed. Besides, and the size of the catalytic activity is closely related to the concentration of metal ions. Therefore, these DNazymes can be used to detect heavy metal ions. Similarly, the DNazymes have been used to detect the ATP, L-histidine and *Escherichia coli*. What should be mentioned is that natural DNazymes are generally D-type nucleic acids, which can be easily degraded by proteinase in physiological fluid. Therefore, in order to extend the applications of DNazymes, emphasis has been placed on improving the selectivity and stability of DNazymes. Based on the principle of enantiomer of nucleic acid, non-natural L-type nucleic acids have been used to prepare DNazymes. L-type DNazymes have similar thermal stability to D-DNazymes, they also have better biostability and are ideal materials for constructing biosensors for complex system detection. Furthermore, based on the property of cleaving RNAs at specific sites, the DNazymes can not only be used to detection, but also can be used to inactivate target cellular mRNA, which can be further applied in the treatment of multiple clinical disease. However, in fact, the gene therapy of DNazymes in tumor and pathogenic microorganisms is only active in the scientific research stage, there is still a long way to realize the real clinical applications. The most prominent problem is the delivery problems, that is, how to choose a safe, efficient and specific guiding carrier to deliver DNzyme to the target gene. In recent years, the rise of nanomedicine has brought new opportunities for gene therapy. The use of nano-sized materials to construct the drug delivery system can effectively deliver genetic drugs to tumor tissues. Nano drug carrier is an effective means to improve drug bioavailability, enhance drug stability and improve drug targeted therapy. In this review, we summarized the researches on DNzyme-based metal ion sensors and gene treatment, and in the basis, we also outlook the possibility that whether the DNazymes can be efficiently used to specifically detect the targets *in vivo*, as well as their applications of diseases therapy.

DNazymes, RNA-cleaving activity, detection, gene therapy

doi: 10.1360/N972018-00874