

分子元素与功能核酸分子

谭燕¹, 李颖颖¹, 玄文静¹, 王若文², 王雪强^{1*}, 谭蔚泓^{1*}

1. 湖南大学化学化工学院分子科学与生物医学实验室, 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082

2. 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 介绍了“分子元素”概念。论述了核酸适体的筛选及其作为大分子药物的应用价值, 概述了人工碱基的合成及进展; 探讨了脱氧核酶的作用原理, 分析了分子信标、分子马达在生物传感、生物合成、生物药物研究等方面的应用前景, 展望了核酸分子研究领域的前景及面临的挑战。

关键词 分子元素; 功能核酸; 人工碱基; 核酸适体; DNA 酶

生物化学家利用人工碱基制造新的蛋白质, 如同化学家利用化学元素合成新的化合物。2017年, Zhang等^[1]报道了将人工碱基对 dNaM-dTPT3 在体内转录为带有 2 种不同非自然密码子的信使 RNA 以及具有同源非自然反密码子的转录 RNA, 通过它们在核糖体上的有效解码, 从而指导天然或非标准氨基酸在绿色荧光蛋白中的位点特异性结合, 由此产生的半合成生物编码了更多的信息, 为创造新的生命形式提供了平台。作为生命体中广泛存在的基本物质之一, 核酸分子携带和传递遗传信息, 直接或间接编码了生命体的功能性构造单元。

核酸包括 RNA、DNA 和核酸类似物, 其基本的组成单元是核苷酸。而核苷酸由 3 部分构成: 戊糖, 磷酸和

碱基。不同的碱基(A, C, G, T, U)由键(磷酸基团)相连。如图 1 所示, 碱基就相当于核酸里的“元素”, 而磷酸则是连接“元素”的“键”。用相同的“键”, 可连接不同的碱基“元素”, 从而合成不同具有生物功能的核酸材料。因此, 将分子元素(molecular element)定义为: 根据功能需求而设计的类似核苷酸的分子单元, 这些分子单元即核苷酸中的碱基是可以任意地与核糖或者修饰核糖的 C-1 通过 β -糖苷键连接而成的活性功能化合物。可通过磷酸二酯键将这些设计合成的分子元素连接构造寡聚类核酸分子。由于这种寡聚类核酸分子可以包含任意功能的分子单元, 可以实现特定的分子识别、催化及智能响应, 从而极大地扩展天然核酸分子的功能。

收稿日期: 2018-07-19; 修回日期: 2018-09-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(81602499)

作者简介: 谭燕, 博士研究生, 研究方向为核酸分子靶向治疗, 电子信箱: nanfeiyang@hnu.edu.cn; 李颖颖(共同第一作者), 博士研究生, 研究方向为核酸适体, 电子信箱: yingyingli@hnu.edu.cn; 王雪强(通信作者), 教授, 研究方向为生物大分子设计及选择性修饰, 电子信箱: wangxq@hnu.edu.cn; 谭蔚泓(通信作者), 教授, 研究方向为生物分子识别, 电子信箱: tan@chem.ufl.edu

引用格式: 谭燕, 李颖颖, 玄文静, 等. 分子元素与功能核酸分子[J]. 科技导报, 2018, 36(22): 54-65; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2018.22.004

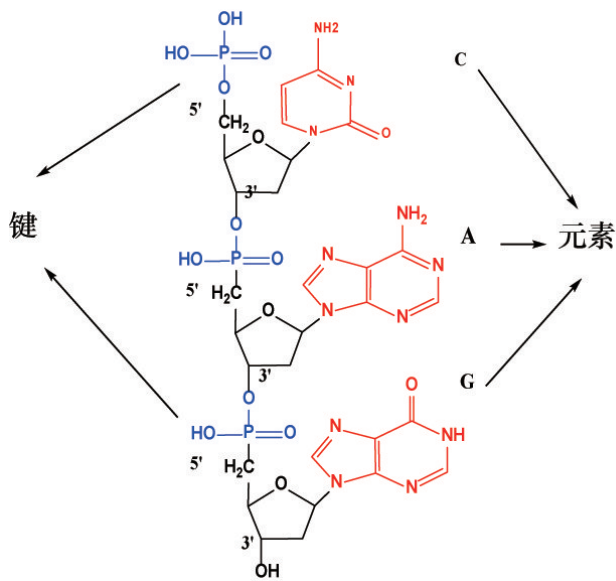


图1 “元素”和“键”构成的核酸
Fig. 1 “Element” and “bond” form nucleic acid

通过自动化DNA合成仪,利用分子元素,合成不同的DNA单链,其二级结构将赋予DNA分子多样性和特异性。从这样的化学角度来解析核酸,用相同的化学键连接不同或相同的分子元素以获得功能型的分子和材料,核酸便具备了高效、低成本、精准和多样性等优点。基于此,科学家开发了一系列有用的功能核酸,包括核酸适体、脱氧核酶、分子信标和分子马达等。

1 核酸适体

作为长度为20~100个碱基的DNA或RNA,核酸适体(aptamer)以特定的三维空间结构识别和结合靶标。靶标分子非常广泛,如金属离子、小分子化合物、蛋白、细胞等^[2-3]。利用指数富集的配基进化系统(SELEX)技术(图2(a)),可在容量为 10^{15} 个不同序列的文库中筛选到能与靶标特异性结合的核酸适体。核酸适体由于具有高特异性、高亲和力、合成重复性好、易于修饰改造等优点,被誉为“化学抗体”。通过化学交联的方法,核酸适体可以偶联其他分子,如荧光素、生物亲和分子、小干扰RNA、小分子毒素药物或纳米材料,使其具备新的功能而不影响核酸适体对靶标的特异识别功能,从而使核酸适体作为核心元素在生物传感、生物分子成像、药物靶向递送等研究领域有重要的价值。

为筛选自然构象下的靶标分子,本课题组开发了基于活细胞的SELEX技术(cell-SELEX)^[4],以多发性骨髓瘤、淋巴细胞白血病、肝癌、非小细胞癌、胰腺癌等细胞模型^[5-7]为筛选对象,分别筛选出特异识别这些细胞的核酸适体,这些核酸适体能与自然状态下的蛋白靶标分子结合,具有临床实用价值。

1.1 修饰的核酸分子及核酸适体

如图2所示,研究人员针对核酸适体存在的一些问题进行改进,如为防止核酸适体被核酸酶降解,在核糖

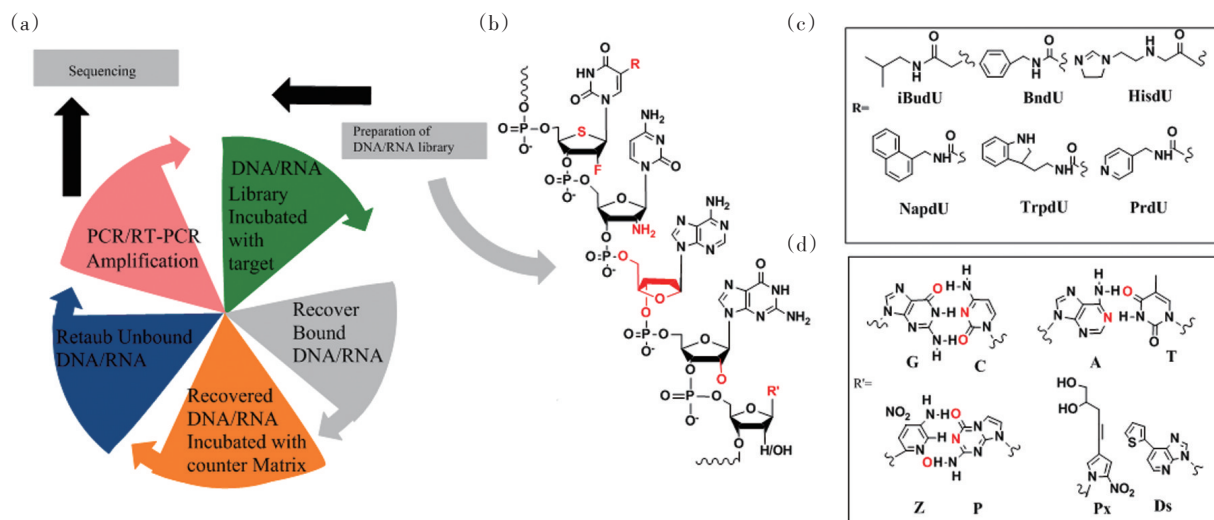


图2 基于修饰文库的SELEX技术筛选的核酸适体
Fig. 2 Aptamer from modified library-based SELEX

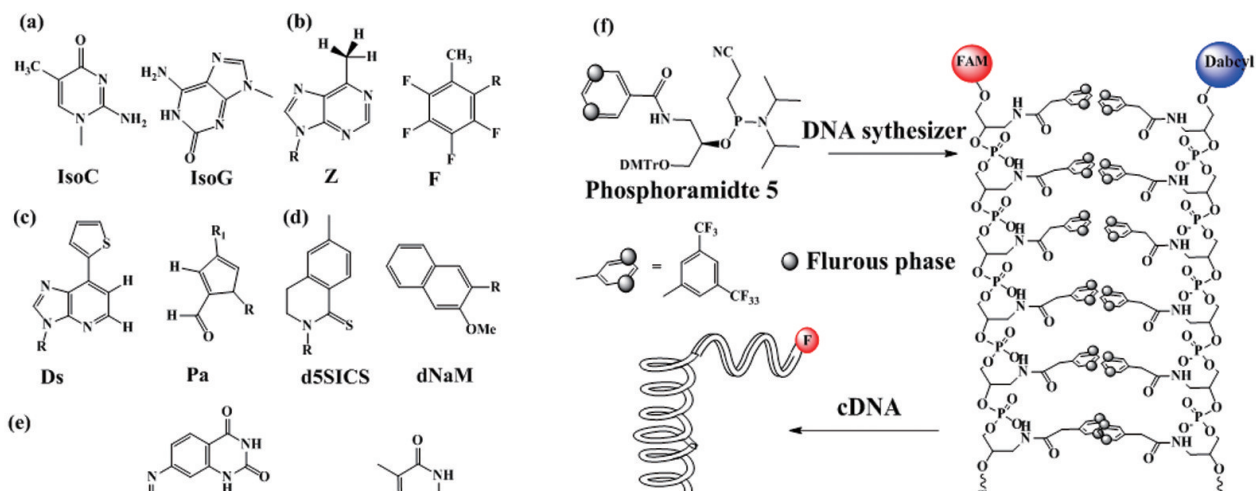
的2'-碳或5'- α -磷酸位上引入人工核糖(1-核糖和锁核酸核糖),可产生核酸酶抗性增强的适配体^[8](图2(b))。为拓展某些核酸适体的功能,将模拟氨基酸侧链的官能团添加到DNA或RNA文库中,以增强与靶标的结合亲和力^[9-11](图2(c))。

在核酸适体的筛选中引入非天然碱基是一种创新的筛选方法^[12]。2014年,Sefah等^[13]将完全随机的人工扩展DNA文库成功用于核酸适体的筛选,采用人工Z-P碱基对扩展的DNA文库进行筛选的轮次和工作量大大降低,筛选得到的核酸适体性能更加优异(图2(d))。2017年,Ren等^[14]在含有40个随机序列的文库中通过7轮筛选到与IL-1 α 高度结合的修饰的核酸适体(解离常数 k_d 为7.3 nmol/L),其中该随机区的dT碱基被5-(2-萘基羧酰胺)-脱氧尿苷(2 NAP-du)取代。2018年,Chen等^[15]用T4连接酶介导的DNA模板聚合的方法,在构建的DNA骨架侧链上含有8种不同化学修饰(聚合物密码子)的文库中,筛选得到与前蛋白转化酶枯草杆菌转化酶/Kexin 9型(PCSK9)和白介素6有高亲和力的核酸适体,该适体与PCSK9的亲合力达到3 nmol/L,能抑制PCSK9与低密度脂蛋白受体的结合。

1.2 人工碱基及其应用

天然碱基对遵循 Watson-Crick 互补配对原则:形状

互补和氢键配对。如K-X,Z-P人工碱基对,是分别基于将氢键供体和受体基团视作可替换的分子元件以及对嘌呤和嘧啶环进行改造修饰而设计的^[16]。20世纪末科学家便开始了对人工碱基对 isoG-isoC 的开发(图3(a))^[17-18],经过20年的发展,开发的人工碱基日益增多,如疏水性人造碱基对 Z-F(图3(b)),而Ds和Pa(图3(c))则实现了人工扩展DNA的体外复制和转录^[19]。Malyshev等^[20]在 dNaM-d5SICS 的人造碱基对的高效高保真PCR复制和转录之后有了进展(碱基对结构如图3(d)所示)。随后,该团队于2017年将人工碱基对导入绿色荧光蛋白的基因,把非关键区域上一个密码子TAC(负责编码酪氨酸)替换为AXC,翻译出了含有非标准氨基酸的绿色荧光蛋白^[1]。核酸检测诊断技术、六分子核酸适体技术拓展了人造碱基对的应用^[21]。本研究组在人工碱基的开发和应用方面的探索主要集中在利用zT作为功能“元素”构建光响应DNA分子。zT碱基是由偶氮苯与天然T碱基结合而成,结构如图3(e)所示。该碱基不仅有着T碱基的功能,还能对光调控有顺反异构的变化^[22]。此外,Wang等^[23]将三氟甲基化DNA作为自组装材料,与正常的核酸自组装方式不同,该三氟甲基自组装是通过疏水作用力实现,可在生理环境中保持稳定,同时还能实现¹⁹F磁共振成像,如图3(f)所示。



(a)~(e)分别为: isoG-isoC, Z-F, Ds - Pa, dazoT-dA 人工碱基对结构, (f)为三氟甲基化DNA通过疏水作用与正常碱基自组装

图3 人工碱基对及三氟甲基化DNA应用示意

Fig. 3 Schematic diagram of artificial base pairs and application of fluorinated nucleic acids

1.3 核酸适体作为药物大分子

Macugen是第一个核酸适体药物,于2004年被批准上市用于治疗老年性眼部黄斑病变^[24]。靶向核仁素的

AS1411用于抗肿瘤,目前在II期临床中^[25]。可靶向凝血酶、凝血素、凝血因子等的核酸适体,作为抗凝剂目前处于I期临床研究^[26]。除了本身作为药物之外,核酸

适体还能与其他药物分子偶联形成新的药物。在本研究组对新型核酸药物的探索研究中, Huang等^[27]将靶向PTK7的核酸适体 sgc8 与抗癌药物阿霉素 (doxorubicin, Dox) 偶联, 在细胞溶酶体的酸性环境中释放出 Dox, 对靶细胞有特异性杀伤作用。Boyaciogul 等^[28]合成的新型二聚体适配体复合物, 能提高载药量。本研究组^[29]利用自动化模块合成方法将氟尿嘧啶 5-Fu 修饰在 sgc8 核酸适体上, 能搭载 5 个药物分子 (图 4(a))。在该研究中, 药物与磷酸胺的骨架由光解连接剂 (pc-linker) 连接在一起, 在光照条件下, pc 断裂释放出 5-Fu 药物分子, 从而抑制癌细胞的增殖。实验数据表明, 该方法不仅提高了核酸适体对药物的负载能力, 而且实现了细胞内药物的可控释放。另一方面, 用甲醛交联剂形成亚甲基连接子将 G 碱基上的 2-NH₂ 和 Dox 上的 3-NH₂ 交联起来, 同样实现在核酸适体上连接多个药物^[30]。并且, 由于亚甲基连接子的温度依赖性裂解, 该核酸适体药物偶联物 (aptamer drug conjugate, ApDC), 可使药物在生理条件下逐渐释放。2017 年, Li 等^[31]用 AS1411 核酸

适体通过可被组织蛋白酶 B 降解的连接子偶联紫杉醇, 该 ApDC 具有靶向抗癌效果, 且通过核酸适体的亲水性作用显著提高紫杉醇的水溶性 (图 4(d))。最近, Gray 等^[32]发展了特异识别前列腺癌细胞的 RNA 核酸适体分别偶联 MMAE、MMAF 抑制微管蛋白的药物, 对前列腺癌动物模型的肿瘤有抑制作用 (图 4(e))。除了利用核酸适体作为生物大分子模块偶联小分子毒素药物之外, 也有非共价偶联药物的研究。本研究组^[33]用改造的 sgc8 核酸适体作为纳米火车头, 双链 DNA 纳米结构含有多个 Dox 嵌入点, 从而搭载多个药物 (图 4b)。Zhu 等^[34]构建的 sgc 8 和 sgd5a 双特异性核酸适体作为载药平台, 能够识别 2 种具有不同生物标志物的癌症亚型 (图 4(c))。因此, 核酸适体不仅可以作为大分子药物, 而且可以作为分子模块通过共价或非共价结合偶联其他毒素药物形成新型靶向治疗药物, 实现对某些疾病如癌症、炎症等的治疗, 核酸适体有望成为生物医学应用中更为广泛的临床工具^[35]。

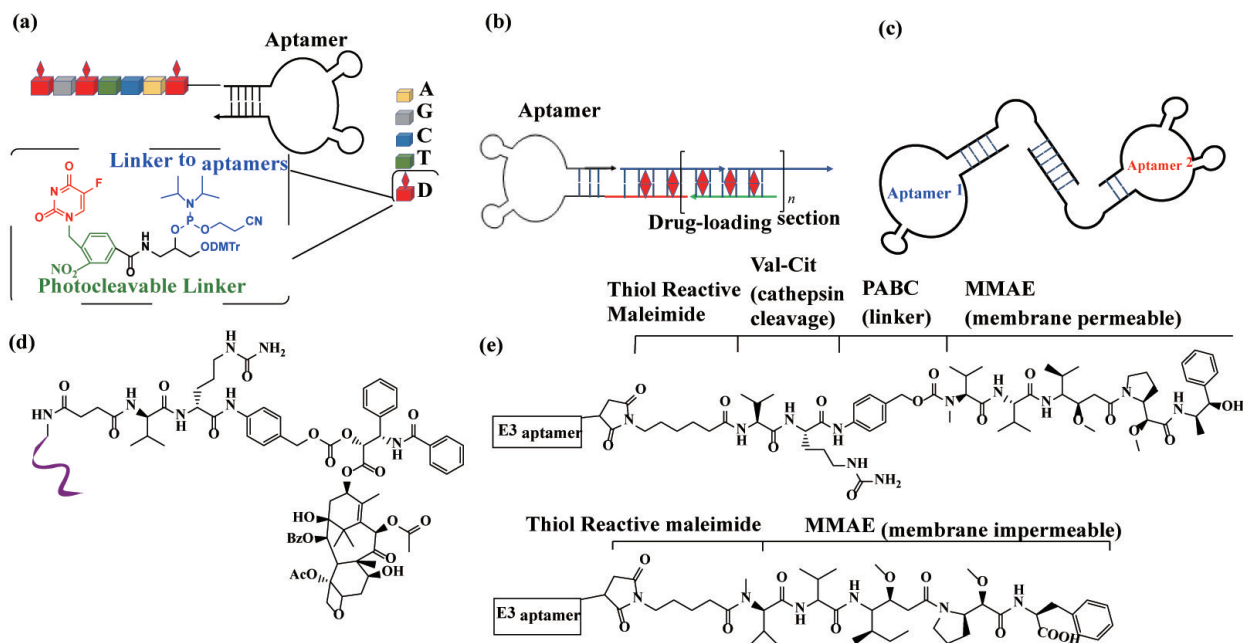


图 4 核酸适体与药物偶联

Fig. 4 Aptamer drug conjugates

2 脱氧核酶

Breaker 等^[36]首次发现单链 DNA 高效的催化活性和结构识别能力, 这些单链 DNA 被称为脱氧核酶 (也称

DNA 酶)。脱氧核酶的发现使人们认识到, 除了某些蛋白质具有催化活性, 某些核酸也有催化活性。

脱氧核酶是一段长度为 30~60 个碱基的特殊序列 DNA, 功能类似于蛋白酶。其分子识别的基础不是碱

基互补配对,而是通过配位、氢键、范德华力等相互作用力形成特定的三维空间结构,与辅因子构象匹配。它可通过体外筛选产生,可催化多种反应,如裂解RNA、DNA或介导DNA的磷酸化等,具有高稳定性、可循环催化、易于规模化合成及功能修饰等优点,被广泛应用于开发基于金属离子、小分子和生物大分子检测的高灵敏度和特异性传感平台。

科学家已经筛选出不同辅因子的脱氧核酶,例如金属离子、小分子、细菌等。基于金属离子的特异性脱氧核酶较多,其中Breaker等筛选以铜离子为辅因子的脱氧核酶对铜离子有高特异识别能力。如Li等^[37]设计一种选择性识别铅离子的荧光探针,对铅离子检测限达10 nmol/L。为提高信噪比,利用一段环状DNA将酶链和底物连接起来,实现分子内杂交^[38]。酶链标记一个淬灭分子,要达到理想的淬灭效果,要求酶链的量大于底物链量,检测辅因子的灵敏度受限制。针对这些技术瓶颈,本研究组^[39]设计了同时标记荧光分子和淬灭分子的大环发夹结构酶底物,并提出了催化信标的概念。该体系酶链无需标记淬灭分子,使用少量的酶可催化大量底物的水解,提高了金属离子的检测灵敏度。通过分子设计,还实现了检测非辅因子目标物,用于放大检测生物小分子^[40]。经实验验证,基于通过构象转换的脱氧核酶用于DNA的检测,检测限为20 pmol/L^[41]。另外,由于脱氧核酶切割DNA、RNA的特异性和活性,在基于细胞的检测和癌症的临床前模型中显示了基因沉默的巨大前景。如Fan等^[42]构建了基于二氧化锰纳米片吸附光敏试剂二氢卟吩(Ce6)标记的DNA酶平台,一方面防止酶被降解,提高了DNA酶进入细胞的效率;另一方面,二氧化锰在细胞内谷胱甘肽还原剂的作用下产生的锰离子作为DNA酶的辅因子,DNA酶切割靶mRNA,基因沉默。

3 分子信标

3.1 分子信标的基本概念

1996年Tyagi和Kramer提出了分子信标(molecular beacon)的概念^[43]。分子信标是一种设计巧妙的发卡形短链DNA,一般由3部分组成:(1)环状区:由15~30个与靶分子特异结合的核苷酸组成;(2)茎干区:由5~8个可发生可逆性解离的碱基对组成;(3)荧光基团和淬灭基团:分别标记在分子信标的2个末端(图5(a))^[44-45]。无靶分子的情况下,分子信标的荧光基团和淬灭基团靠得很近,荧光被淬灭。与靶分子结合后,目标分子与分子信标的环部杂交导致其空间构型发生改变,淬灭基团远离荧光基团,荧光恢复。工作原理如图5(b)所示^[46]。

分子信标的目标结合部位为茎环,即被检测物的结合位点。本研究组提出了核酸适体分子信标(molecular aptamer beacon, MBA)的概念,即将核酸适体和分子信标结合起来(图5(b))^[47],设计合成了基于苝荧光分子的放大检测体系,可检测到复杂体液中微量的目标DNA或者RNA片段^[46](图6)。

图7(a)代表分子信标对随机DNA序列的识别。核酸适体具有识别和靶向功能,通过指数富集的配基系统进化技术,可以筛选出对特殊靶标选择性识别的核酸适体。把核酸适体序列整合分子信标中,形成了具有靶标识别能力的分子信标(图7(b))。在许多传感体系中,脱氧核酶被整合到分子信标的环部,构建具有催化性能的分子信标(catalytic molecular beacons, CAMB)(图7(c))^[48]。

除此之外,针对一些特殊的识别单元,比如肽段,也可以整合到分子信标中。Seitz等^[49]提出了发卡型肽分子信标(hairpin peptide MB, HPMB),HPMB的环部是

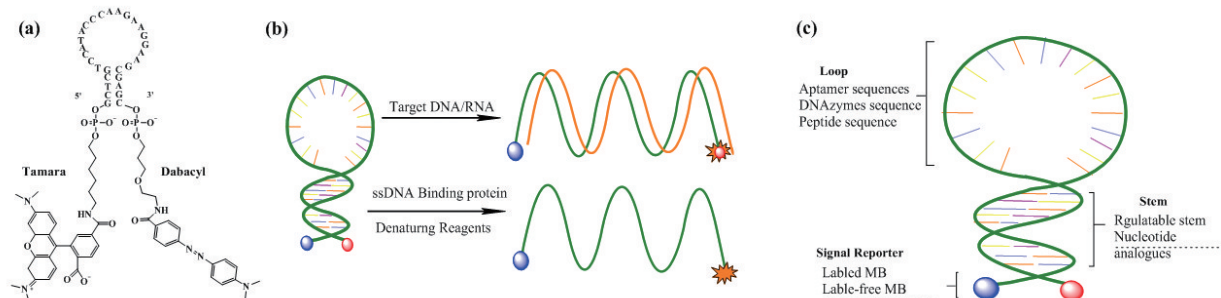


图5 分子信标DNA探针

Fig. 5 Molecular beacon

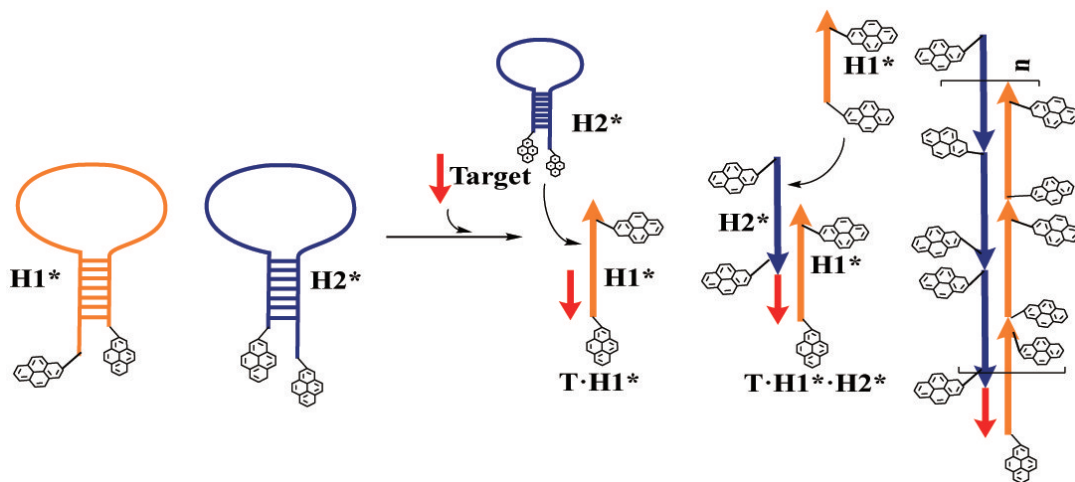


图6 基于芘分子的放大检测体系

Fig. 6 Pyrene based amplifying detection system

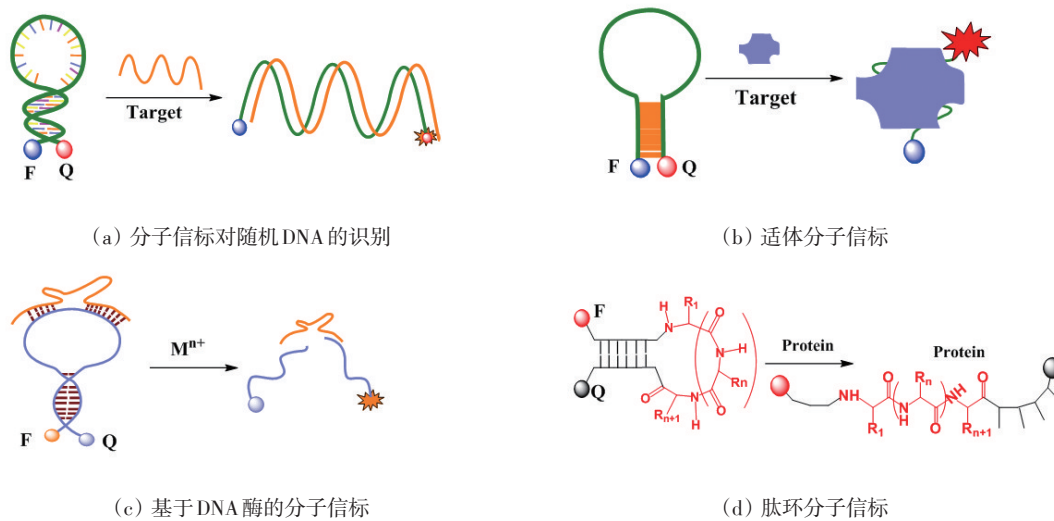


图7 不同类型的分子信标

Fig. 7 Different types of molecular beacons

由一个蛋白质特异性的肽段组成,茎部是由2个互补的DNA类似物肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)构成(如图7(d)所示),可以实现对特殊靶标(比如蛋白质)的识别。

3.2 分子信标的应用

Tyagi 和 Kramer 最初的目的是用分子信标探针在液相中定量测定靶标的量,分子信标具有操作简单、灵敏度高、特异性强等特点,被广泛应用于检测,成像,治疗以及药物递送等^[44-45]。分子信标甚至可应用于活体分析,因此在临床诊断、检测等研究中扮演着重要的角色^[46]。

2003年,Bratu等^[50]使用抗核酶切的分子信标,可视

化监测内源性mRNAs在活细胞中的转运。在卵母细胞形成的早期,nurse cells(稳定邻近细胞并提供食物)中合成了Oskar mRNA,然后通过互连通道把Oskar mRNA转运到卵母细胞中。Oskar mRNA进入卵母细胞后,穿过细胞质,到达卵母细胞后部并和一个局部锚结合。Sanjay Tyagi用甲氧基取代核糖2'-羟基,增强分子信标的抗酶切能力,并使用该分子信标可视化了果蝇卵母细胞Oskar mRNA的实时转移和定位过程(图8),此方法为研究mRNA提供了新思路。

监控基因的表达在医学、生物学及生物技术等研究非常重要,尤其是多重基因监控,更是重中之重。使用微注射法可以把带有不同荧光信号的多种分子信标

注射到单个乳腺癌细胞中,通过荧光显微镜,可以监测活细胞中多重基因的同时表达^[51]。如图9所示,A~D分别表示: β -肌动蛋白分子信标(绿色);对照分子信标

(红色);锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)分子信标(蓝色);钌联吡啶(Ruthenium bipyridine, RuBpy)参照探针(橙色)。

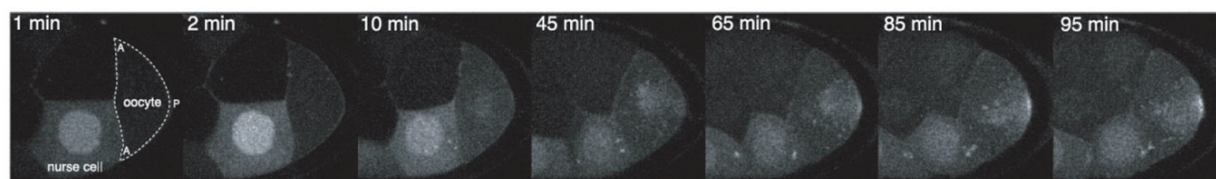


图8 分子信标可视化mRNAs在活细胞中的转运

Fig. 8 molecular beacon as tracer for mRNAs' cell internalization

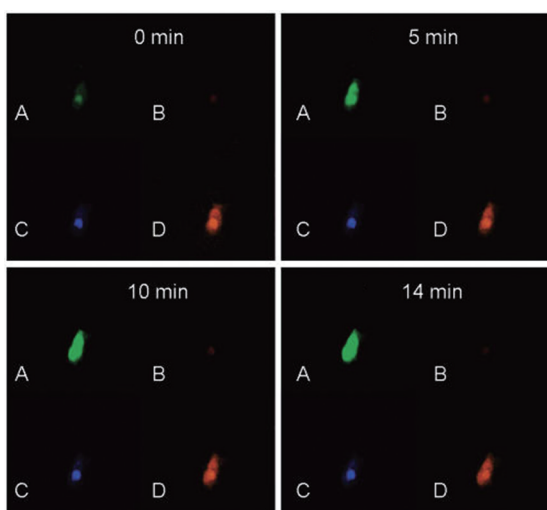


图9 单细胞MDA-MB-231细胞中的分子信标随时间相关的荧光成像图

Fig. 9 Time-elapsing fluorescent images of each MB inside of a single MDA-MB-231 cell

分子信标自报道以来飞速发展,基于分子元素,可以设计出更多新型的分子探针,如用单链DNA(single strand DNA, ssDNA)做环,用RNA-DNA双链做茎的RNA-DNA嵌合型分子信标,用肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)链代替ssDNA形成的PNA分子信标等,为生物医学的研究提供了更多的可能性。

4 分子马达

单分子DNA纳米马达,是由DNA链组成的能够把化学能转化成机械力的机器。其主要的牵引力是DNA碱基互补配对和链置换反应。其主要目的是模拟生物体内的分子马达,或者作为载体递送物质、用于生物合

成等。DNA分子马达具有可程序化、可逻辑性设计等特点。

4.1 化学供能的纳米马达

2002年, Li等^[52]设计了一个DNA分子纳米马达,该纳米马达可通过DNA杂交和链置换反应,实现2种构象之间的转变:17个碱基的DNA纳米马达可以形成分子内的四联体构象E(Intramolecular tetraplex, TE)。当加入 α 链时,可以与 α 链杂交伸展成双链(Duplex, DU)双链结构;又可以通过加入 β 链,通过链置换反应回缩到TE构象,如图10所示。这个由DNA碱基构成的纳米马达能够将化学能转化成机械能。该研究计算了理想能量转换效率 f , f 与 α 链黏性末端的碱基数目相关。对于有10个碱基的黏性末端, f 的值是0.63,当黏性末端的碱基缩减到一个碱基时, f 值将会升至0.94。经计算,在37°C, 25 mM KCl时,理论伸长力和理论伸缩力分别是20.7 pN和2.2 pN。

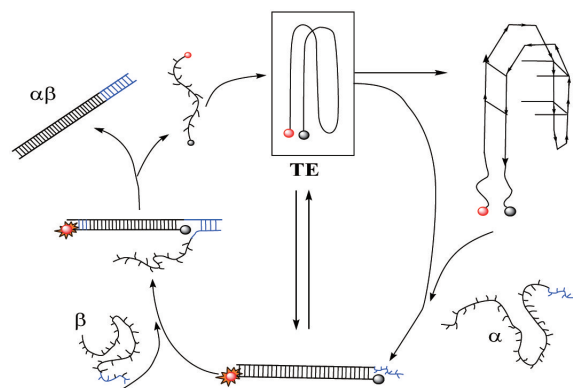


图10 DNA纳米马达

Fig. 10 DNA Nanomotor

4.2 光调控纳米马达

2009年, Kang等^[53]在发卡型结构的茎部引入偶氮

苯基团,无须在体系中引入额外的DNA链进行调控,通过光照实现了可逆光调控的单分子DNA纳米马达,能够将光能转化成机械能。偶氮苯分子能够在紫外和可见光的照射下可逆地在顺式和反式结构之间转变(图11(a)):在DNA侧链中加入偶氮苯,反式结构不影响DNA双链杂交,顺式结构影响DNA双链杂交,如图11(b)所示。在DNA发卡型结构的茎部引入偶氮苯分子,偶氮苯处于反式时,纳米马达处于关闭状态(close);经

紫外光照射,偶氮苯光异构成顺式构象,发卡型结构打开,纳米马达处于打开状态(open)(图11(c)),此纳米马达具有40%~50%的开-关转化效率。

此光驱动纳米马达,能够在纳米尺度下将光能转化成机械运动或机械能,其特点有:光可以远程控制一个DNA分子的运动;无须任何化学反应,无创伤;可以将光能转化为机械能;易于控制;仅在单分子内作用,具有高转化效率。

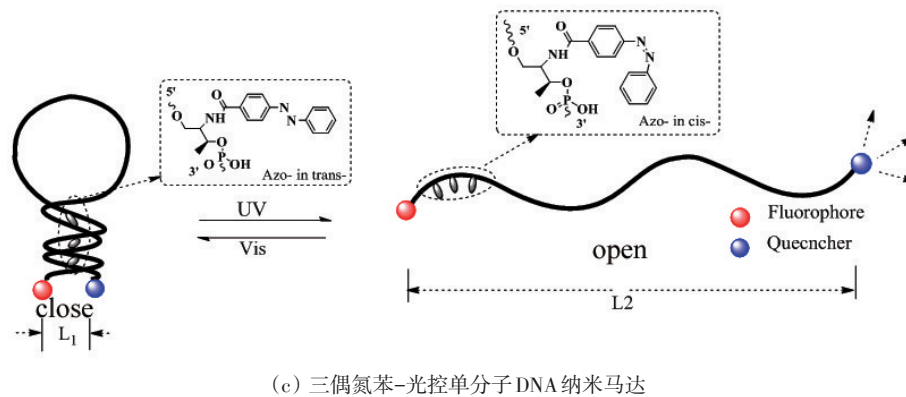
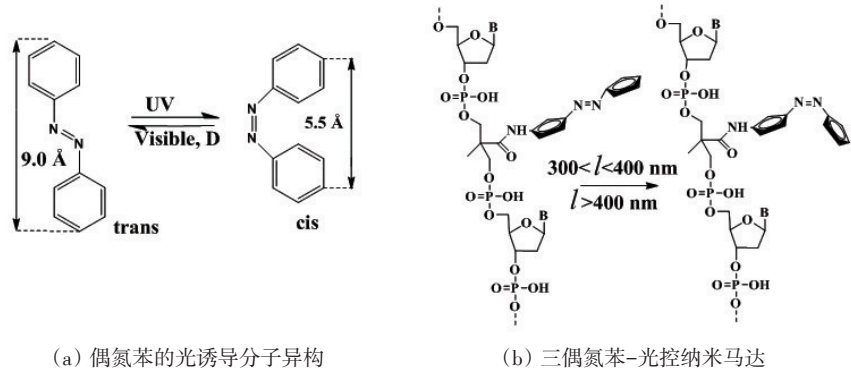


图11 三偶氮苯光控纳米马达
Fig. 11 Photoswitchable single-molecule DNA motor with three Azobenzene

2012年,本研究组^[54]把此分子纳米马达同水凝胶结合,利用偶氮苯的特性,用偶氮苯异的异构调控DNA双链的形成,通过UV和可见光可逆的调节偶氮苯的构

象,使得水凝胶在光照下产生明显的宏观体积变化,实现了光驱动DNA单分子马达的太阳能收集(图12)。

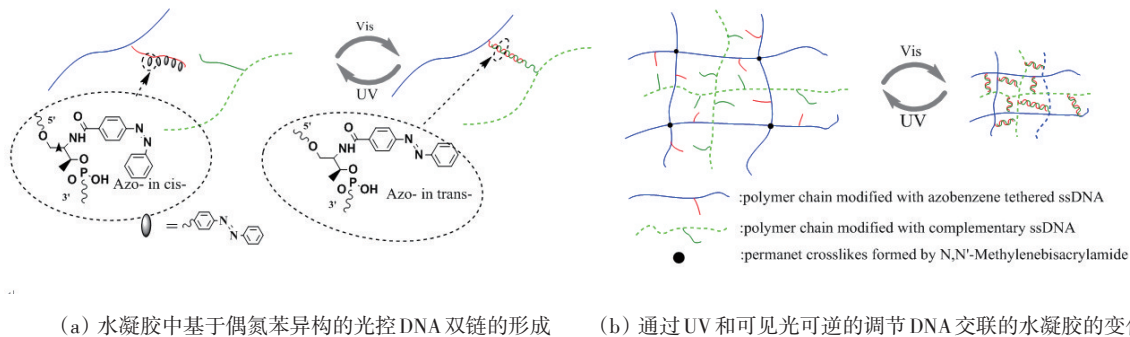


图12 光驱动DNA单分子马达实现太阳能收集

Fig. 12 Reversible volume transition of the DNA-crosslinked hydrogel regulated by UV and visible light based on azobenzene isomerization

4.3 光驱动DNA纳米行走器件

You 等^[55]通过在DNA酶(DNAzyme)类似物的结构中引入了1个光敏功能团,设计了1个自动、可控的光驱动DNA纳米机器人行走系统(图13)。

图13(a)为吡辅助的DNA结构中的二硫键光解原

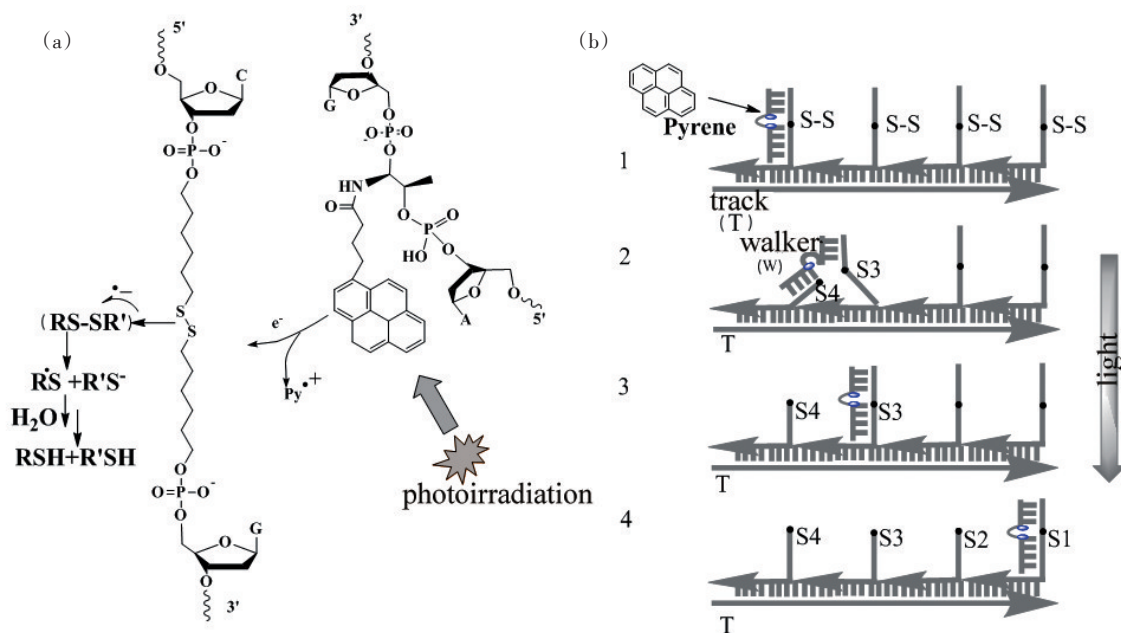


图13 光解与DNA步行系统

Fig. 13 Photolysis and DNA walker system

5 结论

人工碱基的开发大大拓展了核酸分子元素的种类,为构建大量的新的功能核酸分子提供了基础;核酸适体的特异识别性能,不仅可以用来开发各种生物传感、检测工具,还能与药物分子偶联形成新的靶向药物,拓展了核酸适体的医药应用价值。DNA链可以通过合成仪自动化合成,为药物碱基的嵌入提供关键的技术支持,核酸适体有望成为新药研发的重要工具。此外,通过筛选出来的DNA酶,具有切割DNA、RNA的特异性和活性,提高检测各种金属离子的灵敏度,还能用于基因沉默技术。分子信标结合分子元素和荧光标记技术,能可视化监视微观的生物过程,为基础医学研究提供有力工具。分子马达将功能核酸加入了智能动态的元素,为人造核酸机器人、人造核酸机器等提供动力设备,这些在未来也许能应用于微观的生命活动中。

在基于核酸分子元素构建多功能核酸的研究中,需致力于抗癌新药的研发及拓展功能核酸的生物医学应用,并进一步开展更多的基础性研究工作,例如对核

酸的结构和功能进行优化,监测核酸分子的体内代谢,此类研究将有望促进功能核酸的应用于临床。

参考文献 (References)

- [1] Zhang Y, Ptacin J L, Fischer E C, et al. A semi-synthetic organism that stores and retrieves increased genetic information [J]. *Nature*, 2017, 551(7682): 644-647.
- [2] Jayasena S D. Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics[J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45 (9): 1628-1650.
- [3] Keefe A D, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics[J]. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 2010, 9(7): 537-550.
- [4] Shanguan D H, Li Y, Tang Z W, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study[J]. *PNAS*, 2006, 103(32): 11838-11843.
- [5] Shanguan D H, Meng L, Cao Z C, et al. Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(3): 721-728.
- [6] Chen H W, Medley C D, Sefah K, et al. Molecular recognition

- of small-cell lung cancer cells using aptamers[J]. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*, 2008, 3(6): 991–1001.
- [7] Shanguan D H, Cao Z C, Li Y, et al. Aptamers evolved from cultured cancer cells reveal molecular differences of cancer cells in patient samples[J]. *Clinical Chemistry*, 2007, 53(6): 1153–1155.
- [8] Tolle F, Brändle M G. Dressed for success—Applying chemistry to modulate aptamer functionality[J]. *Chemical Science*, 2013, 4(1): 60–67.
- [9] Zichi D, Eaton B, Singer B, et al. Proteomics and diagnostics: Let's get specific, again[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2008, 12(1): 78–85.
- [10] Tolle F, Brandle G M, Matzner D, et al. A versatile approach towards nucleobase-modified aptamers[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(37): 10971–10974.
- [11] Zhang L Q, Wan S, Jiang Y, et al. Molecular elucidation of disease biomarkers at the interface of chemistry and biology [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(7): 2532–2540.
- [12] Kimoto M, Yamashige R, Matsunaga K, et al. Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(5): 453–457.
- [13] Sefah K, Yang Z, Bradley K M, et al. *In vitro* selection with artificial expanded genetic information systems[J]. *PNAS*, 2014, 111(4): 1449–1454.
- [14] Ren X, Gelinas A D, von Carlowitz I, et al. Structural basis for IL-1 α recognition by a modified DNA aptamer that specifically inhibits IL-1 α signaling[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 810.
- [15] Chen Z, Lichter P A, Berliner A P, et al. Evolution of sequence-defined highly functionalized nucleic acid polymers [J]. *Nature Chemistry*, 2018, 10(4): 420–427.
- [16] Malyshev D A, Seo Y J, Ordoukhanian P, et al. PCR with an expanded genetic alphabet[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(41): 14620–14621.
- [17] Li L, Degardin M, Lavergne T, et al. Natural-like replication of an unnatural base pair for the expansion of the genetic alphabet and biotechnology applications[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(3): 826–829.
- [18] Yang Z, Sismour A M, Sheng P, et al. Enzymatic incorporation of a third nucleobase pair[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(13): 4238–4249.
- [19] Hirao I, Kimoto M, Mitsui T, et al. An unnatural hydrophobic base pair system: Site-specific incorporation of nucleotide analogs into DNA and RNA[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(9): 729–735.
- [20] Malyshev D A, Dhami K, Lavergne T, et al. A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet[J]. *Nature*, 2014, 509(7500): 385–388.
- [21] 陈非, 董梦醒, 葛猛, 等. 人造碱基与人工合成生命[J]. *中国科学院院刊*, 2016, 31(4): 457–466.
- Chen Fei, Dong Mengxing, Ge Meng, et al. Artificial bases and synthetic life[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2016, 31(4): 457–466.
- [22] Wang R W, Jin C, Zhu X Y, et al. Artificial base zT as functional "element" for constructing photoresponsive DNA nanomolecules[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(27): 9104–9107.
- [23] Wang R W, Wang C M, Cao Y, et al. Trifluoromethylated nucleic acid analogues capable of self-assembly through hydrophobic interactions[J]. *Chemical Science*, 2014, 5(10): 4076–4081.
- [24] Maberley D. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration[J]. *Issues in Emerging Health Technologies*, 2005(76): 1–4.
- [25] Stuart R K, Stockerl-Goldstein K, Cooper M, et al. Randomized phase II trial of the nucleolin targeting aptamer AS1411 combined with high-dose cytarabine in relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML)[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27(15S): 7019–7019.
- [26] Dobrovolsky A B, Titaeva E V, Khaspekova S G, et al. Inhibition of thrombin activity with DNA-aptamers[J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009, 148(1): 33–36.
- [27] Huang Y F, Shanguan D, Liu H, et al. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells[J]. *ChemBioChem*, 2009, 10(5): 862–868.
- [28] Boyacioglu O, Stuart C H, Kulik G, et al. Dimeric DNA aptamer complexes for high-capacity-targeted drug delivery using pH-sensitive covalent linkages[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2013, 2: e107.
- [29] Wang R, Zhu G, Mei L, et al. Automated modular synthesis of aptamer-drug conjugates for targeted drug delivery[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(7): 2731–2734.
- [30] Zhu G Z, Niu G, Chen X Y. Aptamer-drug conjugates[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2015, 26(11): 2186–2197.
- [31] Li F F, Lu J, Liu J, et al. A water-soluble nucleolin aptamer-paclitaxel conjugate for tumor-specific targeting in ovarian cancer[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1390.
- [32] Gray B P, Kelly L, Ahrens D P, et al. Tunable cytotoxic aptamer-drug conjugates for the treatment of prostate cancer[J]. *PNAS*, 2018, 115(18): 4761–4766.
- [33] Zhu G Z, Zheng J, Song E Q, et al. Self-assembled, aptamer-tethered DNA nanotrains for targeted transport of molecular drugs in cancer theranostics[J]. *PNAS*, 2013, 110(20): 7998–

- 8003.
- [34] Zhu G Z, Meng L, Ye M, et al. Self-assembled aptamer-based drug carriers for bispecific cytotoxicity to cancer cells [J]. *Chemistry - An Asian Journal*, 2012, 7(7): 1630-1636.
- [35] Chen K, Liu B, Yu B, et al. Advances in the development of aptamer drug conjugates for targeted drug delivery[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2017, 9(3): e1438.
- [36] Breaker R R, Joyce G F. A DNA enzyme that cleaves RNA [J]. *Chemistry and Biology*, 1994, 1(4): 223-229.
- [37] Li J, Lu Y. A highly sensitive and selective catalytic DNA biosensor for lead ions[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(42): 10466-10467.
- [38] Wang H, Kim Y, Liu H P, et al. Engineering a unimolecular DNA-catalytic probe for single lead ion monitoring[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(23): 8221-8226.
- [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[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(20): 7603-7607.
- [40] Lu L M, Zhang X B, Kong R M, et al. A ligation-triggered DNAzyme cascade for amplified fluorescence detection of biological small molecules with zero-background signal[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(30): 11686-11691.
- [41] Zhao X H, Gong L, Zhang X B, et al. Versatile DNAzyme-based amplified biosensing platforms for nucleic acid, protein, and enzyme activity detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(7): 3614-3620.
- [42] Fan H H, Zhao Z L, Yan G B, et al. A smart DNAzyme-MnO₂ nanosystem for efficient gene silencing[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(16): 4801-4805.
- [43] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(3): 303-308.
- [44] Goel G, Kumar A, Puniya A K, et al. Molecular beacon: A multitask probe[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(3): 435-442.
- [45] Tan W, Wang K, Drake T J. Molecular beacons[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004, 8(5): 547-553.
- [46] Zheng J, Yang R H, Shi M L, et al. Rationally designed molecular beacons for bioanalytical and biomedical applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(10): 3036-3055.
- [47] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. *Nature*, 1990, 346(6287): 818-822.
- [48] 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[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(12): 5005-5011.
- [49] Thurley S, Roglin L, Seitz O. Hairpin peptide beacon: Dual-labeled PNA-peptide-hybrids for protein detection[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(42): 12693-12695.
- [50] Bratu D P, Cha B J, Mhlanga M M, et al. Visualizing the distribution and transport of mRNAs in living cells[J]. *PNAS*, 2003, 100(23): 13308-13313.
- [51] Medley C D, Drake T J, Tomasini J M, et al. Simultaneous monitoring of the expression of multiple genes inside of single breast carcinoma cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(15): 4713-4718.
- [52] Li J J, Tan W. A Single DNA molecule nanomotor[J]. *Nano Letters*, 2002, 2(4): 315-318.
- [53] Kang H, Liu H, Phillips J A, et al. Single-DNA molecule nanomotor regulated by photons[J]. *Nano Letters*, 2009, 9(7): 2690-2696.
- [54] Peng L, You M X, Yuan Q, et al. Macroscopic volume change of dynamic hydrogels induced by reversible DNA hybridization [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(29): 12302-12307.
- [55] You M X, Huang F J, Chen Z, et al. Building a nanostructure with reversible motions using photonic energy[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(9): 7935-7941.

Molecular element and functionalized nucleic acid

TAN Yan¹, LI Yingying¹, XUAN Wenjing¹, WANG Ruowen², WANG Xueqiang^{1*}, TAN Weihong^{1*}

1. Molecular Science and Biomedicine Laboratory, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University; State Key Laboratory for Chemo/Bio Sensing and Chemometrics, Changsha 410082, China

2. Institute of Molecular Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China

Abstract We put forward an influential concept of "molecular elements" to appreciate the composition of nucleic acids from a new perspective. The nucleic acids that exhibit different functions are designed based on the functional requirement. They are constructed by phosphodiester bonds formation from various "molecular elements" that have different bases, thus achieving a variety of functions such as specific molecular recognition, catalysis, and intelligent response. In this article we present an overview of representative research results of our laboratory upon functional nucleic acid molecules, including the screening and application of nucleic acid aptamers as macromolecular medicine; the synthesis and evolution of artificial bases; the mechanism of DNazymes; molecular beacons, molecular motors and their applications in biosensing, biosynthesis, biopharmaceutical research. Moreover, we discuss the challenges and future research directions in the field of functionalized nucleic acid.

Keywords molecular element; functional nucleic acid; artificial base; aptamer; DNazyme ●



(责任编辑 王志敏)