

基于核酸的蛋白标记技术在膜受体可视化分析中的应用

陈珊^{1,2}, 卓育妃¹, 李婧影¹

(1. 福州大学化学学院, 福州 350108; 2. 闽江学院地理与海洋学院, 福州 350108)

摘要 细胞通讯等动态复杂的生命活动需要多种膜受体的参与. 核酸探针是开发膜受体可视化分析策略的重要分子工具. 本文从非共价靶向识别和共价偶联两种策略类型总结了基于核酸的蛋白标记技术, 系统介绍了这些标记技术在膜受体表达水平、糖型以及相互作用等重要分子信息的可视化分析方面取得的最新研究进展, 并对该领域的挑战和未来发展方向进行了阐述和展望.

关键词 膜受体; 核酸探针; 蛋白标记; 成像

中图分类号 O657.3 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20240567

Nucleic Acid-based Protein Labeling Tools for Visualization of Membrane Receptors

CHEN Shan^{1,2*}, ZHUO Yufei¹, LI Jingying^{1*}

(1. College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;

2. College of Geography and Oceanography, Minjiang University, Fuzhou 350108, China)

Abstract Dynamic and complex cellular activities, such as cell communication and signal transduction, rely on the participation of various membrane receptors. Nucleic acids are important tools for developing membrane receptor visualization strategies in live cells. In this review, protein labeling techniques based on nucleic acid probes are summarized from two aspects: non-covalent target recognition and covalent coupling. The latest research progress of these labeling techniques in the visualization of important molecular information, such as membrane receptor expression, glycoform and protein-protein interactions, was systematically reviewed. The existing challenges and future development in this field were discussed and prospected.

Keywords Membrane receptor; Nucleic acid probe; Protein labeling; Visualization

细胞膜受体是介导活细胞内外信号传递的关键蛋白, 在物质运输、信号转导和细胞通讯等动态复杂的生命活动中发挥重要作用^[1,2]. 各类膜受体感知并整合来自细胞外环境的刺激信号, 引发细胞内的信号级联反应, 从而驱动细胞行为^[3-5]. 然而, 在疾病发展过程中, 细胞膜受体的结构与功能会发生深刻变化^[6,7]. 例如, 血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)介导的信号通路负责诱导内皮细胞分化和血管生成. 在正常生理环境中, VEGFR2 主要表达在血管内皮细胞表面, 其信号转导过程受到多种细胞因

收稿日期: 2024-12-30. 网络首发日期: 2025-02-26.

联系人简介: 李婧影, 女, 博士, 教授, 主要从事细胞膜蛋白成像与调控方面的研究. E-mail: lijingying@fzu.edu.cn

陈珊, 女, 博士, 助理研究员, 主要从事功能核酸探针构建与生物医学应用方面的研究.

E-mail: chenshan331210@163.com

基金项目: 福建省自然科学基金(批准号: 2022J05240)、福建省杰出青年基金(批准号: 2023J06016)和国家自然科学基金(批准号: 22207049, 22474022)资助.

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province, China(No.2022J05240), the Outstanding Youth Foundation of Fujian Province, China(No.2023J06016) and the National Natural Science Foundation of China(Nos.22207049, 22474022).

子的严格调控,以确保血管生成处于动态平衡状态.然而,在肿瘤微环境中,该平衡被打破,肿瘤细胞表面异常表达和活化的 VEGFR2 可促进肿瘤新生血管生成,为病灶提供营养和氧气^[8,9].鉴于膜受体在生理和病理过程中的重要功能,许多膜受体已经作为可靠的生物标志物用于疾病的早期诊断^[10-15].此外,由于膜受体位于细胞表面易于接近且与疾病进程密切相关,针对膜受体的药物研发在疾病治疗中具有广泛应用前景.目前,超过 60% 的药物都以膜受体为作用靶点^[16].因此,研究人员一直致力于解析膜受体携带的分子信息,以促进对膜受体生物学功能和作用机制的认识,并为重大疾病的精准诊疗提供有效手段.

随着生命分析化学研究的深入,研究者发现细胞膜受体携带许多关键的分子信息,包括表达水平、翻译后修饰以及蛋白相互作用等,这些信息都会影响膜受体的功能.值得注意的是,除了膜受体在健康组织和疾病部位的表达水平差异之外,同一个膜受体的糖基化翻译后修饰在生理和病理状态下存在显著差异,而受体表达水平保持不变^[17,18].此外,近期研究结果表明,异常的细胞信号转导过程与受体的亚细胞定位及其相互作用密切相关^[19-21].这些对膜受体分子信息的全面而深入的理解,促使研究焦点逐渐从受体表达水平进一步拓宽到时空分辨的受体动态功能解析,为膜受体可视化研究开辟了新的道路.

近年来,研究人员开发了多种分子探针用于膜受体的可视化分析.为了精确获取膜受体动态多样的分子信息,分子探针必须与膜受体特异性结合,并能够实时反馈膜受体的动态变化.因此,开发精准快速响应的分子探针对膜受体可视化研究是一个重要的挑战.核酸探针因其易于编程设计、生物相容性好且可精准合成组装的优势,在开发多样化动态组装的分子探针方面表现出巨大的应用潜力^[22-24].此外,碱基互补配对规则保证了 DNA 组装过程严格按预期进行,从而确保了准确和快速的响应能力^[25].得益于上述特点,基于核酸的蛋白标记技术不断发展,助力核酸探针与膜受体实现特异性结合,为进一步利用各种动态 DNA 组装反应与 DNA 逻辑运算实现膜受体可视化分析提供了巨大的机会.

本文综述了基于核酸的蛋白标记技术在膜受体可视化分析中的应用进展.首先,总结了基于核酸的蛋白标记技术,主要包含非共价靶向识别和共价偶联两种类型;其次,分别介绍了近年来这些标记技术在膜受体表达水平、糖型和相互作用成像方面的最新应用进展;最后,讨论了基于核酸探针的膜受体可视化分析领域所面临的挑战和发展趋势,为膜受体可视化研究及其在重大疾病早期诊疗中的应用提出新思路.

1 基于核酸的蛋白标记技术

利用核酸探针实现膜受体可视化分析的关键在于将受体的分子信息转化为核酸序列信息,因而需要准确快速地构建核酸探针与膜受体的特异性连接.通常,大多数核酸序列无法直接与膜受体相互作用,需要将核酸序列连接不同的功能元件,以赋予核酸探针“锚定”蛋白的能力.膜受体作为细胞表面重要的信号蛋白,为核酸探针提供了许多“锚定”位点.事实上,基于核酸探针的蛋白标记技术不断发展,帮助研究者对膜受体打上可精准识别的“标签”,能够在复杂多样的蛋白当中准确找到靶标膜受体.近年来发展的标记技术主要分为两种类型:非共价靶向识别策略和共价偶联策略.

1.1 非共价靶向识别策略

非共价靶向识别策略主要依靠特异性结合的“识别元件”与膜受体之间的相互作用.得益于核酸探针的可编程设计和易于化学修饰的优势,将“识别元件”修饰于核酸序列中,即可将设计的各种核酸探针标记在膜受体上.目前,种类多样的“识别元件”,包括抗体^[26]、多肽^[27]、配体^[28]和核酸适配体(Aptamer)^[29]等,均被用于实现核酸探针和膜受体的非共价连接,从而将膜受体携带的分子信息转化成核酸序列信号.抗体作为最常见的“识别元件”之一,被广泛应用于靶向识别膜受体^[30].如,在经典的邻位连接技术(Proximity ligation assay, PLA)技术中,研究者利用抗体共价偶联短链 DNA 序列设计成对的膜受体识别探针.当成对的识别探针结合在两个邻近的膜受体时会使所偶联的 DNA 序列相互接近,在另一个连接 DNA 序列存在时可发生酶促连接,并结合滚环扩增技术(Rolling circle amplification,

RCA)或聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)放大输出信号,已被用于原位分析G蛋白偶联受体寡聚体、促甲状腺激素受体/胰岛素样生长因子-1受体相互作用等^[31-33]。此外,Arg-Gly-Asp(RGD)是纤维连接蛋白中的三肽基序。将RGD多肽修饰在核酸探针中,即可赋予探针特异性靶向整合素受体的能力^[34,35]。PD-1是一种主要表达在T细胞等免疫细胞上的膜受体,其配体之一是PD-L1。研究者通过点击化学反应在DNA折纸结构上精准定点修饰PD-L1蛋白,特异性靶向结合PD-1受体,并揭示配体的纳米级空间分布变化如何调控T细胞信号转导过程^[36]。

在众多“识别元件”中,通过人工筛选获得的Aptamer为标记膜受体提供了新的分子工具^[37]。Aptamer是一种被称作“化学抗体”的功能核酸,可以折叠成独特的三维空间结构,特异性识别和结合靶标膜受体^[38]。通过合理的序列设计,利用DNA全自动合成仪即可将Aptamer连接在核酸序列中,进而将不同的核酸探针锚定于特定的膜受体上。这些特性使Aptamer成为直接在膜受体上“锚定”核酸探针最常用的“识别元件”之一。近年来,功能核酸的研究工作快速发展,研究者通过基于指数富集的配基系统进化技术(SELEX)广泛筛选了针对不同膜受体的“识别元件”^[39-42]。在此基础上,深入研究了这些“识别元件”的作用机制。如,Wu等^[43]通过Cell-SELEX筛选获得了特异性识别转铁蛋白受体(CD71)的Aptamer-XQ-2d,并通过分子动力学模拟确定了CD71受体蛋白中有16个关键氨基酸残基参与稳定CD71-XQ-2d复合物的形成。研究结果还表明,XQ-2d与转铁蛋白(Transferrin, Tf)在CD71上具有相同的结合位点[图1(A)]。类似地,Chen等^[44]验证了广泛使用的Aptamer-Sgc8c与其靶标受体蛋白酪氨酸激酶7(Protein Tyrosin Kinase-7, PTK-7)之间的结合位点在蛋白胞外结构域的Ig3-Ig4区域。随着功能核酸相关研究的深入,如何增强Aptamer在病灶区域的特异性和稳定识别能力一直是功能核酸临床应用面临的关键问题。为了解决这一问题,Xie等^[45]开发了一种环境响应型的功能核酸“识别元件”,选择性地增强Sgc8c在肿瘤微环境中的生物稳定性[图1(B)~(D)]。通过在Sgc8c末端偶联一个ATP响应的保护模块(ARP),设计的ARP-Sgc8c能够通过特异性结合ATP来保护探针免受核酸酶降解。此外,ARP-Sgc8c的抗核酸酶能力可以通过ATP浓度选择性调节,帮助ARP-Sgc8c在ATP浓度高的肿瘤区域有效积累,而在健康器官中被迅速降解。总之,各类新兴的膜受体“识别元件”将核酸探针通过非共价靶向识别策略“锚定”在各种膜受体上,从而扩大了适用于膜受体研究的核酸探针的多样性。

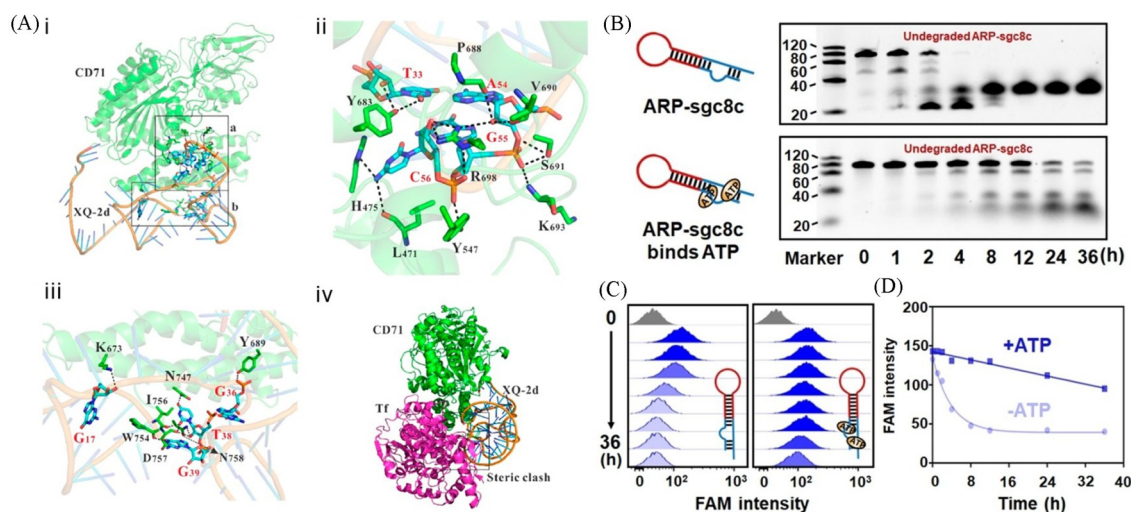


Fig. 1 Nucleic acid-based non-covalent target recognition technique

(A) Identification of interaction between CD71 and Aptamer-XQ-2d *via* molecular dynamics^[43]; (B—D) ARP-Sgc8c exhibited the enhanced resistance against nuclease^[45].

(A) Copyright 2019, American Chemical Society; (B—D) Copyright 2022, Wiley-VCH.

1.2 共价偶联策略

为了提高核酸探针标记膜受体的稳定性,共价偶联策略逐渐成为广泛使用的标记手段。膜受体表面暴露出的巯基、伯氨基等天然官能团是最常见的共价标记位点^[46]。如,4-(*N*-马来酰亚胺基甲基)环

己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)是一种经典的双功能连接分子,可以同时与巯基以及氨基发生共价反应.利用SMCC偶联巯基或氨基修饰的核酸探针,即可实现探针与膜受体的共价连接^[47].类似地,*N*-羟基丁二酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)修饰的核酸探针能够直接与膜受体上的氨基共价偶联^[48].然而,近来研究发现,膜受体表面氨基酸残基的巯基与氨基等大多参与维持受体蛋白的结构与功能,因此,将探针共价偶联在这些位点可能会影响蛋白的正常活性^[49].基于此,研究者将目光投向了受体蛋白上的非氨基酸反应位点,如糖基.蛋白分子上修饰有丰富的聚糖侧链,包含唾液酸、半乳糖、*N*-乙酰半乳糖胺、*N*-乙酰葡萄糖胺及葡萄糖等多种单糖.将分子探针修饰在糖基上能对受体活性的副作用降到最低.因此,糖基成为理想的共价偶联位点之一.借助糖代谢工程技术对细胞进行代谢标记,可将叠氮基、炔基、酮基、硫醇基、烯炔和重氮嘧啶等官能团引入蛋白的糖基结构中,这为糖基与核酸探针通过点击化学反应实现的共价偶联奠定了基础^[50-52].点击化学反应的发展已经使得多种叠氮基或炔基功能化的糖代谢标记试剂被开发,为完成膜受体表面的糖基标记提供了众多选择.目前开发的糖代谢标记试剂中,四酰化*N*-叠氮乙酰基甘露糖胺(Tetra-acylated *N*-acetylmannosamine, Ac4ManNAz)是最常用的一种^[53].它可通过唾液酸生物合成途径被活细胞代谢,将叠氮基引入膜受体的唾液酸聚糖上.随后,对核酸探针进行对应小分子官能团的修饰,如二苯并环辛基(DBCO)和琥珀酰亚胺酯二溴炔等,核酸探针可以通过点击化学反应或Staudinger反应共价连接到膜受体的叠氮基上.尽管这类糖基共价标记策略的通用性很高,所有经过糖代谢标记的蛋白均可修饰上核酸探针,但由于其缺乏膜受体特异性,后续对膜受体的可视化分析还需要加入额外的受体特异性识别步骤.例如,通过再引入另一种Aptamer功能化的核酸探针,可通过核酸探针的序列设计触发膜受体上同时标记的两种核酸探针产生DNA组装而实现特异性受体的可视化分析^[54,55].

为了进一步提高蛋白标记策略的特异性,开发膜受体选择性的共价偶联策略具有重要意义.在此类策略中,受体特异性的“识别元件”常被用于指引核酸探针靶向特定膜受体.由于体积小且易于“擦除”,Aptamer是理想的选择.在Aptamer的导向下,核酸探针被带到靶标蛋白附近,从而实现特定膜受体与核酸探针之间的共价连接.如,Aptamer介导的小分子共价修饰策略可实现对特定膜受体的多重标记^[56].Albright等^[57]在Sgc8c序列中的特定位置修饰带有生物素标签的亲电子试剂,设计了一种共价Sgc8c核酸探针.当该探针与PTK-7结合后,由于探针的亲电子基团与靶标受体表面的亲核基团邻近而发生共价反应,可将生物素标签转移到PTK-7胞外域特定赖氨酸残基上[图2(A)].此外,Sgc8c还被用于将NHS修饰的核酸探针选择性地标记膜受体PTK-7^[58].本课题组^[59]开发了一种DNA模板化的特定蛋白糖基共价偶联技术[图2(B)].结合糖代谢标记技术,设计的“DNA标签”利用Aptamer的靶向作用标记到特定膜受体的唾液酸聚糖上;接着,加入与Aptamer完全互补的核酸序列即可将Aptamer从膜受体上完全“擦除”,避免其占据受体活性位点,从而尽量减少对膜受体生物学功能的干扰.通过替换DNA模板中Aptamer的种类,该策略可用于活细胞表面包括肝细胞生长因子受体(Mesenchymal epithelial transition receptor, c-Met)、人类表皮生长因子受体2(Human epidermal growth factor receptor 2, Her2)以及表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)在内的多种膜受体的特异性标记,为膜受体可视化分析提供理想的技术手段.

综上,利用多种膜受体“识别元件”,核酸介导的蛋白标记策略能够将丰富的核酸探针连接到膜受体上,将膜受体携带的多重分子信息转化成核酸序列信息.非共价靶向识别策略无需复杂的反应,将探针与细胞直接孵育即可完成靶向识别.此外,靶向识别的结合过程可逆,可通过竞争性结合的策略实现可逆结合.然而,靶向识别容易受到外界环境(例如温度、离子强度)的干扰而发生解离,且对于低丰度靶标的结合易被背景信号掩盖.基于共价偶联策略的探针与膜受体结合稳定性高,牢固的共价键更能抵抗外界环境的干扰,适合长时间的实验需求.通过设计反应条件已经可以实现特异性膜受体的共价结合.但是,这种共价偶联过程不可逆,还需要较繁琐的化学反应步骤,可能对细胞活性和膜蛋白功能存在潜在损伤.研究者可根据样本类型和检测需求权衡选择标记策略,必要时可结合两者优势设计复合的标记策略.随后,即可进一步结合核酸探针可编程设计和易于动态组装的特性,开发高效、精准的成像策略,为实现膜受体可视化分析开辟新路径.

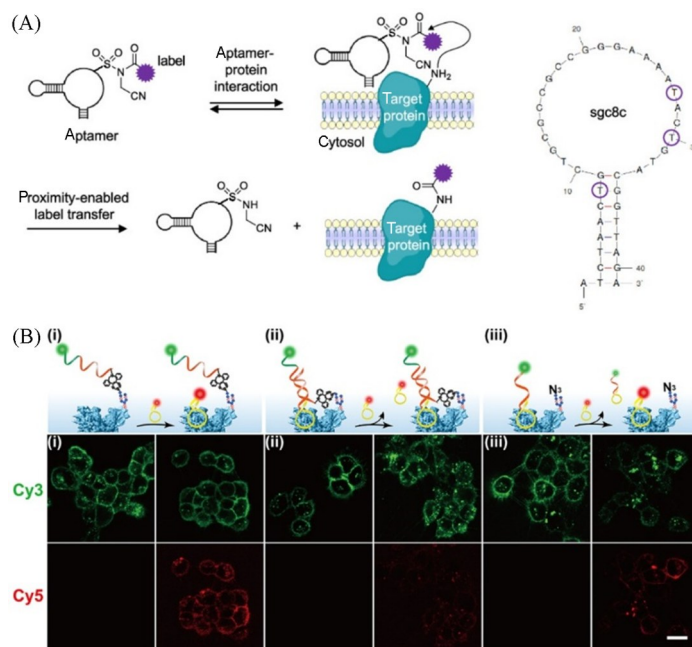


Fig. 2 Nucleic acid-based covalent coupling protein labeling technique

(A) Covalent aptamer-mediated biotin transfer to specific lysine residues on PTK-7^[57]; (B) DNA-templated glycan labeling strategy minimize steric hindrance on the c-Met receptor^[59].

(A) Open access; (B) Copyright 2021, American Chemical Society.

2 膜受体表达水平分析

膜受体的表达水平是最直观的分子信息之一,常作为细胞种类分型的重要指标.许多膜受体在肿瘤细胞和正常细胞中的表达水平存在差异^[60].例如,EGFR是一种广泛表达于内皮细胞的酪氨酸激酶受体,可促进细胞生长、增殖和存活.然而,在多种肿瘤细胞中,EGFR的表达异常升高.研究表明,EGFR的异常表达与肿瘤细胞的失控增殖及抑制细胞凋亡等密切相关^[61].其它膜受体,包括Her2^[62]、叶酸受体^[63]和CXC基序趋化因子受体2^[64]等,也表现出在正常细胞中含量较低,在肿瘤细胞中表达水平异常升高的现象.因此,分析特定膜受体的表达水平可用于区分健康和病变细胞,有望成为疾病早期诊断的有力依据.近年来,已经开发了一系列核酸探针用于膜受体表达水平的特异性成像.其中,修饰荧光染料的Aptamer结合超分辨成像技术为膜受体可视化研究提供了新视角^[65,66].与抗体相比,Aptamer具有更小的空间位阻.此外,Aptamer可与靶标膜受体实现1:1靶向结合,避免了多克隆抗体可能诱导多价结合而导致的受体聚集现象.因此,Aptamer在膜受体的单分子原位分析中展现出巨大潜力,不仅能够定量分析膜受体的表达水平,还能够直观地展示膜受体在不同亚细胞定位的具体分布情况,从而促进对膜受体在生理和病理过程中的功能理解.例如,直接随机光学重构显微镜(Direct stochastic optical reconstruction microscopy, dSTORM)是主流的超分辨率荧光成像技术之一.Chen等^[67]利用Aptamer-Sgc8c对PTK-7进行标记,通过dSTORM可视化分析了PTK-7在细胞膜上的详细空间信息.Jing等^[68]利用Aptamer-AS1411在纳米尺度上可视化分析核仁素的分布情况.超分辨成像结果表明,与正常细胞相比,肿瘤细胞表面的核仁素表达水平更高,且形成更大的蛋白簇.

为了提高肿瘤区域细胞膜受体表达水平分析的精准性,研究者针对肿瘤微环境中ATP浓度高和H⁺累积等特征,开发了系列环境响应型的核酸探针^[69].如,在核酸探针中引入i-motif结构,这种超二级结构只有在微酸性的肿瘤微环境中才能诱导核酸探针发生构型变化,进而在该环境中具有特定膜受体表达的细胞表面产生成像信号^[70].Yuan等^[71]设计了一种三棱柱纳米结构的核酸探针,从三棱柱结构中伸出的两个“机械爪”分别发挥识别微酸性环境和靶向结合PTK-7受体的作用.当该探针在微酸性肿瘤微环境中探测到PTK-7时,DNA链置换反应介导的“与”逻辑运算过程才能输出荧光信号.该核酸探针可在

异种移植 CCRF-CEM 肿瘤细胞 (PTK-7 阳性) 的小鼠模型中实现对肿瘤区域 PTK-7 的靶向识别。值得注意的是, Aptamer 凭借其独特的识别能力和易于修饰的优势, 在活体成像中展现出广阔应用前景^[72]。¹⁸F 修饰的 Aptamer-Sgc8 结合正电子发射计算机断层显像 (Positron emission computed tomography, PET) 技术成功在异种肿瘤移植小鼠模型中实现了 PTK-7 的可视化^[73]。Ding 等^[74]对 Aptamer-Sgc8 进行了 ⁶⁸Ga 放射性核素标记, 首次研究了 Aptamer-Sgc8 在人体内的药代动力学, 揭示了放射性标记的 Aptamer 对正常器官无明显损伤, 大部分 Aptamer 会积聚在肾脏中, 并通过尿液从膀胱排出。

基于单一膜受体表达水平的肿瘤细胞分型精准度已不能满足疾病精准诊断的需求, 多靶标同时关联分析策略成为提高核酸探针成像特异性的突破口。因此, 开发两个乃至多个膜受体的精准识别策略已成为必然趋势^[75]。Hu 等^[76]利用 10 种不同的 Aptamer 对 12 种细胞株的膜受体进行分析, 生成了可准确区分肿瘤类型的热图。进一步的研究显示, 片状的 DNA 折纸纳米结构更易于停留在细胞表面。研究人员将识别肿瘤细胞膜蛋白的 Aptamer-XQ-2d (靶向 CD71) 和 Aptamer-SL1 (靶向 c-Met) 装配到片状 DNA 折纸纳米结构的一侧, 在另一侧装配靶向巨噬细胞膜蛋白 CD16 的 Aptamer-CLN0020, 从而利用核酸探针对膜受体的特异性识别, 按需调节巨噬细胞与肿瘤细胞之间的相互作用。这种具有多重靶向能力的核酸纳米结构为基于膜受体表达水平的精准细胞分型提供了一个重要工具。为了更好地匹配不同膜受体在细胞表面的空间分布模式, Mao 等^[77]设计了一种基于 DNA 折纸的纳米阵列探针来提高核酸探针对多靶标协同识别的亲和力。DNA 折纸的精准定位能力可根据不同受体在细胞表面的排布模式调控多价 Aptamer 的间距, 有效增强纳米阵列探针对循环肿瘤细胞表面 EGFR、Her2 和上皮细胞黏附分子 (EpCAM) 的结合亲和力 [图 3(A)]。

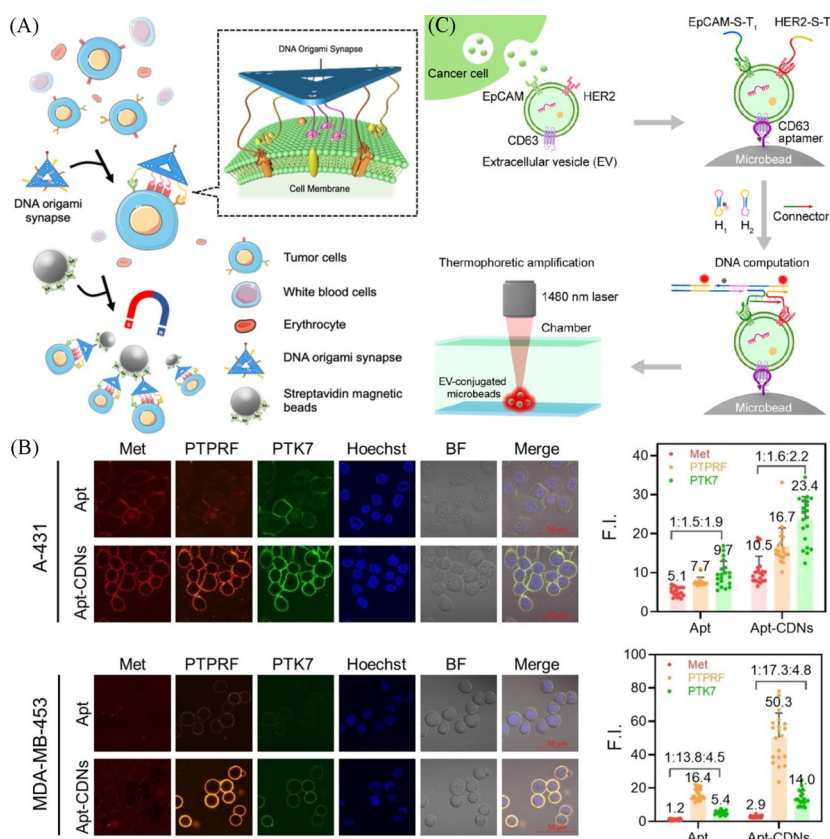


Fig. 3 Receptor expression visualization via nucleic acid-based probes

(A) Schematic representation of DNA-Origami-based nanoarrays enhance receptor binding affinity^[77]; (B) visualization of multiple receptors on live cell membranes using TAR strategy^[80]; (C) schematic representation of thermophoresis-mediated DNA computation for profiling of tumor-derived EVs^[84].

(A) Copyright 2023, American Chemical Society; (B) Copyright 2024, Wiley-VCH; (C) Copyright 2021, American Chemical Society.

为了提高可视化分析的灵敏度,整合了多种基于DNA自组装的信号放大策略到核酸探针中^[78,79].目前常用的信号放大策略,包括杂交链式反应(HCR)、RCA和催化发夹自组装(CHA)等,尽管已经达到较高的信号放大效率,但其信号放大能力不可控,在多重靶标参数分析中会掩盖蛋白的原始相对丰度比,不适于精准定量分析,从而影响细胞分型的准确性.为了解决这一局限,Diao等^[80]提出了一种模板聚合反应(TAR)的信号放大可视化策略.在该体系中,Hairpin模板参与组装形成稳定的核酸纳米结构,通过调整Hairpin模板与Primer的初始浓度比例,可精准控制TAR的信号放大能力.研究者选择了3种常见的肿瘤标志物膜受体:c-Met,PTPRF和PTK-7,设计对应的TAR序列,用于组装DNA信号放大产物.值得注意的是,在A-431和MDA-MB-453两种细胞系中,3种膜受体的相对TAR放大信号比例与其对应的单独Aptamer检测到的原始比例一致,表明TAR放大策略仍能体现多参数靶标的原始相对丰度比[图3(B)].

除了细胞表面的膜受体之外,细胞外囊泡(Extracellular vesicles, EVs)膜受体的表达水平也受到关注^[81,82].作为肿瘤液体活检的重要靶标之一,EVs表面特定膜受体的表达水平与肿瘤的发展进程密切相关.如,膜受体Her2和EpCAM的表达水平是乳腺癌临床诊断的重要分子靶标^[83].Li等^[84]结合HCR和微流控热泳技术,通过对膜受体Her2和EpCAM的联合分析实现了对乳腺癌来源EVs的精准分型[图3(C)].具体来说,CD63-Aptamer修饰的磁珠先将EVs捕获;接着,同时表达EpCAM和Her2的EVs将被核酸探针靶向识别进行逻辑运算并引发HCR;最后,通过微流控热泳技术富集偶联EVs的磁珠并放大输出信号,对来自乳腺癌患者和健康志愿者的EVs分型准确率达97%.

3 膜受体糖型分析

蛋白质翻译后修饰对维持蛋白的结构和功能具有重要作用,糖基化是存在最广泛的翻译后修饰之一^[85,86].研究发现,修饰在蛋白表面的糖链对其生物功能具有重要作用.膜受体作为与外界环境交流的重要信号蛋白,其表面糖型的异常变化与多种人类重大疾病进程密切相关,比如肿瘤和神经退行性疾病等^[87,88].因此,特异性膜受体糖型可视化分析有助于加深对蛋白糖基化机制的理解,为疾病诊断和治疗提供新的靶标.本课题组^[89]结合糖代谢标记技术和邻近诱导的生物正交反应策略,开发了一种基于核酸探针的特定膜受体糖基标记策略,并结合HCR信号放大技术实现了PTK-7受体表面唾液酸的高灵敏成像.在该设计中,蛋白识别探针中的Aptamer靶向识别PTK-7,DBCO修饰的糖基标记探针共价偶联膜表面的唾液酸,将糖基化修饰信息转换成核酸序列信息.利用同一膜受体分子表面的蛋白识别探针与糖基标记探针的邻近效应,诱导核酸探针发生构型改变,引发HCR放大信号,在活细胞以及斑马鱼体内实现高灵敏的细胞表面特定受体唾液酸检测.在此基础上,Liu等^[90]开发了一种用于光声成像的特异性蛋白糖型成像探针,将HCR信号放大过程中的H1链和H2链均修饰上金纳米颗粒(AuNPs),使得在HCR组装DNA长链的过程中伴随着AuNPs的聚集.利用光声成像的深度穿透优势,研究者在活体小鼠模型实现了特定蛋白糖基化的可视化分析.通过联合使用不同的糖代谢标记试剂,Li等^[91]开发了一种基于Aptamer识别和邻近杂交激活的DNAzyme切割策略,可以同时成像特定膜受体中不同糖型[图4(A)].在此策略中,Ac4ManNAz和Ac4FucAl分别为唾液酸和岩藻糖修饰上叠氮基和炔基,通过点击化学反应将特定含有DNAzyme切割位点的核酸探针(GP)连接到这两种单糖亚型上.含有Aptamer区域的蛋白识别探针(PP)末端延伸出一段包含DNAzyme功能的序列.当GP和PP探针都结合到靶标受体时,空间邻近效应使PP的DNAzyme序列与两种单糖上的GP探针杂交,并在Mn²⁺存在下切割GP,从而产生响应信号.随后,PP的DNAzyme序列会通过链置换反应从被切割的GP转移到下一个相邻单糖的GP上,从而实现杂交和切割的循环.通过这种方式,研究者在多种细胞表面实现了对PTK-7、黏蛋白1(MUC1)、程序性死亡配体1(PD-L1)、EpCAM和EGFR的双重特异性糖型成像分析[图4(B)].

为了在天然生理环境中实现特定膜受体的葡萄糖糖化可视化分析,Shao等^[92]开发了一种新型的带有生物正交标签的葡萄糖类似物(6AzGlc)作为糖化报告探针.当膜蛋白被6AzGlc糖化后,修饰有

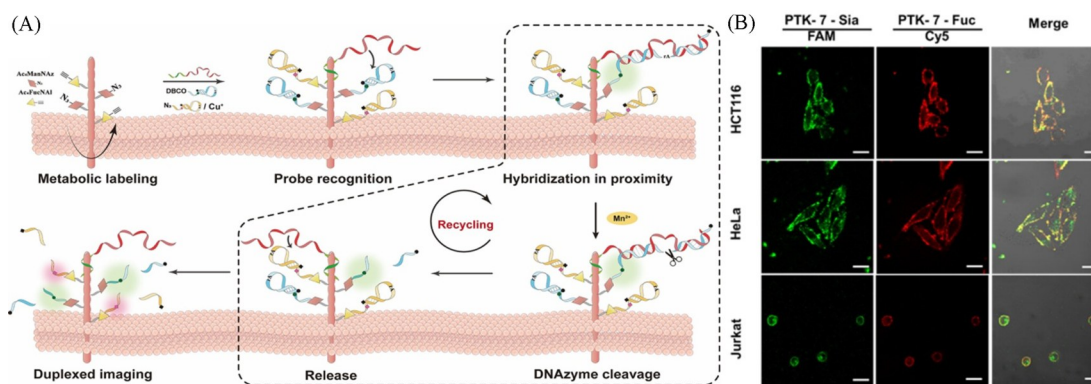


Fig. 4 Schematic representation of receptor-selective glycosylation visualization *via* DNAzyme-based cleavage strategy(A) and imaging of the sialylation and fucosylation in PTK-7 on different cells(B)^[91]

Copyright 2023, American Chemical Society.

DBCO的糖化信号转换探针(GCP)和包含特定“识别元件”的蛋白靶向探针(PTP)依次结合到靶标受体上, 触发邻近诱导的DNA序列杂交并诱导构象变化, 产生荧光共振能量转移(FRET)信号. 研究者针对PD-L1、整合素受体等多种蛋白的葡萄糖糖化修饰进行了可视化分析[图5(A)]. 实验结果表明, 葡萄糖糖化修饰能够降低PD-L1与PD-1的亲和力, 也参与调节整合素受体与RGD的相互作用[图5(B)].

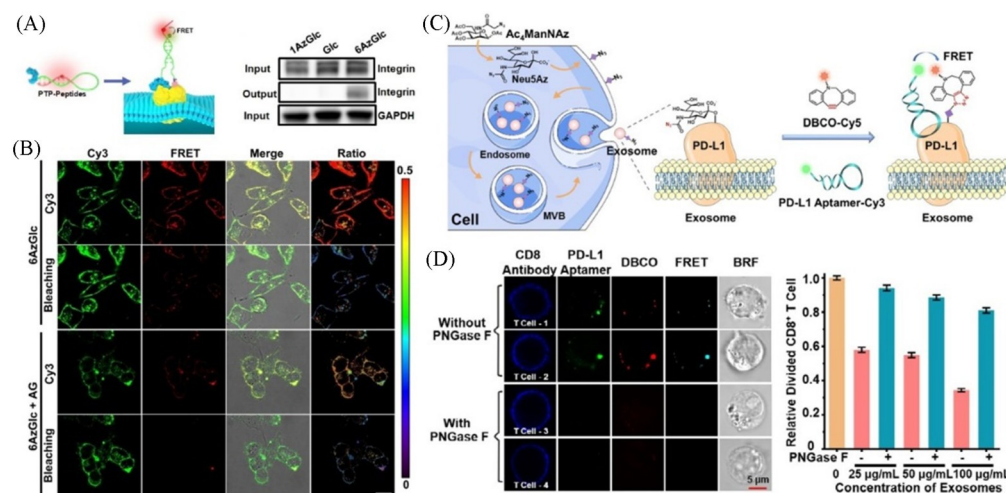


Fig. 5 Glycation of integrin was verified *via* WB assay(A) and CLSM imaging(B)^[92], schematic representation of exoPD-L1 glycosylation visualization *via* nucleic acid probes(C) and the effect of exoPD-L1 glycosylation on the recognition and proliferation of CD8⁺ T cells(D)^[95]

(A, B) Copyright 2022, Wiley-VCH; (C, D) Copyright 2021, Wiley-VCH.

除了细胞膜受体糖型成像, 外泌体表面的膜受体糖型分析也引起了研究者的兴趣^[93,94]. 肿瘤来源的外泌体表面携带来自细胞膜表面的多种糖蛋白, 在生理和病理过程中发挥重要功能. Zhu等^[95]将糖代谢工程技术和Aptamer介导的邻近诱导杂交技术应用于外泌体上特定蛋白的糖型分析[图5(C)]. 在此策略中, 通过荧光标记Aptamer结合外泌体PD-L1(exoPD-L1), 并通过糖代谢标记在糖基上引入荧光标记, 二者发生荧光能量共振转移(FRET), 实现了外泌体特异性蛋白的唾液酸原位成像[图5(D)]. 研究结果还证实, exoPD-L1表面的唾液酸参与抑制CD8⁺ T细胞增殖的过程.

4 膜受体相互作用分析

膜受体发挥功能的重要基础是与其它信号分子的相互作用, 从而参与调节细胞信号网络. 例如, 受体酪氨酸激酶(RTKs)家族的二聚化激活机制是通过受体相互作用调节信号通路的典型范例. 通常,

配体结合到 RTKs 后会诱导受体二聚行为, 从而触发细胞内的一系列下游信号转导过程, 调节细胞功能^[96,97]. 因此, 膜受体空间分辨的相互作用可视化分析将有助于揭示受体功能调控细胞生命活动的生化机制. c-Met 受体是 RTKs 家族中被广泛研究的对象. 在配体 HGF 刺激下, c-Met 受体发生二聚和自身磷酸化, 并进一步诱导下游蛋白 Akt 和 Erk1/2 的磷酸化激活^[98]. 本课题组^[99]利用 Aptamer 介导的靶向识别将 c-Met 受体信息转换成特定核酸序列信息, 结合核酸邻近杂交技术, 当两个 c-Met 受体相互靠近时诱导核酸序列发生 DNA 组装产生荧光信号变化, 从而监测受体二聚过程. 进一步, 我们^[100]利用 HCR 放大策略实现了斑马鱼体内膜受体 c-Met 二聚化的高灵敏成像. 近年来, 更多的核酸探针及信号放大策略被应用于膜受体二聚过程的可视化分析^[101,102]. Xu 等^[103]开发了一种基于 DNA 模板的银纳米簇 (DNA/AgNCs) 与 Aptamer 识别介导的荧光成像策略, 利用 DNA/AgNCs 邻近富含鸟嘌呤的核酸序列诱导荧光增强效应, 对细胞表面 Her2 同源二聚体和 Her2/Her3 异源二聚体进行同时成像. 此外, 超分辨显微技术也为膜受体相互作用可视化分析提供了新策略^[104]. 基于 DNA 的纳米级成像点累积 (DNA Points accumulation in nanoscale topography, DNA-PAINT) 是一种新兴的超分辨率显微成像技术, 包括两种探针: 偶联靶蛋白“识别元件”的锚定链和偶联荧光染料的成像链. DNA-PAINT 利用锚定链与成像链之间瞬时的杂交与解离产生可重复的荧光信号, 实现了单分子定位与图像重建. 通过设计不同的锚定链-成像链组合, 可以对单细胞上的多个靶标进行多色成像, 在膜受体的分布以及相互作用可视化分析中具有应用潜力. 例如, 以抗体或 Aptamer 作为锚定链的“识别元件”, DNA-PAINT 技术已经成功应用于可视化 B 细胞抗原受体、PD-1 和 EGFR 等受体在细胞表面的详细分布情况^[105,106]. Harwardt 等^[107]利用 DNA-PAINT 实现了对 c-Met 和 EGFR 异二聚体的可视化分析.

为了更全面地追踪膜受体相互作用, 本课题组^[59]发展了 Aptamer 介导的糖基共价标记策略, 不仅能实现可视化分析 EGF 诱导 Her2/EGFR 异二聚化过程, 还可用于长时间追踪膜受体在细胞表面以及进一步内化到细胞质后的相互作用 [图 6(A)]. 这一共价蛋白标记策略避免了膜受体二聚后从细胞膜移位细胞质过程中 Aptamer 探针和膜受体发生分离而无法精准成像的问题, 从而实现了 c-Met 受体在不同亚细胞定位的可视化分析. 实验结果表明, 在 HGF 刺激 4 h 后, 约 91% 的 c-Met 受体发生了内化 [图 6(B)]. 值得关注的是, 细胞信号网络中的信号分子彼此关联、相互影响. 因此, 监测由膜受体功能变化引起的关键信号分子分泌变化, 可对 RTKs 激活状态进行可视化反馈. 本课题组^[108]发展了一种

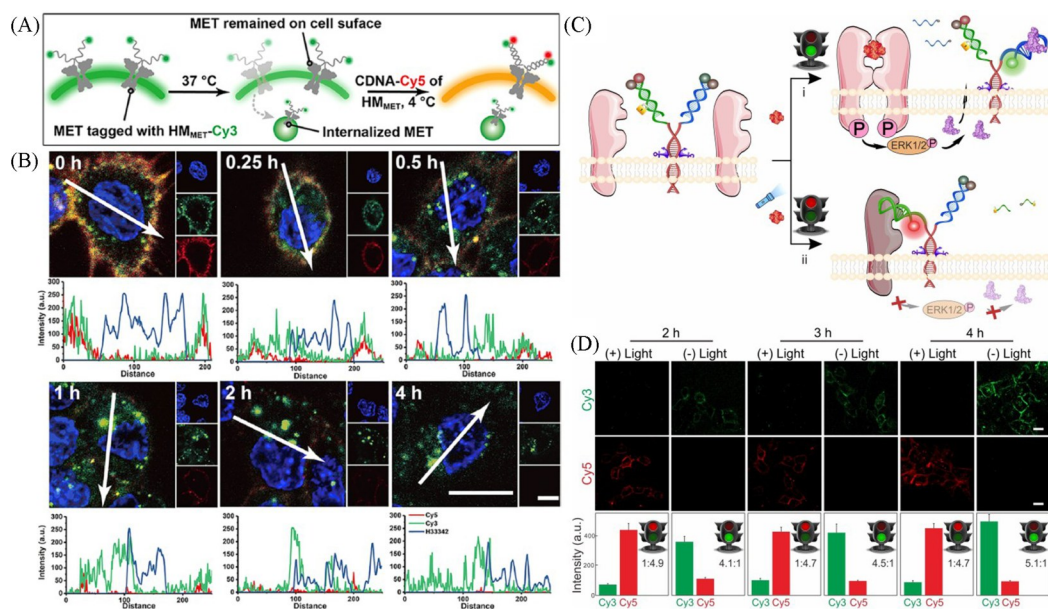


Fig. 6 Schematic representation(A) and CLSM imaging(B) of c-Met receptors distribution after ligand stimulation^[59], schematic representation(C) and CLSM imaging(D) of “traffic light” for dissecting c-Met receptors coordinated with downstream VEGF^[108]

(A, B) Copyright 2021, American Chemical Society; (C, D) Copyright 2022, Wiley-VCH.

细胞膜锚定的多模块DNA纳米结构,充当c-Met受体信号通路的“交通灯”[图6(C)].当c-Met受体由HGF诱导二聚化引发信号级联反应促进VEGF分泌时,“监测模块”中的Aptamer-VEGF识别VEGF而发生构型变化,“绿灯”亮起;当“调控模块”抑制c-Met受体二聚过程时,“红灯”亮起[图6(D)].这种多功能的DNA“交通灯”有助于促进疾病诊疗的智能化.

除荧光成像技术外,表面增强拉曼散射(SERS)成像技术也被应用于可视化分析c-Met和TGF β -II受体的同源二聚过程. Dong等^[109]将发夹结构的H1-Met和H1-TGF β -II修饰在50 nm AuNPs表面,作为双识别探针;将标记不同拉曼分子和发夹结构的单链核酸序列H2-Met或H2-TGF β -II分别修饰在15 nm AuNPs上,制备了膜受体c-Met和TGF β -II的SERS标签.在此设计中,Aptamer作为“识别元件”,当两个膜受体发生同源二聚,邻近诱导CHA反应使50 nm和15 nm的AuNPs聚集形成网状纳米结构,显著增强SERS信号. Wang等^[110]提出了一种更加简单方便的DNA编程等离子体纳米探针,将AuNPs修饰在含有Aptamer-c-Met的核酸探针末端,用于结合c-Met受体.随后加入同样修饰AuNPs的另一核酸长链,当c-Met受体发生二聚时,两个受体的靠近触发邻近杂交反应,使AuNPs相互靠近,从而产生显著的散射信号变化,实现单分子受体二聚成像.

此外,对活细胞中膜受体相互作用网络进行动态分析,还有望发现新型疾病标志物.本课题组^[111]设计了一种邻近催化标记的核酸探针(Apt-Gq/h),包含Aptamer(Apt)和G四联体-血红素复合物(Gq/h)两个组成部分[图7(A)].Apt作为“识别元件”将探针引导至靶标受体,具有过氧化物酶活性的Gq/h用于催化带生物素标签的惰性反应底物,生成高反应活性、短半衰期的自由基,这些自由基可准确标记目标蛋白及其周围20 nm范围内的相互作用蛋白,整个标记反应可在5 min内完成.我们利用生物素标记实现了对c-Met受体在不同激活状态下互作蛋白网络动态变化的分析.通过更换荧光标记,对由PD-1/PD-L1相互作用介导的肿瘤细胞与免疫细胞连接进行了可视化分析[图7(B)].

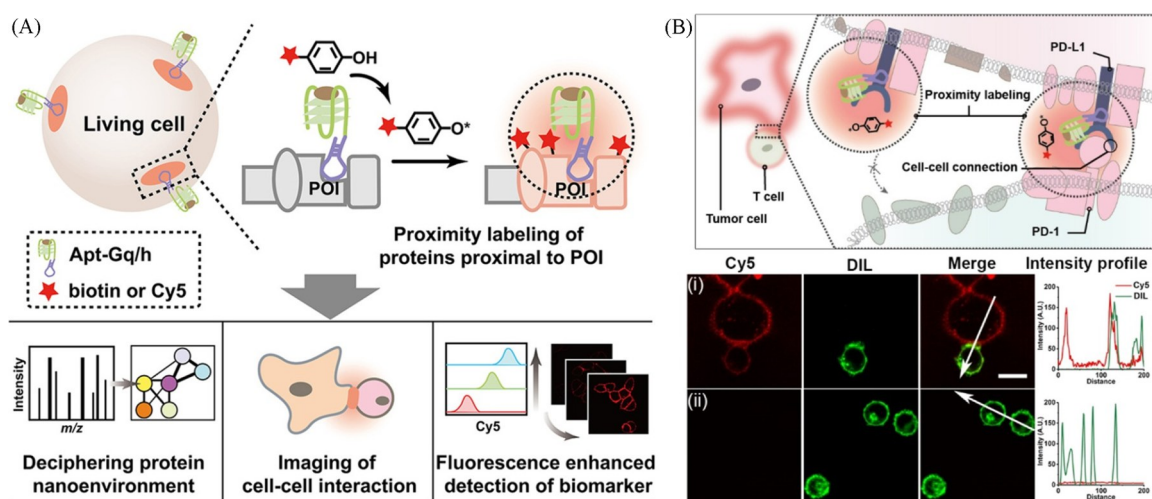


Fig. 7 Schematic representation of receptor interactions visualization *via* nucleic acid-based proximity labeling(A)^[111] and CLSM imaging of PD-L1-targeted proximity labeling in (i) T cell-MDA-MB-231 cell connection and (ii) T cells(B)

Copyright 2022, American Chemical Society.

5 总结与展望

细胞通讯等动态复杂的生命活动依赖于活细胞界面各类膜受体的参与.针对特异性膜受体的可视化分析能揭示其在生理和病理过程中的作用机制,为重大疾病的早期诊疗提供有力依据.基于核酸的蛋白标记技术快速发展,为开发膜受体可视化策略提供了不可或缺的支持.本文主要介绍了非共价靶向识别和共价偶联标记两种类型技术的最新进展.在这些标记技术中,功能核酸Aptamer作为重要的“识别元件”发挥靶向结合作用,主要得益于以下优势:(1)Aptamer通过SELEX技术体外筛选获得,批

次间差异小,且可针对不同膜受体开发种类丰富的 Aptamer; (2) Aptamer 易于进行化学修饰,通过标记荧光染料、放射性同位素或纳米材料,可结合多种成像技术中在不同应用场景中实现可视化分析; (3) 相较于抗体, Aptamer 的分子量小,具有更小的空间位阻,组织穿透性良好且免疫原性低,更加适用于单分子分析和体内成像应用. 近年来,研究者们开发了种类丰富的核酸探针,用于分析膜受体携带的多种分子信息. 可视化分析的靶标对象也从最直观的表达水平逐渐拓展至包括翻译后修饰过程以及蛋白相互作用等在内的多种功能信息. 尽管核酸探针在膜受体可视化分析方面展现了良好的应用前景,但为满足实际临床应用需求仍需克服一些挑战: (1) 虽然 Aptamer 作为重要膜受体“识别元件”展现出了巨大潜力,但目前具备高亲和力与特异性的膜受体 Aptamer 种类仍然有限; (2) Aptamer 与膜受体的非共价结合易发生动态解离,易受微环境结合干扰,导致成像信号不稳定; (3) 蛋白标记的空间特异性仍需提高; (4) 亟需延长核酸探针的在体循环时间. 要应对上述挑战,研究者还需要进行如下工作: (1) 结合分子对接和结构模拟等技术,特别是针对天然生理环境下的活细胞膜受体靶标,发展简便高效的 Aptamer 筛选方法,丰富“识别元件”的工具箱,将拓宽核酸探针标记技术的应用范围; (2) 利用核酸序列编程设计、化学修饰等策略,开发按需响应型的蛋白标记策略,进一步提高标记策略的精准性和安全性; (3) 通过引入新型人工碱基和基团修饰等方法提高核酸的抗酶切能力,为构建生物稳定性高的核酸探针提供了新机会. 总之,基于核酸探针的特异性膜受体可视化技术在构建疾病临床诊断多功能平台方面前景广阔.

参 考 文 献

- [1] Li J., Wang L., Tian J., Zhou Z., Li J., Yang H., *Chem. Soc. Rev.*, **2020**, 49(5), 1545—1568
- [2] Pan L., Fu T. M., Zhao W., Zhao L., Chen W., Qiu C., Liu W., Liu Z., Piai A., Fu Q., Chen S., Wu H., Chou J. J., *Cell*, **2019**, 176(6), 1477—1489
- [3] Trenker R., Jura N., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2020**, 63, 174—185
- [4] Wang M., Yang D., Lu Q., Liu L., Cai Z., Wang Y., Wang H. H., Wang P., Nie Z., *Nano Lett.*, **2022**, 22(21), 8445—8454
- [5] Wang H., Wang Y., Wan Y., Shang J., Wang Q., Jiang Y., Liu X., Wang F., *Adv. Funct. Mater.*, **2023**, 33, 2302708
- [6] Pasquale E. B., *Nat. Rev. Cancer*, **2024**, 24(1), 5—27
- [7] Gao Y., Luan X., Melamed J., Brockhausen I., *Cells*, **2021**, 10(5), 1252
- [8] Simons M., Gordon E., Claesson-Welsh L., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2016**, 17(10), 611—625
- [9] Olsson A. K., Dimberg A., Kreuger J., Claesson-Welsh L., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2006**, 7(5), 359—371
- [10] Rist D., DePalma T., Stagner E., Tallman M. M., Venere M., Skardal A., Schultz Z. D., *ACS Sens.*, **2023**, 8(12), 4636—4645
- [11] Zhao X., Na N., Ouyang J., *Talanta*, **2024**, 267, 125222
- [12] Zhang X., Yin J., Pan W., Li Y., Li N., Tang B., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2023**, 415(1), 67—82
- [13] Lappano R., Maggolini M., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2010**, 10(1), 47—60
- [14] Kuai H., Zhao Z., Mo L., Liu H., Hu X., Fu T., Zhang X., Tan W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139(27), 9128—9131
- [15] Li Y., Qian M., Cheng Y., Qiu X., *Colloid Surface B*, **2025**, 248, 114486
- [16] Christopoulos A., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2002**, 1(3), 198—210
- [17] Caval T., Alisson-Silva F., Schwarz F., *Theranostics*, **2023**, 13(8), 2605—2615
- [18] Chatham J. C., Patel R. P., *Nat. Rev. Cardiol.*, **2024**, 21(8), 525—544
- [19] Chen S., Li J., Liang H., Lin X. H., Li J., Yang H. H., *Chemistry*, **2018**, 24(60), 15988—15992
- [20] Chen S., Xu Z., Yang W., Lin X., Li J., Li J., Yang H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, 58(50), 18186—18190
- [21] Wang Y., Xiong Y., Song L., He S., Yao F., Wu Y., Shi K., He L., *Biomacromolecules*, **2023**, 24(7), 3228—3236
- [22] Li H., Zhang C., Hu Y., Liu P., Sun F., Chen W., Zhang X., Ma J., Wang W., Wang L., Wu P., Liu Z., *Nat. Cell Biol.*, **2021**, 23(6), 642—651
- [23] Xiao M., Lai W., Man T., Chang B., Li L., Chandrasekaran A. R., Pei H., *Chem. Rev.*, **2019**, 119(22), 11631—11717
- [24] Ai L., Peng T., Li Y., Kuai H., Sima Y., Su M., Wang D., Yang Q., Wang X. Q., Tan W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, 61(33), e202109500
- [25] Tang Q., Lai W., Wang P., Xiong X., Xiao M., Li L., Fan C., Pei H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(27), 15013—15019
- [26] Schroder M. S., Harwardt M. I. E., Rahm J. V., Li Y., Freund P., Dietz M. S., Heilemann M., *Methods*, **2021**, 193, 38—45
- [27] Wang Y., Baars I., Fordos F., Hogberg B., *ACS Nano*, **2021**, 15(6), 9614—9626
- [28] Cremers G. A. O., Rosier B., Meijs A., Tito N. B., Van Duijnhoven S. M. J., Van Eenennaam H., Albertazzi L., De Greef T. F. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143(27), 10131—10142
- [29] Chen B., Wang Y., Ma W., Cheng H., Sun H., Wang H., Huang J., He X., Wang K., *Anal. Chem.*, **2020**, 92(22), 15104—15111

- [30] Ang Y. S., Li J., Chua P. J., Ng C. T., Bay B. H., Yung L. L., *Anal. Chem.*, **2018**, *90*(10), 6193—6198
- [31] Qiu Y., Liu Y., Zheng W., Chen J., Yang Y., He X., Lin C., Ke R., *Anal. Chem.*, **2024**, *96*(50), 19863—19868
- [32] Taura J., Lopez-Cano M., Fernandez-Duenas V., Ciruela F., *Curr. Protoc.*, **2023**, *3*(6), e794
- [33] Krieger C. C., Boutin A., Neumann S., Gershengorn M. C., *Front Endocrinol.*, **2022**, *13*, 989626
- [34] Sethi S., Hidaka K., Sugiyama H., Endo M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*(37), 20342—20349
- [35] Stephanopoulos N., Freeman R., North H. A., Sur S., Jeong S. J., Tantakitti F., Kessler J. A., Stupp S. I., *Nano Lett.*, **2015**, *15*(1), 603—609
- [36] Fang T., Alvelid J., Spratt J., Ambrosetti E., Testa I., Teixeira A. I., *ACS Nano*, **2021**, *15*(2), 3441—3452
- [37] Krissanaprasit A., Key C. M., Pontula S., LaBean T. H., *Chem. Rev.*, **2021**, *121*(22), 13797—13868
- [38] Zhao L., Tang C., Xu L., Zhang Z., Li X., Hu H., Cheng S., Zhou W., Huang M., Fong A., Liu B., Tseng H. R., Gao H., Liu Y., Fang X., *Small*, **2016**, *12*(8), 1072—1081
- [39] Wei Y., Long S., Zhao M., Zhao J., Zhang Y., He W., Xiang L., Tan J., Ye M., Tan W., Yang Y., Yuan Q., *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, *146*(1), 319—329
- [40] Gao T., Pei R., *ACS Appl. Bio. Mater.*, **2020**, *3*(10), 7080—7086
- [41] Cheng E. L., Cardle II, Kacherovsky N., Bansia H., Wang T., Zhou Y., Raman J., Yen A., Gutierrez D., Salipante S. J., Des Georges A., Jensen M. C., Pun S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*(30), 13851—13864
- [42] Bi S., Chen W., Fang Y., Wang Y., Zhang Q., Guo H., Ju H., Liu Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, *145*(9), 5041—5052
- [43] Wu X., Liu H., Han D., Peng B., Zhang H., Zhang L., Li J., Liu J., Cui C., Fang S., Li M., Ye M., Tan W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*(27), 10760—10769
- [44] Chen J., He J., Bing T., Feng Y., Lyu Y., Lei M., Tan W., *Anal. Chem.*, **2024**, *96*(26), 10601—10611
- [45] Xie S., Wang Z., Fu T., Zheng L., Wu H., He L., Huang H., Yang C., Wang R., Qian X., Qiu L., Tan W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, *61*(31), e202201220
- [46] Trads J. B., Topping T., Gothelf K. V., *Acc. Chem. Res.*, **2017**, *50*(6), 1367—1374
- [47] Sacca B., Niemeyer, C. M., *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*(12), 5910—5921
- [48] Yan X., Zhang H., Wang Z., Peng H., Tao J., Li X. F., Chris Le X., *Chem. Commun.*, **2018**, *54*, 7491—7494
- [49] Liu T., Ma C. J., Yuan B. F., Feng Y. Q., *Science China Chemistry*, **2018**, *61*(4), 381—392
- [50] Whited J., Zhang X., Nie H., Wang D., Li Y., Sun X. L., *ACS Chem. Biol.*, **2018**, *13*(9), 2364—2374
- [51] Wu J., Li N., Yao Y., Tang D., Yang D., Ongachwa Machuki J., Li J., Yu Y., Gao F., *Anal. Chem.*, **2018**, *90*(24), 14368—14375
- [52] Ghosh P., *Chemistry*, **2024**, *30*, (64), e202401983
- [53] Shi P., Zhao N., Lai J., Coyne J., Gaddes E. R., Wang Y., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*(23), 6800—6804
- [54] Fu Y., Qian H., Zhou X., Wu Y., Song L., Chen K., Bai D., Yang Y., Li J., Xie G., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2021**, *413*(28), 6929—6939
- [55] Liu L., Chen X., Sun B., *Anal. Chem.*, **2022**, *94*(40), 13745—13752
- [56] Chen X., Qiu L., Cai R., Cui C., Li L., Jiang J. H., Tan W., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2020**, *12*(34), 37845—37850
- [57] Albright S., Cacace M., Tivon Y., Deiters A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, *145*(30), 16458—16463
- [58] Cui C., Zhang H., Wang R., Cansiz S., Pan X., Wan S., Hou W., Li L., Chen M., Liu Y., Chen X., Liu Q., Tan W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*(39), 11954—11957
- [59] Yang W., Nan H., Xu Z., Huang Z., Chen S., Li J., Li J., Yang H., *Anal. Chem.* **2021**, *93*(36), 12265—12272
- [60] Lajoie M. J., Boyken S. E., Salter A. I., Bruffey J., Rajan A., Langan R. A., Olshefsky A., Muhunthan V., Bick M. J., Gewe M., Quijano-Rubio A., Johnson, J., Lenz G., Nguyen A., Pun S., Correnti C. E., Riddell S. R., Baker D., *Science*, **2020**, *369*, 1637—1643
- [61] Rajaram P., Chandra P., Ticku S., Pallavi B. K., Rudresh K. B., Mansabdar P., *Indian J. Dent. Res.*, **2017**, *28*(6), 687—694
- [62] Chen K., Mao M., Huo L., Wang G., Pu Z., Zhang Y., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2024**, *16*(23), 29760—29769
- [63] Young O., Ngo N., Lin L., Stanbery L., Creedon J. F., Hamouda D., Nemunaitis J., *Curr. Probl. Cancer*, **2023**, *47*(1), 100917
- [64] Zhang W., Wang H., Sun M., Deng X., Wu X., Ma Y., Li M., Shuo S. M., You Q., Miao L., *Cancer Commun.*, **2020**, *40*, 69—80
- [65] Strauss S., Nickels P. C., Strauss M. T., Jimenez Sabinina V., Ellenberg J., Carter J. D., Gupta S., Janjic N., Jungmann R., *Nat. Methods*, **2018**, *15*(9), 685—688
- [66] Yan Q., Cai M., Zhou L., Xu H., Shi Y., Sun J., Jiang J., Gao J., Wang H., *Nanoscale Adv.*, **2019**, *1*(1), 291—298
- [67] Chen J., Li H., Wu Q., Yan Q., Sun J., Liang F., Liu Y., Wang H., *Anal. Chem.*, **2021**, *93*(2), 936—945
- [68] Jing Y., Cai M., Zhou L., Jiang J., Gao J., Wang H., *Talanta*, **2020**, *217*, 121037
- [69] Li Z., Shen Q., Wang X., Wang X., Yue T., Shu Y., Wang Z., *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2024**, *415*, 136000
- [70] Ma W., Sun H., Chen B., Jia R., Huang J., Cheng H., He X., Huang M., Wang K., *Anal. Chem.*, **2021**, *93*(43), 14552—14559
- [71] Yuan K., Meng H. M., Wu Y., Chen J., Xu H., Qu L., Li L., Li Z., *CCS Chemistry*, **2022**, *4*(5), 1597—1609
- [72] Jacobson O., Weiss I. D., Wang L., Wang Z., Yang X., Dewhurst A., Ma Y., Zhu G., Niu G., Kiesewetter D. O., Vasdev N., Liang S. H., Chen X., *J. Nucl. Med.*, **2015**, *56*(11), 1780—1785
- [73] Wang L., Jacobson O., Avdic D., Rotstein B. H., Weiss I. D., Collier L., Chen X., Vasdev N., Liang S. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*,

- 2015, 54(43), 12777—12781
- [74] Ding D., Zhao H., Wei, D., Yang, Q., Yang C., Wang R., Chen Y., Li L., An S., Xia Q., Huang G., Liu J., Xiao Z., Tan W., *Research*, **2023**, 6, 126
- [75] Liu X., Mao D., Song Y., Zhu L., Isak A. N., Lu C., Deng G., Chen F., Sun F., Yang Y., Zhu X., Tan W., *Sci. Adv.*, **2022**, 8(2), eabk0133
- [76] Hu X., Chi H., Fu X., Chen J., Dong L., Jiang S., Li Y., Chen J., Cheng M., Min Q., Tian Y., Zhang P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, 146(4), 2514—2523
- [77] Mao M., Lin Z., Chen L., Zou Z., Zhang J., Dou Q., Wu J., Chen J., Wu M., Niu L., Fan C., Zhang Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145(9), 5447—5455
- [78] Fan Y., Li L., Lu M., Si H., Tang B., *Chem. Commun.*, **2019**, 55(28), 4043—4046
- [79] Chen B., Ma W., Long X., Cheng H., Sun H., Huang J., Jia R., He X., Wang K., *Anal. Chem.*, **2022**, 94(5), 2502—2509
- [80] Diao N., Hou J., Peng X., Wang Y., He A., Gao H., Yang L., Guo P., Wang J., Han D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2024**, 63(40), e202406330
- [81] Bo B., Li W., Li J., Han C., Fang Q., Yang M., Ni J., Zhou C., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2023**, 15(14), 17696—17704
- [82] Tian F., Zhang S., Liu C., Han Z., Liu Y., Deng J., Li Y., Wu X., Cai L., Qin L., Chen Q., Yuan Y., Liu Y., Cong Y., Ding B., Jiang Z., Sun J., *Nat. Commun.*, **2021**, 12(1), 2536
- [83] Zhang Q., Ma R., Zhang Y., Zhao J., Wang Y., Xu Z., *ACS Sens.*, **2023**, 8(2), 875—883
- [84] Li Y., Deng J., Han Z., Liu C., Tian F., Xu R., Han D., Zhang S., Sun J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143(3), 1290—1295
- [85] Li N., Zhang W., Lin L., Shah S. N. A., Li Y., Lin J. M., *Anal. Chem.*, **2019**, 91(4), 2600—2604.
- [86] Jiang H., Lopez-Aguilar A., Meng L., Gao Z., Liu Y., Tian X., Yu G., Ovrzyn B., Moremen K. W., Wu P., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 57(4), 967—971
- [87] Yuan Y., Wu L., Shen S., Wu S., Burdick M. M., *Life Sci.*, **2016**, 149, 138—145
- [88] Li S., Mao A., Huo F., Wang X., Guo Y., Liu L., Yan C., Ding L., Ju H., *Materials Today*, **2021**, 49, 85—96
- [89] Li J., Liu S., Sun L., Li W., Zhang S. Y., Yang S., Li J., Yang H. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, 140(48), 16589—16595
- [90] Liu Z., Liang Y., Cao W., Gao W., Tang B., *Anal. Chem.*, **2021**, 93(25), 8915—8922
- [91] Li T., Xing S., Liu Y., *Anal. Chem.*, **2023**, 95(48), 17790—17797
- [92] Shao Z., Yuan H., Zhou Z., Wang Y., Hou P., Nan H., Wang W., Tan W., Li J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, 61(41), e202210069
- [93] Kang S., Zhu L., Wang W., Lu Y., You Z., Zhang C., Xu Y., Yang C., Song Y., *Science China Chemistry*, **2022**, 65(6), 1204—1211
- [94] Xu L., Lu S., Wang H., Xu H., Ye B. C., *Anal. Chem.*, **2023**, 95(42), 15745—15754
- [95] Zhu L., Xu Y., Wei X., Lin H., Huang M., Lin B., Song Y., Yang C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(33), 18111—18115
- [96] Lemmon M. A., Schlessinger J., *Cell*, **2010**, 141(7), 1117—1134
- [97] Zhang L., Chu M., Ji C., Wei J., Yang Y., Huang Z., Tan W., Tan J., Yuan Q., *Anal. Chem.*, **2022**, 94(50), 17413—17421
- [98] Ogorek A. N., Zhou X., Martell J. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145(30), 16913—16923
- [99] Liang H., Chen S., Li P., Wang L., Li J., Li J., Yang H. H., Tan W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, 140(12), 4186—4190
- [100] Wang L., Li W., Sun J., Zhang S. Y., Yang S., Li J., Li J., Yang H. H., *Anal. Chem.*, **2018**, 90(24), 14433—14438
- [101] Kan A., Liu, X., Xu X., Zhang N., Jiang, W., *Chem. Commun.*, **2020**, 56(87), 13405—13408
- [102] Zhao X., Han Q., Na N., Ouyang J., *Anal. Chem.*, **2021**, 93(43), 14514—14520
- [103] Xu L., Zhou Z., Gou X., Shi W., Gong Y., Yi M., Cheng W., Song F., *Biosens. Bioelectron.*, **2021**, 179, 113064
- [104] Niederauer C., Nguyen C., Wang-Henderson M., Stein J., Strauss, S., Cumberworth, A., Stehr F., Jungmann R., Schulle P., Ganzinger K. A., *Nat. Commun.*, **2023**, 14(1), 4345
- [105] Ferapontov A., Omer M., Baudrexel I., Nielsen J. S., Dupont D. M., Juul-Madsen K., Steen P., Eklund A. S., Thiel S., Vorup-Jensen T., Jungmann R., Kjems J., Degn S. E., *Nat. Commun.*, **2023**, 14(1), 976
- [106] Riera R., Archontakis E., Cremers G., De Greef T., Zijlstra P., Albertazzi L., *ACS Sens.*, **2023**, 8(1), 80—93
- [107] Harwardt M. I. E., Schroder M. S., Li Y., Malkusch S., Freund P., Gupta S., Janjic N., Strauss S., Jungmann R., Dietz M. S., Heilemann M., *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21(8), 2803
- [108] Chen S., Xu Z., Li S., Liang H., Zhang C., Wang Z., Li J., Li J., Yang H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, 61(11), e202113795
- [109] Dong C., Fang X., Xiong J., Zhang J., Gan H., Song C., Wang L., *ACS Nano*, **2022**, 16(9), 14055—14065
- [110] Wang J., Song J., Zhang X., Wang S. M., Kang B., Li X. L., Chen H. Y., Xu J. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145(2), 1273—1284
- [111] Yang W., Huang Z., Xu Z., Ma X., Huang S., Li J., Li J., Yang H., *Anal. Chem.*, **2022**, 94(2), 1101—1107

(Ed.: N, K)