

脱氧核酶活性调控及其在生物医学领域中应用的研究进展

李园媛¹, 刘新¹, 徐廷双²

(1. 吉林大学第一医院艾滋病与病毒研究所, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学第一医院公共实验平台, 吉林 长春 130021)

[摘要] RNA 裂解型脱氧核酶是一类具有催化 RNA 切割活性的 DNA 分子, 其能够以高特异性切割任意 RNA 底物, 并具有高特异性、对基因组无永久影响、设计简单和序列可编程等优点, 在生物传感以及疾病治疗方面具有巨大潜力。但脱氧核酶在体内或复杂生物环境中的脱靶激活问题限制了其在应用中的灵敏度和选择性。目前研究主要集中于脱氧核酶的化学修饰改造, 通过引入特定的化学基团, 来实现对其催化活性的精确控制, 并通过将脱氧核酶与适配子结合, 以实现其对目标分子的精确识别和高效切割。脱氧核酶序列经过设计后, 可用于逻辑运算及分子计算机的开发。现概述脱氧核酶的多种改造和设计方法, 结合近年经化学修饰、结构改造的 RNA 裂解脱氧核酶在疾病治疗及传感领域的应用实例, 阐述其在生物传感和基因治疗中的独特性及优越性。探讨 RNA 裂解脱氧核酶在疾病诊断和治疗中的作用, 旨在为该类脱氧核酶在相关领域的进一步应用提供参考。

[关键词] 脱氧核酶; 生物传感器; 基因治疗; DNA 纳米结构; 荧光探针

[中图分类号] Q554 **[文献标志码]** A

Research progress in regulation of deoxyribozyme activity and its application in biomedical field

LI Yuanyuan¹, LIU Xin¹, XU Tingshuang²

(1. Institute of AIDS and Virology, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Public Experimental Platform, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT RNA-cleaving deoxyribozymes (DNAzymes) are the DNA molecules with catalytic RNA cleavage activity, and they can cleave the RNA substrates with high specificity with the advantages such as high specificity, no permanent impact on the genome, simple design and sequence-programmable, giving them great potential in biosensing and disease therapy. However, off-target activation of deoxyribozyme *in vivo* or complex biological environments limits their sensitivity and selectivity in various applications. Recent studies have focused on the chemical modification of deoxyribozymes, precise control for their catalytic activity its performed by introducing specific chemical groups; in addition, by combining deoxyribonucleases with aptamers, their precise recognition and efficient cleavage of target molecules can be

[收稿日期] 2024-09-05 [录用日期] 2024-10-20

[基金项目] 国家自然科学基金专项项目 (82341062); 吉林省科技厅省自然科学基金项目 (20210101284JC)

[作者简介] 李园媛 (1981-), 女, 吉林省长春市人, 主管技师, 理学硕士, 主要从事生物化学方面的研究。

[通信作者] 徐廷双, 实验师 (E-mail: xuts@jlu.edu.cn)

realized; and the deoxyribozyme sequences can be used for logical operations and the development of molecular computers after suitable design. In this review, various approaches to the modification and design of DNAzymes were comprehensively discussed, with their unique advantages and superiority in biosensing and gene therapy, including examples of chemically and structurally modified RNA-cleaving deoxyribozyme for therapeutic and sensing applications in the recent years. Ultimately, the review discussed the challenges and prospects of RNA-cleaving DNAzyme by its applications in disease diagnostic and therapy, aiming to provide the reference for the further application of deoxyribozyme in related fields.

KEYWORDS Deoxyribozyme; Biosensor; Gene therapy; DNA nanostructures; Fluorescence probe

疾病相关标志物的精确分析对疾病的早期发现和治疗至关重要^[1]。近年来, 新型生物检测和检测技术的应用提高了患者的生存率及生活质量, 但现有的治疗和检测手段存在一定的缺点和局限性, 阻碍了其进一步的应用和发展。以肿瘤为例, 目前常用的检测手段包括液体活检^[2]、分子检测^[3]和生物成像技术^[4]。液体活检和分子检测能实现肿瘤标志物的检测和疾病的诊断, 但需要对肿瘤组织进行侵入性取样, 因此受到样本量小和肿瘤异质性明显等因素的限制。虽然传统的影像学方法能实现肿瘤的无创检测, 但此类方法的分辨率有限, 不能对较小的病灶进行准确检测, 难以满足早期检测的要求。此外, 除了手术和化学治疗, 基因治疗作为一种高安全性的新兴技术, 在疾病治疗方面有巨大潜力。然而, 由于其较低的递送效率和较差的靶向性, 并未获得广泛应用。目前的研究成果无法满足临床上对于疾病准确诊断和有效治疗的需求^[5], 研究者们致力于寻找并开发出一种新方法, 以满足疾病的早期诊断和后续治疗^[6]。

脱氧核酶是一种通过体外选择鉴定得到的、具有高效催化活性的单链DNA, 能够催化多种化学反应。1995年, BREAKER等^[7]首次发现了RNA切割的脱氧核酶, 作为一种单链DNA其能催化RNA磷酸二酯键酯交换反应。尽管脱氧核酶仅由4种核苷酸碱基构成, 但后续研究^[7-13]显示: 除了RNA水解反应外, 其还能催化DNA或RNA的切割和连接、DNA磷酸化、DNA加帽、卟啉金属化、酪氨酸磷酸化以及酯键和酰胺键的水解等。其中8-17型和10-23型脱氧核酶由于出色的催化活性和稳定的结构, 受到了广泛的关注。上述脱氧核酶通过DNA双链碱基互补配对方式与底物结合, 在辅因子的作用下, 其通过催化环对底物切割位点进行攻击, 从而实现底物切割。由于这些脱氧核酶能高特

异性识别底物并对其进行高效切割, 因此在生物传感和基因治疗领域得到广泛应用^[14]。

相对于传统的蛋白质酶, 脱氧核酶具有许多独特的优势。首先, RNA切割脱氧核酶可以通过指数富集配基系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)在试管中筛选出来, 该方案保证了获得的脱氧核酶和靶标具有高亲和力及选择性。由于该选择过程适用于多种不同的靶标, 因此可以生成多种靶标特异性的脱氧核酶。此外, 一旦确定了RNA切割脱氧核酶的序列, 便可以通过商业核酸合成设备对其进行大批量的合成, 从而以较低的成本实现脱氧核酶的高质量、高重复性的大规模生产。由于脱氧核酶可以通过化学修饰、静电吸引和疏水作用等相互作用方式对其进行化学标记(如使用荧光染料、亚甲蓝和血红素等), 因此可以产生多种读出信号, 如比色、荧光和电化学信号, 为目标检测提供多种信号转导策略。与传统的蛋白酶和核酶相比, RNA切割脱氧核酶的化学性质稳定, 可以长期保存和回收, 且具有较高的催化效率, k_{cat}/K_m 可以达到 1×10^9 。 k_{cat} 表示酶在单位时间内转化底物的速率, 单位为1/s, 反映酶的催化能力; K_m 衡量的是酶与底物间的亲和力, 表示酶促反应速率达到最大值一半时所需的底物浓度。 k_{cat}/K_m 比值有助于评估酶的催化效率。 k_{cat}/K_m 比值越大, 意味着酶转化底物的速度越快, 与底物的亲和力也越高^[15]。由于脱氧核酶是单链DNA, 可以与多种DNA等温扩增技术结合, 如滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)^[16]、杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)^[17]和催化发夹自组装(catalytic hairpin assembly, CHA)^[18], 从而进一步提高对目标检测的灵敏度。

尽管脱氧核酶具有许多优势, 并已在活体生物系统中得到广泛应用, 但其在临床转化方面仍面临

许多挑战。例如, RNA切割脱氧核酶虽然作为短链DNA具有较小的相对分子质量、良好的水溶性和生物相容性, 但其负电荷的磷酸骨架显著降低了脱氧核酶在细胞内的递送效率, 而细胞内复杂的环境和较低金属离子浓度则明显降低了脱氧核酶的催化活性。随着对脱氧核酶研究的深入和应用场景的复杂化, 对脱氧核酶激活的时间和空间精确控制成为了一个重要需求。有研究者^[19]对脱氧核酶进行了一系列的设计和改造, 包括采用脂质递送系统, 实现细胞内高效递送、开发基于脱氧核酶的信号放大系统, 增强检测灵敏度, 采用化学与结构改造及合理设计, 通过刺激响应方式精准调控脱氧核酶活性等。本文作者总结了RNA切割脱氧核酶的改造和精确调控策略的最新进展, 系统地介绍了其在生物体内的传感以及基因治疗中的应用和优势, 分析活性精确调控的脱氧核酶在未来的应用前景和挑战, 旨在为推动脱氧核酶在生物传感和基因治疗领域的进一步应用提供参考。

1 RNA裂解脱氧核酶的体外选择

RNA裂解脱氧核酶是一种通过SELEX技术筛选获得的具有催化功能的单链DNA。在筛选过程中, 可通过加入不同的靶标, 获得对不同靶标具有响应能力的脱氧核酶。此外, 通过增加选择的循环数和选择压力可以进一步提高其靶标特异性和催化活性。在SELEX过程中, 为了实现大规模筛选, 通常先将链霉亲和素修饰的磁珠加入由 $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{16}$ 个生物素化的DNA/RNA嵌合序列组成的DNA文库中。随后, 将携带嵌合核酸序列的磁珠与靶标孵育, 具有靶标响应性的催化活性序列由于靶标的激活, 切割底物并从磁珠上释放。反应完成后通过磁分离将溶液与磁珠分离, 再对含有催化活性序列的溶液进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增其中的DNA。PCR引物采用生物素修饰, 以便使其扩增产物再次固定在链霉亲和素修饰的磁珠上。最后, 用碱洗涤磁珠, 去除互补链, 使候选催化活性序列以单链形式再生, 以供下一轮选择。通常筛选过程重复15~20轮, 直到DNA文库活性达到平稳期, 随后对文库进行测序以确定活性序列。

SELEX的筛选效率和筛选出的脱氧核酶性能受多种因素影响。为了获得高特异性的RNA切割脱氧核酶, 通常在使用预期目标对DNA文库进行正向选择的同时, 还需使用非预期目标或干扰目标的

混合物对其进行反向选择。另外, 脱氧核酶的筛选还受到DNA文库中序列长度的影响。研究^[20]表明: 20~60 nt的随机序列长度是筛选RNA切割脱氧核酶的最佳区间, 较长的核酸序列容易形成复杂的高级结构, 经过长时间孵育可能产生沉淀; 而较短的核酸序列结构多样性有限, 产生具有复杂功能的脱氧核酶的概率较小。另外, 由于脱氧核酶的催化环与其功能直接相关, 而底物结合臂需要与底物直接结合, 因此在选择催化环和结合臂时需要考虑二级结构的形成、序列长度和DNA分子中鸟嘌呤与胞嘧啶碱基所占的比例。由于筛选过程中涉及PCR扩增, 因此还需要考虑引物二聚体的形成。此外, 筛选过程中应确定最佳靶标浓度, 以避免其与非目标DNA序列的非特异性结合。

2 具有代表性的RNA切割脱氧核酶

目前研究最广泛的2个主要的金属离子依赖的脱氧核酶是8-17型和10-23型脱氧核酶^[21]。二者均具有1个催化环和2个底物结合臂, 并且活性的产生依赖 Mg^{2+} 的存在。相较于10-23型脱氧核酶, 8-17型脱氧核酶的催化环在长度和序列编码上更为灵活。典型的8-17型脱氧核酶催化环由14个核苷酸组成, 其中6个核苷酸互补配对形成发夹结构域, 8个核苷酸形成单链区, 其结合臂通过碱基互补配对与底物序列结合并发挥催化作用。研究^[22]表明: 8-17型脱氧核酶的催化环中, 发夹结构域的腺嘌呤6和鸟嘌呤7、单链区的胞嘧啶13和鸟嘌呤14是绝对保守的, 改变或删除上述4个核苷酸都会使脱氧核酶的催化活性显著降低或丧失。催化环的其他部位对核苷酸的替换、添加和删除具有良好的耐受性, 通过改变其他部位的核苷酸产生的8-17型脱氧核酶变体扩大了其切割位点的种类, 其中3个活性最佳的8-17型脱氧核酶可以切割16种不同切割位点中的10个, 其切割速率按 $NG > NA > NC > NT$ (N为任意核苷酸, G为鸟嘌呤, A为腺嘌呤, C为胞嘧啶, T为胸腺嘧啶)的顺序排列。相比之下, 10-23型脱氧核酶理论上可以高效地切割所有RNA底物, 其催化环序列高度保守, 因此只需更改结合臂即可与不同底物结合并发挥作用。与8-17型脱氧核酶类似, 10-23型脱氧核酶对不同切割位点的切割效率同样存在差异, 其切割速率按 $AU = GU > GC > AC$ (A为腺嘌呤, U为尿嘧啶, G为鸟嘌呤, C为胞嘧啶)的顺序排列^[23]。

3 刺激响应的脱氧核酶激活策略

3.1 金属离子对脱氧核酶活性的调控 RNA切割脱氧核酶由于其催化活性高度依赖金属离子, 通常被归类为金属酶。单晶体学研究^[24]表明: 金属离子可以诱导脱氧核酶高级结构的折叠。由于脱氧核酶带有大量负电荷, 因此金属离子对于维持其稳定的DNA结构至关重要。然而, 在大多数应用场景中, 体系中的金属离子浓度较低, 难以达到脱氧核酶发挥功能的最适离子浓度。研究^[25]表明: 10-23型脱氧核酶至少需要 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Mg^{2+} 才能有效形成催化结构域并高效切割底物, 而活细胞中游离 Mg^{2+} 浓度为 $0.2\sim 2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 不足以支持其催化活性结构的形成, 因此导致其较低的胞内活性。

将金属纳米载体与脱氧核酶共同递送至细胞可以增加金属离子的局部浓度。按照以往的金配位纳米材料在生物成像和癌症治疗中的应用策略, 目前已有研究^[26]通过将金属离子纳米材料[如二氧化锰(manganese binoxide, MnO_2)纳米粒子]和金属有机骨架化合物(metal organic framework, MOF)与脱氧核酶结合, 以调节其催化活性用于疾病检测和治疗。其中, MnO_2 纳米片很容易被胞内谷胱甘肽还原产生 Mn^{2+} , 从而提高胞内金属离子浓度^[27]。并且 MnO_2 纳米片作为一种有效的纳米递送载体, 可以帮助带有负电荷的脱氧核酶穿过细胞膜, 增加胞内摄取, 并使其免受内源性核酸酶的消化。而MOFs可由多种金属离子(如 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 等)合成, 在肿瘤组织的酸性环境中可降解为金属离子。 ZIF-8 纳米粒子被用于构建10-23型脱氧核酶载体, 并在酸性肿瘤微环境中分解, 同时释放 Zn^{2+} 和脱氧核酶以启动肿瘤的基因治疗^[28]。

尽管通过无机金属纳米材料承载脱氧核酶能有效解决因胞内金属离子浓度不足导致的低催化活性问题, 但无机金属纳米材料在设计上往往缺乏主动靶向性, 仅依靠被动靶向, 药物在其他器官的分布容易导致全身毒性。因此, 开发新的方法对脱氧核酶进行设计和改造, 以实现其活性的精确调控并减少脱靶效应是当前亟待解决的问题。

3.2 脱氧核酶与适配子结合以响应非金属小分子

考虑到肿瘤细胞内特定小分子和代谢产物的高表达, 小分子激活的RNA切割脱氧核酶在癌症治疗和诊断领域有广泛的应用前景。尽管目前很少发现非金属离子小分子依赖性脱氧核酶, 但对变

构脱氧核酶研究的深入, 越来越多的研究^[29-30]通过改造原始脱氧核酶, 使其具有对非金属小分子的特异性响应功能。其中, 适配酶因其具有高特异性的靶标识别功能及出色的可编程性受到广泛关注。适配酶是一类催化活性受配体激活的脱氧核酶, 由于其包含了适配体结构域和核酶结构域, 因此同时具有适配子的特异性靶标识别功能和脱氧核酶的高效底物催化活性, 可以轻松地将结合信号转换为更明显的酶活性信号。以三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)响应性适配酶为例, 通常在未结合目标配体时, 其催化结构域不能正确折叠, 导致催化活性无法表达。然而, 当其适配体结构域与配体结合, 其催化环可产生适应性折叠, 形成催化活性构象, 从而激活其催化活性的产生。SOUKUP和BREAKER^[31]是将脱氧核酶催化结构域与适配子识别结构域耦合的先驱, 后续研究基于该策略, 将适配酶的分子识别转化为底物的定量催化, 并将其广泛应用于靶标检测及疾病的诊断和治疗中。

YANG等^[32]首次报道了金属材料与适配酶结合, 用于活细胞中ATP的成像, 其将金纳米粒子(Au nanoparticles, AuNPs)与性能良好的ATP响应性适配酶连接, 该适配酶由 Mg^{2+} 依赖性10-23型脱氧核酶和ATP适配体组成。通过目标分子ATP特异性地激活适配酶, 进而切割AuNPs上荧光基团标记底物且释放荧光产物并最终产生放大的荧光信号, 结果表明: 适配体-金纳米粒子(Aptazyme-AuNPs)可以轻松进入活细胞, 并在生理浓度的 Mg^{2+} 下实现活细胞内ATP检测。此外, 适配酶与基因编辑(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)技术结合显示出对基因表达的动态控制能力。TANG等^[33]在小向导RNA(small guide RNA, sgRNA)中嵌入自切割适配酶, 在未结合配体时阻断正常的sgRNA功能。当配体存在时, 适配酶形成特定三级结构, 随后通过自裂解恢复sgRNA功能。上述嵌入适配酶的sgRNA在哺乳动物细胞中表现出3个独特特征: 小分子控制的核酸酶介导基因组编辑、小分子控制的碱基编辑和小分子依赖的转录激活。

3.3 阻断脱氧核酶活性结构形成以响应核酸链

脱氧核酶作为单链DNA, 可通过DNA双链碱基互补配对方式与其他核酸链互补配对。由于单链核酸具有高度的序列可编程性, 因此通过脱氧核酶与

核酸链结合调节其催化活性成为一种简单而流行的方法。考虑到脱氧核酶具有2个不同的功能区域(催化核心结构域和底物结合结构域),目前利用核酸结合控制脱氧核酶活性的策略主要有3种:①催化环阻断;②底物结合臂阻断;③多组分核酸酶组装。

催化环阻断策略通过将脱氧核酶催化环互补的短链核酸(DNA或RNA)结合到脱氧核酶催化环上,以锁定其催化活性,并通过链置换反应移除短链核酸,实现脱氧核酶活性的精确控制。与蛋白酶的变构调节类似,脱氧核酶的活性不仅取决于保守的催化结构域,还受到催化环二级结构的控制。ZHENG等^[34]提出了一种脱氧核酶的变构策略并将其应用于E6脱氧核酶。该体系由3条核酸链组成:脱氧核酶Z1、抑制剂T1和底物R1。抑制剂T1与脱氧核酶催化环形成双链结构,抑制其形成具有催化活性的二级结构,从而阻止底物R1的切割。当加入置换剂I1时,I1通过T1上的Toehold位点与T1发生链置换反应,生成完全互补的I1-T1双链产物,激活脱氧核酶Z1并裂解底物。不同于上述催化环阻断策略,GAO等^[35]通过将17E脱氧核酶的保守催化结构域分裂并插入靶标结合域,实现催化环阻断策略。该靶标结合域可与微小RNA(microRNA, miRNA)互补配对,当与靶miRNA杂交时,脱氧核酶的分裂催化结构域被带到正确位置,进而形成催化所需的活性二级结构。

STOJANOVIC等^[36]基于底物结合臂阻断策略设计了催化分子信标,并将其作为单链靶核苷酸变构控制的模块化脱氧核酶。其中,脱氧核酶的3'端底物结合臂与底物结合,5'端底物结合臂被附加的功能分子信标阻断,功能分子信标与脱氧核酶5'端底物结合臂形成茎环结构,包括1个未配对的环区和短的沃森-克里克配对的茎区。由于靶序列与分子信标的环区互补,当靶标存在时,其与环区形成的双链具有刚性的二级结构,分子信标与底物结合臂形成的茎环结构被打开,脱氧核酶的5'底物结合臂被释放,从而允许脱氧核酶与底物自由结合并催化底物裂解。不同于经典变构调节的核酸酶,WANG等^[37]报道了一种通过合理设计得到的可拓展的脱氧核酶活性调节方式。在该体系中,脱氧核酶和底物采取“6+3”的配对模式,即脱氧核酶的一侧结合臂(6个核苷酸)与底物完全互补配对,而另一侧结合臂仅有3个核苷酸与底物互补。因

此,由于酶-底物复合物的热力学不稳定性,二者无法稳定结合以进行底物裂解。当加入中间链后,其通过同时与酶和底物的游离部位结合,恢复脱氧核酶与底物的最佳碱基配对(6+7),以引发底物裂解反应的发生。

由于以上2种策略是基于完整脱氧核酶,通过短核酸链与其结合臂或催化环形成双链实现的活性阻断,因此在复杂环境下其不可避免地会出现信号泄露。相比之下,由于多组分核酸酶(multicomponent nucleases, MNAzyme)是将完整的脱氧核酶从催化环处彻底分裂形成2条独立的短DNA链(分别包含部分催化结构域和一侧的底物结合臂),因此可以最大程度上避免信号泄露问题的产生。当MNAzyme与特定的核酸链结合时,其断开的催化核心被重新连接,活性被激活。WU等^[38]设计了一种信号放大的MNAzyme用于胞内miRNA的检测。该检测体系由羧基荧光素(carboxyfluorescein, FAM)修饰的底物和分裂的DNAzyme组成,其中DNAzyme2上修饰了黑洞淬灭(black hole quencher, BHQ)基因,当底物、DNAzyme1和DNAzyme2互补配对形成复合物时,底物上的羧基荧光素(6-carboxyfluorescein, FAM)被DNAzyme2的BHQ淬灭。在靶标链存在的条件下,其与DNAzyme1和DNAzyme2结合,此时DNAzyme的环状催化结构域形成从而产生活性DNAzyme,随后活性DNAzyme将底物裂解产生荧光信号。与此同时,靶标链从DNAzyme上脱落并激活下一个分裂的DNAzyme实现信号的放大。同样针对于靶标链的检测,ZHU等^[39]设计了编码MNAzyme的四面体DNA框架(tetrahedral DNA framework, TDF)用于活细胞内多个miRNA的超灵敏成像。将设计好的多种DNA链同时加入到体系中,通过一步退火实现TDF的组装并将2种针对miRNA-21和miRNA-155的带有荧光标记的MNAzyme编码到TDFs的结构中。此外,TDFs的顶端还连接了富含鸟苷的寡聚核苷酸适配序列,以靶向癌细胞中过表达的核仁蛋白。当TDFs进入细胞后,2种MNAzyme分别与靶标miRNA-21和miRNA-155结合,形成活性DNAzyme结构,随后带有荧光标记的底物被裂解导致miRNA的释放和循环放大的荧光信号的产生。

3.4 对脱氧核酶进行化学修饰以响应外部/内部刺激 刺激响应性化学修饰通过将更多功能基因整

合到脱氧核酶中, 以实现其催化活性的时空控制或拓展其识别功能。研究者^[40]通过固相合成方法向脱氧核酶序列中引入2种光响应性化学分子N-甲基芳基偶氮吡唑和2', 6'-二甲基偶氮苯(dimethylazobenzene, DM-azo), 以正交和可逆地控制DNAzyme在不同波长光照下的活性。由于光在空间和时间上的可控性, 并且光照是非侵入性的, 对细胞的二次扰动最小。因此, 这种光不稳定化学修饰被广泛开发并用于控制脱氧核酶活性。目前常用的光敏基团主要包括6-硝基苯氧基甲基(nitrophenoxymethyl, NPOM)和邻硝基苄基(o-Nitrobenzyl, ONB)衍生物。YOUNG等^[41]通过将光敏基团NPOM掺入10-23型脱氧核酶中, 开发出一种光激活的RNA切割脱氧核酶。其通过对脱氧核酶的底物结合臂和催化环中的T12残基进行修饰, 可实现脱氧核酶的完全失活。随后, 使用25 W、365 nm的紫外线照射1 min, 脱氧核酶结合臂和T12上的NPOM基团被去除, 脱氧核酶活性恢复。除了对脱氧核酶的底物结合臂和催化环上的关键残基进行化学修饰, 底物切割位点rA同样可以作为修饰对象以阻止切割反应的发生。TORABI等^[42]将光不稳定的ONB基团修饰在底物链rA裂解位点的2'-OH上, ONB通过阻断2'-OH作为酯交换反应中亲核试剂的活性, 阻止底物裂解。经过365 nm波长的紫外线短暂照射后, 光笼基团很容易被移除, 通过该方式可以可控地实现底物从不可裂解到可裂解的转变。

尽管光不稳定的化学基团修饰解决了脱氧核酶的可控激活问题, 但由于激活过程需要紫外线照射, 而高能紫外线可能会引起细胞损伤。相较于紫外线, 近红外光具有更好的生物相容性, 同等照射时间引起的光损伤更少, 并且具有更强的组织穿透性。YANG等^[43]报道了一种近红外光控制的体内金属离子传感器, 该传感器由8-17型脱氧核酶底物复合物及掺杂镧系元素的上转换纳米粒子(upconversion nanoparticles, UCNP)构成。UCNP可将980 nm的近红外光转换为局部365 nm的紫外发射光, 受到局部紫外光照射后, 底物rA残基上修饰的2'-硝基苄基基团被解离, 脱氧核酶的催化活性被重新激活, 结果显示: 该传感器可成功用于经980 nm近红外光照射后活细胞内动态分布的Zn²⁺成像。

除了通过光控手段调节脱氧核酶催化活性, 研

究者们还建立了脱氧核酶的热可逆控制。相较于近红外或紫外光, 温度控制更容易引入各种实验环境。为实现脱氧核酶的热响应, KNUTSON等^[44]使用乙二醛对10-23型脱氧核酶进行化学修饰。乙二醛与核苷酸碱基上的氮原子反应, 产生稳定的双半加合物。凝胶电泳结果表明: 乙二醛修饰通过破坏DNA的二级结构抑制了10-23型脱氧核酶活性, 经过95 °C加热10 min即可恢复脱氧核酶的活性。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是许多细胞功能(信号传导和功能失调)的关键代谢产物。细胞内过高的ROS浓度是氧化应激导致免疫反应、癌症和衰老的标志。虽然光和热活化脱氧核酶可以在细胞内特定部位和时间激活, 从而进行更精确的胞内反应。但光和热刺激是外部的, 无法与细胞内重要生物代谢产物信息关联。XIAO等^[45]将苯硼酸酯和硫代磷酸修饰引入Zn²⁺依赖性的8-17型脱氧核酶, 使其活性受细胞内ROS(过氧化氢和次氯酸)激活, 结果显示: 通过分别将苯硼酸酯和硫代磷酸修饰的脱氧核酶递送到同一细胞, 胞内的过氧化氢和次氯酸可以成功地正交激活上述2种脱氧核酶, 从而分别裂解2种不同的核酸底物。

3.5 多种刺激协同激活的脱氧核酶 尽管已有研究^[46]报道了由细胞内源性刺激(如酶和ROS)激活的化学修饰脱氧核酶, 但由于内源性刺激在非靶细胞中表达量低, 单一刺激响应的脱氧核酶存在脱靶激活的风险。利用2种或多种刺激正交激活脱氧核酶活性已被证实可保证其有效的时空激活, 避免脱靶激活的产生。WANG等^[47]将8-17型脱氧核酶分成2个MNAzyme亚基(DNAzyme A和DNAzyme B), 并在催化核心核苷酸中用苯硼酸酯修饰, 得到miRNA-21和过氧化氢双响应DNAzyme(double response-DNAzyme, DR-DNAzyme), 并将其与普鲁士蓝模拟(prussian blue analog, PBA)和MOF集成, 构建了一种以DNAzyme逻辑门为控制中心、以MOF为执行器的智能纳米机器。该纳米机器可感知肿瘤细胞中高浓度的miRNA-21和过氧化氢并被激活, 激活的DR-DNAzyme开始抑制过氧化氢酶的表达, 导致过氧化氢积累。同时, 过氧化氢进一步作为输入信号激活逻辑门系统, 这种正反馈机制进一步促进了癌细胞中过氧化氢的积累。相反, 当细胞内miRNA-21和过氧化氢丰度较

低时, DR-DNAzyme 在胞内保持沉默。为实现疾病的按需治疗, WANG 等^[48]报道了一种生物正交诱导的脱氧核酶设计, 通过在酶的指定骨架位点进行特异性的生物正交笼状化学修饰使其失活, 并通过磷化氢触发的施陶丁格(Staudinger)反应恢复其活性, 结果表明: 该诱导型脱氧核酶可用于活细胞中外源和内源性 mRNA 的生物正交控制裂解, 并可拓展到光激活和内源性刺激激活, 以实现按需控制下的基因沉默。

4 RNA 切割脱氧核酶在生物传感器中的应用

RNA 切割脱氧核酶作为一种功能性核酸, 具有成本低、稳定性强和催化效率高等优势。目前, 已有大量基于脱氧核酶的生物传感平台被开发, 用于检测金属离子、蛋白质和 miRNA 等靶标^[49-51]。然而, 上述传感器经常存在信号泄露或稳定性不足的问题。为解决这些问题, 越来越多具有自我保护和靶向能力的脱氧核酶被开发, 并用于生物传感器设计, 以拓展其在靶标检测中的应用潜力。YI 等^[52]提出了一种酶激活的脱氧核酶传感器, 用于区分肿瘤细胞和正常细胞中的金属离子信号。与传统传感器相比, 该传感器的活性受到一段包含非碱基位点的封闭序列抑制, 该位点可被癌细胞内特异性表达的无嘌呤/无嘧啶核酸内切酶 1 (apurinic/aprimidinic endonuclease 1, APE1) 切割, 从而实现癌细胞内的特异性激活并传感金属离子。为了实现脱氧核酶检测金属离子的精确时空控制, WANG 等^[53]报道了 1 种远程和非侵入性控制脱氧核酶激活的金属离子探针。其中, Zn^{2+} 选择性脱氧核酶探针的活性被阻断链抑制。通过高强度聚焦超声 (high intensity focused ultrasound, HIFU) 远程提供按需且具有时空分辨的热能以提高局部温度, 当局部温度超过阻断链和脱氧核酶结合的中点温度时, 脱氧核酶活性被激活。通过这种设计, 该传感器已在 HeLa 细胞和小鼠体内实现 Zn^{2+} 特异性成像。

miRNAs 与许多疾病的发生发展有关, 已成为诊断和治疗的生物标志物, 目前 miRNA 的异常表达已被广泛研究并用于精确的肿瘤成像。在早期的 miRNA 检测研究中, 已有报道实现了斑马鱼胚胎中 miRNA 的检测, 但由于其荧光信号受斑马鱼幼体透明度的影响, 灵敏度和检测限较差, 且无法应用于非透明动物模型^[54]。MENG 等^[55]设计了一种包含铜的金属有机框架 (Cu-MOF) 和 DNA 序列

杂化组成 1 个多功能纳米系统 DNA@Cu-MOF, 用于体内 miRNA-21 的检测。在缺氧条件下, 此纳米系统可以释放 Cu^{2+} 、DNAzyme 前体和底物链进入细胞。miRNA-21 通过立足点介导的链置换反应 (toehold-mediated strand displacement, TMSD) 将信号链置换, 并诱导荧光标记物 (Cyanine3, Cy3) 标记的 DNA 探针的荧光恢复以实现 miRNA-21 检测。此外, WEI 等^[56]构建了一种由蜂窝状 MnO_2 海绵 (honeycomb MnO_2 nanosponge, hMNS) 和自催化脱氧核酶组成的生物电路, 用于肿瘤核磁共振和体内 miRNA 成像。hMNS 将探针递送至细胞后被胞内谷胱甘肽分解, 产生 Mn^{2+} 作为脱氧核酶辅因子。随后, 内源性 miRNA-21 激活了杂交链式反应 (hybridization chain reaction, HCR) 介导的串联脱氧核酶自主组装。组装好的脱氧核酶将底物裂解, 其产物可作为新的触发器加入 HCR 中, 产生放大的信号。

5 具有 RNA 切割功能的脱氧核酶在基因治疗中的应用

除了被设计为生物传感器外, 脱氧核酶还可以作为肿瘤基因治疗的工具。脱氧核酶通过与靶 mRNA 结合, 特异性切割 mRNA, 使其无法被翻译成蛋白质, 从而达到基因沉默的目的。由于脱氧核酶具有良好的膜渗透性和可修饰性, 目前已被广泛用于癌症治疗研究。LIU 等^[57]开发了由脱氧核酶和 Cu^{2+} 组成的杂化纳米结构 Cu-DNAzyme。Cu-DNAzyme 入胞后, 通过 Cu^{2+} 产生的化学动力学治疗和脱氧核酶对血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 基因的特异性沉默, 实现了放大的级联抗肿瘤作用。尽管针对这些异常基因的基因治疗策略在癌症治疗方面取得了重大突破, 但癌细胞转移、免疫抑制和治疗耐药仍是癌症治愈的主要制约因素。为解决上述问题, 研究者们正致力于对脱氧核酶进行合理改造和设计, 以产生更加个性化、精准化和智能化的基因治疗方案。

为了高效、特异性地杀伤肿瘤细胞, MOLDEN 等^[58]报道了一种基于 DNAzyme 的靶向癌细胞的纳米机器人, 其由 1 个双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 平台和 4 个功能 DNA 链构成, 包括 RNA 切割 Dz1 和 Dz2 以及分裂的脱氧核酶链 Dz-a 和 Dz-b; 其中 Dz1 和 Dz2 可以识别以单碱基致癌突变为特征的癌症标志物的 RNA

片段, 切除该片段得到的产物可用于桥接 Dz-a 和 Dz-b。随后 Dz-a 与 Dz-b 结合重新形成催化核心, 进而靶向细胞的管家基因 mRNA, 最终引发癌细胞死亡。换言之, 该研究通过 dsDNA 平台, 利用脱氧核酶的癌症标志物识别功能和 RNA 切割特性, 设计了结构简单且具有癌症靶向性的纳米机器。更加复杂且多功能的纳米复合物也是近年来的研究热点。ZHAO 等^[59] 基于脱氧核酶和 DNA 纳米结构等物质, 构建了近红外光驱动的基因治疗系统。该系统的支架为含有脱氧核酶序列的 DNA 纳米框架, 并且其表面包覆了聚多巴胺 -MnO₂ 涂层 (polydopamine-MnO₂, PM)。当纳米复合材料在肿瘤部位聚集时, 通过近红外光照射, PM 涂层可进行光热转化, 使肿瘤部位温度升高, 并且胞内谷胱甘肽可以引发 PM 涂层的分解, 释放出 Mn²⁺, 激活脱氧核酶活性。另外, PM 诱导的温度升高可增强脱氧核酶催化活性, 与肿瘤组织的热应激起到协同的抗肿瘤作用。不同于以上研究, WANG 等^[60] 设计了一种具有仿生自我代谢功能的 DNA 纳米胶囊, 用于维持治疗性脱氧核酶的肿瘤特异性级联激活, 其中具有 RNA 裂解功能的脱氧核酶在多级滚环复制胶囊中被暂时失活, 从而在生理条件下保持非活性状态。通过多价肿瘤锚定适配体链与肿瘤靶标的结合, 多级滚环复制胶囊实现癌细胞内特异性积累, 并被激活, 最终通过级联刺激反应将脱氧核酶释放, 以发挥其基因沉默功能。

6 总结与展望

本研究系统地总结了近年 RNA 切割脱氧核酶的活性调控方法及其在生物传感和基因治疗中的优势。脱氧核酶因高稳定性、高催化活性及低毒性等优点, 可应用于生物传感器设计, 特异性识别金属离子、化学小分子、细菌和其他辅助因子。脱氧核酶通过序列特异性切割 RNA 底物, 实现精确生物传感和基因治疗 (如切割肿瘤或病毒致病 RNA)。然而, 目前基于脱氧核酶的生物传感系统主要应用于实验室环境, 体内检测仍受许多生物因素限制, 提高检测系统的抗干扰能力和体内稳定性势在必行。脱氧核酶基因沉默能力优于反义寡核苷酸, 其稳定性更高、成本更低, 无需依赖 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)。然而, 递送效率低是阻碍基于脱氧核酶的基因治疗广泛应用的一个重要问题。随着纳米技术的快速发展, 用于提高脱氧核酶递

送效率的自支撑多功能纳米递送系统的新研究正在进行中。未来的研究应考虑脱氧核酶的有效性, 包括与靶标的结合效率、细胞摄取效率和稳定性, 以及局部二价阳离子浓度等。近年 RNA 切割脱氧核酶在基因治疗中的应用虽已被广泛探索, 但研究多集中在肿瘤方向, 应拓展疾病研究范围, 并解决体内运输、突破生理屏障等问题。随着研究的深入及新型高效递送系统的开发, 脱氧核酶将在诊断、分子生物学及疾病的基因治疗中发挥更大的作用。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

李园媛参与文献收集、整理和论文撰写, 刘新和徐廷双参与文献收集、整理及论文审核。

[参考文献]

- [1] JAYANTHI V S P K S A, DAS A B, SAXENA U. Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 15-23.
- [2] WANG J, KOO K M, WANG Y L, et al. Engineering state-of-the-art plasmonic nanomaterials for SERS-based clinical liquid biopsy applications[J]. *Adv Sci*, 2019, 6(23): 1900730.
- [3] HORBINSKI C, LIGON K L, BRASTIANOS P, et al. The medical necessity of advanced molecular testing in the diagnosis and treatment of brain tumor patients[J]. *Neuro Oncol*, 2019, 21(12): 1498-1508.
- [4] GAO X, LIU Y X, HUO W D, et al. RNA-cleaving DNazymes for accurate biosensing and gene therapy[J]. *Nanoscale*, 2023, 15(27): 11346-11365.
- [5] ZHAO Y, LI R M, SUN J L, et al. Multifunctional DNzyme-anchored metal-organic framework for efficient suppression of tumor metastasis [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(4): 5404-5417.
- [6] HE L J, PAGNEUX Q, LARROULET I, et al. Label-free femtomolar cancer biomarker detection in human serum using graphene-coated surface plasmon resonance chips [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 89: 606-611.
- [7] BREAKER R R, JOYCE G F. A DNA enzyme with Mg²⁺-dependent RNA phosphoesterase activity [J]. *Chem Biol*, 1995, 2(10): 655-660.

- [8] CHANDRA M, SACHDEVA A, SILVERMAN S K. DNA-catalyzed sequence-specific hydrolysis of DNA[J]. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(10): 718-720.
- [9] FLYNN-CHARLEBOIS A, WANG Y M, PRIOR T K, et al. Deoxyribozymes with 2'-5'RNA ligase activity[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(9): 2444-2454.
- [10] LI Y F, BREAKER R R. Phosphorylating DNA with DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(6): 2746-2751.
- [11] LI Y F, LIU Y, BREAKER R R. Capping DNA with DNA[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(11): 3106-3114.
- [12] LI Y F, SEN D. A catalytic DNA for porphyrin metallation[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 1996, 3(9): 743-747.
- [13] WALSH S M, SACHDEVA A, SILVERMAN S K. DNA catalysts with tyrosine kinase activity[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(40): 14928-14931.
- [14] KUMAR S, JAIN S, DILBAGHI N, et al. Advanced selection methodologies for DNAzymes in sensing and healthcare applications[J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(3): 190-213.
- [15] MCCONNELL E M, COZMA I, MOU Q B, et al. Biosensing with DNAzymes[J]. *Chem Soc Rev*, 2021, 50(16): 8954-8994.
- [16] ZHANG R, WU J, AO H, et al. A rolling circle-amplified G-quadruplex/hemin DNAzyme for chemiluminescence immunoassay of the SARS-CoV-2 protein[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(28): 9933-9938.
- [17] WU Q, WANG H, GONG K K, et al. Construction of an autonomous nonlinear hybridization chain reaction for extracellular vesicles-associated microRNAs discrimination[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(15): 10172-10179.
- [18] YANG L, WU Q, CHEN Y Q, et al. Amplified microRNA detection and intracellular imaging based on an autonomous and catalytic assembly of DNAzyme[J]. *ACS Sens*, 2019, 4(1): 110-117.
- [19] SAMARIDOU E, HEYES J, LUTWYCHE P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 154/155: 37-63.
- [20] LEGIEWICZ M, LOZUPONE C, KNIGHT R, et al. Size, constant sequences, and optimal selection[J]. *Rna*, 2005, 11(11): 1701-1709.
- [21] MUÑOZ-GONZÁLEZ M, SILVA-GALLEGUILLOS V, PARRA-MENESES V, et al. Catalytic mechanisms of the 8-17 and 10-23 DNAzymes: shared mechanistic strategies[J]. *Org Biomol Chem*, 2025, 23(19): 4564-4577.
- [22] BROWN A K, LI J, PAVOT C M, et al. A lead-dependent DNAzyme with a two-step mechanism[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(23): 7152-7161.
- [23] CAIRNS M J. Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(11): 2883-2889.
- [24] LIU H H, YU X, CHEN Y Q, et al. Crystal structure of an RNA-cleaving DNAzyme[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 2006.
- [25] CIESLAK M, SZYMANSKI J, ADAMIAK R W, et al. Structural rearrangements of the 10 - 23 DNAzyme to $\beta 3$ integrin subunit mRNA induced by cations and their relations to the catalytic activity[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(48): 47987-47996.
- [26] YI J T, CHEN T T, HUO J, et al. Nanoscale zeolitic imidazolate framework-8 for ratiometric fluorescence imaging of microRNA in living cells[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(22): 12351-12359.
- [27] FAN H H, ZHAO Z L, YAN G B, et al. A smart DNAzyme-MnO₂ nanosystem for efficient gene silencing[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54(16): 4801-4805.
- [28] WANG H M, CHEN Y Q, WANG H, et al. DNAzyme-loaded metal-organic frameworks (MOFs) for self-sufficient gene therapy[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58(22): 7380-7384.
- [29] ZHANG C Y, LI Q T, XU T B, et al. New DNA-hydrolyzing DNAs isolated from an ssDNA library carrying a terminal hybridization stem[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(11): 6364-6374.
- [30] BORGGRÄFE J, VICTOR J, ROSENBACH H, et al. Time-resolved structural analysis of an RNA-cleaving DNA catalyst[J]. *Nature*, 2022, 601(7891): 144-149.
- [31] SOUKUP G A, BREAKER R R. Nucleic acid molecular switches[J]. *Trends Biotechnol*, 1999, 17(12): 469-476.
- [32] YANG Y J, HUANG J, YANG X H, et al. Aptazyme-gold nanoparticle sensor for amplified molecular probing in living cells[J]. *Anal Chem*, 2016, 88(11): 5981-5987.
- [33] TANG W X, HU J H, LIU D R. Aptazyme-embedded

- guide RNAs enable ligand-responsive genome editing and transcriptional activation[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15939.
- [34] ZHENG X D, YANG J, ZHOU C J, et al. Allosteric DNAzyme-based DNA logic circuit: operations and dynamic analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(3): 1097-1109.
- [35] GAO Y S, ZHANG S B, WU C W, et al. Self-protected DNAzyme walker with a circular bulging DNA shield for amplified imaging of miRNAs in living cells and mice[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(12): 19211-19224.
- [36] STOJANOVIC M N, DE PRADA P, LANDRY D W. Catalytic molecular beacons[J]. *ChemBioChem*, 2001, 2(6): 411-415.
- [37] WANG D Y, SEN D. A novel mode of regulation of an RNA-cleaving DNAzyme by effectors that bind to both enzyme and substrate[J]. *J Mol Biol*, 2001, 310(4): 723-734.
- [38] WU Y N, HUANG J, YANG X H, et al. Gold nanoparticle loaded split-DNAzyme probe for amplified miRNA detection in living cells[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(16): 8377-8383.
- [39] ZHU D, WEI Y Q, SUN T, et al. Encoding DNA frameworks for amplified multiplexed imaging of intracellular microRNAs[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(4): 2226-2234.
- [40] WANG X Y, FENG M L, XIAO L, et al. Postsynthetic modification of DNA phosphodiester backbone for photocaged DNAzyme [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(2): 444-451.
- [41] YOUNG D D, LIVELY M O, DEITERS A. Activation and deactivation of DNAzyme and antisense function with light for the photochemical regulation of gene expression in mammalian cells [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(17): 6183-6193.
- [42] TORABI S F, WU P W, MCGHEE C E, et al. *In vitro* selection of a sodium-specific DNAzyme and its application in intracellular sensing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(19): 5903-5908.
- [43] YANG Z L, LOH K Y, CHU Y T, et al. Optical control of metal ion probes in cells and zebrafish using highly selective DNAzymes conjugated to upconversion nanoparticles[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(50): 17656-17665.
- [44] KNUTSON S D, SANFORD A A, SWENSON C S, et al. Thermoreversible control of nucleic acid structure and function with glyoxal caging[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(41): 17766-17781.
- [45] XIAO L, GU C M, XIANG Y. Orthogonal activation of RNA-cleaving DNAzymes in live cells by reactive oxygen species[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58(40): 14167-14172.
- [46] LIN Y, YANG Z L, LAKE R J, et al. Enzyme-mediated endogenous and bioorthogonal control of a DNAzyme fluorescent sensor for imaging metal ions in living cells[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58(47): 17061-17067.
- [47] WANG Z, YANG J, QIN G, et al. An intelligent nanomachine guided by DNAzyme logic system for precise chemodynamic therapy [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61(38): e202204291.
- [48] WANG R, HE W H, YI X, et al. Site-specific bioorthogonal activation of DNAzymes for on-demand gene therapy[J]. *J Am Chem Soc*, 2023, 145(32): 17926-17935.
- [49] ILCHOVSKA D D, BARROW D M. An Overview of the NF- κ B mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF- κ B ligand RANKL and related nutritional interventions [J]. *Autoimmun Rev*, 2021, 20(2): 102741.
- [50] TIAN L, ZHANG J Y, ZHANG Y, et al. Bipedal DNAzyme walker triggered dual-amplification electrochemical platform for ultrasensitive ratiometric biosensing of microRNA-21 [J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 220: 114879.
- [51] HOSSEINZADEH E, RAVAN H, MOHAMMADI A, et al. Target-triggered three-way junction in conjugation with catalytic concatemers-functionalized nanocomposites provides a highly sensitive colorimetric method for miR-21 detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 117: 567-574.
- [52] YI D Y, ZHAO J, LI L L. An enzyme-activatable engineered DNAzyme sensor for cell-selective imaging of metal ions[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60(12): 6300-6304.
- [53] WANG X J, KIM G, CHU J L, et al. Noninvasive and spatiotemporal control of DNAzyme-based imaging of metal ions *in vivo* using high-intensity focused ultrasound[J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144(13): 5812-5819.
- [54] HE X J, YAN Y L, DELAURIER A, et al. Observation of miRNA gene expression in zebrafish

- embryos by *in situ* hybridization to microRNA primary transcripts[J]. *Zerbrafish*, 2011, 8(1): 1-8.
- [55] MENG X D, ZHANG K, YANG F, et al. Biodegradable metal-organic frameworks power DNAzyme for *in vivo* temporal-spatial control fluorescence imaging of aberrant microRNA and hypoxic tumor[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(12): 8333-8339.
- [56] WEI J, WANG H M, WU Q, et al. A smart, autocatalytic, DNAzyme biocircuit for *in vivo*, amplified, microRNA imaging [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59(15): 5965-5971.
- [57] LIU C Z, CHEN Y X, ZHAO J, et al. Self-assembly of copper-DNAzyme nanohybrids for dual-catalytic tumor therapy[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60(26): 14324-14328.
- [58] MOLDEN T A, NICCUM C T, KOLPASHCHIKOV D M. Cut and paste for cancer treatment: a DNA nanodevice that cuts out an RNA marker sequence to activate a therapeutic function[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59(47): 21190-21194.
- [59] ZHAO H X, ZHANG Z L, ZUO D, et al. A synergistic DNA-polydopamine-MnO₂ nano complex for near-infrared-light-powered DNAzyme-mediated gene therapy[J]. *Nano Lett*, 2021, 21(12): 5377-5385.
- [60] WANG J, YU S S, WU Q, et al. A self-catabolic multifunctional DNAzyme nanosponge for programmable drug delivery and efficient gene silencing [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60(19): 10766-10774.