

DOI: 10.20098/j.cnki.1001-5132.2025.0518

基于 DNA 四面体 HCR 信号放大纳米体系的活细胞内 circRNA 检测与生物成像

谢格格^{1,2}, 陈静雯^{1,2}, 刘浩蓉^{1,2}, 喻盛容^{1,2}, 唐科奇^{1,2*}

(1.宁波大学 材料科学与化学工程学院, 浙江 宁波 315211; 2.宁波镇海质谱研究院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 鉴于可靠生物标志物对早期诊断、治疗和预后评估疾病的关键作用, 且现有研究证实 circRNA 具备成为潜在诊断与预后生物标志物的重要价值。本研究构建了一种基于 DNA 四面体的信号放大纳米体系 (DTNH), 该体系利用杂交链式反应 (Hybridization Chain Reaction, HCR) 进行信号放大, 实现对活细胞中 circRNA 的检测及生物成像。HCR 作为一种无酶、等温的信号放大技术, 原理是通过目标物触发两个稳定的 DNA 发夹 (H1 和 H2) 发生交替、自持续的级联杂交反应, 进而形成长双链 DNA 聚合物。基于此原理构建的 DTNH 由两种功能化的 DNA 四面体探针 (DTNH-1 和 DTNH-2) 构成。通过荧光法得出 DTNH 展现出优异的灵敏度和选择性, 检测限为 1.2×10^{-11} mol/L。同时, DTNH 具有良好的生物相容性, 凭借独特的纳米结构优势, 能进入细胞, 并成功用于活细胞内 circMTO1 的成像研究。开发的纳米体系不仅能动态监测细胞内 circMTO1 的表达水平, 还可区分肿瘤细胞和正常细胞, 同时为揭示 circRNA 空间表达特征提供了新方法, 有望为开发精准高效的肿瘤诊断平台奠定一定基础。

关键词: circRNA; DNA 四面体; 荧光探针; 信号放大; 生物成像

中图分类号: R318

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2026) 02-0072-09

Detection and imaging of circRNA in living cells based on DNA tetrahedron HCR signal amplification nanosystem

XIE Gege^{1,2}, CHEN Jingwen^{1,2}, LIU Haorong^{1,2}, YU Shengrong^{1,2}, TANG Keqi^{1,2*}

(1.School of Materials Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Ningbo Zhenhai Insititute of Mass Spectrometry, Ningbo 315211, China)

Abstract: The discovery of reliable biomarkers is crucial for the early diagnosis, treatment, and prognostic assessment of diseases. Current research indicates that circRNA possesses significant potential as a diagnostic and prognostic biomarker. In this study, we developed a DNA tetrahedron-based signal amplification nanosystem (DTNH) that utilizes hybridization chain reaction (HCR) for signal amplification to detect circRNA in living cells and enable biological imaging. HCR is an enzyme-free, isothermal signaling amplification technique based on the principle of target-induced triggering of two stable DNA hairpins (H1 and H2), which then engage in alternating, self-sustaining cascade hybridization reactions to form long double-stranded DNA polymers. The DTNH constructed based on this principle comprises two types of functionalized DNA tetrahedron probes (DTNH-1 and DTNH-2). Fluorescence assays demonstrated that the DTNH exhibits excellent

收稿日期: 2025-05-19

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金 (U20A20121)

第一作者: 谢格格, 硕士研究生, 主要研究方向为化学生物传感。E-mail: 17729177520@163.com

*通信作者: 唐科奇, 教授, 主要研究方向为质谱学理论及技术应用。E-mail: tangkeqi@nbu.edu.cn

sensitivity and selectivity with a detection limit of 1.2×10^{-11} mol/L. Additionally, the DTNH showcases good biocompatibility; due to its unique nanoscale structural advantages, it can enter cells effectively and has been successfully applied for imaging studies of circMTO1 within live cells. The developed nanoplatform can not only dynamically monitor the expression levels of circMTO1 within cells but also distinguish between tumor cells and normal cells. At the same time, it provides a new method for revealing the spatial expression characteristics of circRNA, which is expected to lay a certain foundation for developing precise and efficient tumor diagnostic platforms.

Keywords: circRNA; DNA tetrahedron; fluorescence probe; signal amplification; biological imaging

circRNA (circular RNA) 是一类单链共价闭合结构的非编码 RNA 分子^[1], 通过前体 mRNA 外显子的反向剪接机制生成, 存在于多种物种中^[2]。由于 circRNA 有许多生物学功能, 可作为 RNA 分子海绵吸附 RNA 或 RNA 结合蛋白 (RBPs)^[3-4], 还能参与转录调控、基因表达调控及可变剪接事件的调控^[5-6]。现有研究^[7-9]证实, circRNA 具有高度结构稳定性和保守的组织特异性表达模式, 其异常表达与肿瘤、代谢疾病、神经系统疾病等多种人类疾病的发生发展密切相关。凭借这些特性, circRNA 在临床诊断和预后生物标志物开发中展现出独特优势, 尤其在疾病早期诊断领域具有重要价值^[10]。

传统 circRNA 检测方法包括实时定量聚合酶链反应 (RT-qPCR)^[11]、微阵列分析^[12]、RNA 测序^[13]、北方印迹法^[14]及原位荧光杂交 (FISH)^[15]。但由于细胞内 circRNA 浓度极低, 以上方法难以实现活细胞内 circRNA 表达水平的原位检测, 也无法提供相关的时空信息。目前, 基于信号放大策略的核酸探针 (如杂交链式反应 (HCR)^[16]) 为 circRNA 的细胞内分析提供了有效途径, 但其也面临细胞摄取效率低的瓶颈^[17]。尽管纳米技术的发展 (如金属有机框架、金属量子点等载体) 可改善核酸探针的跨膜递送, 但其存在潜在的细胞毒性^[18-19]、复杂的合成与负载工艺以及难以精确控制发夹比例等问题, 最终限制了其实际应用。因此, 开发一种生物相容性优异、制备简便且能高效实现细胞内原位检测的探针, 对于活细胞内低丰度 circRNA 的检测及生物成像研究具有重要意义。

基于 DNA 纳米技术的框架, 核酸生物传感策略为解决上述挑战提供了新方向^[20]。其中, DNA 四面体^[21-23]作为典型的三维框架核酸纳米结构, 其顶点区域可进行功能化修饰, 通过精确控制探针的空间排布来显著提升分子识别的取向稳定性, 同时

降低非目标分子的非特异性吸附。另一方面, 以 DNA 四面体为载体的核酸探针, 通过针对不同目标引入多个识别单元, 提高检测准确性^[24-25]。因此, 基于 DNA 四面体构建高效检测平台, 有望为活细胞中低丰度 circRNA 的分析提供有效解决方案。

基于上述研究背景, 本文构建了一种基于 DNA 四面体的 HCR 信号放大纳米体系 (DTNH)。该体系通过 HCR 反应生成超支链大分子产物, 实现了活细胞内 circRNA 的高灵敏检测与生物成像。DTNH 由两种功能化 DNA 四面体探针 (DTNH-1 和 DTNH-2) 组成, 靶标 circRNA 可触发探针内 H1 与 H2 发夹之间的 HCR 反应。为实现荧光信号输出, 我们在 H1 发夹上分别修饰荧光团 FAM 和猝灭团 BHQ1, 当无 circRNA 存在时, DTNH 仅产生微弱荧光信号; 当存在 circRNA 时, circRNA 能触发 H1 和 H2 之间的 HCR 反应, 使 FAM 与 BHQ1 分离, 从而恢复荧光。该方法不仅成功实现了对 circRNA 的检测, 还为活细胞内 circRNA 的原位成像提供了新思路。

1 实验部分

1.1 实验试剂与仪器

Tris-HCl 购自上海生工生物工程技术有限公司, 六水合氯化镁 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司, DNA Maker 及 DNA 上样缓冲液购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 琼脂糖购自北京全式金生物技术股份有限公司, 核酸染料 Gel-Red 购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司。实验室配制 TM 缓冲液 (0.02 mol/L Tris-HCl, 0.05 mol/L MgCl_2 , pH 8.0)。胎牛血清 (FBS) 购自康宁 (Corning, 美国)。超纯水采用 Milli-Q 参考系统 (Millipore, 美国) 净化。

核酸电泳仪购自伯乐生命医学产品 (上海) 有

限公司，T20S 多孔板热循环仪购自杭州朗基科学仪器有限公司，FireReader V10 凝胶成像仪购自广州市科之蓝仪器有限公司。使用 RF-6000 分光光度计（岛津，日本）记录荧光测量数据。使用 Bruker 扫描探针显微镜（布鲁克，美国）观察样品的形貌。利用 FV3000 共聚焦激光扫描显微镜（奥林巴斯，日本）对细胞进行共聚焦成像。

1.2 DNA 序列

实验中 H1 由上海生工生物工程技术服务有限公司提供，其余 DNA 链由乐毅基因纯化合成。具体序列信息见表 1。

1.3 DTNH 的制备

DTNH 合成示意如图 1 所示。体系采用 4 条 DNA 单链（L1-L4）与 2 个发夹结构（H1 和 H2）作为基础元件进行构建，具体制备过程步骤如下：（1）将所有组分均按等摩尔浓度配比均匀分散于 TM 缓冲液中，置于 PCR 仪，在 95 ℃ 下加热 5 min；（2）反应结束后，样品迅速转移至 4 ℃ 冰箱中保存 2 h 以上；（3）将 DNA 四面体分别与发夹探针（H1 和 H2）进行混合，37 ℃ 下孵育 1 h；（4）孵

育结束后，将 DTNH-1 和 DTNH-2 放入 4 ℃ 冰箱储存，以备后续实验使用。

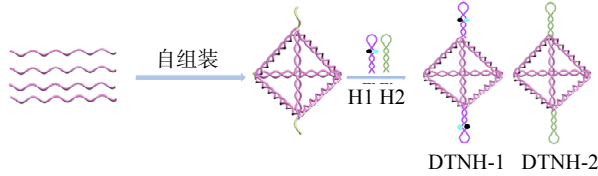


图 1 DTNH 的合成示意图

1.4 材料表征

1.4.1 琼脂糖凝胶电泳

将 10 μL DNA 样品和 2 μL 6×DNA Loading buffer 混合均匀，依次加入到每个孔中，在 1×TBE 缓冲液（Tris-硼酸盐 EDTA，pH 8.3）中以 90 V 的电压运行约 45 min。结束后，使用 Fire Reader V10 对凝胶进行拍摄。

1.4.2 原子力显微镜（AFM）

将 5×10^{-8} mol/L DTNH 与等浓度 circMTO1 混合，37 ℃ 下孵育 90 min。结束后取 10 μL DTNH 上述混合溶液缓慢滴落在新鲜裂解的云母表面，置于室温下自然干燥。待样品完全干燥后，使用 Scan

表 1 DNA 具体序列情况

引物编号	序列信息
L1	5'-TAA GTG AAG TTC TAT TCC ATT TTT ACA TTC CTA AGT CTG AAA CAT TAC AGC TTG CTA CAC GAG AAG AGC CGC CAT AGT A-3'
L2	5'-CAA GCA ATA AAC TAA CTA ATT TTT TAT CAC CAG GCA GTT GAC AGT GTA GCA AGC TGT AAT AGA TGC GAG GGT CCA ATA C-3'
L3	5'-TAA GTG AAG TTC TAT TCC ATT TTT TCA ACT GCC TGG TGA TAA AAC GAC ACT ACG TGG GAA TCT ACT ATG GCG GCT CTT C-3'
L4	5'-CAA GCA ATA AAC TAA CTA ATT TTT TTC AGA CTT AGG AAT GTG CTT CCC ACG TAG TGT CGT TTG TAT TGG ACC CTC GCA T-3'
H1	5'-TGG AAT AGA ACT TCA CTT ATT TTT CAA CAA AAC CCA GTC /iBHQ1dT/AC ATA CGA TGT G/i6FAMdT/AG ACT GGG ATC ATA-3'
H2	5'-TGG AAT AGA ACT TCA CTT ATT TTT TGT AGA CTG GGT TTT GTT CCC AGT CTA CAC ATC GTA C-3'
circMTO1	5'-TGT AGA CTG GGT TTT GTT GGG G-3'
circCDYL	5'-CTG TTA ACG GGA AAG GTT GAA A-3'
circHIPK3	5'-TCG GTA CTA CAG GTA TGG CCT C-3'
M-1	5'-TGT AGA CTG GAT TTT GTT GGG G-3'
M-2	5'-TGT AGA CTG GAT TTC GTT GGG G-3'
sense MTO1	5'-UCU GAC CCA AAA CAA CCC C-3'
antisense MTO1	5'-GGG GUU GUU UUG GGU CAG A-3'

Asyst 模式的 Multimode V8 对其进行观察。

1.4.3 动态光散射 (DLS)

取 1 mL DTNH 溶液及反应产物加入到比色皿中, 通过动态光散射 (DLS) 对 DTNH 及加入靶标 circMTO1 反应产物的平均粒径大小进行分析。

1.5 荧光性能考察

(1) 荧光可行性。将 5×10^{-8} mol/L DTNH 分为两组: 一组与浓度为 2×10^{-7} mol/L 的 circMTO1 混合, 另一组作为空白对照 (不加靶标 circMTO1), 分别于 37°C 孵育 90 min。孵育结束后, 进行荧光测量。其中 FAM 激发波长为 500 nm, 狭缝为 5 nm, 收集 505~640 nm 处的荧光信号。所有实验组均设置 3 个平行样品。

(2) 反应动力学分析。将 5×10^{-8} mol/L DTNH 与等浓度的 circMTO1 混合后, 于不同时间点 (0~150 min) 孵育, 以不含 circMTO1 的 DTNH 作为对照, 使用荧光光谱仪收集 FAM 的荧光信号, 仪器参数同上。所有实验组均设置 3 个平行样品。

(3) 灵敏度分析。将 5×10^{-8} mol/L DTNH 与不同浓度的 circMTO1 进行孵育 (0 、 10^{-10} 、 5×10^{-10} 、 10^{-9} 、 6×10^{-9} 、 10^{-8} 、 2.5×10^{-8} 、 5×10^{-8} 、 10^{-7} 和 2×10^{-7} mol/L), 最后用荧光光谱仪收集 FAM 的荧光信号, 仪器参数同上。所有实验组均设置 3 个平行样品。

(4) 特异性分析。将 5×10^{-8} mol/L 的 DTNH 分别与浓度为 5×10^{-8} mol/L 的不同 circRNAs (circ HIPK3、circCDYL、ciRS-7、两个突变体 circMTO1-M1/M2 和 circMTO1), 在 37°C 下孵育 90 min。用荧光光谱仪收集 FAM 的荧光信号, 仪器参数同上。所有实验组均设置 3 个平行样品。

(5) 干扰性分析。在 5×10^{-8} mol/L DTNH 中, 分别加入不同离子 (K^+ 、 Na^+ 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-}), 同时设置含相同浓度 circMTO1 的实验组 (DTNH+circMTO1) 和仅含 DTNH 的对照组, 在 37°C 下孵育 90 min, 收集 FAM 的荧光信号, 仪器参数同上。所有实验组均设置 3 个平行样品。

1.6 生物稳定性分析

将 3×10^{-7} mol/L 的 DTNH 和游离发夹 H1+H2 分别混合于含 10% FBS 的缓冲溶液体系中, 置于孵育仪, 在 37°C 下孵育不同时间 (0、2、4、6、8 和 10 h)。随后, 采用 4% 琼脂糖凝胶电泳 (电压 90 V, 运行时间 45 min) 对反应产物进行分析, 并

使用凝胶成像系统进行拍照。

1.7 共聚焦成像

将细胞以适宜密度接种至 24 孔板, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h 后, 吸弃旧培养基。随后, 将 DTNH 与新鲜培养基充分混合, 加入各孔, 继续孵育 4 h。弃去含 DTNH 的培养基, 用 PBS 轻轻洗涤细胞 3 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液室温固定 15 min, 再次用 PBS 洗涤 3 次去除残留的多聚甲醛溶液。最后用 FV-3000 共聚焦激光扫描显微镜对细胞进行成像。

2 结果与讨论

2.1 DTNH 的表征分析

通过琼脂糖凝胶电泳法对 DTNH 构建进行验证。如图 2 所示, 随着体系中单链 DNA 的逐步增加, 泳道 1~4 中可以清晰观察到电泳条带的迁移速率逐渐变慢, 条带分子量逐渐增加。结果表明 DNA 四面体已成功构建。将构建好的 DNA 四面体分别与发夹 H1 (泳道 5) 和发夹 H2 (泳道 6) 进行混合, 在泳道 5 和泳道 6 中均观察到产物分子量的增加。以上实验结果说明 DTNH 已成功构建。

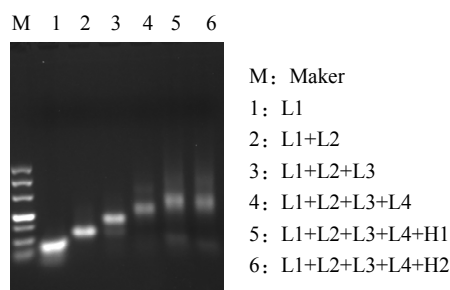


图2 DTNH 的 4% 琼脂糖凝胶电泳图

接着对 DTNH 检测靶标 circMTO1 的可行性进行评估。从图 3 的 4% 琼脂糖凝胶电泳结果可见, 当没有靶标 circMTO1 时, DTNH-1 (泳道 1) 及 DTNH-1+DTNH-2 (泳道 2) 条带迁移稳定; 当加

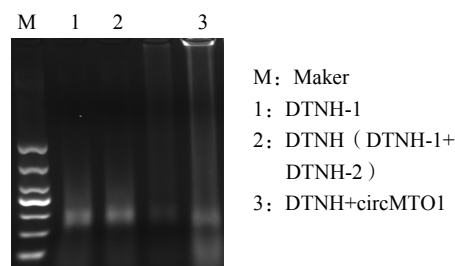


图3 DTNH 与 circMTO1 孵育前后的 4% 琼脂糖凝胶电泳图

入靶标 circMTO1 时, 条带迁移率显著降低。此现象表明靶标 circMTO1 可触发 DTNH-1 与 DTNH-2 间的 HCR 反应, 生成超支链大分子产物, 进而导致电泳迁移速率变慢(泳道 3)。结果表明 DTNH-1 与 DTNH-2 间的 HCR 反应是可行的。

采用原子力显微镜(AFM)对 DTNH 进行形貌表征。如图 4 和图 5 所示, 未加入靶标 circMTO1 时, DTNH 呈现离散点状结构; 加入靶标 circMTO1 后, 体系转变为紧密的网状结构。进一步通过动态光散射(DLS)对反应前后的体系进行分析(图 6 和图 7), 显示反应前 DTNH 粒径分布在 40~80 nm; 加入靶标 circMTO1 后, 生成产物粒径显著增大至 400~1 100 nm, 这与琼脂糖凝胶电泳及原子力显微

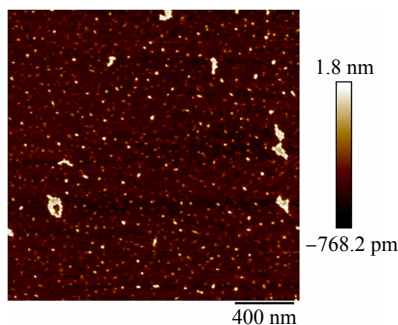


图 4 DTNH 原子力显微镜图

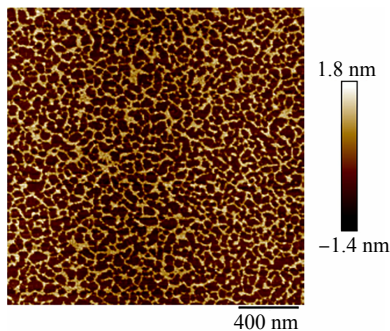


图 5 DTNH 与 circMTO1 反应后的原子力显微镜图

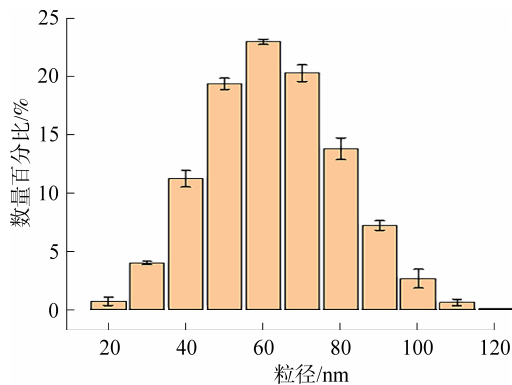


图 6 DTNH 的动态光散射图

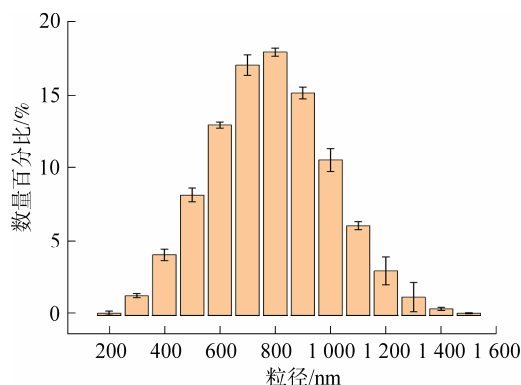


图 7 DTNH+circMTO1 反应后的动态光散射图

镜的表征结果高度吻合。上述实验结果共同表明, DTNH 能够有效识别靶标 circMTO1, 并触发 HCR 生成超支链大分子产物。

2.2 荧光可行性分析

为探究 DTNH 对靶标 circMTO1 的荧光响应性能, 将 5×10^{-8} mol/L 的 DTNH 与等浓度 circMTO1 于 37 °C 避光孵育后, 进行荧光检测。设定 FAM 激发波长为 500 nm, 采集 505~640 nm 区间的荧光信号。由图 8 可见, 当没有靶标 circMTO1 时, DTNH 荧光信号较弱; 但加入靶标 circMTO1 后, 荧光信号显著提升了约 5 倍。该结果表明所构建的 DTNH 可有效实现对 circMTO1 的荧光检测。

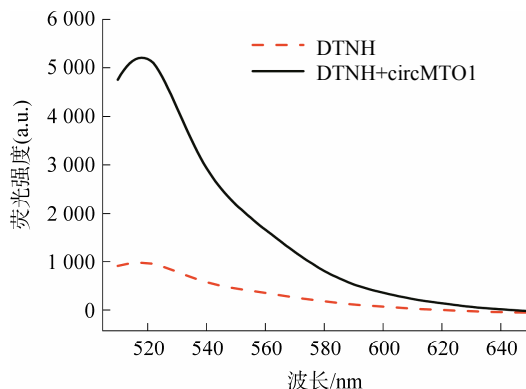


图 8 DTNH 中有无 circMTO1 的荧光光谱

2.3 反应动力学分析

将 DTNH 和靶标 circMTO1 混合、孵育不同时间, 利用荧光光谱仪测量不同时间点(0~150 min)的荧光强度, 以不含 circMTO1 的 DTNH 作为对照组。DTNH 对 circMTO1 的反应动力学结果如图 9 所示, 可知随着时间的延长, DTNH 荧光强度均逐渐增强, 在大约 90 min 时, 荧光强度不再显著变化。因此, 最终选择 90 min 作为体外实验中的最佳

孵育时间。

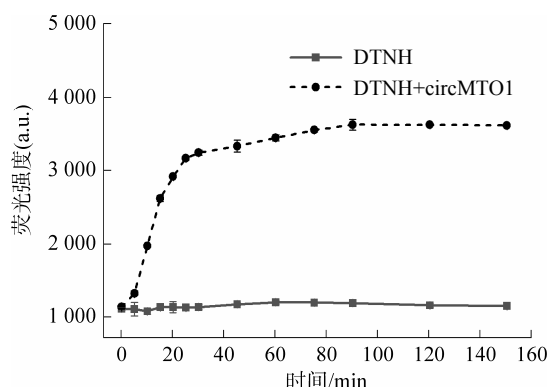


图9 DTNH对circMTO1的反应动力学结果

2.4 灵敏度分析

对DTNH检测靶标circMTO1的灵敏度进行评估。通过荧光实验测定circMTO1浓度在 $0 \sim 2 \times 10^{-7}$ mol/L范围内的荧光光谱(图10),结果显示,随着circMTO1浓度的增加,荧光信号强度逐渐增强,并在 2×10^{-7} mol/L时趋于稳定。在低浓度区间($0 \sim 10^{-8}$ mol/L)内,荧光信号强度与circMTO1浓度呈现良好线性关系(图11)。通过 $3\sigma/k$ 算式计算可得出,DTNH对circMTO1的检测限低至 1.2×10^{-11}

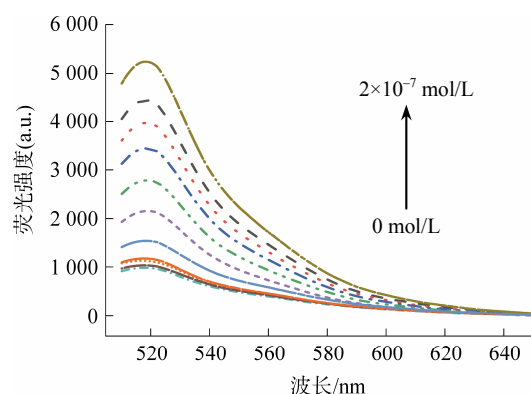


图10 DTNH与不同浓度circMTO1的荧光光谱

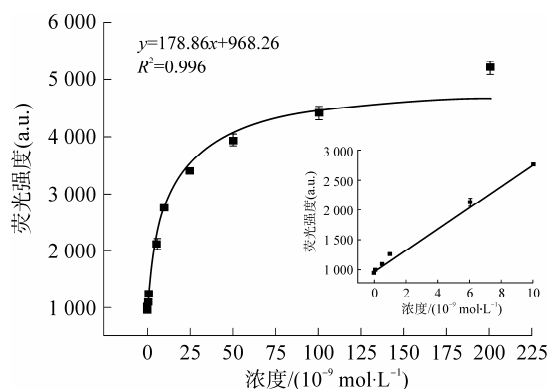


图11 荧光强度与circMTO1浓度的关系

mol/L。上述数据均充分表明,DTNH对circMTO1的检测具有极高灵敏度。

2.5 特异性及干扰性分析

采用荧光光谱法对不同circRNAs(circHIPK3、circCDYL、ciRS-7及2个突变体circMTO1-M1/M2)进行检测,获得相应荧光光谱(图12)及柱状图(图13),来探究DTNH对靶标circMTO1的检测特异性。结果显示,仅当靶标circMTO1存在时,DTNH荧光信号显著增强,其他非靶标circRNA组荧光信号与空白对照组基本一致。值得注意的是,即使面对序列高度相似的突变体分子(circMTO1-M1/M2),DTNH表现出差异化的响应,circMTO1-M1因突变碱基未完全破坏目标识别序列,使得部分荧光信号恢复,而circMTO1-M2因关键识别位点被破坏,荧光信号与空白组无显著差异。上述结果充分表明,DTNH对靶标circMTO1具有识别特异性,能够有效区分同源序列及单双碱基突变体。

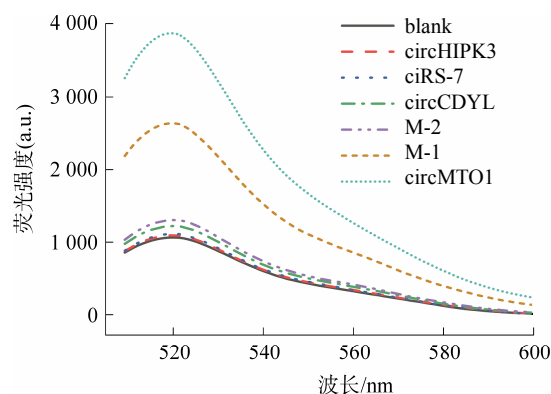


图12 DTNH对不同circRNAs的荧光光谱

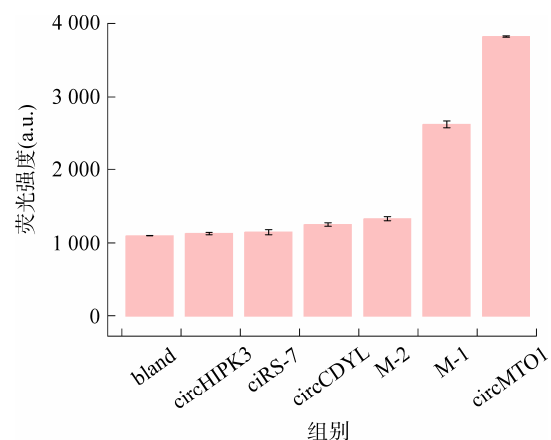


图13 图12对应的荧光强度柱状图

此外,针对生理环境中普遍存在的离子可能对检测体系造成干扰的问题,本文还评估了部分离子

(Fe^{3+} 、 Cl^- 、 Zn^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 SO_4^{2-}) 对 DTNH 的潜在干扰。图 14 和 15 为有无靶标 circMTO1 时, DTNH 在不同离子干扰下的荧光强度。可以看到, 在 circMTO1 存在或不存在条件下, 这些干扰离子均未引起 DTNH 荧光信号的显著变化, 该结果也充分证明 DTNH 具备良好的抗离子干扰能力。

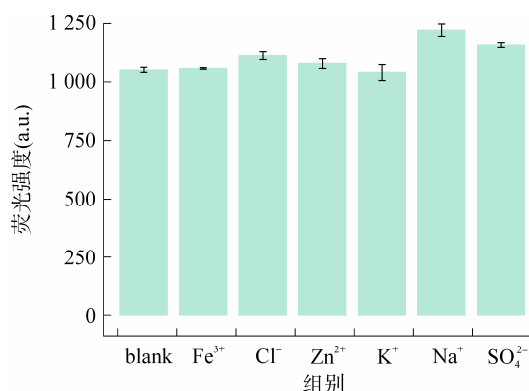


图 14 DTNH 在不同离子干扰下的荧光柱状图

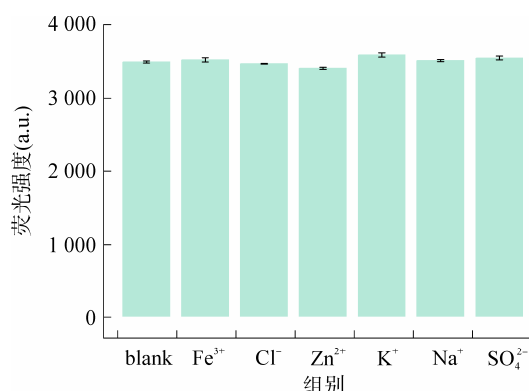


图 15 DTNH+circMTO1 在不同离子干扰下的荧光柱状图

2.6 生物稳定性及细胞存活率分析

DTNH 若要在生理环境中得到应用, 良好的生物稳定性是关键, 因此对 DTNH 以及游离发夹 H1+H2 进行了生物稳定性实验。将 DTNH 和游离发夹 H1+H2 分别与 10%FBS 进行孵育, 通过琼脂糖凝胶电泳法进行分析。如图 16 所示, 从琼脂糖凝胶

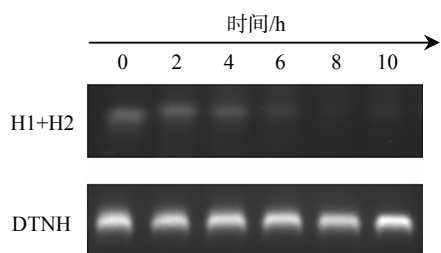


图 16 发夹 H1+H2 与 DTNH 在 10%FBS 中孵育不同时间后的降解情况

电泳结果中可以看到, 随着孵育时间的不断增加, H1+H2 电泳条带逐渐变弱, 最后完全消失。与之形成对比的是, 当孵育 10h 后, DTNH 电泳条带依然保持较高的亮度。此结果表明 DTNH 具有抗核酸酶降解的能力。

为验证 DTNH 在生物环境中的安全性, 采用 CCK-8 法对细胞活力进行分析。将 HeLa 细胞接种于 96 孔板 (每孔 5×10^3 个细胞), 孵育 24 h 后, 加入不同浓度的 DTNH (0 、 2.5×10^{-8} 、 5×10^{-8} 和 10^{-7} mol/L), 每组设置 5 个平行孔。继续分别培养 12 h 和 24 h 后, 每孔中加入 $10 \mu\text{L}$ 的 CCK-8 试剂, 避光孵育 1 h, 使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值, 计算细胞存活率。实验结果如图 17 所示, 在逐渐增加 DTNH 浓度过程中, 细胞存活率始终稳定在 90% 以上。此结果说明, DTNH 具有良好的生物相容性, 可为其在活细胞成像及体内检测中的应用提供安全保障。

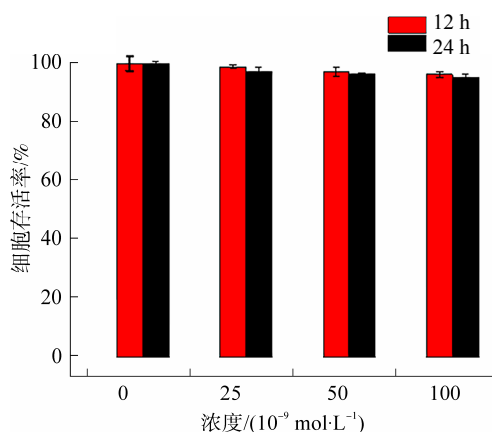


图 17 不同浓度的 DTNH 与细胞孵育后的细胞存活率

2.7 细胞成像的探究

为探究 DTNH 在肿瘤细胞内的成像能力, 将游离发夹 H1+H2 与 DTNH 分别加入 HeLa 细胞中孵育 4 h, PBS 洗去未摄取的探针, 经 4% 多聚甲醛固定 15 min 后, 通过共聚焦显微镜观察细胞摄取效率。如图 18 所示, 与游离 H1+H2 孵育的 HeLa 细胞内荧光信号微弱, 而与 DTNH 孵育的细胞呈现强烈荧光信号。该结果表明 DTNH 凭借其独特的纳米结构显著提升了细胞摄取效率, 能够进入活细胞内, 实现对 circMTO1 的原位荧光成像。

将合成的干扰 RNA (siRNA) 转染至 HeLa 细胞, 通过 DTNH 对 circMTO1 表达水平进行动态分

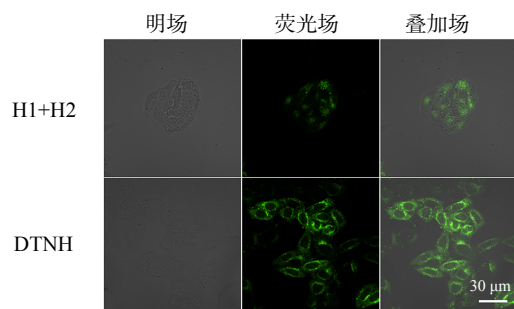


图 18 HeLa 分别与 DTNH 和 H1+H2 孵育后的共聚焦图析。实验设置为 2 组: siRNA 转染组 (抑制组) 和未处理的 HeLa 细胞组 (对照组)。如图 19 所示, 与 DTNH 孵育后, 抑制组细胞内荧光信号显著低于对照组。结果表明, DTNH 能够高灵敏地检测活细胞内低丰度靶标 circMTO1 的表达水平, 为实时监测内源性 circRNA 动态变化提供了有效工具。

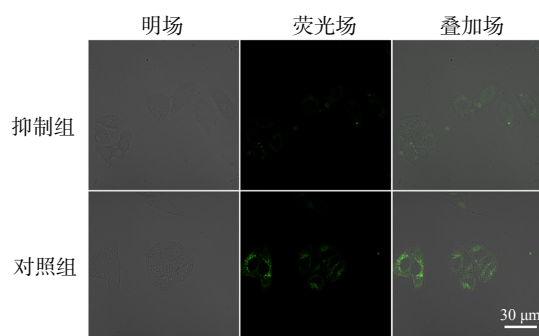


图 19 经不同预处理的细胞与 DTNH 孵育后的共聚焦图

为进一步评估 DTNH 对不同肿瘤细胞的成像能力, 选取宫颈癌 HeLa 细胞、肺癌 A549 细胞及正常 LO2 肝细胞 3 种细胞系进行细胞成像实验。共聚焦成像结果如图 20 所示, 看到 HeLa 细胞呈

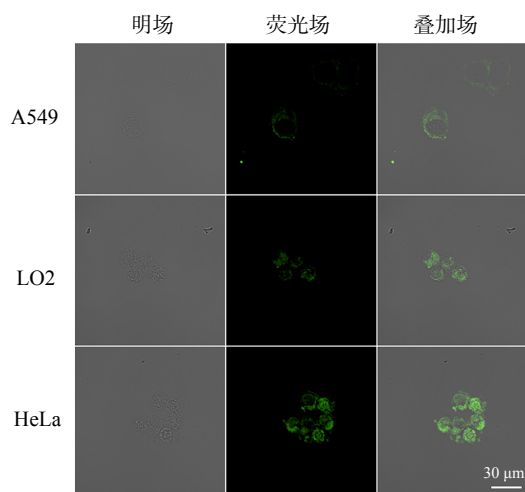


图 20 不同细胞的共聚焦图

现较强荧光信号, LO2 细胞荧光信号较弱, 而 A549 细胞荧光信号最弱。此差异表明 circMTO1 在 HeLa 细胞中表达水平最高, LO2 细胞次之, A549 细胞最低。上述结果充分证实, DTNH 能基于 circMTO1 表达差异, 有效区分肿瘤细胞与正常细胞, 为肿瘤早期诊断提供了新方法。

3 结论

本研究成功构建了一种基于 DNA 四面体的 HCR 信号放大纳米体系 (DTNH), 通过 HCR 反应生成超支链大分子产物, 实现了活细胞中 circRNA 高效检测及生物成像。体外实验数据显示, DTNH 对 circMTO1 的检测表现出优异的灵敏度和识别特异性, 检测限低至 1.2×10^{-11} mol/L。在 10% FBS 模拟生理环境下, 体系仍保持稳定, 细胞活力实验结果表明了 DTNH 具有良好的抗核酸酶稳定性和生物相容性。相较于传统的游离发夹 H1+H2, DTNH 展现出更强的细胞摄取能力, 可成功实现活细胞内 circMTO1 的生物成像。该体系不仅能够灵敏监测活细胞内低丰度 circMTO1 的动态表达变化, 还具备区分正常细胞与不同肿瘤细胞的能力, 有利于揭示 circRNA 的空间表达信息, 为相关疾病的检测和诊断提供新思路。

参考文献:

- [1] LIU C X, CHEN L L. Circular RNAs: characterization, cellular roles, and applications[J]. Cell, 2022, 185(12): 2016-2034.
- [2] PATOP I L, WÜST S, KADENER S. Past, present, and future of circRNAs[J]. The EMBO journal, 2019, 38(16): e100836.
- [3] WANG S, SUN Z, LEI Z, et al. RNA-binding proteins and cancer metastasis[J]. Seminars in cancer biology, 2022, 86:748-768.
- [4] WANG B, WEI S, LI Y, et al. Reveal the potential molecular mechanism of circRNA regulating immune-related mRNA through sponge miRNA in the occurrence and immune regulation of papillary thyroid cancer[J]. Annals of medicine, 2023, 55(2):2244515.
- [5] ZHANG N, WANG X, LI Y, et al. Mechanisms and therapeutic implications of gene expression regulation by circRNA-protein interactions in cancer[J]. Communica-

- tions biology, 2025, 8(1):77.
- [6] ZOU L X, ZHAO J, LI H J, et al. CircASbase: a comprehensive database of alternative splicing events in circRNAs[J]. Genomics, proteomics & bioinformatics, 2025, DOI:10.1093/gpbjnl/qzaf121.
- [7] ZHANG Q, WANG W, ZHOU Q, et al. Roles of circRNAs in the tumour microenvironment[J]. Molecular cancer, 2020, 19(1):14.
- [8] YUAN Q, SUN Y, YANG F, et al. CircRNA DICAR as a novel endogenous regulator for diabetic cardiomyopathy and diabetic pyroptosis of cardiomyocytes[J]. Signal transduction and targeted therapy, 2023, 8(1):99.
- [9] MA Y, LIU Y, JIANG Z. CircRNAs: a new perspective of biomarkers in the nervous system[J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2020, 128:110251.
- [10] LEI M, ZHENG G, NING Q, et al. Translation and functional roles of circular RNAs in human cancer[J]. Molecular cancer, 2020, 19(1):30.
- [11] TURAI P I, NYIRŐ G, BORKA K, et al. Exploratory circular RNA profiling in adrenocortical tumors[J]. cancers, 2022, 14(17):4313.
- [12] TANG K L, JI X J, ZHOU M D, et al. Rank-in: enabling integrative analysis across microarray and RNA-seq for cancer[J]. Nucleic acids research, 2021, 49(17):e99.
- [13] LEGER A, AMARAL P P, PANDOLFINI L, et al. RNA modifications detection by comparative nanopore direct RNA sequencing[J]. Nature communications, 2021, 12(1):7198.
- [14] WANG X, SHAN G. Nonradioactive northern blot of circRNAs[M]. New York: Humana Press, 2018:135-141.
- [15] KOCKS C, BOLTENGAGEN A, PIWECKA M, et al. Single-molecule fluorescence in situ hybridization (FISH) of circular RNA CDR1as[M]. New York: Humana Press, 2018:77-96.
- [16] 舒杨, 杨曼, 李志豪, 等. 基于金纳米粒子聚集于杂交链式扩增的 microRNA 传感[J]. 应用化学, 2024, 41(1):109-117.
- [17] ZHOU T, LUO R, LI Y, et al. Activity assay and intracellular imaging of APE1 assisted with tetrahedral DNA nanostructure modified-dnzyme and molecular beacon[J]. Sensors and actuators B: chemical, 2020, 317:128203.
- [18] GAO P, LOU R, LIU X, et al. Rational design of a dual-layered metal-organic framework nanostructure for enhancing the cell imaging of molecular beacons[J]. Analytical chemistry, 2021, 93(13):5437-5441.
- [19] YAN M, ZHANG Y, XU K, et al. An in vitro study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots[J]. Toxicology, 2011, 282(3):94-103.
- [20] SEEMAN N C, SLEIMAN H F. DNA nanotechnology[J]. Nature reviews materials, 2017, 3(1):17068.
- [21] OUYANG Y, ZHANG P, WILLNER I. DNA tetrahedra as functional nanostructures: from basic principles to applications[J]. Angewandte chemie international edition, 2024, 63(41):e202411118.
- [22] YANG Z, SHI L, WANG Y, et al. Unveiling the potential of tetrahedral DNA frameworks in clinical medicine: mechanisms, advances, and future perspectives[J]. Small, 2025, 21(5):2410162.
- [23] ZHANG B, TIAN T, XIAO D, et al. Facilitating in situ tumor imaging with a tetrahedral DNA framework-enhanced hybridization chain reaction probe[J]. Advanced functional materials, 2022, 32(16):2109728.
- [24] 余利星, 翟睿, 龚晓云, 等. DNA 四面体纳米材料及其功能化研究进展[J]. 分析化学, 2019, 47(11):1742-1750.
- [25] LU S, WANG Q, DAI Z Q, et al. Detection and in situ imaging of APE1 through self-initiated hyperbranched hybridization chain reaction of multifunctional DNA tetrahedral nanoprobe[J]. Sensors and actuators B: chemical, 2025, 443:138171.

(责任编辑 章践立)