

四面体框架核酸在液体活检中的研究进展和前景*

何 喆^{1,2}, 陈志国³, 赵著洋⁴, 徐敦全¹, 王 玲¹, 阳 莎^{1△}

1. 陆军军医大学第二附属医院日喀则分院检验病理科, 西藏日喀则 857000; 2. 重庆医科大学
检验医学院/临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016; 3. 联勤保障部队大连康复疗养
中心, 辽宁大连 116011; 4. 联勤保障部队第 945 医院检验病理输血科, 四川雅安 625000

摘 要:液体活检作为一种新兴的肿瘤早期检测手段, 因其微创性、可重复性和准确性而被广泛研究。然而, 仍有诸多问题限制了液体活检在肿瘤诊断中的应用。四面体框架核酸(tFNAs)因其结构稳定性、可编程性、优异的细胞内吞和组织穿透能力被广泛应用于生物医学领域, 也使其成为构建液体活检生物传感平台的理想选择。tFNAs 有效优化了循环肿瘤细胞(CTCs)、循环肿瘤 DNA(ctDNA)和细胞外囊泡(EVs)的结合效率, 提高液体活检生物传感平台的灵敏度和检测限。该文将基于 tFNAs 的液体活检生物传感器进行深入概括, 阐述 tFNAs 的合成和性质, 分析其在生物传感应用中的多样化策略、优势, 以及在 CTCs、ctDNA 和 EVs 领域的应用, 并探讨 tFNAs 在液体活检领域中所面临的挑战及应用前景。

关键词:四面体核酸框架; 液体活检; DNA 四面体; 生物传感器

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.17.003 **中图法分类号:**R-1

文章编号:1673-4130(2025)17-2062-07 **文献标志码:**A

**Research progress and prospects of tetrahedral framework
nucleic acids in liquid biopsy***

HE Zhe^{1,2}, CHEN Zhiguo³, ZHAO Zhuyang⁴, XU Dunquan¹, WANG Ling¹, YANG Sha^{1△}

1. Shigatse Branch, Xinqiao Hospital, Army Military Medical University, Shigatse, Xizang
857000, China; 2. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics, Chinese
Ministry of Education/College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical
University, Chongqing 400000, China; 3. Dalian Rehabilitation and Nursing
Center of the Joint Logistics Support Force, Dalian, Liaoning Province
116011, China; 4. the 945th Hospital of the Joint Logistics Support
Force, Ya'an, Sichuan 625000, China

Abstract: Liquid biopsy, as an emerging minimally invasive early detection method for tumors, has shown great potential; however, several challenges limit its application in tumor diagnosis. Tetrahedral framework nucleic acids (tFNAs) have garnered significant attention in the biomedical field due to their structural stability, programmability, and superior intracellular endocytosis and tissue penetration capabilities. These properties make tFNAs an ideal candidate for constructing advanced biosensing platforms for liquid biopsy applications. tFNAs significantly enhance the binding efficiency of circulating tumor cells (CTCs), circulating tumor DNA (ctDNA), and extracellular vesicles (EVs), thereby improving the sensitivity and detection capability of the liquid biopsy biosensing platform. This review provides a comprehensive overview of tFNAs-based biosensors in the liquid biopsy field. It elaborates on the synthesis, characteristics, and applications of tFNAs in detecting CTCs, ctDNA, and EVs. Additionally, it discusses the diverse strategies and advantages of tFNAs in biosensing applications, highlighting how these features significantly enhance the performance and reliability of biosensors. Finally, this review addresses the current challenges faced by tFNAs in liquid biopsy and explores

* **基金项目:**国家自然科学基金项目(82502822); 国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目(U23A20477); 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2025NSCQ-GPX0600)。

专家简介:阳莎, 医学博士, 现任陆军军医大学第二附属医院日喀则分院检验病理科主治医师。师从陆军军医大学第一附属医院检验科陈鸣主任, 2024 年 6 月于陆军军医大学获得临床检验诊断学博士学位。近 5 年, 以第一/通信作者(含共同)发表 SCI 论文 14 篇, IF>10 论著 6 篇, 累计影响因子 128 分, 单篇最高 18.0 分; 已授权国家发明专利 8 项(第一发明人 7 项)、实用新型专利 2 项(第一发明人 1 项); 获评全军优秀硕士学位论文、陆军军医大学优秀硕士/博士毕业生、第十四届重庆市青少年科技创新市长提名奖。△ **通信作者,** E-mail: ys123abc@qq.com。

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1176.R.20250902.1120.002.html\(2025-09-03\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1176.R.20250902.1120.002.html(2025-09-03))

their future prospects, aiming to facilitate early screening, precise diagnosis, and integrated diagnostic-treatment approaches for tumors.

Key words: tetrahedral DNA frameworks; liquid biopsy; DNA tetrahedron; biosensor



阳 莎

在中国,癌症仍然是一个重大的公共卫生问题,其严重影响居民健康和社会经济发展,并且随着老龄化人口的增多,新发病例持续增加。面对如此严重的健康问题和社会负担,癌症的早期诊断对于提高生存率和减少经济负担至关重要^[1]。迄今为止,癌症的诊断手段仍受限于生物标志物检测、影像学检查和组织活检。传统的肿瘤生物标志物,例如甲胎蛋白(AFP)和癌胚抗原(CEA)等,常作为肿瘤诊断的辅助手段,但并非所有癌症患者 AFP 或 CEA 水平都升高,因此容易造成误诊和漏诊。计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)等影像学检查能精确判断肿瘤大小,确定其边缘界限,但其检查费用较高,并且不能反映肿瘤的类型。目前,组织活检仍然是癌症诊断的“金标准”,但是其作为一种侵入性检查,容易对患者造成损伤,不便于连续监测肿瘤进展,并且检查结果受限于取材部位和专业人员操作。综上可见,现有手段在早期诊断灵敏度、无创动态监测可行性、克服肿瘤异质性、实时反映全身肿瘤负荷及分子演变等方面存在局限,急需探索更好的肿瘤诊断方法用于肿瘤的早发现、早诊断和早治疗。

液体活检作为一种新兴的微创检测手段,主要通过收集血液、尿液和唾液等生物液体,检测其中的循环肿瘤细胞(CTCs)、循环肿瘤 DNA(ctDNA)、细胞外囊泡(EVs)和微小 RNA(miRNA)等肿瘤衍生物^[2],从而实现肿瘤的诊断。与目前临床上常用的肿瘤检测技术相比,它的优点是能检测到早期微小肿瘤,可区分肿瘤分子亚型,且几乎无创。然而,该技术仍存在诸多难题需要解决。例如:(1)CTCs 来源于肿瘤,能反映原发肿瘤的生物信息,但是其在血液中数量稀少,每 10^9 个细胞中才存在 1 个,提取较为困难。(2)ctDNA 在癌症中早期水平极低,远低于来自正常细胞的细胞游离 DNA(cfDNA),并且其在血液中半衰期只有 30 min,这限制了 ctDNA 在早期肿瘤筛查中的应用。(3)EVs 的大小仅为纳米级,目前分离 EVs 的“金标准”为超速离心法,其操作步骤复杂,分离时间长,成本高昂。这些问题都局限了液体活检在肿瘤诊断中的应用,解决这些问题将极大推动液体活检在检验医学领域的应用。

四面体框架核酸(tFNAs),又叫 DNA 四面体,作为 DNA 纳米技术中的代表性三维纳米结构,最初是由 GOODMAN 等^[3]在 2005 年提出,该团队采用“一锅退火”方法通过 4 个单链 DNA 精确的互补碱基配

对自组装设计出 tFNAs。tFNAs 作为最简单的 DNA 多面体,因简单设计、易合成、高产量的特点使其成为 DNA 纳米技术研究领域的焦点。tFNAs 表现出优越的内在特性,如(1)结构稳定性:tFNAs 的四面体构型具有优秀的机械稳定性,可以有效抵抗变形,并且它在复杂环境中表现出显著增强的抗酶分解耐久性;(2)可编程性:研究者可以对 tFNAs 的结构进行专门设计以实现目标功能,同一个 tFNAs 可以包含多个功能区,通过修饰适配体、抗体、药物和荧光基团等,从而执行各种生物学角色,包括靶向、成像和治疗干预等^[4];(3)细胞内吞和组织穿透能力:tFNAs 可以在没有转染试剂的情况下有效进入体外哺乳动物细胞,其穿透能力与尺寸相关^[5]。这些特性拓宽了 tFNAs 在生物医学领域的应用,使其被广泛应用于生物传感、药物递送、组织再生、抗菌策略和疾病诊疗领域。

tFNAs 可被广泛应用于液体活检领域,为解决液体活检所存在的问题提供了新的方向。本文将对基于 tFNAs 的液体活检生物传感器进行概括,阐述 tFNAs 的合成和性质,讨论它在生物传感应用中的多样化策略、优势,以及在液体活检 CTCs、ctDNA、EVs 中的应用,并探讨 tFNAs 在应用于液体活检领域时所面临的挑战及应用前景,以期为实现肿瘤的早期筛查、精准诊断和诊疗一体化提供理论依据。

1 tFNAs 合成方法及表征

构建 tFNAs 需要精确的 DNA 序列设计、温度控制和短 DNA 序列的组装,最终这些短 DNA 序列被结合成靶向的 3D 结构。目前,有 3 种技术可合成 tFNAs:一锅退火法、三向连接杂交技术和支架折叠策略^[4]。由于目前与后两种方法相关的经济和产量限制了其应用,本研究主要讨论一锅退火法合成 tFNAs。一锅退火法,通常被称为单链退火,是目前合成 tFNAs 最普遍和有效的方法,合成效率约为 90%。其合成效率优于其他更大和更复杂的结构,如 DNA 十二面体(76%)和 DNA 球(69%)^[6]。易合成和高产量使 tFNAs 成为 DNA 纳米技术研究领域的焦点。图 1 展示了自组装 tFNAs 的过程,从 4 条 DNA 单链开始,每条链被分割成 3 个部分,它们与相邻链上各自的互补片段特异性杂交,形成四面体结构的顶点和边缘,从而稳定其 3D 形式。此外,三通接头杂交利用 4 个枢轴三通接头来加工四面体构型。如图 2 所示,目前有多种方法来纯化和表征制备 tFNAs,例如凝胶电泳、原子力显微镜及其他成像技术等。在 tFNAs 的合成过程中,tFNAs 的表征工作对于微调配和纯化过程至关重要,根据表征的结果,研究者可调整 DNA 链的浓度、长度或退火过程中的温度来优化 tF-

NAs 的合成工作。精心设计的 DNA 序列具有精确的互补性,从而保证 tFNAs 的成功组装,这对稳定四

面体结构的合成至关重要。

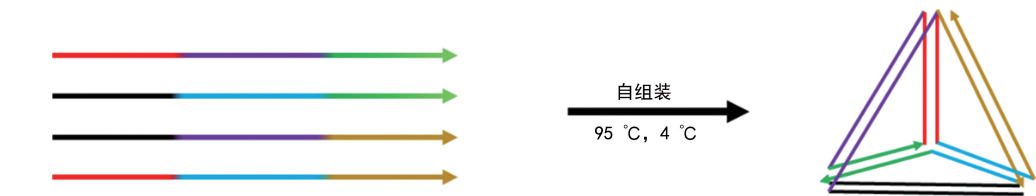
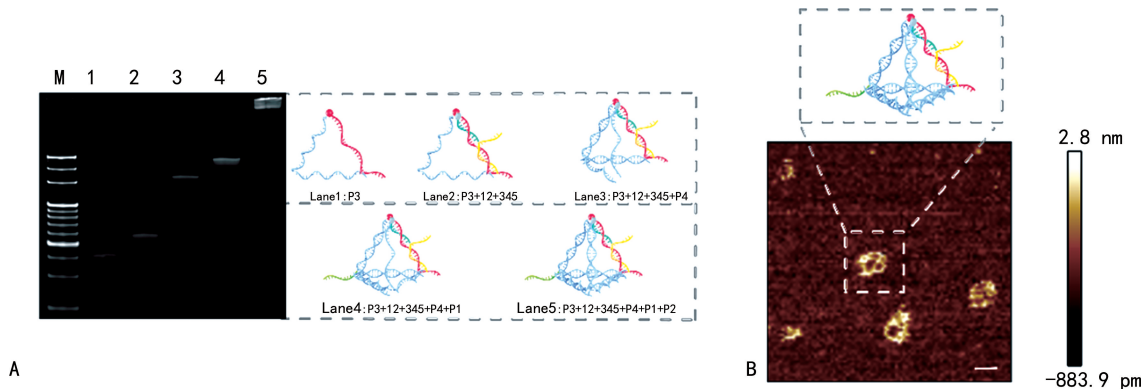


图 1 自组装 tFNAs 示意图



注:图 A 为 tFNAs 的凝胶电泳图,M 为 DNA 参考要带,图 B 为 tFNAs 的原子力显微镜图像。

图 2 tFNAs 合成表征

2 tFNAs 在液体活检方面的应用

2.1 CTCs CTCs 是从原发肿瘤或转移部位主动或被动释放到外周血液循环系统中的肿瘤细胞。CTCs 被认为与转移性肿瘤的形成有关,且血液中高 CTCs 水平与预后不良和转移性疾病的风险增加有关。CTCs 作为原发肿瘤释放的完整生物实体,可提供原发肿瘤蛋白质、DNA 和 RNA 等动态信息,但是 CTCs 的稀有性、癌症的异质性及转移过程中细胞生物学特性的动态变化使 CTCs 的检测和鉴定变得复杂,因此需要高灵敏度的先进技术来有效捕获和检测 CTCs,为临床医学提供基于 CTCs 研究的分子图谱,进而辅助医生制订治疗策略,以及监测肿瘤转移和复发^[2]。

目前 CTCs 的分离方法主要有两种,一种是基于 CTCs 的物理性质(大小、电荷、变形能力等)的分离方法,例如密度梯度离心和微流控芯片等,但是这种分离方法得到的 CTCs 纯度较低;另一种是基于其表面生物标志物[上皮细胞黏附分子(EpCAM)、黏蛋白(MUC1)波形蛋白和 N-钙黏蛋白]的分离方法,例如 CellSearch 和免疫磁性分离等,但在复杂的流体环境中,立体阻碍、链间缠结、适配体与生物标志物之间的尺寸不匹配及生物标志物在生物膜上的高阶空间组织均可能限制适配体与靶标的结合亲和力,从而导致 CTCs 的捕获效率较低。

tFNAs 作为一种精确设计的结构核酸,研究者可对 tFNAs 大小、形态和机械性能进行可编程控制,其在生物分子大小调节和复杂生物样品的空间组织方面展现出卓越的多功能性。例如,CHEN 等^[7]利用

tFNAs 偶联到磁珠,对探针上配体的空间排列和化学计量进行编程,克服了 CTCs 捕获中的局限性,增强了磁珠的流体稳定性,实现了全血中 CTCs 的分离,然后通过洗脱,对 CTCs 进行体外荧光成像和计数,实现了肝癌的进展监测和患者分类。此外,因为核酸框架具有良好结构刚性、稳定性和优异空间定位能力,tFNAs 被认为是高效生物功能化界面的有效生物材料,可实现均匀和定向分布,从而有效降低空间阻力的影响。tFNAs 通过化学结合修饰到磁珠、玻璃、捕获电极和聚二甲基硅氧烷(常作为微流控芯片合成材料)表面,可提高捕获效率和纯度。例如,有学者将 tFNAs 修饰到微流控芯片表面,将 tFNAs、人字形通道芯片与适配体触发杂交链反应(HCR)相结合,开发出了一种高效的微流控系统,用于捕获和释放 CTCs,并开发了一个集成的自动技术平台,该平台在 CTCs 的多价捕获和释放方面具有很好的性能^[8]。并且由于 tFNAs 极好的生物相容性,该方法并不会对细胞活性造成影响。同时,因为 tFNAs 的 DNA 结构,实验人员还可通过 DNA 酶或者链置换反应实现 CTCs 的无损捕获和释放,而释放的 CTCs 能通过细胞培养和单细胞分析技术,进一步提供海量的肿瘤生物学信息。另一方面,tFNAs 为 DNA 合成的纳米结构,可与滚环扩增(RCA)、HCR 等核酸扩增技术结合,作为传感元件触发核酸扩增反应,提高检测的灵敏度,实现单细胞检测。PENG 等^[9]通过将 HCR 和 tFNAs 结合,对 CTCs 进行信号放大,检测限达到 3 个细胞,基本满足临床需求。同时,tFNAs 还能通过与一些光

电材料联用,提高电化学和荧光传感器的灵敏度^[10]。CHEN 等^[11]建立了一个基于 tFNAs 的“感知和治疗”定位药物输送系统,该系统通过细胞内化,协同化疗和光动力疗法特异性破坏 CTCs。虽然该实验没有进行体内实验,但是作为概念证明了 tFNAs 具有通过协同破坏 CTCs 来抑制肿瘤转移的潜力。表 1 对近几年基于 tFNAs 的检测 CTCs 的生物传感器进行了总结。

表 1 用于 CTCs 检测的代表性 tFNAs 生物传感器			
靶标	检测方法	线性范围 (个细胞/毫升)	检测限 (个细胞/毫升)
EpCAM ^[12]	荧光	5~200	4
核仁素 ^[13]	荧光	10 ² ~10 ⁶	7
EpCAM ^[14]	电化学	0~1 000	4
EpCAM ^[15]	电化学	1~10 ⁵	1
EpCAM ^[16]	电化学	10 ² ~5×10 ⁴	23
EpCAM ^[9]	电化学	10~10 ⁴	3
MUC1 ^[17]	电化学	1~10 ⁶	7
MUC1 ^[10]	光电化学	50~5×10 ⁵	43

2.2 ctDNA cfDNA 是指存在于细胞外、可在体液中被检测到的 DNA 片段。在血浆中,cfDNA 通常由长度为 140~170 碱基对(bp)的双链 DNA 片段组成,这些片段大多来自正常白细胞和基质细胞。ctDNA 是指来自癌细胞的 cfDNA,其长度通常小于来源于正常细胞的 cfDNA,由长度小于 145 bp 的双链 DNA 片段组成。有研究证实,癌症患者血浆中 cfDNA 水平通常较高,并且血浆中检测到的 ctDNA 基因组改变与肿瘤组织中发现的基因组改变高度一致^[18]。与 CTCs 类似,研究者不仅可以从血液中获得 ctDNA,也可以从腹水、胸膜液、尿液和脑脊液中分离 ctDNA。但相比其他的液体活检标志物,ctDNA 的半衰期更短,ctDNA 可以在给定的时间点对肿瘤的状态作出动态评估。随着技术的进步,ctDNA 的检测变得越来越简单,如实时定量聚合酶链反应(PCR)、微滴式数字 PCR(ddPCR)、Sanger 测序和二代测序(NGS)。可以预见,在未来,ctDNA 检测将被广泛用于新疗法,以监测肿瘤负荷的动态变化、癌症进展及预后。但是目前该类方法成本高、劳动强度大、仪器昂贵,不适宜进行肿瘤筛查。例如 ddPCR 对于鉴定潜在的罕见突变和计算拷贝数变异非常有用,但是它操作步骤烦琐,且只能用于评估特征序列的存在。

基于 tFNAs 的 ctDNA 电化学传感器主要采用三明治结构,学者将 tFNAs 固定在金电极表面,利用互补序列捕获游离的 ctDNA,随后结合核酸扩增和核酸切割技术,实现信号放大。如 HAO 等^[19]首次在金电极表面修饰 tFNAs 并用于 DNA 检测,极大提高了电化学传感器的灵敏度。而在电化学传感器中引入

tFNAs,可通过控制探针密度和取向有效改善 ctDNA 与适配体识别情况,减少电极表面的非特异性吸附,同时控制电化学活性物质与电极间的距离,保持有效电信号传输。如 WANG 等^[20]将 tFNAs 探针修饰在电极表面,使得特异性单链扩增子能够高效杂交,并利用酶促扩增将界面杂交事件定量转化为电化学信号,该团队提出一种基于顺序辨别-扩增策略的循环甲基化 DNA 的单拷贝敏感电化学分析,该方法特异度很高,能实现在 200 μL 血浆中检测肺癌相关的甲基化基因。此外,研究者还能利用 tFNAs 的高负载能力,构建信号放大探针,例如 LI 等^[21]构建的多柔比星[®] DNA 四面体-金纳米粒子不仅能增强金纳米粒子的分散性和溶解性,还能作为一种电化学指示剂,该团队开发的电化学传感器检测限低至 0.29 fmol/L。

tFNAs 除了能与电化学检测联用,还能与碳纳米晶体管(CNT)结合用于 ctDNA 检测。CNT 能够将生物分子结合事件直接转化为可测量的电信号,实现核酸的无标记、实时和快速检测。tFNAs 能够增强 DNA 杂交效率,有效改善 CNT 生物传感器在灵敏度和检测限方面的性能,MA 等^[22]开发了一种整合有 DNA 四面体纳米结构的 CNT 晶体管生物传感器,实现了与三乳腺癌相关的 AKT2 基因的直接无标记 DNA 检测。tFNAs 的采用使得生物传感器灵敏度提高了至少 35%,可达到 2 fmol/L 的理论检测限。REN 等^[23]进一步完成基于 tFNAs 的 CNT 生物传感器的小型化和集成化,实现了 ctDNA 的超灵敏和即时检测。表 2 对近几年基于 tFNAs 的 ctDNA 检测生物传感器进行了总结。

表 2 基于 tFNAs 的 ctDNA 检测生物传感器			
靶标	检测方法	线性范围	检测限
KRAS 基因 ^[24]	电化学	1 fmol/L~1 nmol/L	1 amol/L
KRAS 基因 ^[25]	电化学	1 fmol/L~100 pmol/L	0.66 fmol/L
KRAS 基因 ^[26]	电化学	10 fmol/L~1 nmol/L	0.5 fmol/L
KRAS 基因 ^[21]	电化学	1 fmol/L~10 nmol/L	0.29 fmol/L
AKT2 基因 ^[22]	CNT	1 pmol/L~1 μmol/L	2 fmol/L
AKT2 基因 ^[23]	CNT	10 ⁻¹⁴ ~10 ⁻¹⁰ mol/L	0.2 amol/L

2.3 EVs EVs 是所有活细胞主动分泌到细胞外环境的一种脂质双层膜囊泡。不同细胞来源的 EVs 成分各不相同,根据囊泡大小和内容物,EVs 可分为小 EVs(sEVs)或外泌体、大 EVs 和凋亡体。EVs 携带着蛋白质、核酸、脂类和代谢产物等生物活性分子,可对免疫系统、肿瘤代谢和耐药性产生重大影响,从而影响肿瘤的发展^[2]。本研究主要阐述用于 sEVs 检测的 tFNAs 生物传感器的发展。

尽管 sEVs 对于临床诊断具有潜在的价值,但其小尺寸和复杂的生物环境阻碍了研究者对它的快速分离。目前分离 sEVs 的“金标准”是超速离心法,但

庞大且昂贵的仪器、耗时的过程及对样品量的要求限制了其应用。tFNAs 的四面体构型有助于修饰多个适配体,从而偶联多个 sEVs,聚集 sEVs 便于研究者对其进行分离。LU 等^[27]通过 tFNAs 的四面体纳米结构偶联多个适配体序列,从而交联多个 sEVs。

得益于交联 sEVs 形成的大聚集体和 tFNAs 的高浮力密度,实验人员可以以低离心速度($20\,000\times g$),在短时间内(30 min)富集 sEVs。该方法使用 tFNAs 作为 DNA 砧码,实现了 sEVs 的快速离心,不像超速离心法对仪器有很高的要求($100\,000\times g$),并且可节约近 3 h 的时间。tFNAs 除了可用于 sEVs 的分离,还能用于 sEVs 的分析。目前 tFNAs 主要和电化学、荧光和表面增强拉曼光谱(SERS)结合用于 sEVs 表面蛋白和 sEVs miRNA 的分析。和其他的液体活检标志物一样,用于检测 sEVs 的基于 tFNAs 的电化学传感器一般采用三明治结构,研究者先将修饰了适配体的 tFNAs 固定在金电极表面,通过适配体识别 sEVs 表面蛋白,捕获 sEVs,随后再结合具有信号放大作用的材料,实现 sEVs 电化学高灵敏度检测。例如 CHENG 等^[28]利用双靶标识别策略,识别 sEVs 表面的 CD63 和 MUC1,金电极上 CD63 适配体修饰的 tFNAs 被用作识别元件,用于特异性捕获 sEVs。捕获 sEVs 后,MUC1 适配体和亚甲基蓝修饰的金纳米粒子可识别 MUC1,并结合 sEVs,实现信号放大,该方法可用于区分健康者和乳腺癌患者。基于 tFNAs 的荧光传感器一般采用荧光共振能量转移策略,通过控制荧光基团和荧光淬灭剂之间的距离,实现信号开关,减少信号泄露。同时由于 tFNAs 的强穿透性,其可以携带荧光基团无损进入 sEVs 内,对 sEVs 内的靶标进行监测。CHEN 等^[29]开发了一种发夹 tFNAs 纳米探针,利用 tFNAs 和单核苷酸识别的非破坏性穿透 sEVs 的特点和发夹探针免洗荧光读数的优点,在没有 RNA 提取或泄漏的情况下实现了 sEVs miR-

NA 的高保真荧光可视化,该方法可用于区分非小细胞肺癌患者和健康者,证明了 tFNAs 实时追踪 sEVs 的潜力。而为了实现单个 sEVs 的分析,LIU 等^[30]开发了一种基于 tFNAs 的单分子荧光成像,通过使用全内反射显微镜,无需扩增,可对单个 sEVs 中的单拷贝 miRNA 进行原位成像分析。该研究结果显示,tFNAs 的内化效率高达 70%,且不会破坏 sEVs 的天然结构,此外,LIU 等^[30]发现,耐药相关 miRNAs 在 sEVs 中的分布模式在耐药发生前后会发生变化,这对于探索肿瘤耐药相关机制研究和指导临床肿瘤用药有重大意义。

SERS 因为激光聚焦、贵金属表面的拉曼信号放大效应,具有特征指纹峰、高灵敏度和低检测限等优点,常被用于检测 sEVs。但是,固定在 SERS 基底上的单链 DNA 适配体的方向和密度是无序的,这会造成 DNA 缠结,并大大降低适配体与其靶标的结合效率。而具有结构稳定性和机械刚性的 tFNAs 可以用于减少相邻适配体之间的缠结和过度拥挤,通过将多价适配体与 tFNAs 结合构建 sEVs 识别传感界面,可提高目标识别和捕获能力。LIU 等^[31]提出了一种超高灵敏度的 SERS 传感器,该传感器由分支杂交链式反应和基于 tFNAs 的三价适配体驱动,用于精确检测癌症来源的 sEVs。该团队将对 MUC1 特异的适配体与 tFNAs 偶联,随后将 tFNAs 固定在银纳米棒阵列的表面,构建能够特异性捕获过表达 MUC1 的 sEVs 的 SERS 活性传感芯片。sEVs 触发适配体从而启动分支杂交链式反应。该方法检测限很低,可检测 $2\,\mu\text{L}$ 样品中的单个 sEVs,并且利用该方法检测人血清中的 sEVs 可区分胃癌患者和健康者。SERS 传感器能实现超少量样本的超灵敏 sEVs 检测,其有望成为早期精确检测癌症 sEVs 的有力工具。表 3 对近几年基于 tFNAs 的 sEVs 检测生物传感器进行了总结。

表 3 基于 tFNAs 的 sEVs 检测生物传感器

sEVs 类型	靶标	检测方法	线性范围	检测限
sEVs 表面蛋白	CD63、MUC1 ^[28]	电化学	103~108 个/微升	158 个/微升
	CD63 ^[32]	电化学	$1.39\times 10^2\sim 5.05\times 10^7$ 个/毫升	62.7 个/毫升
	CD63 ^[33]	电化学	$1.6\times 10^2\sim 1.6\times 10^6$ 个/毫升	13.79 个/毫升
	CD63、HER2 ^[34]	电化学	$2.31\times 10^3\sim 2.73\times 10^7$ 个/毫升	—
	CD63、MUC1 ^[35]	SERS	$7\times 10^3\sim 7\times 10^7$ 个/毫升	2.98×10^3 个/毫升
	MUC1 ^[31]	SERS	$1.44\sim 1.44\times 10^4$ 个/微升	0.39 个/微升
	CD63 ^[36]	磁检测器	$1.98\times 10^3\sim 1.98\times 10^7$ 个/毫升	1.98×10^3 个/毫升
	CD63、EpCAM ^[27]	荧光	$1.7\times 10^4\sim 1.7\times 10^{10}$ 个/微升	1.8×10^2 个/微升
sEVs miRNA	miRNA-21 ^[37]	电化学	1 fmol/L~1 nmol/L	0.43 fmol/L
	miRNA-1246 ^[38]	电化学	100 amol/L~10 pmol/L	21 amol/L
	miRNA-21 ^[39]	纸基电化学	100 amol/L~0.2 $\mu\text{mol/L}$	34.6 amol/L

注:—表示无数据。

3 小结和展望

tFNAs 具有精心设计的三维结构、卓越的结构稳定性和细胞穿透能力,是核酸纳米技术领域的一个关键进步。tFNAs 通过简化的一锅退火法合成,在合成效率和功能多样性方面都超过了传统的 DNA 纳米结构。基于 tFNAs 的生物传感器是一种多功能传感工具,能够检测包括 CTCs、ctDNA 和 EVs 在内的多种液体活检生物标志物。以 3 个顶点为特征的 tFNAs 是生物传感器的基本组成部分,其可与荧光、电化学、场效应晶体管和 SERS 等多种信号传导模式集成,从而完成液体活检靶标的测定。同时 tFNAs 能与规律间隔成簇短回文重复序列(CRISPR)、CNT、RCA 和 HCR 等核酸扩增技术及新兴材料联合应用,提高传感器的性能。此外,tFNAs 还具有优异的细胞渗透性和无细胞毒性等诸多特点,这些特点有助于无损捕获和释放 CTCs,以及无损穿透 sEVs 和 CTCs,进而实现细胞内和 sEVs 内靶标的原位检测和分析。近年来,tFNAs 生物传感器在液体活检方面取得了重大进展。然而,仍有几项挑战亟待解决:(1)tFNAs 的结构会受到全血中复杂成分和干扰物质(如高盐和高蛋白等)的影响,这限制了其在临床样品液体活检中的应用;(2)基于 tFNAs 的荧光生物传感器被广泛应用于 CTCs 内和 sEVs 内靶标的原位成像,如 miRNA、酶和蛋白质等,但假阳性信号、信号泄露和背景信号等可能影响检测结果。因此,迫切需要开发能够精确控制细胞内和 sEVs 内生物标志物成像的 tFNAs 生物传感器;(3)目前大多数报道的基于 tFNAs 的生物传感器只能用于检测单一的液体活检靶标,这限制了其在临床肿瘤诊断和肿瘤治疗疗效监测中的广泛应用,因此,需要开发能够同时检测多种液体活检标志物的新型 tFNAs 生物传感器,从而提高肿瘤诊断的精准度;(4)大规模生产 tFNAs 的标准化流程和成本控制仍需优化;(5)tFNAs 已被用于肿瘤诊疗一体化,CTCs 和 sEVs 是肿瘤转移的重要介质,针对这些标志物的原位监测、分离和灭活研究对于抑制肿瘤转移、加强肿瘤免疫治疗疗效具有重大医学意义,但鲜有团队利用 tFNAs 对液体活检标志物进行诊疗一体化研究;(6)一些新型液体活检标志物,如肿瘤相关血小板、环状 RNA 和 CTCs 簇等,也与肿瘤发展密切相关,推动 tFNAs 生物传感器对这些新兴液体活检标志物的研究,将有利于液体活检生物靶标的基础机制研究和加快液体活检的临床医学转化。综上所述,新兴技术和材料(如人工智能、DNA 计算、石墨烯、微流控芯片、微针、DNA 水凝胶和钙钛矿等)的快速发展有效推动了 tFNAs 生物传感器的精准化和便携化发展,随着未来更加深入的研究,tFNAs 在液体活检领域的发展潜力会越来越大。

参考文献

[1] HAN B,ZHENG R,ZENG H,et al. Cancer incidence and

- mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4 (1): 47-53.
- [2] MA L, GUO H, ZHAO Y, et al. Liquid biopsy in cancer: current status, challenges and future prospects[J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 336.
- [3] GOODMAN R P, BERRY R M, TURBERFIELD A J. The single-step synthesis of a DNA tetrahedron[J]. Chem Commun (Camb), 2004, 12: 1372.
- [4] FAN Q, SUN B, CHAO J. Advancements in engineering tetrahedral framework nucleic acids for biomedical innovations[J]. Small Methods, 2024, 24: 2401360.
- [5] LIANG L, LI J, LI Q, et al. Single-particle tracking and modulation of cell entry pathways of a tetrahedral DNA nanostructure in live cells[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2014, 53(30): 7745-7750.
- [6] HE Y, YE T, SU M, et al. Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra[J]. Nature, 2008, 452(71): 198-201.
- [7] CHEN Y, LI F, ZHANG S, et al. DNA framework-ensembled aptamers enhance fluid stability in circulating tumor cells capture for tumor treatment evaluation[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2025, 64(24): e202425252.
- [8] WANG C, XU Y, LI S, et al. Designer tetrahedral DNA framework-based microfluidic technology for multivalent capture and release of circulating tumor cells[J]. Mater Today Bio, 2022, 16: 100346.
- [9] PENG Y, PAN Y, HAN Y, et al. Direct analysis of rare circulating tumor cells in whole blood based on their controlled capture and release on electrode surface[J]. Anal Chem, 2020, 92(19): 13478-13484.
- [10] WANG X, XIONG S, LIU Y, et al. Organic photoelectrochemical transistor biosensor based on BiVO₄-ZnIn₂S₄ material for efficient and sensitive detection of MCF-7 cells[J]. Biosens Bioelectron, 2025, 271: 117011.
- [11] CHEN N, QIN S, YANG X, et al. "Sense-and-treat" DNA nanodevice for synergetic destruction of circulating tumor cells[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 40(8): 26552-26558.
- [12] WANG X, ZENG Y, ZHU N, et al. In vitro detection of circulating tumor cells using the nicking endonuclease-assisted lanthanide metal luminescence amplification strategy[J]. Talanta, 2024, 273: 125909.
- [13] JIANG H, WANG L B, ZHANG Y T, et al. An entropy-driven three-dimensional multipedal-DNA walker for ultrasensitive detection of cancer cells[J]. Anal Chim Acta, 2022, 1228: 340299.
- [14] ZHOU G, LIN M, SONG P, et al. Multivalent capture and detection of cancer cells with DNA nanostructured biosensors and multibranch hybridization chain reaction amplification[J]. Anal Chem, 2014, 86(15): 7843-7848.
- [15] WANG C, XU Y, ZHAO X, et al. A double-tetrahedral DNA framework based electrochemical biosensor for ultrasensitive detection and release of circulating tumor cells[J]. Analyst, 2021, 146(21): 6474-6481.

- [16] LU B, DENG Y, PENG Y, et al. Fabrication of a polyvalent aptamer network on an electrode surface for capture and analysis of circulating tumor cells[J]. *Anal Chem*, 2022, 94(37):12822-12827.
- [17] GUO H, FU Y, CHEN S, et al. Electrochemical cytosensor utilizing tetrahedral DNA /bimetallic AuPd holothurian-shaped nanoparticles for ultrasensitive non-destructive detection of circulating tumor cells[J]. *Mikrochim Acta*, 2024, 191(6):298.
- [18] TIVEY A, CHURCH M, ROTHWELL D, et al. Circulating tumour DNA: looking beyond the blood[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(9):600-612.
- [19] HAO P, NA L, YANLI W, et al. A DNA nanostructure-based biomolecular probe carrier platform for electrochemical biosensing. [J]. *Adv Mater*, 2010, 42(22):4754-4758.
- [20] WANG X, CHEN F, ZHANG D, et al. Single copy-sensitive electrochemical assay for circulating methylated DNA in clinical samples with ultrahigh specificity based on a sequential discrimination-amplification strategy[J]. *Chem Sci*, 2017, 8(7):4764-4770.
- [21] LI D, XU Y, FAN L, et al. Target-driven rolling walker based electrochemical biosensor for ultrasensitive detection of circulating tumor DNA using doxorubicin@tetrahedron-Au tags [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 148:111826.
- [22] MA S, ZHANG Y, REN Q, et al. Tetrahedral DNA nanostructure based biosensor for high-performance detection of circulating tumor DNA using all-carbon nanotube transistor[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 197:113785.
- [23] REN Q, JIANG L, MA S, et al. Multi-body biomarker entrapment system: an all-encompassing tool for ultrasensitive disease diagnosis and epidemic screening [J]. *Adv Mater*, 2023, 35(46):2304119.
- [24] DUAN X, QIN W, HAO J, et al. Tetrahedral DNA nanostructures-assisted electrochemical assay for detecting circulating tumor DNA by combining a masking tactic with 3D-hybridization chain reactions[J]. *Talanta*, 2025, 285:127287.
- [25] ZHA X, QIN W, CHEN J, et al. Anchoring red blood cell with tetrahedral DNA nanostructure: electrochemical biosensor for the sensitive signage of circulating tumor DNA [J]. *Talanta*, 2023, 251:123793.
- [26] DONG J, LI X, HU W, et al. A universal electrochemical biosensor based on CRISPR/Cas12a and a DNA tetrahedron for ultrasensitive nucleic acid detection [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2024, 60(52):6667-6670.
- [27] LU Z, SHI Y, MA Y, et al. Fast and specific enrichment and quantification of cancer-related exosomes by DNA-nanoweight-assisted centrifugation[J]. *Anal Chem*, 2022, 94(26):9466-9471.
- [28] CHENG W, DUAN C, CHEN Y, et al. Highly sensitive aptasensor for detecting cancerous exosomes based on clover-like gold nanoclusters [J]. *Anal Chem*, 2023, 95(7):3606-3612.
- [29] CHEN X, JIA M, LIU L, et al. High-fidelity determination and tracing of small extracellular vesicle cargoes[J]. *Small*, 2020, 16(40):2002800.
- [30] LIU W, YANG H, LIU X, et al. Ultrasensitive quantification of microRNA copy number in individual extracellular vesicles using DNA tetrahedron-based single-molecule imaging[J]. *Anal Chem*, 2025, 97(7):4233-4240.
- [31] LIU X, ZHANG J, CHEN Z, et al. Branched hybridization chain reaction and tetrahedral DNA-based trivalent aptamer powered SERS sensor for ultra-highly sensitive detection of cancer-derived exosomes[J]. *Biosens Bioelectron*, 2025, 267:116737.
- [32] JIANG B, ZHANG T, LIU S, et al. Polydopamine-assisted aptamer-carrying tetrahedral DNA microelectrode sensor for ultrasensitive electrochemical detection of exosomes[J]. *J Nanobiotechnol*, 2024, 22(1):55.
- [33] CUI W, QU L, XU Y, et al. MXene@Ni₃(HITP)2@AuNPs combined with NiCo@Fe-MWCNTs-LDH for electrochemical detection of extracellular vesicles[J]. *Talanta*, 2025, 282:126987.
- [34] XU F, WANG K, XU C, et al. Enrichment and detection of HER2-expressing extracellular vesicles based on DNA tetrahedral nanostructures: a new strategy for liquid biopsy in breast cancer[J]. *Anal Chem*, 2025, 97(17):9212-9219.
- [35] ZHANG J, YAN C, XIE L, et al. Multivalent aptamer-linked tetrahedron DNA assisted catalytic hairpin assembly for accurate SERS assay of cancer-derived exosomes in clinical blood[J]. *Biosens Bioelectron*, 2025, 28(21):7497-7504.
- [36] QIAN Q, WEI Y, XU Y, et al. Microfluidic magnetic detection system combined with a DNA framework-mediated immune-sandwich assay for rapid and sensitive detection of tumor-derived exosomes[J]. *Microsyst Nanoeng*, 2023, 9(1):139.
- [37] CHENG W, PAN H, CHEN J, et al. Enzyme-free and triple sensitivity amplification for electrochemical detection of exosomal microRNA [J]. *Anal Chem*, 2025, 97(9):5244-5250.
- [38] ZHANG Y, LI W, JI T, et al. Localized DNA tetrahedrons assisted catalytic hairpin assembly for the rapid and sensitive profiling of small extracellular vesicle-associated microRNAs[J]. *J Nanobiotechnol*, 2022, 20(1):503.
- [39] QIU X, YANG H, SHEN M, et al. Multiarmed DNA jumper and metal-organic frameworks-functionalized paper-based bioplatfrom for small extracellular vesicle-derived miRNAs assay[J]. *J Nanobiotechnol*, 2024, 22(1):274.

(收稿日期:2025-01-12 修回日期:2025-04-28)

(本文编辑:陈玮嘉 张耀元)