



生命科学实验指南系列



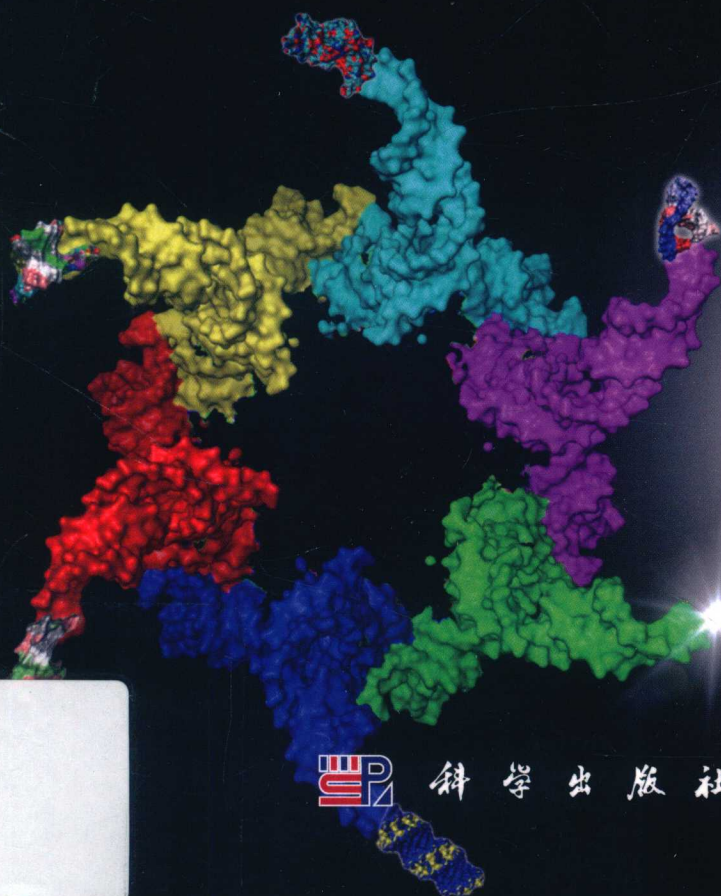
RNA Nanotechnology and Therapeutics:
Methods and Protocols

RNA纳米技术与治疗 ——方法与方案

〔美〕郭培宣(Peixuan Guo) Farzin Haque 著

汪琛颖 李闰婷 译

马润林 审



科学出版社

生命科学实验指南系列

RNA 纳米技术与治疗 ——方法与方案

〔美〕郭培宣 (Peixuan Guo) Farzin Haque 著

汪琛颖 李闰婷 译

马润林 审

科学出版社

北 京

图字：01-2016-1754 号

内 容 简 介

本书主要内容是对近年来与 RNA 纳米技术以及它在纳米生物技术和纳米医药的应用直接相关的技术和实验室方案的汇编。涉及的主题包括分析 RNA 结构和性能的各种生物化学、生物物理和生物信息学方法；分析 RNA 结构的多级装配过程的方法；通过超速离心和高效液相色谱法(HPLC)纯化多功能 RNA 纳米颗粒；体内 RNA 纳米构建物的实时检测；成像、目标定位和治疗效应模块分子结合到 RNA 支架上；RNA-蛋白质纳米结构的设计和特性描述等。

RNA 纳米技术是一个涉及材料工程和合成结构生物学的新领域，是一种新兴的生物化学和纳米材料的交叉学科。本书各章节涵盖的研究方法可供 RNA/DNA 相关科学研究的研究生和博士后研究人员逐步地进行理解和操作。本书亦可作为关注 RNA 纳米技术的从事物理、工程和生命科学研究的人员的学习参考材料。

Translation from English language edition: *RNA Nanotechnology and Therapeutics: Methods and Protocols* edited by Peixuan Guo and Farzin Haque
Copyright © Springer New York 2015

Springer New York is a part of Springer Science+Business Media

All Rights Reserved

图书在版编目(CIP)数据

RNA 纳米技术与治疗：方法与方案 / (美) 郭培宣 (Peixuan Guo) 等著. 汪琛颖, 李国婷译. —北京：科学出版社, 2017.1

(生命科学实验指南系列)

ISBN 978-7-03-050763-1

I. ①R… II. ①郭…②汪…③李… III. ①纳米技术—应用—核糖核酸—药理学 IV. ①R915

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 280459 号

责任编辑：罗 静 刘 晶 / 责任校对：何艳萍

责任印制：徐晓晨 / 封面设计：刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 1 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2017 年 1 月第一次印刷 印张：14 1/2

字数：275 000

定价：98.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

前 言

此书是大家所熟知的“*Methods in Molecular Biology*”实验室方案系列丛书的新成员。尽管已出版了一本特刊“*Methods*” (Volume 54; Issue 2, Page 201–294, 2011, Elsevier) 和一部著作 (*RNA Nanotechnology and Therapeutics*, 2013, CRC 出版社), 这本书仍是对与 RNA 纳米技术及其在纳米生物技术和纳米医药中的应用直接相关的技术和实验室方案的首次汇编。RNA 纳米技术 (Guo P. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5:833–842) 利用在多层次结构水平的 RNA 折叠和装配的模块化及设计性来合理设计并功能化具有不同应用的 RNA 纳米颗粒。虽然在 15 年前自下而上组装 RNA 纳米技术的概念就被证明过 (Guo et al. *Molecular Cell*, 1998, 2:149), 但在这个领域中有意义的进步也只是近 5 年的事情。为了推进该领域研究迈向新的高度, 我们及时编辑出版了这本方法书, 供从事物理、工程和生命科学的研究人员参考。

本书涵盖的研究方法很广泛, 便于经历过不同科学训练的研究生和博士后人员分步进行理解与操作。全书内容包括: 分析核糖核酸 (RNA) 结构和性能的各种生物化学、生物物理和生物信息学方法 (第 2~4 章); 分析 RNA 结构的多级装配过程的方法 (第 4、7 和 10 章); 通过超速离心和高效液相色谱法 (HPLC) (第 5 和 6 章) 纯化多功能 RNA 纳米颗粒; 体内 RNA 纳米构建物的实时检测 (第 7、9、10 章); 成像、目标定位和治疗模块结合到 RNA 支架上 (第 8~13 章); RNA-蛋白质纳米结构的设计和特性描述 (第 14~16 章)。这项任务的完成得益于在这一领域领先的有关专家, 花费大量时间编写了各章节, 在此, 我们向他们表示衷心感谢。同时, 由衷感谢 Humana 出版社/Springer 的编辑和制作人员, 尤其要感谢的是 *Methods in Molecular Biology* 系列丛书的总编辑 John Walker 先生, 是他让我们下决心着手实施这个计划。我们很高兴这本内容丰富的书得以出版, 希望各领域的研究者均能从中有所收益。

Peixuan Guo 博士
Farzin Haque 博士
美国肯塔基州列克星敦
(汪琛颖 译)

目 录

前言

第 1 章 RNA 纳米技术方法综述——RNA 纳米颗粒的合成、纯化及特性	1
1 RNA 纳米技术的定义	1
2 构建多功能 RNA 纳米颗粒	2
2.1 纳米颗粒的 RNA 支架组装	4
2.2 合并功能模块为 RNA 纳米颗粒	7
3 多功能 RNA 纳米颗粒的纯化和特征	11
3.1 凝胶移位分析	11
3.2 超速离心法	11
3.3 高效液相色谱法	12
3.4 RNA 纳米颗粒的结构特征	12
3.5 RNA 纳米颗粒的功能试验	13
4 展望	13
5 结论	14
致谢	14
参考文献	14
第 2 章 调查细菌小调控 RNA 自我组装的多种方法	19
1 引言	19
2 材料	23
2.1 试剂	23
2.2 缓冲液和溶液	23
3 方法	24
3.1 用于聚合作用研究的小非编码 RNA (sRNA) 的体外转录	24
3.2 电泳分析 sRNA 的自组装	25
3.3 二级结构预测和 sRNA 自组装最小序列的特征	25
3.4 热变性分析	26
3.5 利用近红外光谱分析碱基配对	28
3.6 sRNA 组装的分子成像	30
3.7 粗提物中 sRNA 聚合物的检测	33

3.8 非编码 sRNA 的 RT-PCR 定量分析	34
3.9 结论	35
4 注释	36
致谢	36
参考文献	36
第 3 章 使用 AFM 测量包含核糖核苷酸的 DNA 分子的弹性	40
1 引言	40
2 材料	42
2.1 寡核苷酸	42
2.2 寡核苷酸上硫醇基的去保护	43
2.3 原子力显微镜底衬的制备	43
2.4 制备镀金的羧基修饰的氮化硅悬臂	43
2.5 在金表面固定 DNA 底衬	43
2.6 原子力显微镜液体电池	44
2.7 原子力显微镜和配件	44
3 方法	44
3.1 制备含核糖核苷一磷酸的 DNA 寡核苷酸	44
3.2 制备双链嵌入式-核糖核苷一磷酸 DNA 基质	45
3.3 制备镀金羧基修饰氮化硅悬臂及含核糖核苷一磷酸的 DNA 基质的固定化	45
3.4 用于测量力的原子力显微镜的校准	46
3.5 原子力显微镜液体电池的清洁	47
3.6 利用原子力显微镜力光谱测量双链含核糖核苷一磷酸的 DNA 的弹性	47
3.7 数据分析	48
4 注释	50
致谢	51
参考文献	51
第 4 章 RNA 纳米技术之银纳米簇: RNA 纳米颗粒组装的观察 以及跟踪的步骤	55
1 引言	55
2 材料	56
2.1 转录和 RNA 纳米颗粒组装成分	56
2.2 Ag:RNA 成分	57
3 方法	57
3.1 RNA 合成	57

3.2 RNA 纳米立方体的组装	57
3.3 RNA 组装的天然聚丙烯酰胺凝胶电泳实验	58
3.4 合成 Ag:RNA	58
3.5 Ag:RNA 光学测量	58
4 注释	59
致谢	60
参考文献	61
第 5 章 利用制备性超速离心大规模纯化 RNA 纳米颗粒	63
1 引言	63
2 材料	67
2.1 梯度准备	67
2.2 超速离心	68
2.3 分馏和样品分析	68
3 方法	69
3.1 CsCl 平衡密度法纯化 RNA	69
3.2 速率区带蔗糖梯度法分离纳米颗粒	70
3.3 分馏和样品分析/回收 (CsCl 和蔗糖的相同)	72
3.4 预期结果	73
4 注释	73
致谢	75
参考文献	75
第 6 章 HPLC 纯化长达 59 个核苷酸具有单核苷酸分辨率的 RNA 适配体	78
1 引言	78
2 材料	80
2.1 RNA 样品	80
2.2 HPLC 仪器	81
2.3 试剂和缓冲液	81
3 方法	81
3.1 配制缓冲液	81
3.2 初始化和平衡柱子	81
3.3 上样	82
3.4 再平衡柱子	83
3.5 样品处理	83
4 注释	83

参考文献	87
第 7 章 在原核和真核细胞中利用具有热力学稳定基序和荧光模块的 RNA 纳米颗粒实时检测 RNA 的折叠和翻转	89
1 引言	89
2 材料	91
2.1 体外转录和纯化 RNA	91
2.2 在 <i>E. coli</i> 中表达 RNA	92
2.3 体外和体内 MG/DFHBI 结合分析	93
2.4 动物及人类细胞中 RNA 表达、折叠和降解的荧光成像	93
3 方法	94
3.1 融合 RNA 纳米颗粒的设计	94
3.2 通过 T7 RNA 聚合酶体外转录制备 RNA 纳米颗粒并用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化 RNA	95
3.3 利用细菌表达、装配和纯化 RNA 纳米颗粒	95
3.4 通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳体外评估 RNA 折叠	96
3.5 通过 MG 分析, 体外评估 RNA 的折叠	98
3.6 通过 DHBFI 结合分析, 体外评估 RNA 折叠	98
3.7 体外监测 RNA 降解	98
3.8 细菌体内 RNA 折叠的评估	98
3.9 真核细胞中 RNA 折叠的评估	99
3.10 在动物和人类细胞中实时检测 RNA 纳米颗粒半衰期	100
4 注释	101
致谢	103
参考文献	103
第 8 章 小 RNA 3' 端氧化的荧光标记	105
1 引言	105
2 材料	106
2.1 体外转录组分	106
2.2 标记组分	107
2.3 凝胶阻滞成分	107
3 方法	107
3.1 体外转录	107
3.2 RNA 标记	108

3.3 凝胶阻滞分析	109
4 注释	109
致谢	110
参考文献	111
第9章 RNA 纳米颗粒对转移性肿瘤靶向定位及给药的方法和分析	112
1 引言	112
2 材料	113
2.1 试剂	114
2.2 设备	115
2.3 试剂配制 (见注释 1)	116
3 方法	117
3.1 三叉接口 (3WJ) 自我装配	117
3.2 通过激光共聚焦显微镜试验 pRNA-3WJ 纳米颗粒的细胞结合和内化	118
3.3 通过流式细胞仪 (FACS) 实验检测 pRNA-3WJ 纳米颗粒的 细胞结合 (可选)	118
3.4 为了产生小鼠皮下移植瘤, 皮下注射肿瘤细胞 (图 9-3)	119
3.5 为了产生转移瘤小鼠模型, 在脾内注射肿瘤细胞	119
3.6 靶肿瘤细胞中荧光 RNA 纳米颗粒的 IVIS 光谱在体成像 (见注释 13)	120
3.7 靶肿瘤组织中 RNA 荧光纳米颗粒的微观成像	122
3.8 用流式细胞仪分析新鲜组织 (可选)	122
4 注释	123
致谢	124
参考文献	124
第10章 RNA 纳米颗粒在脑瘤中靶向给药的功能性试验	127
1 引言	127
2 材料	128
2.1 材料	128
2.2 设备	129
2.3 试剂配制	130
3 方法	131
3.1 体内合成 RNA 以及构建 RNA 纳米颗粒	131
3.2 用原子力显微镜成像显示 RNA 纳米颗粒的结构	131
3.3 流式细胞仪分析体外检测叶酸介导的人脑瘤细胞定位 (图 10-2)	133
3.4 荧光共聚焦显微镜体外检测叶酸介导的人癌细胞定位 (图 10-3)	134

3.5 向小鼠模型系统中移植脑瘤 (图 10-4)	135
3.6 利用核磁共振成像 (MRI) 对小鼠植入脑瘤的定位并测量大小 (图 10-4)	135
3.7 患有脑瘤小鼠的间接体内荧光成像 (图 10-5)	136
3.8 siRNA 给药后体内生物荧光全身成像检测脑瘤 (图 10-6)	137
4 注释	138
致谢	140
参考文献	140
第 11 章 适配体介导的纳米颗粒相互作用: 从寡核苷酸-蛋白质复合体到 SELEX 筛选	142
1 引言	142
2 材料	144
2.1 流感病毒基质蛋白-1	144
2.2 寡聚核苷酸合成和纯化	144
2.3 自动化的 SELEX	145
2.4 RNA 候选的自动化合成	145
2.5 AlphaScreen® 试验	145
3 方法	146
3.1 SELEX	146
3.2 C6 (36) 适配体的特性: AlphaScreen® 的 M1 复合体	146
3.3 C1 (36) -M1 分析	149
3.4 C1 (36) -M1-C6 (36) 夹心试验	149
3.5 HAPIscreen	151
4 注释	154
致谢	154
参考文献	154
第 12 章 通过黏性桥组合特异性的适配体-siRNA 纳米颗粒的方法 内化 B 细胞淋巴瘤	157
1 引言	157
2 材料	159
2.1 细胞系	159
2.2 通过体外转录合成 BAFF-R R-1 和 HIV-1 gp120 A-1 对照适配体	160
2.3 适配体-黏性-siRNA 纳米颗粒的结构	161
2.4 通过凝胶迁移试验确定分离常数	161
2.5 通过激光共聚焦显微镜分析细胞内化	162

2.6 RNA 抽提	162
2.7 利用 RT-PCR 进行基因沉默	162
2.8 通过 MTS 试验和流式细胞术分析细胞增殖及凋亡	163
2.9 siRNA 的电转化	163
3 方法	163
3.1 通过体外转录的 BAFF-R R-1 和 HIV-1 gp120 A-1 控制适配体的合成	164
3.2 BAFF-R R-1 适配体-黏性-STAT3 siRNA 纳米颗粒的产生	164
3.3 利用凝胶迁移试验测定分离常数	164
3.4 利用激光共聚焦显微镜分析细胞内化	166
3.5 通过定量 RT-PCR 分析 STAT3 siRNA 功能	167
3.6 通过 MTS 试验分析细胞增殖	168
3.7 利用流式细胞法分析细胞凋亡	168
4 注释	169
致谢	170
参考文献	170
第 13 章 一种用于在人黑色素瘤细胞中剪接转换寡核苷酸的功能运输的 高通量筛选方法	173
1 引言	173
2 材料	175
2.1 A375 pLuc 细胞培养和 SSO 转染	175
2.2 荧光素酶检测	175
2.3 RT-PCR 检测	175
3 方法	176
3.1 A375 pLuc 细胞培养和 SSO 转染步骤 (见注释 9)	176
3.2 荧光素酶检测	176
3.3 RNA 提取和 RT-PCR (见注释 10)	177
4 注释	179
参考文献	180
第 14 章 RNA-蛋白纳米结构的设计、组装和评估	182
1 引言	182
2 材料	184
2.1 设计	184
2.2 合成	185
2.3 电泳迁移率试验	186

2.4 大气中原子力显微镜	186
3 方法	187
3.1 设计	187
3.2 合成	188
3.3 电泳迁移率试验 (EMSA)	190
3.4 大气中原子力显微镜 (AFM)	191
4 注释	192
致谢	194
参考文献	194
第 15 章 利用 CLIP-Seq 技术在病毒中定位 RNA 和蛋白质的相互作用	196
1 引言	196
2 材料	199
2.1 交联和免疫沉淀组分	199
2.2 RNA 片段化和提取试剂	200
2.3 cDNA 文库构建及序列组成	200
3 方法	200
3.1 紫外交联和 RNA 片段化	200
3.2 免疫沉淀反应和 RNA 提取	201
3.3 cDNA 文库构建	203
3.4 数据分析	204
4 注释	205
致谢	205
参考文献	206
第 16 章 用 RCAP、RNA 交联和肽段指纹识别技术定位蛋白质-RNA 相互作用	208
1 引言	208
1.1 RCAP	209
1.2 甲醛交联	209
1.3 亲和捕获 RNA	210
1.4 质谱分析	211
1.5 数据分析	211
1.6 RCAP 数据的独立确定	212
2 材料	213
2.1 RCAP 试验: 交联和胰蛋白酶消化试剂	213
2.2 RCAP 试验: RNA 沉淀和重悬浮	213

2.3 样品清除	214
3 方法	214
3.1 RCAP 试验: RNA-多肽复共轭对配合物的制备	214
3.2 RCAP 试验: RNA-肽段复共轭对配合物的沉淀和再悬浮	214
3.3 样品处理和质谱分析	215
4 注释	215
致谢	216
参考文献	216

第1章 RNA 纳米技术方法综述——RNA 纳米颗粒的合成、纯化及特性

Farzin Haque 和 Peixuan Guo

摘要 RNA 纳米技术包括使用限定大小、结构和化学量的 RNA 作为一种结构材料,以自下而上的自组装方式来建立同性质的纳米结构。这个于 1998 年提出的开创性概念 (Guo et al., *Molecular Cell*, 1998, 2:149–155; *Molecular Cell* 是 *Cell* 的特色刊物) 已经成为一个涉及材料工程和合成结构生物学的新领域 (Guo, *Nature Nanotechnology*, 2010, 5:833–842)。人们对 RNA 纳米技术领域的关注度近几年急剧升高,在著名的期刊上发表的有关 RNA 纳米结构及其在纳米药物和纳米技术应用方面的文章激增。RNA 化学、RNA 生物物理学、RNA 生物学的快速发展为基础科学向临床实践的转化创造了新的机遇。RNA 纳米技术在这方面拥有相当大的发展前景。大量增加的证据显示,占人类基因组 98.5% (Lander et al., *Nature* 409:860–926, 2001)、曾经的“垃圾 DNA”,实际上是编码非编码 RNA 的。随着我们对 RNA 结构与功能相关性了解的日益增加,我们可以人工合成用于诊断和治疗疾病的 RNA 纳米颗粒。本章简要概述了在纳米技术和纳米医学方面有着不同应用的 RNA 纳米颗粒的设计、构建、纯化,以及它们的特性。

关键词 RNA 纳米技术, 纳米医学, 纳米生物技术, RNA 治疗, RNA 纳米颗粒, pRNA, 细菌噬菌体 phi29, 超速离心法, PAGE, HPLC, AFM

1 RNA 纳米技术的定义

RNA 因其在结构和功能上的多样性,已经成为一种独特的纳米材料。RNA 具有较高的热力学稳定性^[1, 2],表现出规则和 irregular 的碱基配对性能^[3~7],以及碱基堆积能力和三级结构互作能力^[1, 2]。通过转录、终止、自我加工、剪接, RNA 在体内自我组装^[8~14]产生 RNA 片段。RNA 还表现出一些特殊的功能,如 siRNA、miRNA、RNA 适配子、核糖开关和核酶。RNA 纳米技术是一个独特的领域^[14~17],有别于经典的 RNA 结构/折叠的研究及 RNA 的分子生物学研究^[18~24]。除了分子内 (在一个分子内) 相互作用和折叠之外,还需要分子间 (不同分子之间) 的相互作用。RNA 纳米颗粒可通过纯化达到均质化,并且可通过化学、物理、生物物

理学和光学方法来定性。简单地结合功能性 RNA 组件到金、脂质体、树枝状大分子或聚合物纳米颗粒并不等同于 RNA 纳米技术；相反，RNA 纳米技术是以自下而上的途径来组装由 RNA 作为主要成分的纳米级粒子的。

纳米技术平台与其他纳米传送系统（如脂质、聚合物、树枝状聚合物、无机物、病毒等）相比很独特，主要表现在以下几个方面：①某些 RNA 纳米颗粒，比如包装 RNA-3 叉接口（pRNA-3WJ）结构，热力学性质稳定，耐 8 mol/L 尿素变性，体内超低浓度不解离^[25, 26]；通过 2'-氟（2'-F）化学修饰获得核糖核酸酶抗性，同时保持原初的折叠，以及支架和结合功能组件真正的生物活性^[25~27]；②RNA 是一种阴离子聚合物，因此能够避免通过带负电荷的细胞膜进入非特异性细胞，以及在此过程减少由于通过肝脏枯否细胞和肺巨噬细胞^[15, 32]滞留引起的脏器蓄积的毒性效应；③RNA 纳米颗粒有限定的大小、结构和化学量，因此，可以避免由非匀质粒子产生的不可预知的副作用^[25, 26, 33, 34]，一些 RNA 纳米颗粒还有促进穿透肿瘤和 EPR（增强渗透与滞留）效应的有利形状^[25, 34]；④典型的 RNA 纳米颗粒直径为 10~100nm，这足以纳入化疗药物、siRNA、miRNA 和/或 RNA 适配子，它们的大小足以避免通过肾脏排泄，同时又可以通过受体介导的内吞作用进入靶细胞^[35]；⑤RNA 纳米颗粒是高度可溶的，不易产生聚集，不需要连接聚乙二醇或血清白蛋白^[15, 36]，通常作为广泛使用的普通纳米颗粒；⑥RNA 纳米颗粒的多价性允许一个模块化的设计，这项技术的真正独特之处在于它能够设计不同功能的 RNA 片段序列，而且可以自组装成完整的超微粒^[25, 26, 34]；⑦在体内，pRNA-3WJ 纳米颗粒展示出良好的药代动力学和生物分布轮廓，无毒，在小鼠体内不诱导 I 型干扰素或产生细胞因子^[25, 26, 34, 36]；⑧给小鼠全身注射 pRNA-3WJ 纳米颗粒 3~4h 后可强烈地结合肿瘤，几乎不或完全不在健康的肝脏、肺、脾脏和肾脏中累积^[25, 26, 34, 36]；⑨RNA 纳米颗粒不含蛋白质，不引起宿主抗体反应，这将允许重复治疗癌症和慢性疾病，特别适用于那些对蛋白试剂起中和和抗体反应的患者。

在本章，我们主要简述了 RNA 纳米技术领域关于 RNA 纳米颗粒的设计、构建、纯化及其特性。有兴趣的读者如果想进行更深入的分析，可以阅读参考文献中提到的几本优秀的综述，以及多年来已出版的相关书籍^[15~17, 37~42]。

2 构建多功能 RNA 纳米颗粒

构建 RNA 纳米颗粒包括 7 个步骤（图 1-1）^[15]。第一步是构思，需要定义希望得到的纳米颗粒的特性，如整体结构、形状和潜在的应用（见第 4、7、9~11、13 和 14 章）。第二步涉及一种计算方法来预测各个建筑块的结构/折叠及组装在最终的 RNA 复合体中 RNA 分子间和分子内的相互作用（第 2、4 和 13 章）。有几个可用于预测 RNA 折叠的在线资源，如 Mfold^[43]、RNA designer^[44]、Sfold^[45]、

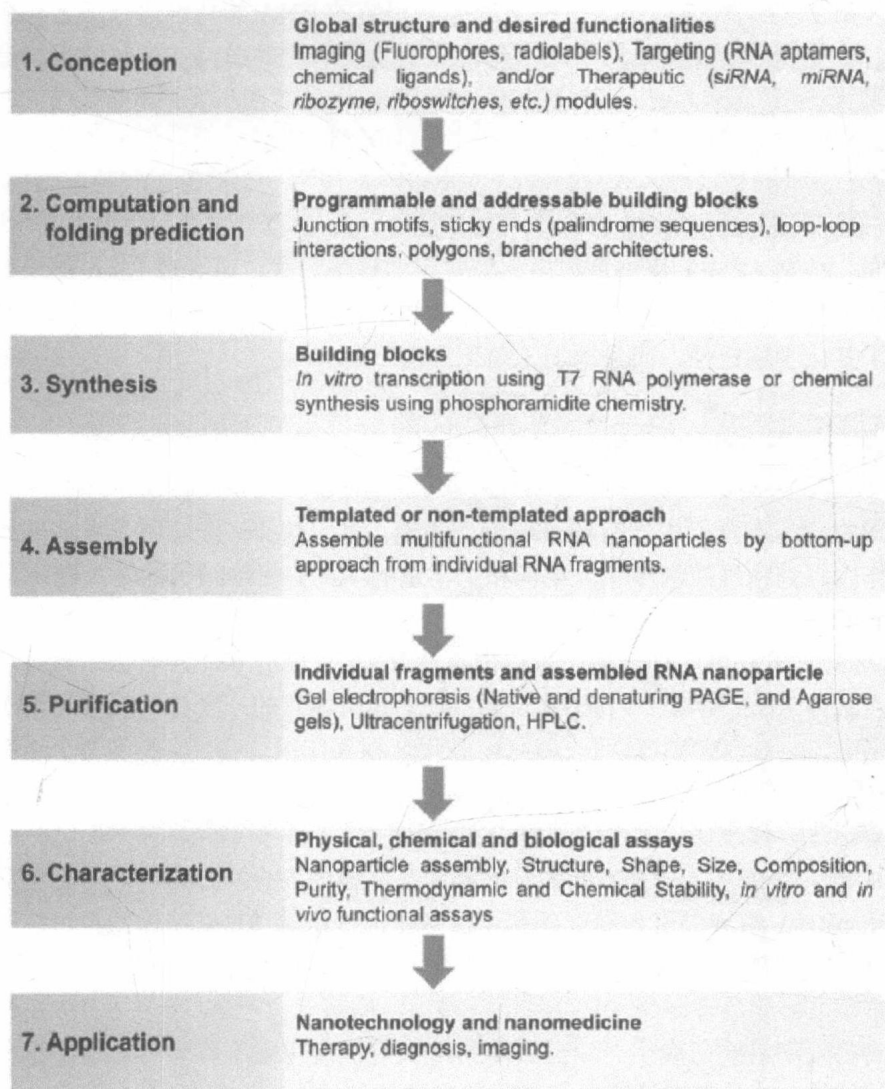


图 1-1 RNA 纳米技术的方法。构建 RNA 纳米颗粒包括 7 个关键步骤：构思、计算、合成、组装、纯化、表征、应用。图来源于参考文献[15]并经过调整和修改，© Nature Publishing Group

NUPACK^[46]和其他^[47]。第三步是单体建筑块的合成，无论是使用 T7 RNA 聚合酶在体外转录（第 2、4~11 章），或是使用亚磷酰胺化学过程的化学合成（第 9 和 10 章）。第四步是既可以通过模板化（面对空间、结构或外力），又可以通过非模板化（无任何约束）的方法组装 RNA 四级结构架构（第 4、7、9、10 和 13 章）。第五步是纯化单个 RNA 片段及整个组装的 RNA 纳米颗粒（第 2、5~7、9 和 10 章）。第六步是利用各种不同的生物化学、生物物理学和生物信息学方法，如原子力显微镜（AFM）、电子显微镜（EM）、凝胶电泳和色谱法、热变性、超速离心

等方法（第 2、3、7、9、10、12~16 章）对组装的 RNA 的特性进行深入描述。第七步，也是最后一步，是用于纳米药物和纳米技术的多功能 RNA 纳米构造的应用（第 7、9~13 章）。

众所周知，RNA 容易受到影响而在血清中降解。为了提高 RNA 的化学稳定性，可以对碱基（如形成 5-溴尿嘧啶和 5-碘尿嘧啶）^[48]、磷酸键（如形成硫代磷酸酯和 boranophosphate）、核糖 2'-羟基（如形成 2'-氟、2'-O-甲基或 2'-NH₂）^[27, 50~52] 进行修饰。2'-氟（2'-F）修饰是体内比较常用的修饰方式，可导致 RNA 纳米颗粒在大多数的情况下表现出其真实的结构和生物学功能^[25, 27]（第 9 和 10 章）。这不仅提高了其化学稳定性，而且增加了熔化温度^[53]。

2.1 纳米颗粒的 RNA 支架组装

天然的 RNA 分子中含有环、螺旋、凸起、茎、结和假结，所有这些结构基元可以作为组装精确控制形状、结构和化学量的 RNA 三维结构的建筑砌块^[15]。噬菌体 phi29 DNA 包装马达是包装 RNA（pRNA）的一个典型例子^[54]。郭培宣博士于 1998 年的开拓性工作表明，可以由再造 RNA 片段的 pRNA 合成二聚体、三聚体和六聚体 RNA 结构^[14]。pRNA 多功能子，其所具有的三种结构特征可用于构建多效价 RNA 纳米颗粒。①环-环（手拉手）相互作用：pRNA 包含两个连锁环（表示右手环和左手环），可以通过环-环相互作用被设计形成二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体纳米结构^[14] [图 1-2 (a)]。②回文序列（脚-脚相互作用）：回文序列从 5'→3' 方向的一股链和互补链的 5'→3' 方向读取的是相同的序列，在 pRNA 螺旋端引入回文序列可以高效促进桥接 RNA 结构的自组装（脚对脚的分子间相互作用）^[33, 34] [图 1-2 (a)]。③使用连接结构基元形成分支 RNA：pRNA 的中央部分包含一个 3WJ（三叉连接）结构基元，它是由 3 个短 RNA 片段以异常高的效率组装而成^[25, 26]。pRNA-3WJ 具有高度可编程性^[55]，可用于形成高度分支的结构，以及带有目标几何形状的多聚体结构^[25, 26, 34, 56~58]（见第 7、9 和 10 章中有代表性的实例 pRNA-3WJ，拥有多功能模块结构基元）（图 1-2 和图 1-3）。

RNA 通过规则和不规则的碱基配对、碱基堆积和三级结构相互作用，自然地折叠成复杂的结构，因此，管理 RNA 折叠的规则非常复杂。Bruce Shapiro 研究团队已经开发了各种计算方法（建模软件，如 RNA2D3D^[59]、Nanotiller^[60]）和分子动力学模拟（molecular dynamics simulation）来设计 RNA 序列（模块化积木）装置以自组装成设计的三维结构，如纳米颗粒和纳米环^[61, 62]。他们还开发了数据库^[11]以提取已知的 RNA 结构单位来制备具有期望性能的新型 RNA 纳米颗粒。这些纳米支架可以进一步被功能化，具备治疗模块和荧光素，如银纳米簇是用来跟踪