

基于信号扩增的荧光技术检测 MicroRNAs 的研究进展

朱桂池¹ 许文静^{1,2} 张春阳¹

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

²(中国科学院大学深圳先进技术学院 深圳 518055)

摘 要 基于信号扩增的荧光技术结合了荧光检测与扩增技术两者的优点, 是一种拥有广阔发展前景的生化分析方法。因其具有扩增效率高、信号易于读取和实时分析等优点, 正成为核酸检测中的一个研究热点。文中综述了近年来基于信号扩增的荧光技术应用于 microRNAs 检测的最新进展, 包括链置换扩增、滚环扩增、基于外切酶的信号扩增、基于双链特异性核酸酶的信号扩增和无酶信号扩增等, 并对今后的发展方向进行了展望。

关键词 荧光; 信号扩增技术; microRNAs; 超灵敏检测; 生物标志物

中图分类号 O 657.3 Q 522 **文献标志码** A

Progress in Signal Amplification-Based Fluorescence Methods for MicroRNAs Assay

ZHU Guichi¹ XU Wenjing^{1,2} ZHANG Chunyang¹

¹(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(Shenzhen College of Advanced Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract Signal amplification-based fluorescent methods combine the advantages of both fluorescence detection and signal amplification strategy. Recently, they have gained increasing attention in nucleic acid detection due to their high efficiency, easy read-out, and real-time monitoring. In this review, we summarize the recent progress in signal amplification-based fluorescent methods for microRNAs assay, and focus on five categories including strand displacement amplification (SDA), rolling circle amplification (RCA), exonuclease-assisted signal amplification, duplex specific nuclease (DSN)-assisted signal amplification, and enzyme-free signal amplification. We highlight their future direction as well.

Keywords fluorescence; signal amplification; microRNAs; sensitive detection; biomarker

1 引 言

生物医学作为一门新兴的交叉学科展现了巨大的发展潜力, 其最重要的任务之一是对肿瘤进行早期的诊断与治疗。肿瘤在演变过程中会产生

一些特异性的生物标志物, 测定这些标志物分子可用于肿瘤的早期诊断。MicroRNAs (miRNAs) 是一种具有代表性的肿瘤标志物。miRNAs 是一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA 小分子, 由较长的初级转录产物经过 Drosha 酶和 Dicer 酶的剪切加工而产生^[1,2]。在人类基因组中

收稿日期: 2015-04-13 修回日期: 2015-04-25

作者简介: 朱桂池, 助理研究员, 研究方向为荧光型生物传感器应用于肿瘤标志物的检测; 许文静, 硕士研究生, 研究方向为生化分析与生物传感器; 张春阳(通讯作者), 博士, 研究员, 研究方向为单分子检测与成像及其临床应用研究, E-mail: zhangcy@siat.ac.cn。

已经有几百种 miRNAs 被确定,大部分在细胞增殖、分化和凋亡等生物学过程中起着关键的调控作用^[3-5]。目前,越来越多的研究表明 miRNAs 在细胞内的异常表达与人类疾病具有密切的关系,例如肺癌、肝癌、乳腺癌和胃癌等^[6-9]。近年来,miRNAs 已经被当作一种拥有巨大潜力的肿瘤标志物和治疗靶点。

传统的 miRNAs 分析方法通常包括 Northern 印迹法^[10]和微阵列芯片技术^[11],但这些方法通常灵敏度低、样品需求量大、特异性差、操作步骤繁琐。为了提高检测的灵敏度和应用性,反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)获得了广泛的发展,已经成为 miRNAs 检测的常用方法^[12]。但该方法需要精确的温度控制和复杂的引物设计,这无疑增加了实验的成本和复杂性。另外,PCR 方法很容易遭受非特异性扩增的影响,产生假阳性的实验结果。因此,建立一种简单、准确且高灵敏度的 miRNAs 检测方法,对于 miRNAs 的生物学研究、疾病的早期诊断和治疗靶点的发现都具有非常重要的意义。

基于信号扩增的荧光技术能在某一特定的温度下对待测物(DNA 或 RNA)进行荧光信号放大,具有设计简单、反应快速、仪器要求简单等优点。经过二十多年的不断完善与进步,基于信号扩增的荧光技术已经在分子生物学、生物医学、药物筛选和环境监测等多个领域得到应用,在 miRNAs 检测领域中也日益受到重视。本文将分别从链置换扩增技术、滚环扩增技术、基于外切酶的信号扩增技术、基于双链特异性核酸酶的信号扩增技术和无酶信号扩增技术等五个方面介绍 miRNAs 检测的最新进展,并对今后的发展方向进行展望。

2 链置换扩增技术

自上世纪 90 年代初,为了寻找更加简单的核

酸分析方法,很多实验室致力于发展无需热变性的等温扩增技术。链置换扩增(Strand Displacement Amplification, SDA)是一种典型的且应用广泛的等温扩增技术,由 Walter 课题组于 1992 年首次提出^[13]。SDA 反应主要基于切口酶(Nicking Enzyme)和聚合酶(Polymerase)的协同作用,在 DNA 双链中打开缺口并在缺口处延伸而取代下游链的原理,其扩增效率在数分钟内能够达到 $10^6 \sim 10^9$ 倍^[14,15]。Li 课题组^[16]利用 SDA 方法的高扩增效率成功地对 miRNA 进行了检测。如图 1 所示,他们设计一条 5' 端和 3' 端具有相同序列的单链 DNA 模板,在模板中间具有切口酶的识别序列。当加入待测 miRNA 后, DNA 模板的 3' 端能与其互补结合,形成聚合酶的作用底物。在聚合酶的催化下,miRNA 本身作为引物不断被延伸直到与模板形成完整的双链结构。此时双链结构中间区域的序列将被切口酶识别并进行切割,形成的缺口被聚合酶利用,进行下一轮的延伸置换反应,产生大量的寡核苷酸链,这是第一阶段的 SDA 反应。这些新产生的寡核苷酸链与 miRNA 具有相同的序列,它们能够与新的 DNA 模板互补结合,启动第二阶段的 SDA 反应,生成大量寡核苷酸片段产物。这种方法操作简单,反应快速(半小时左右),检测限能够达到 0.1 zmol。

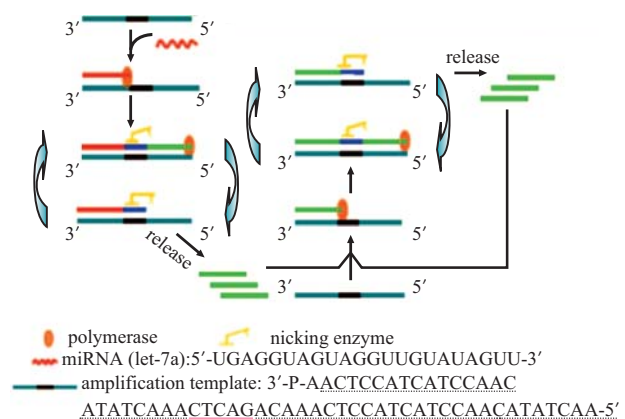


图 1 链置换扩增技术用于 miRNA 检测示意图

Fig. 1 Scheme of SDA method for miRNA assay

结合基于单个量子点的荧光能量共振转移技术(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET), Zhang 课题组^[17]发展了一种 SDA 方法实现了对 miRNA 的超灵敏检测。如图 2 所示, 这种方法分为三个主要步骤: 指数 SDA 反应, 线性 SDA 反应和量子点表面自组装反应。首先, miRNA 通过与模板 X' -X' 互补结合, 在 DNA 聚合酶和切口酶的共同作用下启动第一步指数 SDA 反应, 产生大量寡核苷酸链 X₀。然后, 所扩增的产物 X₀ 能够与另一条模板 X' -Y' 互补结合, 启动第二步线性 SDA 反应, 将 X₀ 转变成更多数量的寡核苷酸链 Y。最后, 扩增产物 Y 被两条标记有信号分子(Cy5)和生物素(Biotin)的探针捕获, 形成三明治结构。当加入链霉亲和素修饰的量子点后, 三明治结构能够自组装至量子点表面。在 488 nm 激光的激发下, 量子点和 Cy5 之间发生 FRET。这种方法的灵敏度达 0.1 aM。基于类似的 SDA 扩增原理, Zhang 课题组以发夹探针作为 SDA 扩增模板之一成功进行了 miRNA 的检测^[18]。miRNA 首先与单链 DNA 模板结合以启动第一步 SDA 反应。所

产生的寡核苷酸链能够与 3' 端突出的发夹探针结合, 在聚合酶的作用下发夹探针被打开, 使荧光基团与淬灭基团分离, 产生强烈荧光信号。最后被打开发夹探针能够被切口酶识别, 在聚合酶的催化作用下进行第二步 SDA 反应。这两步 SDA 反应有机结合起来, 形成指数扩增。

Zhong 课题组^[19]和 Wang 课题组^[20]分别采用两条不同的 DNA 模板对待测 miRNA 进行 SDA 扩增, 检测限分别达 16 zmol 和 0.1 aM。Ye 课题组^[21-23]发展了一系列双功能 SDA 扩增技术用于检测 miRNA。他们利用一条较长的 DNA 模板可同时扩增出两条不同序列的寡核苷酸链。DNA 模板链中一般含三个功能区域, 分别为 miRNA 的互补区域和两条寡核苷酸链的互补区域。2014 年的文献显示, DNA 修复酶^[24]和 DNA 三线结构(Three-way Junction Structure)^[25]也被引入 SDA 用于 miRNA 检测。

3 滚环扩增技术

滚环扩增(Rolling Circle Amplification,

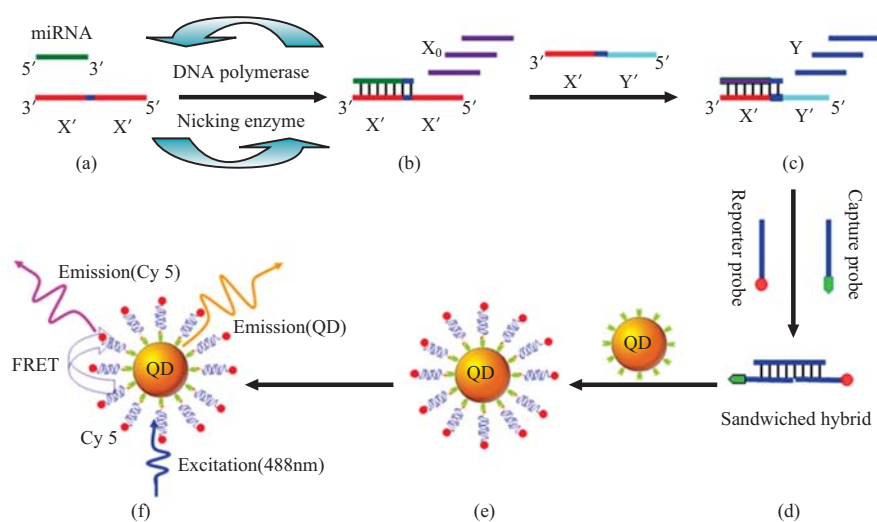


图 2 链置换扩增技术结合基于单个量子点的 FRET 技术用于 miRNA 检测示意图

Fig. 2 Scheme of SDA and single quantum dot-based FRET method for miRNA assay

RCA) 是一种简单高效的等温扩增技术, 于 90 年代中期发展起来, 主要借鉴于噬菌体中环状 DNA 分子滚环式的复制方式。经典 RCA 方法以环状 DNA 为模板, 以一段单链 DNA 或 RNA 作为引物, 在聚合酶的作用下引物不断被延伸, 产生包含许多重复片段的单链 DNA 分子。RCA 方法可以分为线性扩增和指数扩增, 其中指数扩增的效率高达 10^9 倍^[26]。2006 年, Kjems 课题组^[27]将 RCA 方法应用于 miRNA 检测。锁式探针 (Padlock Probe) 首先与待测 miRNA 互补结合, 然后在连接酶的作用下将锁式探针变成环状, 最后以 miRNA 为引物在聚合酶的催化作用下不断延伸, 产生大量的单链重复片段。这种方法简单快速, 但由于属于线性扩增, 灵敏度不高。为了进一步提高 miRNA 检测的灵敏度, Li 课题组^[28]在 2009 年利用双引物发展了一种指数 RCA (即分支滚环扩增技术 Branched Rolling Circle Amplification, BRCA) 检测 miRNA。如图 3 所示, 待测 miRNA 作为第一条引物启动线性 RCA 反应, 形成较长具有重复片段的 DNA 产物, 接着第二条引物以产物为模板启动下一步扩增反应, 形成指数扩增。灵敏度可达 10 fM。

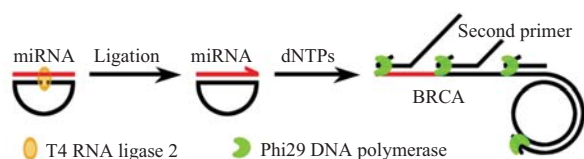


图 3 分支滚环扩增技术用于 miRNA 检测示意图

Fig. 3 Scheme of BRCA method for miRNA assay

2013 年, Tang 课题组^[29]发展了一种新的指数型 RCA 方法用于 miRNA 检测, 只需要一条引物就实现指数扩增。如图 4 所示, 待测 miRNA 与锁式探针互补杂交后, 在 T4 RNA 连接酶作用下将锁式探针连接成环状, 作为 RCA 的扩增模板。加入 Phi29 DNA 聚合酶后, 引物不断被延伸, 形成包含有切口酶识别序列的重复片段。这

些重复片段能够与新的锁式探针互补结合形成双链 DNA 结构。随后这些双链 DNA 被切口酶识别并切割, 产生大量寡核苷酸链 (Trigger)。这些寡核苷酸链可作为引物与新的锁式探针作用启动下一轮 RCA 反应, 不断循环实现指数扩增。Zhang 课题组结合 RCA 方法和基于单个量子点的 FRET 技术对 miRNA 实现了超高灵敏度的检测, 检测限可达 50.9 aM ^[30]。这种方法可应用于临床肺癌样品的分析。近年来, 许多其他类型 RCA 方法也被广泛应用于 miRNA 检测^[31-35]。

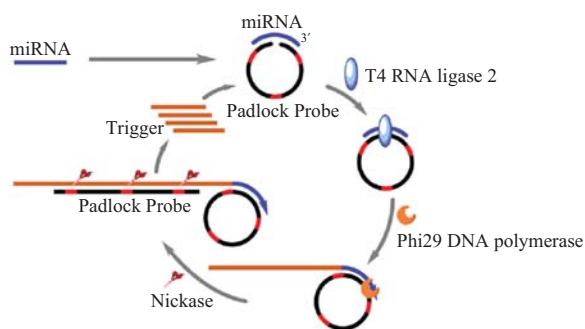


图 4 指数型滚环扩增技术用于 miRNA 检测示意图

Fig. 4 Scheme of exponential RCA method for miRNA assay

4 基于外切酶的信号扩增技术

外切酶 (Exonuclease) 是一类从核酸链的末端开始, 依次水解磷酸二酯键而生成单个核苷酸的核酸酶。近年来, 基于外切酶的信号扩增技术在生化分析领域得到了广泛应用。Xia 课题组^[36]利用 Lambda 外切酶的循环酶切信号放大原理, 发展了一种超灵敏 miRNA 检测方法。如图 5 所示, 这种方法包括两步循环过程: 首先分子信标 (Molecular Beacon) 与待测 miRNA 结合, 导致荧光团和淬灭团分开, 产生较强荧光信号; 然后, miRNA 在聚合酶和引物延伸的作用下被置换下来, 被替换的 miRNA 又可以结合新的分子信标。经过一段时间的循环后, 越来越多的分子信

标被打开, 形成大量 Lambda 外切酶作用底物。这些双链底物在切口酶的作用下暴露出 5' 端磷酸基团(PO_4), 迅速被 Lambda 外切酶识别并消化, 导致荧光基团与淬灭基团的距离进一步扩大, 产生更强荧光信号。这种方法通过两步循环扩增对荧光信号放大, 检测限在 37°C 和 4°C 分别达 10 fM 和 1 aM 。

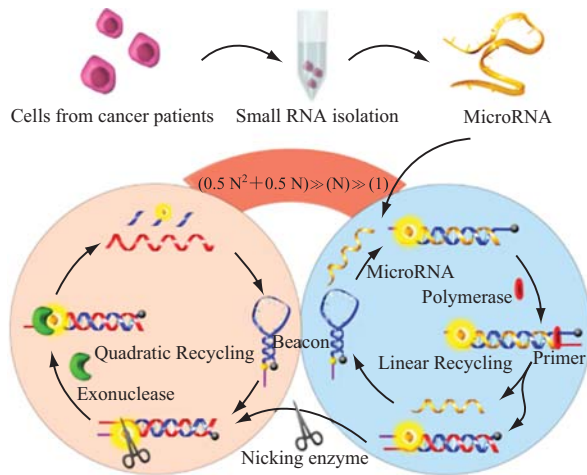


图 5 基于 Lambda 外切酶的信号扩增技术用于 miRNA 检测示意图

Fig. 5 Scheme of Lambda exonuclease-assisted signal amplification method for miRNA assay

2014 年, Zhang 课题组结合 Lambda 外切酶与 2-氨基嘌呤(2-aminopurine)发展了一种新型无需淬灭基团标记(Quencher-free)的 miRNA 检测方法^[37]。2-氨基嘌呤是一种具有荧光信号的腺嘌呤类似物, 其荧光信号在 DNA 链中会被邻近的碱基所淬灭^[38]。如图 6 所示, 一条含有 2-氨基嘌呤的 DNA 探针可捕获待测 miRNA, 在聚合酶和切口酶的共同催化作用下, 形成可被 Lambda 外切酶作用的底物, 导致 2-氨基嘌呤分子从 DNA 链中释放出来, 产生强烈荧光信号。这种方法操作简单, 只需一步反应即可完成, 不需要额外修饰淬灭基团。除 Lambda 外切酶外, 外切酶 III^[39]和 T7 外切酶^[40]也可应用于 miRNA 的检测。

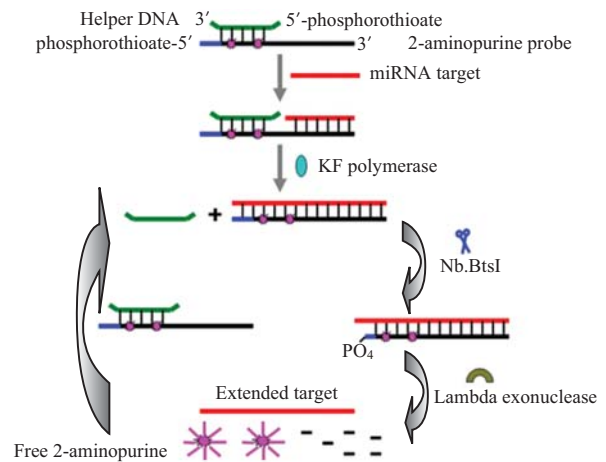


图 6 基于 2-氨基嘌呤和 Lambda 外切酶的信号扩增技术用于 miRNA 检测示意图

Fig. 6 Scheme of 2-aminopurine and Lambda exonuclease-assisted signal amplification method for miRNA assay

5 基于双链特异性核酸酶的信号扩增技术

双链特异性核酸酶(Duplex Specific Nuclease, DSN)能特异性识别并切割双链 DNA 或杂交链 DNA/RNA 中的 DNA, 但对单链 DNA、单链或双链 RNA 均没有切割作用。DSN 被广泛应用于基因工程领域, 但由于其独特切割方式, 也被用于 miRNA 检测。Ye 课题组于 2012 年将 DSN 用于 miRNA 分析^[41]。如图 7 所示, 这种方法采用传统 Taqman 探针。当反应体系中不存在待测 miRNA 时, Taqman 探针保持单链状态不会被 DSN 切割, 因而荧光背景信号很低。当在反应体系中加入待测 miRNA 后, 其与 Taqman 探针形成完全配对的 DNA/RNA 杂交链。DSN 能够识别杂交链并切割其中的 DNA 链(即 Taqman 探针), 导致荧光基团和淬灭基团分离, 产生增强荧光信号。释放的 miRNA 可结合新的 Taqman 探针参与 to 下一个循环中。这种方法极为简单, 一步反应即可完成, 灵敏度可达 0.1 pM 。基于类似的原理, Yang 课题组^[42]将 Taqman 探针换成成分

子信标,改善了 miRNA 检测的特异性,可分辨具有单个碱基错配的 miRNA。此外,Zhou 课题组^[43]利用 DSN 对杂交链特异性切割,产生一段具有催化活性的 8-17 DNAzyme。这种 DNAzyme 能特异性切割发夹分子信标,产生增强荧光信号。

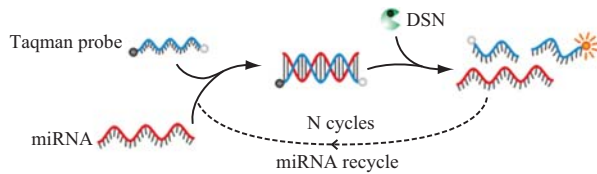


图 7 基于双链特异性核酸酶的信号扩增技术用于 miRNA 检测示意图

Fig. 7 Scheme of DSN-assisted signal amplification method for miRNA assay

利用金纳米粒子的高效荧光淬灭功能,Fiammengo 课题组^[44]发展了一种新的 miRNA 检测方法。如图 8 所示,他们在金纳米粒子表面修饰 DNA 荧光探针,由于荧光分子与金纳米之间的距离很近,荧光信号被淬灭。当加入待测 miRNA,其与荧光探针形成杂交链结构,该结构被 DSN 识别并切割,使荧光探针远离金纳米表面,产生增强荧光信号。释放的 miRNA 可进入下一个循环去形成更多的 DSN 作用底物,导致

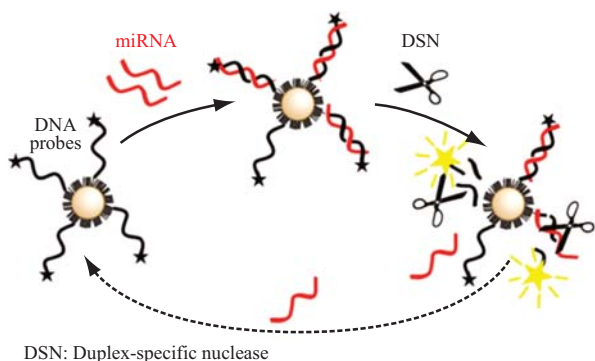


图 8 基于金纳米粒子与双链特异性核酸酶的信号扩增技术用于 miRNA 检测示意图

Fig. 8 Scheme of gold nanoparticles and DSN-assisted signal amplification method for miRNA assay

荧光信号的循环放大。除金纳米外,DSN 结合其他纳米材料也可用于 miRNA 的检测^[45,46]。

6 无酶信号扩增技术

上述四类信号扩增技术都必须依赖于蛋白酶的催化作用,如聚合酶、切口酶、外切酶和 DSN 等。为了发展一种更为简单的 miRNA 检测方法,无需蛋白酶参与(Enzyme-free)的信号扩增技术引起研究者的重视。杂交链式反应(Hybridization Chain Reaction, HCR)是一种典型的无酶扩增技术,其利用待测目标物作为启动器,依次打开两条部分互补配对的发夹 DNA,形成具有多个重复单元的双链 DNA^[47]。如图 9 所示^[48],在不存在 miRNA 的情况下,两条具有部分互补序列的发夹 DNA 荧光探针各自保持独立状态。当加入待测 miRNA,其中一条发夹 DNA 被打开,引发第二条发夹 DNA 结构的改变,依此方式不断循环,最后形成一段较长带有许多荧光分子的双链 DNA。由于双链 DNA 具有刚性结构,能够直立在氧化石墨烯表面,导致荧光分子与氧化石墨烯的距离增大,减弱荧光淬灭效果。此外,基于发夹 DNA 设计的无酶扩增也可用于 miRNA 检测^[49,50]。

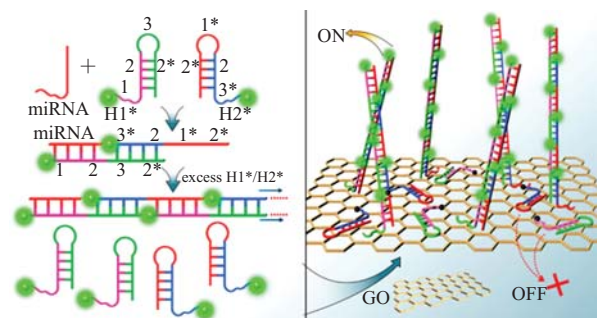


图 9 基于杂交链式反应的信号扩增技术用于 miRNA 检测示意图

Fig. 9 Scheme of HCR-based signal amplification method for miRNA assay

7 结论与展望

近年来, 信号扩增技术以其灵敏度高、特异性强和快速简便等优点日益受到研究者的关注。本文主要针对应用广泛的信号扩增技术, 包括链置换扩增、滚环扩增、基于外切酶的信号扩增、基于双链特异性核酸酶的信号扩增和无酶信号扩增技术等, 介绍了 miRNAs 检测的最新研究进展。因为在实际临床样本(如血清)中 miRNA 含量通常非常低, 如何建立一种简单高效的基于信号扩增的荧光技术显得尤为重要。未来的发展方向应聚焦于提高检测灵敏度与拓展复杂样品分析两个方面, 使该技术在生物学研究和临床早期诊断中得到广泛应用。

参 考 文 献

- [1] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(2): 126-139.
- [2] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(9): 597-610.
- [3] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(11): 857-866.
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [5] Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2004, 5(5): 396-400.
- [6] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis [J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(3): 189-198.
- [7] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues [J]. *Oncogene*, 2006, 25(17): 2537-2545.
- [8] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. *Cancer Research*, 2005, 65(16): 7065-7070.
- [9] Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers [J]. *British Journal of Cancer*, 2010, 102(7): 1174-1179.
- [10] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, 294(5543): 853-858.
- [11] Thomson JM, Parker J, Perou CM, et al. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression [J]. *Nature Methods*, 2004, 1(1): 47-53.
- [12] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(20): e179.
- [13] Walker GT, Little MC, Nadeau JG, et al. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(1): 392-396.
- [14] Van Ness J, Van Ness LK, Galas DJ. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(8): 4504-4509.
- [15] Tan E, Wong J, Nguyen D, et al. Isothermal DNA amplification coupled with DNA nanosphere-based colorimetric detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(24): 7984-7992.
- [16] Jia HX, Li ZP, Liu CH, et al. Ultrasensitive detection of microRNAs by exponential isothermal amplification [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(32): 5498-5501.
- [17] Zhang Y, Zhang CY. Sensitive detection of microRNA with isothermal amplification and a single-quantum-dot-based nanosensor [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(1): 224-231.

- [18] Wang GL, Zhang CY. Sensitive detection of microRNAs with hairpin probe-based circular exponential amplification assay [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(16): 7037-7042.
- [19] Shi C, Liu Q, Ma CP, et al. Exponential strand-displacement amplification for detection of microRNAs [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(1): 336-339.
- [20] Wang K, Zhang K, Lv Z, et al. Ultrasensitive detection of microRNA with isothermal amplification and a time-resolved fluorescence sensor [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 57: 91-95.
- [21] Liu YQ, Zhang M, Yin BC, et al. Attomolar ultrasensitive microRNA detection by DNA-scaffolded silver-nanocluster probe based on isothermal amplification [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(12): 5165-5169.
- [22] Wang XP, Yin BC, Ye BC. A novel fluorescence probe of dsDNA-templated copper nanoclusters for quantitative detection of microRNAs [J]. *RSC Advances*, 2013, 3: 8633-8636.
- [23] Yin BC, Liu YQ, Ye BC. Sensitive detection of microRNA in complex biological samples via enzymatic signal amplification using DNA polymerase coupled with nicking endonuclease [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(23): 11487-11493.
- [24] Zhou DM, Du WF, Xi Q, et al. Isothermal nucleic acid amplification strategy by cyclic enzymatic repairing for highly sensitive microRNA detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(14): 6763-6767.
- [25] Zhang Q, Chen F, Xu F, et al. Target-triggered three-way junction structure and polymerase/nicking enzyme synergetic isothermal quadratic DNA machine for highly specific, one-step, and rapid microRNA detection at attomolar level [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(16): 8098-8105.
- [26] Lizardi PM, Huang XH, Zhu ZR, et al. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification [J]. *Nature Genetics*, 1998, 19(3): 225-232.
- [27] Jonstrup SP, Koch J, Kjems J. A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification [J]. *RNA*, 2006, 12(9): 1747-1752.
- [28] Cheng Y, Zhang X, Li Z, et al. Highly sensitive determination of microRNA using target-primed and branched rolling-circle amplification [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(18): 3268-3272.
- [29] Liu HY, Li L, Duan LL, et al. High specific and ultrasensitive isothermal detection of microRNA by padlock probe-based exponential rolling circle amplification [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(16): 7941-7947.
- [30] Zeng YP, Zhu GC, Yang XY, et al. A quantum dot-based microRNA nanosensor for point mutation assays [J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(54): 7160-7162.
- [31] Zhou Y, Huang Q, Gao J, et al. A dumbbell probe-mediated rolling circle amplification strategy for highly sensitive microRNA detection [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(15): e156.
- [32] Li Y, Liang L, Zhang CY. Isothermally sensitive detection of serum circulating miRNAs for lung cancer diagnosis [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(23): 11174-11179.
- [33] Ge J, Zhang LL, Liu SJ, et al. A highly sensitive target-primed rolling circle amplification (TPRCA) method for fluorescent in situ hybridization detection of microRNA in tumor cells [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(3): 1808-1815.
- [34] Zhang LR, Zhu G, Zhang CY. Homogeneous and label-free detection of microRNAs using bifunctional strand displacement amplification-mediated hyperbranched rolling circle amplification [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(13): 6703-6709.
- [35] Xu F, Shi H, He X, et al. Concatemeric dsDNA-templated copper nanoparticles strategy with improved sensitivity and stability based on rolling circle replication and its application in microRNA detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(14): 6976-6982.
- [36] Duan RX, Zuo XL, Wang ST, et al. Lab in a tube:

- ultrasensitive detection of microRNAs at the single cell level and in breast cancer patients using quadratic isothermal amplification [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(12): 4604-4607.
- [37] Zhu G, Liang L, Zhang CY. Quencher-free fluorescent method for homogeneously sensitive detection of microRNAs in human lung tissues [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(22): 11410-11416.
- [38] Mitsis PG, Kwagh JG. Characterization of the interaction of lambda exonuclease with the ends of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(15): 3057-3063.
- [39] Huang RC, Chiu WJ, Li YJ, et al. Detection of microRNA in tumor cells using exonuclease III and graphene oxide-regulated signal amplification [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(24): 21780-21787.
- [40] Cui L, Zhu Z, Lin NH, et al. A T7 exonuclease-assisted cyclic enzymatic amplification method coupled with rolling circle amplification: a dual-amplification strategy for sensitive and selective microRNA detection [J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(13): 1576-1578.
- [41] Yin BC, Liu YQ, Ye BC. One-Step, multiplexed fluorescence detection of microRNAs based on duplex-specific nuclease signal amplification [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(11): 5064-5067.
- [42] Lin XY, Zhang C, Huang YS, et al. Backbone-modified molecular beacons for highly sensitive and selective detection of microRNAs based on duplex specific nuclease signal amplification [J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(65): 7243-7245.
- [43] Tian T, Xiao H, Zhang Z, et al. Sensitive and convenient detection of microRNAs based on cascade amplification by catalytic DNAzymes [J]. *Chemistry-A European Journal*, 2013, 19(1): 92-95.
- [44] Degliangeli F, Kshirsagar P, Brunetti V, et al. Absolute and direct microRNA quantification using DNA-gold nanoparticle probes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(6): 2264-2267.
- [45] Guo S, Yang F, Zhang YL, et al. Amplified fluorescence sensing of miRNA by combination of graphene oxide with duplex specific nuclease [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(11): 3598-3603.
- [46] Xi Q, Zhou DM, Kan YY, et al. Highly sensitive and selective strategy for microRNA detection based on WS2 nanosheet mediated fluorescence quenching and duplex-specific nuclease signal amplification [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(3): 1361-1365.
- [47] Dirks RM, Pierce NA. Triggered amplification by hybridization chain reaction [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(43): 15275-15278.
- [48] Yang L, Liu CH, Ren W, et al. Graphene surface-anchored fluorescence sensor for sensitive detection of microRNA coupled with enzyme-free signal amplification of hybridization chain reaction [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2012, 4(12): 6450-6453.
- [49] Jiang ZZ, Wang H, Zhang XB, et al. An enzyme-free signal amplification strategy for sensitive detection of microRNA via catalyzed hairpin assembly [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(23): 9477-9482.
- [50] Zhu D, Zhang L, Ma W, et al. Detection of microRNA in clinical tumor samples by isothermal enzyme-free amplification and label-free graphene oxide-based SYBR Green I fluorescence platform [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 65: 152-158.