

• 综 述 •

基于双链特异性核酸酶水解信号放大检测 miRNA 的方法学进展*

秦荟钧¹, 王树急¹综述, 段晓雷^{1,2△} 审校

1. 遵义医科大学附属医院医学检验科, 贵州遵义 563000;

2. 遵义医科大学检验医学院, 贵州遵义 563000

摘 要:微小 RNA(miRNA)作为肿瘤等多种疾病相关的一类核酸标志物,在疾病早期或预后阶段水平极低,需要提高 miRNA 检测灵敏度。双链特异性核酸酶(DSN)是近年来新发现的一种特异性水解 DNA-RNA 杂交链中 DNA、而对单链 RNA 不产生作用的核酸酶;利用其酶切特性可导致 miRNA 循环再利用,从而实现 miRNA 检测信号放大。目前基于 DSN 酶切放大效应检测 miRNA 为一项热点研究,其与等温扩增及纳米材料相结合,主要在 DSN 介导的比色传感器、荧光传感器、电化学及电化学发光传感器等方面发展出许多 miRNA 检测新方法,为医学检验工作者提供了极具前景的 miRNA 技术工具。巧妙设计 DNA 探针、克服 DSN 部分局限性、增加新型纳米材料等则是基于 DSN 酶切放大效应检测 miRNA 新方法的未来研究发展方向。

关键词:微小 RNA; 双链特异性核酸酶; 生物传感器; 信号放大

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.02.020

中图法分类号:R446.9

文章编号:1673-4130(2023)02-0231-05

文献标志码:A

The methodological progress of duplex-specific nuclease-based signal amplification for microRNA detection*

QIN Huijun¹, WANG Shuji¹, DUAN Xiaolei^{1,2△}

1. Department of Medical Laboratory, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi,

Guizhou, 563000, China; 2. College of Medical Laboratory, Zunyi Medical

University, Zunyi, Guizhou 563000, China

Abstract: miRNA is one kind of nucleic acid biomarkers related to tumor and other diseases. The content of is miRNA extremely low in the early or prognostic stages of mentioned diseases, and the detection sensitivity of miRNA need to be improved. Duplex-specific nuclease (DSN) is a newly discovered nuclease that specifically hydrolyze DNA in DNA-RNA hybridization chains but not hydrolyze single stranded RNA, and the enzyme digestion property can be used to recycle miRNA and amplify miRNA detection signal. At present, miRNA detection based on DSN digestion amplification effect is a hot research, which mainly in DSN mediated colorimetric sensors, fluorescence sensors, electrochemistry and electroluminescence sensors combining with different isothermal amplifications and a variety of nanomaterials. It provides some promising miRNA analysis tools for medical laboratory. How to design DNA probes ingeniously, to overcome some limitations of DSN enzymatic activity and to add new nanomaterials are the future research directions of the new miRNA detecting methods based on DSN amplification effect.

Key words: miRNA; duplex-specific nuclease; biosensors; signal amplification

微小 RNA(miRNA)是一类长度约 21~23 nt 的短链非编码 RNA 分子,其通过与靶向 mRNA 结合在基因沉默和翻译表达中发挥作用,在基因表达调控中以及广泛的生理、病理过程中具有重要的功能^[1]。有研究表明,miRNA 与肿瘤发生、发展密切相关^[2]。因此,在肿瘤等疾病的早期筛查中检测特异性 miRNA 具有重要的临床意义。但是由于在发病早期或预后阶段血液中某种 miRNA 水平极低^[3],因此临床诊断

miRNA 需要高度灵敏的检测方法。目前 miRNA 常见的检测方法主要包括探针杂交与扩增技术,前者包括 Northern 印迹技术、微阵列芯片技术等^[4],后者有实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)、测序技术等^[5]。但是由于实验中放射性元素的使用,临床样品对聚合酶的抑制作用,以及所需的设备和试剂成本高等相关问题,导致传统的 miRNA 检测方法在灵敏度和特异度方面存在一定局限;而目前芯片技术虽能实

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82160409);重庆市基础研究与前沿探索项目/重庆市自然科学基金(cstc2018jcyjAX0201);贵州省科技厅基础研究项目(黔科合基础[2018]1196);贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwmkj2019-1-196)。

△ 通信作者, E-mail: duanxiaolei0@163.com。

现快速、高通量的检测,但其缺点是重复性和准确性较差^[6],所以研发出高灵敏、高特异检测 miRNA 的新方法尤为重要。

近几年来,核酸等温扩增技术发展迅速,主要包括滚环扩增技术(RCA)^[7]、环介导等温扩增技术(LAMP)^[8]、催化发夹自组装(CHA)^[9]等,可以有效对靶标核酸分子进行信号放大;其中,基于双链特异性核酸酶(DSN)水解反应的信号放大策略是一类比较特殊的等温扩增技术,其具有仅水解 DNA-RNA 杂交链中 DNA 的特点^[10]。DSN 是一种降解双链核酸中 DNA 链的蛋白酶,其作为非特异性 DNA/RNA 内切酶家族中的一员,其表现出独特的底物选择性^[11],DSN 仅水解 dsDNA 或 DNA-RNA 杂交链中 DNA,对单链 DNA 或 RNA 不裂解,且与核苷酸序列无关^[10],非常适宜检测 RNA 类靶标分子。近年来,DSN 水解反应被作为一种新的信号放大策略正在被逐渐广泛用于 miRNA 的高灵敏度检测中,基于 DSN 水解反应特性对靶标分子 miRNA 实现循环再利用,促使微量的 miRNA 触发大量“信号分子”的释放,从而显著提高了检测方法的灵敏度^[12]。本文着重分析与归纳了 DSN 介导的比色传感器、荧光传感器、电化学与电化学发光传感器检测 miRNA 的方法学研究进展,帮助医学检验工作者认识此类新兴技术在本领域的最新发展。同时还讨论了基于 DSN 水解放大效应检测 miRNA 新方法研究所面临的挑战及在医学检验应用中的巨大前景。

1 DSN 介导的比色传感器检测 miRNA

比色测定法为 miRNA 的检测提供了快速便捷的选择,其无需任何先进的仪器,甚至可以用肉眼观察结果^[13]。在 2012 年,TIAN 等^[14]最早成功设计出基于 DSN 的 miRNA 灵敏且便捷的比色检测新方法。该方法主要是通过 DSN 水解 DNA 探针-miRNA 杂交链中 DNA 部分,使 miRNA 循环利用,而 DNA 剩余部分形成 G-四链体(单链富含 G 序列)与血红素结合具有过氧化物酶活性,从而使 2,2'-叠氮基双(3-乙基苯并噻唑啉)-6-磺酸(ABTS²⁻)氧化,与 H₂O₂ 反应引起底物颜色变化^[15]。该传感器的优点是无需昂贵的设备即可实现靶标分子的裸眼检测,并且在系统中,无需标记探针就可以有效放大检测信号。基于其检测优点,该方法可被开发成商业试剂盒,并用于实际样品分析。因此,其检测潜力非常可观。

为了进一步构建灵敏度高与方便快捷的新型 miRNA 比色检测技术,王奎宇等^[16]将 DSN 与 CHA 等温扩增技术相结合研发出一种双重放大信号的方法。该实验以试纸条作为信号输出方式用于 miRNA 的检测,DSN 循环反应酶切释放 CHA 的启动序列并引发 CHA 反应,最终的产物可以在试纸条检测线上出现红线。该实验的最低检测限可达 7.66 pmol/L,且能够区分单碱基序列;这种体系以试纸条作为稳

定、低廉的信号输出方式,且无需昂贵的染料标记物,在今后 miRNA 的临床诊断领域中提供了全新的检测手段。

最近,CHOI 等^[17]开发了一种短时间(30 min)内快速检测靶标 miRNA 的比色方法,这种检测 miRNA 的高效诊断工具是基于 nPfu DNA 聚合酶^[18]进行引物延伸来进行比色测定。该方法采用 Cu²⁺ 螯合 pp 探针(焦磷酸盐传感探针)来识别引物延伸过程中产生焦磷酸盐,然后 Cu²⁺ 和焦磷酸盐形成的复合物会从探针中去除 Cu²⁺,从而导致颜色的变化^[19]。这种巧妙的发夹结构介导的诊断方法可以通过焦磷酸盐的传感实现非常简单和快速的 miRNA 比色检测;该传感器的优点在于整个检测过程仅需要 30 min,并且其在人血清中的 miRNA 检测限较低,可进一步发展为床旁即时检测(POCT)。上述这些比色传感新方法都清晰的表明,DSN 介导的比色传感器检测 miRNA 新方法正在逐步满足诊断的重要要求:快速、高灵敏度、即时检测,在临床应用中显示出广阔前景。

2 DSN 介导的荧光传感器检测 miRNA

由于荧光传感器具有灵活简便、检测限低和易于操作等特点,因此在各种靶标分子的检测方法学研究中应用广泛。然而,靶标 miRNA 通常处于低丰度状态,常规的荧光检测无法定量检测出低浓度的 miRNA(特别是在临床标本中),限制了荧光技术在低浓度 miRNA 检测领域的发展。近年来,基于 DSN 水解反应的 miRNA 信号放大策略很好地解决了上述困境,DSN 水解 miRNA-DNA 杂交双链中的 DNA 部分,miRNA 解离后可循环利用,将微量 miRNA 信号转变为大量的 DNA 信号,再结合荧光技术的优势,可以很好地改善低浓度 miRNA 检测效果。为了设计出一种新型恒温信号放大方法用于 miRNA 的高灵敏度检测,李晓利等^[20]将氧化石墨烯(GO)与 DSN 水解放大效应相结合。由于 DSN 可以水解双链中的 DNA 而不降解 miRNA,GO 对酶切产生的 DNA 碎片吸附能力显著降低,使得荧光基团远离 GO 表面而不被淬灭,通过 DSN 的不断酶切作用,荧光信号可以得到显著放大。该方法的优点是直接方便、灵敏度高,而且全程在恒温下进行,因此技术上易于实施。

除了结合使用常规的纳米材料作为检测 miRNA 外,PENG 等^[21]还设计了一种通过 DSN 辅助裂解荧光信号,再利用流式细胞术(FCM)灵敏、特异地检测出多种 miRNA。带有荧光纳米球(FS)的单链 DNA(ssDNA)固定在二氧化硅(SiO₂)微球表面上,形成 SiO₂-ssDNA-FS 探针;当靶标 miRNA 与 SiO₂-ssDNA-FS 探针杂交后,DSN 选择性地水解 ssDNA,并通过多个循环释放 FS,使得 SiO₂-ssDNA-FS 的荧光信号明显衰减,从而显著提高靶标 miRNA 的检测灵敏度。它还实现了对临床血液标本 miRNA 的简单、准确和定量检测。该研究新方法的优点正是基于

DSN 辅助 miRNA 循环再利用,并借助临床检验中常用的 FCM 技术用于 miRNA 检测,并且该方法允许在体外临床血液样品中 miRNA 的多重检测。该方法作为一种新颖的一步式淬灭荧光信号传感器,具有较高的精确度和灵敏度,可成功检测临床样品,未来该方法在肿瘤相关 miRNA 等的早期临床诊断中具有巨大的潜力。

miRNA 家族成员通常是高度同源的序列,甚至只有一个碱基的差异^[22],由于 DSN 只具有核酸双链体特异性而非序列特异性,因此进一步研发基于 DSN 的高特异性 miRNA 检测新方法至关重要。XIAO 等^[23]设计了一种新型的纳米探针——MoS₂ 纳米材料的分子信标(MBs)用于 DSN 介导的 miRNA 高灵敏度和特异度检测。MoS₂ 纳米材料不仅表现出对 MBs 的高亲和力,而且还充当了 MBs 的有效淬灭剂^[24];MoS₂ 与 DSN 结合的强淬灭荧光能力有助于该方法获得更高的灵敏度,其检测限(LOD)比传统检测方法低 4 个数量级;由于 MBs 和 DSN 的单碱基区分能力,还显示出较高的选择性,可用于区分具有单一碱基差异的同类 miRNA 序列;此外,装载 MoS₂ 的 MBs 纳米探针还可用于 miRNA 的多重检测。鉴于其高灵敏度和多重检测功能,这种新型传感器在生物医学研究和临床诊断中具有广阔的应用前景。

除了上述常规的基于 DSN 的荧光传感器检测 miRNA 外,还有新开发的基于磁性纳米材料及以量子点为信号分子的荧光生物传感器。目前在已经报道出多种基于 DSN 的 miRNA 检测生物传感器,其常常采用多种有机染料作为“信号分子”,并且他们大多数都结合一些功能强大的纳米材料例如金纳米(AuNPs)、氧化石墨烯(GO)、MoS₂ 纳米片等来淬灭荧光团的荧光,以设计新颖的基于 DSN 的 miRNA 生物传感器^[25-26]。由于这些检测方法具有可量化、高灵敏度和特异度等优点,因此检测 miRNA 效果更佳。研究表明,磁性纳米珠(MNs)由于其优异的磁选性能,在磁芯组装方面具有广阔的应用前景^[27-28],并且量子点在同时检测多种病毒核酸序列或病毒粒子方面具有独特的优势^[29]。最近,WANG 等^[30]设计了一种利用磁性纳米珠和量子点组装的“卫星结构”用于检测多种肠道病毒 71 型(EV71)相关的 miRNA,通过记录悬浮液中量子点的荧光信号,还可以轻松实现定量检测。该磁性纳米材料及量子点形成的“卫星结构”,结合 DSN 水解反应实现靶标 miRNA 循环,既降低了样品污染和降解的风险,又可以同时检测多种 miRNA。目前,该方法已成功用于监测 EV71 感染细胞在不同时间点的 miRNA 表达水平,充分展示了其诊断与治疗应用的潜力。

3 DSN 介导的电化学传感器检测 miRNA

电化学传感器与荧光、比色传感器相比,具有检测灵敏度高、专一性强、操作简便且能在复杂体系的

临床标本中实现 miRNA 检测等优势^[31];电化学发光法则进一步在电极表面发生电化学反应与化学发光持续循环进行,实现超高灵敏度分析与显著光学信号检测^[32]。近年来,利用 DSN 水解效应放大 miRNA 信号并基于电化学与电化学发光平台,研发出许多独具匠心的新型生物传感器。2019 年,ZHUANG 等^[33]研发出一种偶联捕获探针(CPs)的 AuNP 修饰金电极(AuNP-AuE)的电化学生物传感器,用于胃癌血清中 miR-100 的快速、灵敏和特异性检测。当靶标 miR-100 与 CPs 在电极表面杂交,加入 DSN 水解杂交链中的 CPs 部分使电极的暴露产生电化学信号;该电化学传感器对 miR-100 的检测范围为 100 aM~10 pM,检测限(LOD)大约为 10 aM,且可直接用于临床胃癌血清中的 miRNA 检测,因此该方法在恶性肿瘤的早期临床诊断中有着巨大发展潜力。

为了突破生物识别组件的保质期有限与非特异性吸附等电化学检测中的技术“瓶颈”,WANG 等^[34]在电极表面共修饰金纳米和银纳米颗粒(AgNPs)中成功的开发了一种高度特异性检测靶标 miRNA 的电化学生物传感器。在存在靶标 miRNA 的情况下,AuNPs 上的 DNA 与 miRNA 杂交,加入 DSN 将水解杂交链中的 DNA,裸露 AuNPs 允许 AgNPs 结合产生电化学信号;而干扰性 miRNA 存在时则 DSN 反应不发生,AuNPs 上的 DNA 阻碍 AgNPs 结合而无电化学信号。该方法最大优点在于有效区分检测靶标 miRNA 和干扰性 miRNA,LOD 低至 0.62 fM,未来该传感器可能用于 miRNA 相关生物医学研究和疾病诊断的 miRNA 生物标志物筛选。

近年来,新型纳米材料被逐渐应用于 miRNA 的高灵敏、高特异的电化学发光检测研究中。2017 年,南京大学的 HUO 等^[35]利用静电斥力和体积排斥作用研发出一种基于 AuNPs 修饰的 DNA 探针(DNA-AuNPs)与鲁米诺阴离子探针、阳极氧化铝(AAO)纳米孔电极协同作用的 miRNA 电化学发光传感器。当靶标 miR-107 存在并与 AuNPs 修饰的 DNA 探针杂交时,加入 DSN 可水解其中 DNA 部分,AAO 反应膜上的鲁米诺电化学发光信号增强;相反,没有靶标 miRNA 时 AAO 反应膜上的 Ru(bpy)₃²⁺ 电化学发光信号增强。该双阳性信号体系可高灵敏、高特异地检测 miRNA,并调整捕获 DNA 探针序列就可扩展到其他 miRNA 的检测应用中。

ZHU 等^[36]首次提出了一种基于 DSN 酶切循环和量子点修饰西瓜种子状介孔纳米球的双信号放大电化学发光(ECL)生物传感器。通过嵌入 CdTe 量子点成功制备了纳米微晶纳米粒子(mSQSNSs)进入到二氧化硅的介孔材料从而极大增加了电化学发光的信号;当靶标 miRNA 存在时,AuNPs 修饰的磁珠(Fe₃O₄@Au)表面的发卡型 DNA 探针被打开,加入 DSN 水解 DNA-miRNA 杂交链中的 DNA 部分产生

连接短链 DNA 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Au}$, 并进一步与 mSQSNSs 耦联形成电化学发光的二次信号放大, 巨大的纳米复合物富集在电化学发光电极表面产生信号。该电化学发光法检测 miRNA 达到 33 fM, 并实现临床血液标本检测, 为肿瘤早期筛查提供了潜在的技术工具。

4 总结与展望

综上所述, 基于 DSN 水解反应信号放大策略在特异性检测体内微量浓度 miRNA 方面具有独特的优势, 其只水解与 miRNA 互补的 DNA 序列, 靶标 miRNA 得以循环再利用; 这使得基于 DSN 的 miRNA 检测分析新方法因其优越的传感性能而备受关注^[37-38]。基于 DSN 新方法的灵敏度和特异度与 miRNA 分析金标准 (qRT-PCR 方法) 相似, 但比 qRT-PCR 方法更快、更方便、更便宜; 其结合比色、荧光、电化学、电化学发光等分析平台, 近年来已经发展出多种类型的 miRNA 检测新策略和新方法。基于 DSN 的信号放大策略是目前提高 miRNA 检测灵敏度和特异度的最有效方法之一, 在特定 miRNA 的早期诊断中显示出良好的潜力。

当然, 尽管基于 DSN 信号放大策略检测 miRNA 的方法学领域已经取得了许多重要进展, 但是要真正实现临床实际样品中 miRNA 的高选择性和高灵敏度的普适性检测方法仍面临许多挑战。其中, 与靶标 miRNA 结合 DNA 探针的设计应是目前基于 DSN 水解反应放大策略检测 miRNA 时最大的问题, 这主要是由于传统 ssDNA 探针与 DSN 反应前后都会存在 ssDNA 的非特异性后续反应的假阳性信号; 近年来人们逐渐引入发卡结构探针^[17]、双发卡探针^[39]、G4 DNA 探针^[40]等抵消非特异单链 DNA 导致的假阳性。另一方面, DSN 的酶活性本身有一定的局限性: DSN 需要至少 10 bp 的杂交底物才能有效切割^[41], DSN 只切割双链 DNA (不具有序列特异性) 使得多重检测难以实现^[11]; 因此, 需要额外的材料、新策略来辅助提升检测低丰度 miRNA 的分析灵敏度, 正如本文归纳描述中的纳米技术和新型材料 (金纳米颗粒、石墨烯、磁珠、量子点等) 被大量引入基于 DSN 放大策略检测 MiRNA 的新方法中^[42-43], 用来增加探针的数量或检测信号的强度。这些问题的逐渐解决正是未来更多新颖的 DSN 信号放大策略检测 miRNA 的方法学研究的前进方向, 科研人员不断开发出更加灵敏、稳定、高通量的 miRNA 生物传感器, 将在肿瘤等疾病相关 miRNA 的临床标本早期检测领域中取得更加丰硕的成果。

参考文献

- [1] AZLAN A, RAJASEGARAN Y, KANG ZI K, et al. Elucidating miRNA function in cancer biology via the molecular genetics' toolbox[J]. *Biomedicine*, 2022, 10(4): 915.
- [2] GAHLAWAT A W, FAHED L, WITTE T, et al. Total cir-

- culating microRNA level as an independent prognostic marker for risk stratification in breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2022, 127(1): 156-162.
- [3] HE B, ZHAO Z, CAI Q, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2628-2647.
- [4] JET T, GINES G, RONDELEZ Y, et al. Advances in multiplexed techniques for the detection and quantification of microRNAs[J]. *Chem Soc Rev*, 2021, 50(6): 4141-4161.
- [5] CADONI E, MANICARDI A, MADDER A. PNA-based microRNA detection methodologies[J]. *Molecules*, 2020, 25(6): 1296.
- [6] REN A, DONG Y, TSOI H, et al. Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer[J], 2015, 16(2): 2810-2823.
- [7] XIAO F, LIU J, GUO Q, et al. Dual-signal amplification strategy for sensitive microRNA detection based on rolling circle amplification and enzymatic repairing amplification[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(50): 32738-32743.
- [8] TRAN D H, PHUNG H J J O P D. Detecting Fasciola hepatica and Fasciola gigantica microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *J Parasit Dis*, 2020, 44(2): 364-373.
- [9] WU Y, FU C, SHI W, et al. Recent advances in catalytic hairpin assembly signal amplification-based sensing strategies for microRNA detection [J]. *Talanta*, 2021, 235: 122735.
- [10] QIU X, ZHANG H, YU H, et al. Duplex-specific nuclease-mediated bioanalysis[J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(3): 180-188.
- [11] ZHOU X, CAO H, ZENG Y. Microfluidic circulating reactor system for sensitive and automated duplex-specific nuclease-mediated microRNA detection [J]. *Talanta*, 2021, 232: 122396.
- [12] WU Y, CUI S, LI Q, et al. Recent advances in duplex-specific nuclease-based signal amplification strategies for microRNA detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 165: 112449.
- [13] YOU Z, YANG Z, CHEN Y, et al. Visual detection of heart failure associated MiRNA with DSN enzyme-based recycling amplification strategy[J]. *RSC Adv*, 2021, 11(29): 18068-18073.
- [14] TIAN T, XIAO H, ZHANG Z, et al. Sensitive and convenient detection of microRNAs based on cascade amplification by catalytic DNAzymes[J]. *Chemistry*, 2013, 19(1): 92-95.
- [15] CHEN Y, QIU D, ZHANG X, et al. Highly sensitive biosensing applications of a magnetically immobilizable covalent g-quadruplex-hemin DNAzyme catalytic system[J]. *Anal Chem*, 2022, 94(4): 2212-2219.
- [16] 王奎宇, 卜胜君, 王月, 等. DSN 结合 CHA 用于 miRNA 的可视化检测[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017, 60(10): 13-16.
- [17] CHOI M H, SEO Y J. Rapid and highly sensitive hairpin structure-mediated colorimetric detection of miRNA[J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1176: 338765.

- [18] WANG G, DING X, HU J, et al. Unusual isothermal multimerization and amplification by the strand-displacing DNA polymerases with reverse transcription activities [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):13928.
- [19] PANDITH A, SEO Y J. Label-free sensing platform for miRNA-146a based on chromo-fluorogenic pyrophosphate recognition [J]. *J Inorg Biochem*, 2020, 203: 110867.
- [20] 李晓利, 王愈聪, 张学晶, 等. 双链特异性核酸酶介导的高灵敏度 microRNA 分析[J]. *化学学报*, 2014, 72(3):395-400.
- [21] PENG W, HUANG Y, ZHAO Q, et al. A fluorescent signal "removal" sensor via duplex-specific nuclease-aided cleavage for miRNA detection in flow cytometry [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 185:110570.
- [22] LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4):1202-1207.
- [23] XIAO M, MAN T, ZHU C, et al. MoS(2) Nanoprobe for MicroRNA quantification based on duplex-specific nuclease signal amplification[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(9):7852-7858.
- [24] XIAO M, CHANDRASEKARAN A R, JI W, et al. Affinity-modulated molecular beacons on MoS(2) nanosheets for MicroRNA detection[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(42):35794-35800.
- [25] HE M, SHANG N, ZHENG B, et al. Ultrasensitive fluorescence detection of microRNA through DNA-induced assembly of carbon dots on gold nanoparticles with no signal amplification strategy[J]. *Mikrochim Acta*, 2022, 189(6):217.
- [26] HAN Y, QIU Z, NAWALE G N, et al. MicroRNA detection based on duplex-specific nuclease-assisted target recycling and gold nanoparticle/graphene oxide nanocomposite-mediated electrocatalytic amplification[J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 127:188-193.
- [27] TIAN B, MA J, QIU Z, et al. Optomagnetic detection of MicroRNA based on duplex-specific nuclease-assisted target recycling and multilayer core-satellite magnetic superstructures[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(2):1798-1806.
- [28] SUN Y, WANG C, TANG L, et al. Magnetic-enhanced fluorescence sensing of tumor miRNA by combination of MNPs @ PDA with duplex specific nuclease [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(5):2968-2975.
- [29] WANG J J, JIANG Y Z, LIN Y, et al. Simultaneous point-of-care detection of enterovirus 71 and coxsackievirus B3[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(21):11105-11112.
- [30] WANG J J, ZHENG C, JIANG Y Z, et al. One-step monitoring of multiple enterovirus 71 infection-related MicroRNAs using core-satellite structure of magnetic nanobeads and multicolor quantum dots[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(1):830-837.
- [31] 马雯, 吕微风, 郑磊. 电化学生物传感器在 microRNA 检测中的应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 28(2):114-121.
- [32] ZHAO J, CHEN C X, ZHU J W, et al. Ultrasensitive and visual electrochemiluminescence ratiometry based on a constant resistor-integrated bipolar electrode for MicroRNA detection[J]. *Anal Chem*, 2022, 94(10):4303-4310.
- [33] ZHUANG J, WAN H, ZHANG X. Electrochemical detection of miRNA-100 in the sera of gastric cancer patients based on DSN-assisted amplification[J]. *Talanta*, 2021, 225:121981.
- [34] WANG M, CHEN W, TANG L, et al. Duplex-specific nuclease assisted miRNA assay based on gold and silver nanoparticles co-decorated on electrode interface[J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1107:23-29.
- [35] HUO X L, YANG H, ZHAO W, et al. Nanopore-based electrochemiluminescence for detection of microRNAs via duplex-specific nuclease-assisted target recycling[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(38):33360-33367.
- [36] ZHU H Y, DING S N J B, BIOELECTRONICS. Dual-signal-amplified electrochemiluminescence biosensor for microRNA detection by coupling cyclic enzyme with CdTe QDs aggregate as luminophor[J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 134:109-116.
- [37] DM A, CH A, JING Z A, et al. Quantitative detection of exosomal microRNA extracted from human blood based on surface-enhanced Raman scattering[J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 101:167-173.
- [38] WANG M, CHEN W, TANG L, et al. Duplex-specific nuclease assisted miRNA assay based on gold and silver nanoparticles co-decorated on electrode interface[J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1107:23-29.
- [39] TAO Y, YIN D, JIN M, et al. Double-loop hairpin probe and doxorubicin-loaded gold nanoparticles for the ultrasensitive electrochemical sensing of microRNA[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 96:99-105.
- [40] LIU L Q, YIN F, LU Y, et al. A light-up "G-quadruplex nanostring" for label-free and selective detection of miRNA via duplex-specific nuclease mediated tandem rolling circle amplification[J]. *Nanomedicine*, 2021, 32:102339.
- [41] ZHAO Q, PIAO J, PENG W, et al. Simple and sensitive quantification of MicroRNAs via PS@ Au Microspheres-Based DNA probes and DSN-assisted signal amplification platform[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(4):3324-3332.
- [42] MAHANI M, KHAKBAZ F, JU H. Hairpin oligosensor using SiQDs: Förster resonance energy transfer study and application for miRNA-21 detection [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414(7):2505-2512.
- [43] TIAN B, MA J, QIU Z, et al. Optomagnetic detection of MicroRNA based on duplex-specific nuclease-assisted target recycling and multilayer core-satellite magnetic superstructures[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(2):1798-1806.