

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001523

基于链置换和催化发夹组装策略用于 miRNA 高灵敏生物传感检测

文 博¹, 赵 敏¹, 周晓燕¹, 程 伟², 丁小娟¹, 丁世家¹

(1. 重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第一医院临床分子医学检测中心, 重庆 400016)

【摘 要】目的:基于链置换扩增(strand displacement amplification, SDA)和催化发夹组装(catalytic hairpin assembly, CHA)级联放大策略构建电化学生物传感器用于 microRNA(miRNA)高灵敏检测。**方法:**靶标 miR-21 引发 SDA 获得大量与靶标 miR-21 相关的触发 DNA, 继而引发 CHA, 得到大量生物素标记的双链 DNA。然后, 所获得的双链 DNA 与修饰在电极表面的辅助探针杂交, 再利用生物素与链霉亲和素的特异性识别作用, 将含链霉亲和素的碱性磷酸酶(streptavidin-alkaline phosphatase, ST-AP)修饰在电极表面上, 在底物 α -萘酚磷酸酯(α -naphthyl phosphate, α -NPP)存在下, ST-AP 催化 α -NPP 水解, 在电极表面原位产生具有电化学活性的 α -萘酚(α -naphthol, α -NP), 获得电化学信号, 从而实现靶标 miR-21 的高灵敏检测。**结果:**在最优实验条件下, 所制备的 miR-21 生物传感器的线性范围为 0.1 pmol/L 至 10 nmol/L, 最低检测限为 60 fmol/L。**结论:**所设计的 miR-21 生物传感器展现出高的灵敏度和强的特异性, 将为临床上 miR-21 的检测提供新思路和新平台。

【关键词】电化学生物传感器; miRNA; 链置换扩增; 催化发夹组装

【中图分类号】TP212.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-10-11

Electrochemical biosensor based on strand displacement amplification and catalytic hairpin assembly strategy for highly sensitive detection of miRNA

Wen Bo¹, Zhao Min¹, Zhou Xiaoyan¹, Cheng Wei², Ding Xiaojuan¹, Ding Shijia¹

(1. Key Laboratory of Diagnostic Medicine Designated by the Ministry of Education;

2. Department of Molecular Diagnostic Center for Clinical Medicine,

The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct a high sensitive electrochemical biosensor for the detection of microRNA(miRNA) based on the strand displacement amplification(SDA) and catalytic hairpin assembly(CHA) cascading amplification strategy. **Methods:** Target miR-21 initiated SDA to obtain mass target-related DNA which could further trigger CHA to obtain mass biotin-labeled dsDNA. And then, the obtained biotin-labeled dsDNA was immobilized onto the surface of the electrode modified with auxiliary probe. Later, ST-AP was modified onto the electrode surface by the specific recognition of biotin and streptavidin. When the α -NPP was in the test buffer, α -NPP was catalyzed by ST-AP to in situ produce α -NP on the surface of the electrode. Finally, the electrochemical signal of α -NP was correlated with the concentration of miR-21. **Results:** Under the optimized experimental conditions, the prepared biosensor showed a linear response to miR-21 range from 0.1 pmol/L to 10 nmol/L with the limit of detection low to 60 fmol/L. **Conclusion:** The designed biosensor has been exhibited high sensitivity and excellent specificity, which may provide a new idea and new platform for clinical determination of miR-21.

【Key words】electrochemical biosensor; miRNA; strand displacement amplification; catalytic hairpin assembly

作者介绍: 文 博, Email: 844981729@qq.com,

研究方向: 分子诊断和生物传感。

通信作者: 丁世家, Email: dingshijia@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81572080)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180321.0922.010.html>

(2018-03-21)

MicroRNA(miRNA)是一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA,其大小长 20~25 个核苷酸^[1-2],在生命活动中扮演着至关重要的调控角色,可以抑制基因转录后的表达,包括细胞增殖、分化、凋亡及代谢等。许多研究表明,miRNA 的异常表达与人类疾病(如肺癌、腺癌、结肠癌、前列腺癌等)的发生发展、诊断预后等密切相关,已逐渐成为一种潜在的肿瘤标志物^[3-6]。目前,传统 miRNA 检测方法包括 Northern 印迹^[7]、聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)^[8]、微阵列^[9]等,但上述方法存在灵敏度低、耗时、操作步骤繁琐等局限性,进而促使研究者们进一步发展高灵敏、高特异性检测 miRNA 的分析方法。电化学分析技术因其成本低、体积小、操作简单、使用方便、灵敏度高和选择性强等优点可应用于高效检测 miRNA^[10-11]。为了进一步提高电化学分析技术检测 miRNA 的灵敏度,将结合高效核酸信号放大策略。

近年来,各种等温核酸放大策略已被广泛应用于荧光、表面等离子共振、比色及电化学分析方法。例如,链置换扩增(strand displacement amplification, SDA)^[12-13]、滚循环扩增(rolling circle amplification, RCA)^[14-15]、环介导扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[16]、酶修复放大技术(enzymatic repairing amplification, ERA)^[17]、催化发夹组装(catalytic hairpin assembly, CHA)^[18]、杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)^[19-20]等。其中,SDA 是一种通过特定引物(DNA 或 RNA)借助切割内切酶辅助产生大量单链 DNA 产物的等温聚合反应,因其指数扩增放大效率的优点受到越来越多的青睐^[21]。Chen 等^[22]利用靶标 miRNA 引发 SDA 核酸放大策略构建超灵敏 Signal-on 电致化学发光生物传感平台,展现出优异的特异性。CHA 是通过核酸杂交作为能量以驱动 DNA 发夹结构源源不断进行组装,实现无酶核酸信号放大^[23]。Li 等^[23]将 2 个发夹探针分别标记磁珠和电致化学发光信号标签,通过精心设计 2 个发夹探针的碱基序列,使 2 个发夹探针由目标物 miRNA 催化组装,实现了信号放大及对 miRNA 的检测,证明了发夹组装结构可以用作扩增子信号转换、放大的输出部分。受上述工作的启发,本工作将靶标 miRNA 引发 SDA 得到大量的下游 DNA,进一步引发 CHA,实现双重信号放大,提高检测靶标 miRNA 的特异性和灵敏度,其相关研究

还鲜有报道。

本工作基于靶标引发 SDA 和 CHA 级联放大策略构建高灵敏电化学生物传感器用于 miRNA 的灵敏检测。具体过程如图 1 所示,靶标 miRNA(以 miR-21 作为模型)引发从 3'端开始的双链 DNA 聚合反应。同时,内切酶 Nb.BbvCI 识别双链 DNA 上的剪切位点并剪切出一个缺口,SDA 在此缺口处 3'端延伸并释放下游 DNA 链(CHA 触发链)。通过聚合和剪切的循环反应将产生大量的触发链,然后打开 H1 发夹结构环部,暴露出来的片段继续打开 H2 发夹,获得 H1/H2 复合物并挤走触发链,实现触发链的循环并参与下一次 CHA 反应。接着,H1/H2 复合物裸露出来的一端与金电极表面的辅助探针杂交,再利用生物素-链霉亲和素特异性识别,将含链霉亲和素的碱性磷酸酶(streptavidin-alkaline phosphatase, ST-AP)固载在修饰电极界面。在底物 α -萘酚磷酸酯(α -naphthyl phosphate, α -NPP)存在下,ST-AP 催化 α -NPP 水解,在电极表面原位产生具有电化学活性的 α -萘酚(α -naphthol, α -NP),获得电化学信号,从而实现对靶标 miR-21 的定量分析。基于 SDA 和 CHA 双重信号放大,所制备的 miR-21 电化学生物传感器展现出高灵敏和强特异性的分析性能。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

Nb.BbvCI 限制性内切酶、Klenow 片段 DNA 聚合酶(富酶泰斯生物技术有限公司,中国)。ST-AP、6-巯基-1-己醇(MCH)、 α -NPP 酯、吐温-20(Tween-20, Sigma-Aldrich 公司,美国)。miR-21(Takara, 中国大连)、脱氧核苷酸溶液混合物(dNTP)和 DNA 核酸序列及其他试剂(上海生工生物科学有限公司,中国)。本工作中使用的寡核苷酸的核苷酸序列见表 1。

电化学检测均在 CHI660D 电化学工作站(海辰仪器有限公司,中国)上进行。利用参比电极饱和甘汞电极、辅助电极铂丝和工作电极金电极($\Phi=2$ mm)作为实验中所用的三电极体系。

1.2 探针的制备

根据无酶链置换的核酸循环原理设计模板底物链、发夹探针 H1 和发夹探针 H2^[24]。将发夹探针 H1 与 H2 分别置于 95 °C 水浴箱内变性 5 min,室温冷却后保存在 4 °C 备用。

1.3 生物传感器的制备过程

将裸金电极用 0.05 μm 三氧化二铝(Al_2O_3)粉打磨抛光

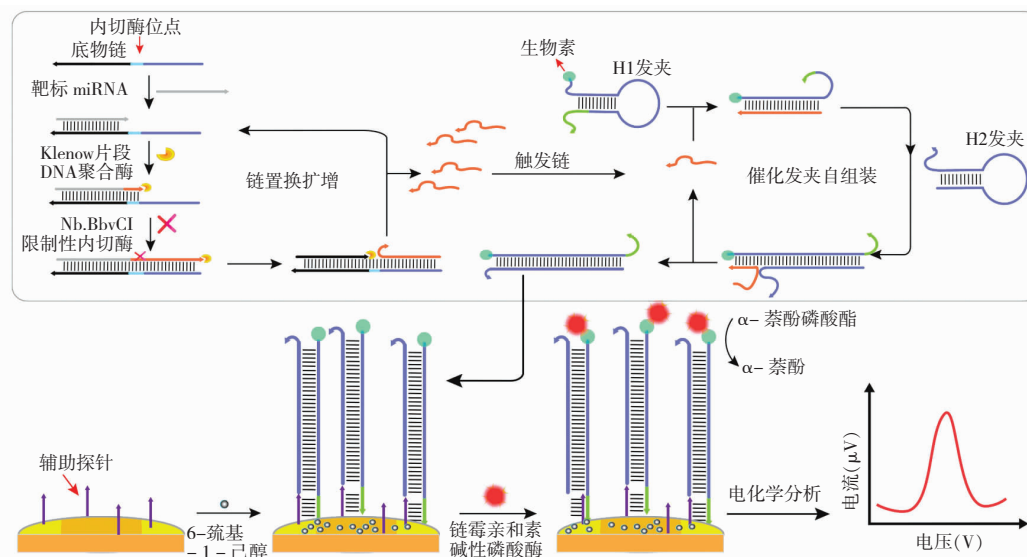


图1 基于 SDA 和 CHA 级联放大策略构建电化学生物传感器高灵敏检测 miR-21 的示意图

表1 核酸序列信息

DNA名称	DNA 序列(5' → 3')
靶标 miRNA (miR-21)	UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A
模板底物链	TCA ACA TCA GTC TGA TAA GCT ACC TCA GCT CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA CCT CAG CAA A
发夹探针 H1	Biotin-TTT TCA ACA TCA GTC TGA TAA GCT ACC ATG TGT AGA TAG CTT ATC AGA CTC TAC TCA
发夹探针 H2	TAA GCT ATC TAC ACA TGG TAG CTT ATC AGA CTCCAT GTG TAG A
辅助探针	SH-(CH ₂) ₆ -TT TTG AGT AGA GTC TGA
单碱基错配链	UAG CUU AUC AGA CUG AUG UU <u>U</u> A
双碱基错配链	UAG CUU AUC AGA CUG AU <u>U</u> UU <u>U</u> A
非互补链 miRNA-17	CAAAGUGCUUAC AGUGCA GGUAG
非互补链 miRNA-222	AGC UAC AUC UGG CUA CUG GGU CUC

注:带下划线的碱基为错配碱基

至镜面,并用超纯水进行超声处理。随后,浸泡在食人鱼溶液($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=3:1$) 10 min,用超纯水彻底冲洗。将 10 μL 200 nmol/L 巯基修饰的辅助探针滴加到电极表面固定,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育 12 h。后用三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲溶液冲洗,将所修饰的电极置于 100 μL 1 mmol/L MCH 溶液中浸泡 1 h,以封闭修饰电极表面的非特异性位点制得电化学传感器。

1.4 miR-21 的检测过程

向 EP 管中先后加入 5 μL 各种浓度的目标 miR-21、10 μL 100 nmol/L 的模板底物链、1 μL 0.1 U/ μL Klenow 片段、1 μL 0.2 U/ μL Nb.BbvCI、1.2 μL 250 $\mu\text{mol/L}$ dNTP、1.5 μL 1.2 U/ μL RNA 酶抑制剂、5 μL NE Buffer(10 mmol/L pH 7.9 Tris-HCl、50 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl_2 和 1 mmol/L DTT)、5 μL CutSmartTM 缓冲液(20 mmol/L pH 7.9 Tris-乙酸酯、500 mmol/L 乙酸钾、10 mmol/L 乙酸镁和 100 $\mu\text{g/mL}$ BSA)和 20.3 μL 焦碳酸二乙酯(DEPC)水,使得最终体积为 50 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行 SDA 反应 80 min,然后在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 20 min 使酶失活。向上述 SDA 产物中加入 H1 探针和 H2 探针混

合,37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 CHA 反应 30 min。接着,将最终产物滴涂在所制备的生物传感器界面上,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min。孵育结束后,用二乙醇胺(DEA)缓冲溶液(含 100 mmol/L DEA、1 mmol/L MgCl_2 、100 mmol/L KCl)冲洗修饰电极。之后,将 10 μL 含有 1.25 $\mu\text{g/mL}$ ST-AP 和 0.8 mg/mL BSA 的 DEA 缓冲液滴在上述的修饰电极界面上,反应 30 min,再用含有 0.05% Tween-20 的 DEA 缓冲溶液彻底冲洗传感界面。最后,将所制备的生物传感器在含有 1 mg/mL α -NPP底物的 DEA 缓冲液中进行电化学信号检测,使用差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV),其电位扫描范围为-0.1~0.5 V。

2 结果

2.1 生物传感器修饰过程的电化学表征

利用电化学阻抗谱(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)和方波伏安法(square wave voltammetry, SWV)表征生物传感器修饰过程。图 2 展示了不同修饰电极在含 1 mol/L KCl 的 5 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-4-}$ 溶液中的 EIS 和 SWV

曲线。如图 2A 所示,曲线 a 表示扫描裸金电极的阻抗曲线,其呈现一个小半径的半圆形,说明有相对低的阻抗值。当辅助探针修饰到电极界面后,由于带负电的 DNA 链排斥带负电的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 靠近电极界面使得阻抗值增加(曲线 b)。当 MCH 封闭修饰电极界面上的非特异性位点之后,阻抗值明显增加(曲线 c)。之后,孵育靶标 miR-21 引发的 SDA 和 CHA 产物后,阻抗值继续增加(曲线 d),其结果主要归因于生成的双链 DNA 组装在修饰电极表面上,使得 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 难以靠近电极界面。最后,当孵育 ST-AP 之后,阻抗值继续增加(曲线 e),主要归因于蛋白质大分子阻碍电子传递。以上的表征结果与理论分析中阻抗值变化是一致的。图 2B 所示的是 SWV 表征的结果,电流变化趋势同样是与理论分析一致的,表明电极修饰的每一步都是成功的。

2.2 实验条件优化

为使所制备的传感器达到最佳的检测性能,对模板底物链的浓度、SDA 的反应时间以及反应温度进行条件优化。首先,对模板底物链的浓度进行优化,如图 3A 所示,当模板底物链的浓度从 20 nmol/L 增加到 80 nmol/L 时,信噪比随之增加;当模板底物链浓度继续增加到 120 nmol/L 时,信噪比降低。因此,本实验选择 80 nmol/L 为模板底物链的最优浓度。SDA 的反应时间及反应温度对 SDA 放大效率起到至关重要的作用。如图 3B 所示,随着 SDA 反应时间的增加,信噪比逐

渐提高并趋向于稳定,80 min 后基本稳定。因此,SDA 的反应时间选择为 80 min。另外,当 SDA 反应温度在不同温度下(4 ℃~55 ℃),如图 3C 所示,在 37 ℃时信噪比达到最大值,因此,所选最优 SDA 反应温度为 37 ℃。

2.3 传感器的线性分析

在最佳优化实验条件下,将所制备的生物传感器先后孵育含不同浓度靶标 miR-21 的 SDA 和 CHA 反应体系及 ST-AP,并置于含有 α -NPP 底物的 DEA 缓冲液中进行电化学信号检测。如图 4A 所示,DPV 电流值随着靶标 miR-21 浓度的增加而增加。该生物传感器对 miR-21 浓度在 0.1 pmol/L 至 10 nmol/L 浓度范围内呈现良好的线性关系(图 4B),线性方程为 $I(\mu\text{A})=1.616 \lg c(10^{-9} \text{ mol/L})+10.08$ (I 表示 DPV 电流值; c 表示 miR-21 的浓度),相关系数 $R^2=0.9873$,最低检测限(limit of detection, LOD)为 60 fmol/L($S/N=3$)。

2.4 传感器的特异性分析

为考察生物传感器的特异性,将所制备的生物传感器孵育不同干扰物质,包括单碱基错配 miR-21(single-base mismatched, SM)和双碱基错配 miR-21(double-base mismatched, DM),完全不互补的 miR-17 和 miR-222,其干扰物质的浓度与靶标 miR-21 的浓度均为 10 nmol/L。实验结果如图 5 所示,所制备的传感器在孵育了 10 nmol/L 靶标 miR-21 的电流响应远远高于空白对照及其余干扰物质的电流响应。

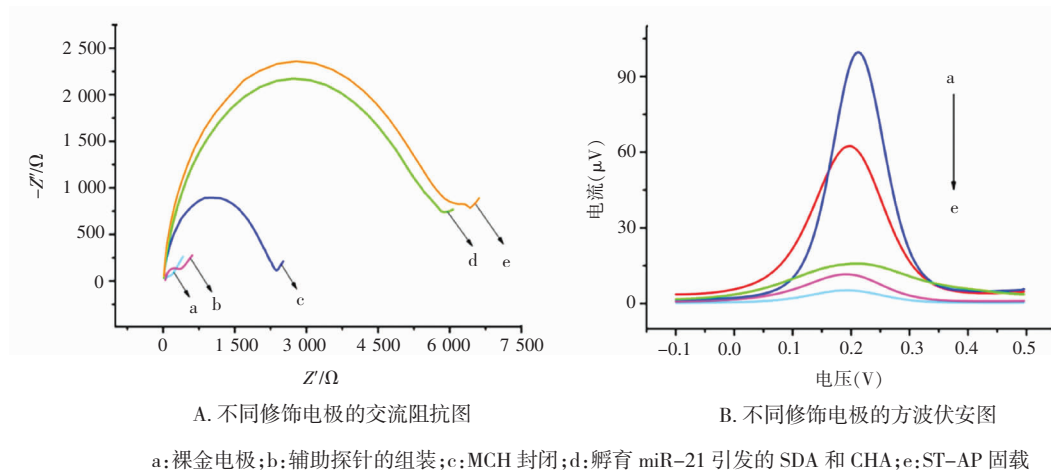


图 2 传感器修饰过程的电化学表征

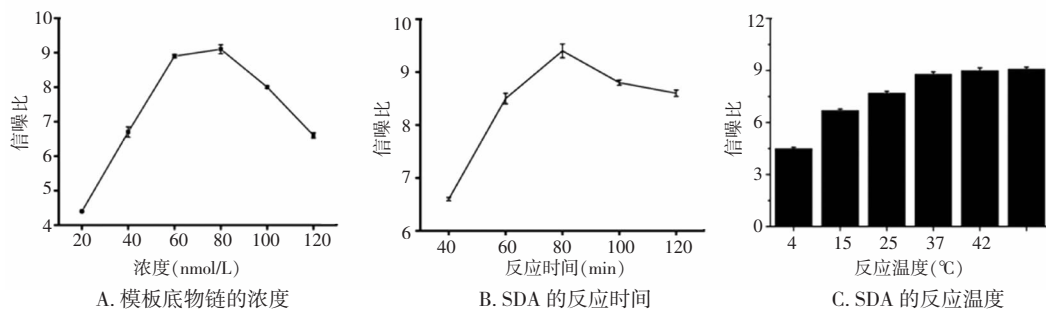


图 3 不同实验条件对传感器电化学信号响应的影响

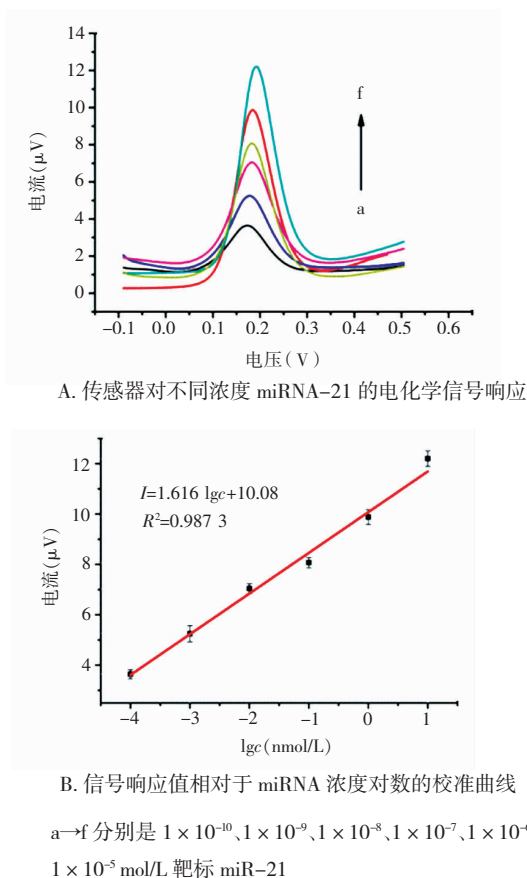


图 4 传感器的线性分析

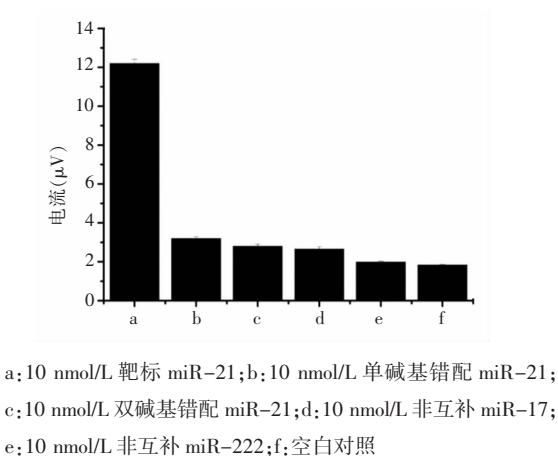


图 5 生物传感器的特异性

3 讨论

3.1 传感器条件的优化

本实验对模板底物链的浓度、SDA 的反应时间以及反应温度的最适条件进行考察。图 3A 结果表明当模板底物链的浓度过高时,SDA 产物的 DNA (CHA 的触发链)会与过量的模板底物链杂交,继而不引发 CHA 反应,从而降低双重核酸放大的效率使电化学信号响应减小。图 3B 结果表明,随着孵育时间增加,杂交产物增加,当孵育时间足够反应完全时,产物的生成也会饱和。图 3C 结果表明,低温时候分子杂交碰撞效率和聚合剪切所用酶活性都不足,致使最终信号偏低,不断升高孵育温度能有效提高最终的信号输出直到 37 ℃ 后逐渐趋向稳定。

3.2 传感器的线性分析

本实验对不同浓度的靶标 miR-21 对传感器 DPV 信号响应的影响进行了考察,并根据所得结果绘制了校准曲线。结果表明,本实验基于 SDA 和 CHA 级联放大策略比文献中已有报导的单一信号放大策略检测核酸的方法有更低的检测限和更宽的检测范围^[25-28](表 2)。这表明该分析方法在临床检验诊断中具有潜在应用价值。

3.3 传感器的特异性分析

根据特异性分析研究的考察结果,传感器在孵育不同干扰物质的电流响应与空白对照的电流响应基本无变化,并可与靶标 miR-21 结果有明显的区分,表明所制备的生物传感器可以特异地识别靶标 miR-21 和非靶标物质,展现出高的特异性,这主要归因于底物模板链的独特设计。该模板包括 3 个区域,分别是用于识别靶标物质的识别域,含有剪切位点的切口域和用于聚合的扩增域。只有靶标 miR-21 才能特异性杂交底物模板链从而打开该模板链结构。同时,实验后续中使用的生物素-链霉亲和素

表 2 不同核酸生物传感器的性能比较

检测方法	信号放大策略	线性范围 (nmol/L)	检测限 (pmol/L)	参考来源
比色	金纳米颗粒	$5.0 \times 10^{-1} \sim 5.0 \times 10^1$	4.4×10^{-1}	[25]
比色	CHA	$1.0 \times 10^{-1} \sim 1.0 \times 10^0$	1.0×10^0	[26]
荧光	CHA	$2.0 \times 10^{-1} \sim 1.2 \times 10^2$	2.0×10^{-1}	[27]
表面等离子体共振	不对称 PCR	$5.0 \times 10^{-1} \sim 1.0 \times 10^2$	5.0×10^{-1}	[28]
电化学	SDA+CHA	$1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^1$	6.0×10^{-2}	本方法

和素极高的亲和力也保证了其产物结合的特异性。

总之,本工作基于目标物引发 SDA 和催化发夹杂交级联放大策略成功地构建了高灵敏检测 miRNA 的电化学生物传感器。值得一提的是,由目标物引发的 SDA 不但明显提高了生物传感器的特异性,还结合 CHA 放大策略改善了生物传感器的检测灵敏度,使传感器展示出宽的线性范围(0.1 pmol/L 至 10 nmol/L)和低的 LOD(60 fmol/L)。因此,该电化学生物传感器为生物医学上高灵敏检测 miRNA 提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA regulation of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 703–720.
- [2] 樊宇, 杨春, 何永林, 等. microRNA 与结核病相互关系的研究进展[J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 40(9): 1167–1171.
- [3] Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease[J]. *RNA Biol*, 2011, 8(5): 706–713.
- [4] Wang XC, Wei W, Zhang ZB, et al. Overexpression of miRNA-21 promotes radiation-resistance of non-small cell lung cancer[J]. *Radiat Oncol*, 2013, 8: 146.
- [5] 姜学东, 门万夫, 张林, 等. miRNA21 对人肺癌 A549 细胞增殖及迁移的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(23): 3706–3710.
- [6] 秦志辉, 朱喜丹, 黄远帅, 等. 循环 miRNA21 在肝细胞癌早期诊断中的价值[J]. *四川医学*, 2013, 34(9): 1423–1425.
- [7] Qi H, Mao Z, Li S, et al. A non-radioactive method for small RNA detection by northern blotting[J]. *Rice*, 2014, 7(1): 26–32.
- [8] Rao X, Lai D, Huang X. A new method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis[J]. *J Comput Biol*, 2013, 20(9): 703–711.
- [9] Su Z, Fang H, Hong H, et al. An investigation of biomarkers derived from legacy microarray data for their utility in the RNA-seq era[J]. *Genome Biol*, 2014, 15(12): 523.
- [10] Zhu X, Feng C, Ye Z, et al. Fabrication of magneto-controlled moveable architecture to develop reusable electrochemical biosensors[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 4169.
- [11] Sharma VK, Jelen F, Trnkova L. Functionalized solid electrodes for electrochemical biosensing of purine nucleobases and their analogues: a review[J]. *Sensors (Basel)*, 2015, 15(1): 1564–1600.
- [12] Joneja A, Huang X. Linear nicking endonuclease-mediated strand-displacement DNA amplification[J]. *Anal Biochem*, 2011, 414(1): 58–69.
- [13] Srinivas N, Ouldrige TE, Šulc P, et al. On the biophysics and kinetics of toehold-mediated DNA strand displacement[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(22): 10641–10658.
- [14] Yoshimura T, Suzuki T, Mineki S, et al. Controlled microwave heating accelerates rolling circle amplification[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0136532.
- [15] Mohsen MG, Kool ET. The discovery of rolling circle amplification and rolling circle transcription[J]. *Acc Chem Res*, 2016, 49(11): 2540–2550.
- [16] Li J, Xiong C, Liu Y, et al. Loop-mediated isothermal amplification(LAMP): emergence as an alternative technology for herbal medicine identification[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1956.
- [17] Zhou DM, Du WF, Xi Q, et al. Isothermal nucleic acid amplification strategy by cyclic enzymatic repairing for highly sensitive microRNA detection[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(14): 6763–6767.
- [18] Yu YQ, Wang JP, Zhao M, et al. Target-catalyzed hairpin assembly and intramolecular/intermolecular co-reaction for signal amplified electrochemiluminescent detection of microRNA[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 442–450.
- [19] Schwarzkopf M, Pierce NA. Multiplexed miRNA northern blots via hybridization chain reaction[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(15): e129.
- [20] Choi HM, Beck VA, Pierce NA. Next-generation in situ hybridization chain reaction; higher gain, lower cost, greater durability[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(5): 4284–4294.
- [21] Deng W, Xu H, Ding W, et al. DNA logic gate based on metal-toehold strand displacement[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111650.
- [22] Chen A, Gui GF, Zhuo Y, et al. Signal-off electrochemiluminescence biosensor based on Phi29 DNA polymerase mediated strand displacement amplification for microRNA detection[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(12): 6328–6334.
- [23] Li B, Ellington AD, Chen X. Rational, modular adaptation of enzyme-free DNA circuits to multiple detection methods[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16): e110.
- [24] Chen X. Expanding the rule set of DNA circuitry with associative toehold activation[J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(1): 263–271.
- [25] Luo R, Li Y, Lin X, et al. A colorimetric assay method for invA gene of Salmonella using DNAzyme probe self-assembled gold nanoparticles as single tag[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 198: 87–93.
- [26] Ma C, Wang W, Li Z, et al. Simple colorimetric DNA detection based on hairpin assembly reaction and target-catalytic circuits for signal amplification[J]. *Anal Biochem*, 2012, 429(2): 99–102.
- [27] Li H, Ren J, Liu Y, et al. Application of DNA machine in amplified DNA detection[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2014, 50(6): 704–706.
- [28] Zhang D, Yan Y, Li Q, et al. Label-free and high-sensitive detection of Salmonella using a surface plasmon resonance DNA-based biosensor[J]. *J Biotechnol*, 2012, 160(3–4): 123–128.

(责任编辑: 冉明会)