

催化发夹自组装技术用于 miRNA 检测的研究进展

龙禹同, 万里, 赵国杰*

(中国医科大学 生命科学学院, 中国辽宁 沈阳 110122)

摘要: 微 RNA (microRNA, miRNA) 是一类小分子 RNA, 参与了众多的细胞过程, 在生命体的生长发育过程中起到了关键作用。鉴于 miRNA 的重要性和结构特殊性, 其对于疾病的预测与评估有着深刻的意义。当前, miRNA 检测技术迅猛发展, 其中, 催化发夹自组装 (catalytic hairpin assembly, CHA) 是一项新型核酸恒温扩增技术, 具有反应过程无需酶催化、检测灵敏度高特异性强、操作简单方便等优点, 在 miRNA 的检测领域有着巨大潜力。本文将着重阐述 CHA 技术的检测原理, 从靶标识别、信号扩增、信号输出 3 个方面对基于 CHA 技术的 miRNA 检测策略进行介绍, 并提出该技术当前面临的挑战及前景, 旨在为医学、生物信息等相关领域的研究提供进一步参考。

关键词: 微 RNA (miRNA); 催化发夹自组装 (CHA); 检测

中图分类号: Q503

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)01-0086-09

Research Progress of Catalytic Hairpin Assembly Technique for miRNA Detection

LONG Yutong, WAN Li, ZHAO Guojie*

(College of Life Sciences, Chinese Medical University, Shenyang 110122, Liaoning, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of small RNA molecules that are involved in numerous cellular processes and play a key role in the growth and development of living organisms. Given the importance and structural specificity of miRNAs, they have profound implications for the prediction and assessment of diseases. In the rapid development of miRNA detection methods, catalytic hairpin assembly (CHA) is a novel thermostatic nucleic acid amplification technology, with high sensitivity, high specificity, simple and convenient operation, and no enzyme catalysis in the reaction process. Therefore, it has great potential in miRNA detection. Herein, the principle of CHA technology, and the CHA-based miRNA detection strategy in target identification, signal amplification and signal output were introduced, and the current challenges and prospects of this technology were also discussed, aiming to provide some ideas and reference for related research.

Key words: microRNA (miRNA); catalytic hairpin assembly (CHA); detection

(Life Science Research, 2023, 27(1): 086-094)

微 RNA (microRNA, miRNA) 是一类小分子非编码 RNA, 仅由几十个碱基序列构成, 主要调节基因表达, 参与了细胞增殖、迁移、凋亡以及癌变等基本细胞生命过程, 生物体所患有的很多疾病已被证实与 miRNA 的异常表达密切相关^[1-2]。miRNA 凭借稳定地存在于人的外周血液中这一优

势, 被认为是液体活检的重要标志物, 临床意义重要。miRNA 在不同细胞中的表达是异质性的, 研究单细胞 miRNA 的表达对研究 miRNA 介导的调控通路以及 miRNA 相关疾病的复杂性和异质性具有重要价值^[3-5]。此外, 在面对庞大而复杂的临床样本时, 研发出快捷简单、准确有效的 miRNA

收稿日期: 2022-05-11; 修回日期: 2022-08-11; 网络首发日期: 2022-09-30

基金项目: 沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目(RC190235); 中国医科大学大学生创新创业项目(X202210159088)

作者简介: 龙禹同(2000—), 女, 辽宁鞍山人, 学生; 龙禹同和万里对本文的贡献相同, 为本文共同第一作者; *通信作者: 赵国杰(1978—), 男, 辽宁沈阳人, 博士, 中国医科大学教授, 主要从事核酸及核苷酸衍生物的生物化学、核酸相关酶学、核酸扩增等方面的研究, E-mail: gjzhao@cmu.edu.cn。

检测方法也尤为重要。

传统的 miRNA 检测方法包括实时荧光定量 PCR、Northern 印迹杂交等, 这些方法存在耗时长、价格昂贵、检测灵敏度低、设备要求较高等问题。新型检测方法中极具代表性的是恒温无酶扩增法。恒温无酶扩增包括杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)、催化发夹自组装(catalytic hairpin assembly, CHA)等, 该类方法因为不需要特定的酶, 恒温下即可反应, 应用广泛^[6]。其中, CHA 技术可以实现目标链的连续利用, 在降低成本的同时缩短了级联反应时间^[7-10]。目前, 研究者们常将 CHA 技术与 HCR 技术结合用于靶标物的大量扩增, 这种级联扩增与荧光、磁矩和电化学相结合, 可以实现靶标序列的特异性检测^[11-12]。

1 基于催化发夹自组装(CHA)技术检测 miRNA

CHA 是 Yin 等^[13]在 2008 年提出的一种新型核酸探针信号放大等温扩增技术, 根据放大方式不同可分为线性与指数两种扩增形式。该技术具有无酶恒温扩增、结果特异性强、灵敏度高、重复性好、操作简单方便、易于自动化等优点, 有效避免了试剂昂贵、修饰过程复杂、易受污染、易受环境因素影响等问题, 可以在无酶条件下将目标信号循环放大进行检测^[14]。

CHA 技术的靶标循环原理如图 1 所示: 特异的发夹型结构使发夹未打开时 H1 与 H2 自身稳定, 可同时存在于溶液中; 在靶标 DNA 引发链存在的条件下, 靶标 DNA 作用于探针 H1 的立足点使茎环状 H1 打开呈链状, H1 暴露出与 H2 互补

的序列从而打开 H2, 依据反应动力学及碱基互补配对原则, 形成 H1-H2 的双链复合物, 替换出靶标 DNA; 替换出的靶标 DNA 进入下一个循环, 打开新的 H1 结构, 经反复利用, 产生大量的 H1-H2 双链复合物^[15]。发卡结构上标记的信号分子可随该反应过程实现信号放大。该技术具有 50~100 倍的信号放大效应。

随着科学技术的发展, miRNA 的检测已逐渐成为 CHA 技术应用最为广泛的领域之一。目前, CHA 技术在靶标识别、信号扩增、信号输出 3 个环节都有不同程度的改进, 衍生出了多种新的检测策略。

1.1 靶标识别

1.1.1 启动方式

目前, CHA 技术的启动方法分为 miRNA 直接启动和 miRNA 转换为特定的 DNA 序列启动两种, miRNA 直接启动的原理与检测 DNA 的原理类似, 而转换为特定 DNA 序列启动可以有效地克服 miRNA 的不稳定性和降解问题^[16]。miRNA 直接启动最初是在设计的分子信标(molecular beacon, MB)环中加入目标 miRNA 的互补结构域^[17], 靶标 miRNA 与 MB 结合后, 暴露出引发序列, 扩增反应随即开始; miRNA 转换为特定的 DNA 序列启动是 miRNA 与双链 DNA 结合后替换出“替代 DNA”, 进而引发扩增反应(图 2A)^[16]。部分研究者通过引入序列依赖性酶如双链特异性核酸酶(duplex-specific nuclease, DSN) (图 2B)^[16]、核酸外切酶 III 等来将 miRNA 转化为 DNA, 以提高检测敏感性^[16]。DSN 是一种特异性核酸酶, 仅能降解双链 DNA 或者是 DNA-RNA 杂交双链中的 DNA 链,

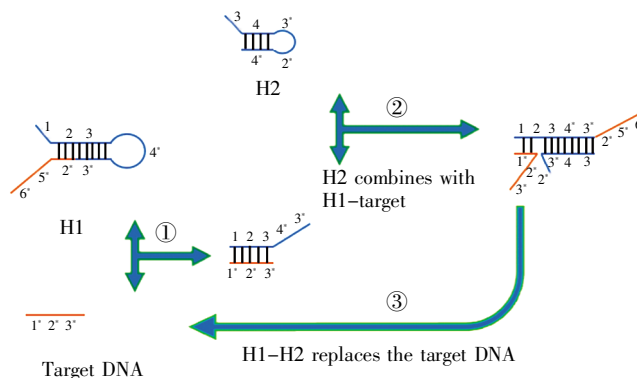


图 1 CHA 靶标循环的简要原理示意图^[15]

① 探针 H1 与靶标 DNA 结合, H1 茎环结构被打开; ② 探针 H2 与 H1-靶标复合物结合, 形成 H1-H2 复合物; ③ 替换出的靶标 DNA 进入下一个循环。

Fig.1 Brief schematic diagram of CHA target cycle^[15]

① H1 combines with the target DNA; ② H2 combines with H1-target and forms H1-H2; ③ Target DNA goes into the next cycle.

但对单链核酸分子几乎没有作用,将 DSN 酶的这种特异性与 CHA 技术结合起来用于 miRNA 的检测,可以精确到单个碱基,有效地区分同源性较高的 miRNA^[18]。

1.1.2 识别靶标分子

miRNA 是多种疾病的新型生物标志物,在转录后基因调控中发挥了关键作用。当前,针对不同的靶标分子 miRNA,检测策略有所差异。

1.1.2.1 miRNA-21

miRNA-21 参与人体多种生理病理过程,例如:神经再生的调控、周围神经损伤(peripheral nerve injury, PNI)等^[19]。作为最热门的生物标志物之一,研究者将 CHA 和滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)集成到电化学生物传感器中,用于 miRNA-21 的灵敏度和特异性检测^[19]。相关研究还设计了一种局域化催化发夹自组装技术(localized catalytic hairpin assembly, LCHA),通过独特的 DNA 骨架将 H1 和 H2 发夹探针诱导入细胞,实现了活细胞内动态检测 miRNA 的突破;而且,将荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)与 LCHA 结合,可以有效地避免假阳性结果的产生^[20]。此外,一项结合了 MXene-MoS₂ (一种二维过渡金属碳化物/氮化物-二硫化钼复合物)异质结构的新型电化学生物传感器,可用于 miRNA-21 的无标记检测。MXene-MoS₂ 的高度折叠结构和较好的反应面积增强了通过碰撞提高分子杂交效率的能力,实现了在 100 fmol/L 到 100 nmol/L 的宽动态范围对 miRNA-21 的检测,

检测限低至 26 fmol/L^[21]。

1.1.2.2 miRNA-155

miRNA-155 在各类免疫细胞的发育分化、免疫应答调控中发挥着重要作用,其主要来自活化的淋巴细胞及单核/巨噬细胞内高表达的非编码转录产物,通过调控相关靶基因的表达参与免疫、炎症、肿瘤及心血管系统疾病等众多病理生理过程,miRNA-155 信号通路与系统性硬化病的免疫损伤和纤维化密切相关^[22-23]。有文献报道了一种基于 CHA 靶标回收并结合了超声和纳米材料的方法,以增强鲁米诺-O₂ (luminol-O₂)系统的电化学信号,该方法可实现 miRNA 的高灵敏度检测。这种新设计的生物传感平台可在 0.1 fmol/L 至 1 nmol/L 范围内对 miRNA-155 进行灵敏检测,检测限为 0.057 fmol/L^[24]。

1.1.2.3 miRNA-141

miRNA-141 在多种癌细胞中表达,如 MDA-MB-231 细胞(乳腺癌细胞系)^[19]。有研究利用 CdTe 量子点(quantum dot, QD)的发光特性,结合多种类型核酸和化学信号技术,开发了磁性纳米颗粒(magnetic nanoparticle, NP)和滤波辅助分离多模传感策略^[19]。该策略采用 miRNA-141 作为代表性靶标,可以触发催化的发夹组装和杂化链反应无核酸信号扩增,从而产生长双链 DNA。随后,释放大量的 Ag⁺的银 NP (Ag NP)进行化学扩增并被引入系统,利用 CdTe QD 和 Ag⁺之间的阳离子交换反应淬灭 CdTe QD 的荧光,释放游离的 Cd²⁺,最后,结合视觉/荧光/化学蒸汽生成-原子荧光光谱法/电

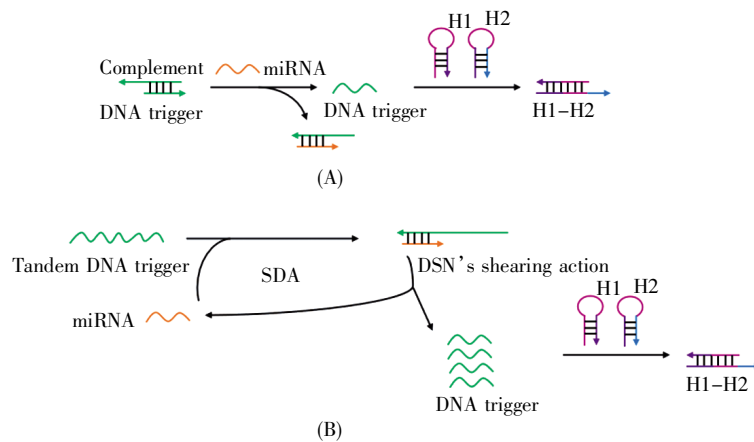


图2 CHA 检测 miRNA 原理图^[16]

(A) 从 miRNA 到 DNA 探针介导的 miRNA 生物传感器的转化; (B) miRNA 介导的 miRNA 生物传感器转化。

Fig. 2 Schematic diagram of miRNA detection by CHA^[16]

(A) Equivalent transformation from miRNA to DNA triggers mediated miRNA biosensor; (B) Numerous DNA triggers converted from miRNA mediated miRNA biosensor.

感耦合等离子体质谱方法进行 miRNA 分析^[19]。

1.1.1.2.4 miRNA-721

miRNA-721 是一种新的急性心肌炎诊断生物标志物^[25]。有研究提出了一种非酶三重放大电化学生物传感器,用于定量检测 miRNA-721^[26]。该传感器基于分子信标样 CHA 电路、双放大纳米酶和传感界面的协同效应,可以实现目标物质微量水平的准确检测,这可能为检测 miRNA-721 以早期诊断急性心肌炎提供了一种潜在的方法。分子信标样 CHA 电路是指将每个目标转换放大并使信号探针固定在传感接口上,从而产生增强的电化学信号。结合了分子信标样 CHA 电路、双放大纳米酶的用于信号放大的传感接口,可使该生物传感器具有 0.25 fmol/L 的低检测限和高特异性^[26]。

1.1.1.2.5 其他种类 miRNA

miRNA let-7a 是较早被发现的一种肿瘤抑制 miRNA,其高表达可导致神经功能评分降低^[27]。有研究开发了一种磁珠/DNA 系统来构建逻辑门库,用于传感多重靶标 miRNA^[28]。通过 CHA 技术构建的极其具有特异性的串联逻辑电路,可以在逻辑功能控制下区分单个目标 miRNA,从而实现 miRNA let-7a 等的检测,在快速智能检测领域的发展前景广阔^[28]。miRNA-133 在心肌细胞中可特异性表达,有 a 和 b 两种类型,其中 miRNA-133a 可作为急性心肌梗死相关的生物标志物^[29]。有文献报道了一种超敏表面增强拉曼散射(surface enhancement of Raman scattering, SERS)生物传感器,其将可调节的中空 Ag/Au 纳米球 SERS 探针与 CHA 技术结合,以实现信号放大。通过这种方式,靶标 miRNA-133 可以在宽的线性范围内被检测到,检测限为 0.306 fmol/L^[30]。

1.2 信号扩增

鉴于 CHA 技术单一检测目前仍存在着一定的局限性,研究者尝试将该技术与其他扩增技术相结合,旨在改善单一检测技术的缺陷与不足。其中,CHA 与其他无酶反应相结合的新型扩增策略现已成为研究热点。这些新型策略可以实现靶标信号的大量扩增,在降低检测限的同时可提高检测灵敏度与准确度,在 miRNA 的检测方面显现出巨大潜力,为临床微量生物标记的检测提供了新方向。

HCR 的概念是由 Driks 和 Pierce 在 2004 年提出的,现作为一种无酶扩增技术已被广泛应用

于核酸检测领域^[6]。将 HCR 与 CHA 相结合的新型级联放大策略,可以使信号放大效率大幅提升。例如,肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)和双级联核酸电路相结合的扩增策略,可以实现方便、低成本、灵敏、特异并定量检测癌症相关 miRNA 的目的。血清中的 miRNA-155 触发 CHA 反应后,产物被 PNA 探针特异性捕获并触发 HCR 反应,导致转化酶的局部富集。转化酶底物(蔗糖)的引入导致葡萄糖的产生,而后者可通过个人血糖仪检测。凭借 CHA 和 HCR 之间的协同等温放大反应,该传感器可实现宽动态范围(从 1 fmol/L 到 10 nmol/L),检测限低至 0.36 fmol/L (比没有 HCR 的情况低 3 个数量级),同时能够区分单碱基失配序列^[31]。此外,有研究团队设计了一种创新的可视化方法,该方法结合了 CHA 和 HCR 放大信号,可用于 miRNA 的无标记定量(图 3)^[11]。miRNA-21 存在时,可以打开发夹结构的 DNA 探针(H1),形成复合物 H1-T,然后复合物 H1-T 通过 CHA 打开发夹 H2,形成复合物 H1-H2,同时释放靶标以进行下一次循环。在 CHA 反应后, H1-H2 复合物与 H3 和 H4 杂交,进一步启动 HCR 扩增,导致大量 G-四联体的形成。G-四联体与血红素(hemin)结合形成过氧化物酶,该酶可以用于模拟 DNAzyme 与 H₂O₂ 产生一系列试纸条显色反应。少量的 miRNA 即可通过 CHA 和 HCR 有效触发级联放大反应,产生大量血红素/G-四联过氧化物酶,实现低丰度 miRNA 的定量检测^[11]。

DNAzyme 是一种具有催化性能的单链核酸,能够催化剪切 RNA 或 DNA,是一种很有潜力的信号放大器^[6]。近年来,结合 DNAzyme 的 CHA 扩增策略在 miRNA 的检测中受到了广泛关注。Yan 团队^[32]设计了一种简单且通用的比色策略,该策略基于分子信标引发的链置换扩增(strand displacement amplification, SDA)、CHA 以及 DNAzyme 可以对 miRNA 实现超灵敏和特异性检测。靶标 miRNA 触发 SDA,释放缺口 DNA 触发器,启动 CHA,产生大量 CHA 产物。这些 CHA 产物可以与血红素结合形成 G-四联体/血红素 DNAzyme,用以催化比色反应。该生物传感器在 5 fmol/L 到 5 nmol/L 动态响应范围内显示出高灵敏度和高选择性,检测限低至 1.7 fmol/L。此外,其通过改变 miRNA 的识别序列,可以检测不同的 miRNA;通过 SDA 混合物的纯化,可以消除基质干扰,减少非特异性 CHA 产物,提高检测结果的准确度。有

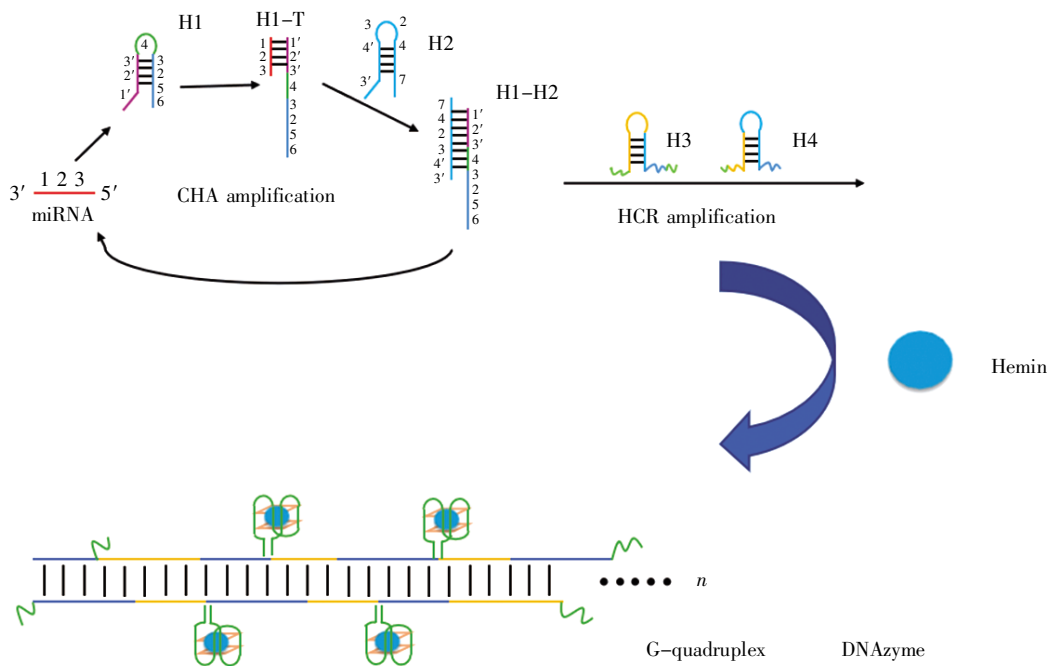


图3 CHA 启动 HCR 检测 miRNA 的反应过程^[11]

Fig.3 CHA initiates the reaction process of HCR for miRNA detection^[11]

研究报道,将 SDA 与 CHA 技术结合起来,可以有效区分序列略有不同的干扰 miRNA^[35];将 CHA 策略与 DNAzyme 介导的催化信号放大和金修饰磁纳米粒表面上的多层 DNA 结合,构建的比色生物传感器,虽然样品处理过程耗时且复杂,但拥有优异的单碱基错配鉴别能力^[34]。

此外, Wang 等^[35]在 2019 年提出了一种恒温核酸串联扩增体系,其将上述两种无酶扩增策略(HCR、DNAzyme)同时与 CHA 反应结合在一起,实现了更为敏感的 miRNA 检测。该体系由起始的 CHA 反应、中间的 HCR 扩增及末端的 DNAzyme 放大单元组成。上游的靶标检测物触发 CHA 反应后,形成的产物进一步触发 HCR 反应,最终得到含有 DNAzyme 结构的长串联纳米线。最后,经 Mg^{2+} 活化的扩增单元催化裂解被荧光团/淬灭剂修饰的底物,产生相应的扩增荧光信号。这种 CHA-HCR-DNAzyme 方案已被证实可以显著增强单项检测技术的检测性能,可以对 miRNA 进行放大分析并实现细胞内成像。

1.3 信号输出

1.3.1 基于电化学信号的 CHA 输出策略

CHA 可结合化学反应,对目标产物进行特异性检测。在目标物 miRNA-21 上,研究者分别对 5-氨基-2,3-二氧基-1,4-萘醌(ADNQ)和 3(2-咪唑)丙酸(FPA)进行修饰,通过 CHA 反应破坏 AD-

NQ 的化学结构,使其发生第尔斯-阿尔德反应(Diels-Alder reaction),导致电化学反应信号减弱,基于此过程,研究人员可检测 miRNA-21 的浓度^[36]。基于碳球-MoS₂(CS-MoS₂)和 CHA 策略的靶向回收扩增,研究人员开发了一种三明治型电化学生物传感平台,用于 miRNA 的超灵敏测定。该检测方法得益于夹层式结构的优势、CS-MoS₂ 良好的电化学性质和 CHA 靶标回收扩增策略,对 miRNA-21 具有 1.6×10^{-17} mol/L 的低检测限^[6]。另外一种结合 SDA 的扩增策略(图 4),同样通过电化学反应信号进行输出^[37]。靶标 miRNA-21 与双链 DNA 聚合,在限制性内切酶作用下产生切口,SDA 在此切口释放大量与靶标 miRNA-21 相关的触发 DNA,引发 CHA 反应,所得的 H1-H2 复合物裸露的一端与金电极表面的辅助探针杂交。研究者利用生物素与链霉亲和素的特异性识别作用,将含有链霉亲和素的碱性磷酸酶固定在修饰电极表面,获得电化学信号,实现了靶标 miRNA-21 的高灵敏定量检测^[37]。

1.3.2 基于荧光显色的信号输出策略

DNA Ag 纳米团簇(nanocluster, NC)是一种新型荧光纳米材料,其因独特的优点即超小尺寸、可增强光致发光、低毒和优良的生物相容性等而备受关注。有研究团队提出了一种无酶等温 CHA 荧光传感策略,该策略通过点亮荧光 DNA Ag NC

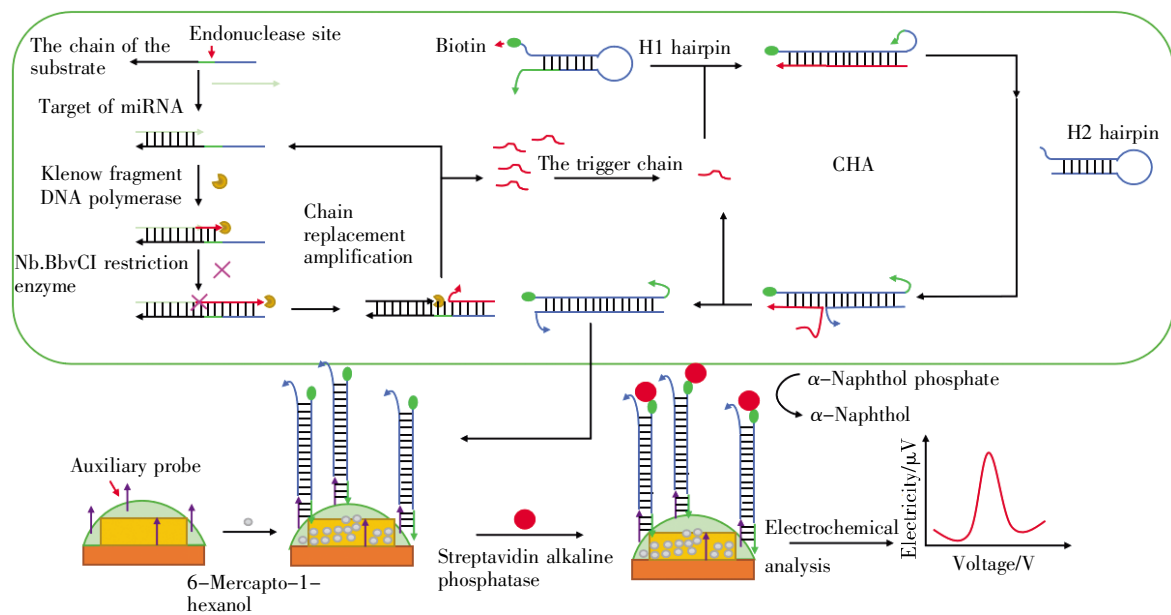


图 4 基于 SDA 和 CHA 级联放大策略构建电化学生物传感器高灵敏检测 miRNA-21 的原理示意图^[37]

Fig.4 The schematic diagram of the electrochemical biosensor constructed based on SDA and CHA cascade amplification strategy for highly sensitive detection of miRNA-21^[37]

对 miRNA 进行灵敏检测。在该平台中, Ag NC 被设计为组装元件, 它们可以在没有靶标的情况下保持稳定; 在添加靶标分子 miRNA 后, CHA 反应得以启动, Ag NC 被转化为多聚鸟嘌呤延长的双链 DNA 产物, 从而产生放大的荧光信号。该策略检测 miRNA-21 的检测限低至 38 pmol/L^[38]。

1.3.3 基于纳米颗粒的信号输出策略

有研究团队将金纳米(AuNP)材料作为“信号转换物质”, 与 CHA 检测策略结合起来, 用以检测 miRNA。他们通过在 AuNP 表面组装两种荧光素(fluorescein, FAM)标记的发夹探针(H1 和 H2), 设计了一种基于 LCHA 的 3D DNA 步行器, 该装置处于非活动状态时, AuNP 通过表面能量转移进行荧光猝灭产生的荧光信号可以忽略不计。该传感平台的检测限低至 6.1 pmol/L。而且, 由于其自供电和无酶特性, 极其适用于原位监测癌细胞中的 miRNA^[39]。另外, 还有一种利用 AuNP 对发卡进行修饰, 构成探针, 同时结合试纸条生物传感器的定量检测方法, 该方法通过生物素和链霉亲和素的作用, 建立 SERS 强度与 miRNA-21 浓度之间的定量关系, 可以实现 miRNA-21 含量的精确测量^[40]。也有研究者通过将 4 个不同发夹结构 DNA 序列 1 中的一个固定到 4 个 Au/Ag 合金纳米颗粒(Au/AgNP)涂层检测孔的其中一个上, 构建了具有 4 个不同传感单元的传感器阵列, 当存在靶向 miRNA 时, SERS 标签通过重复的特异性

CHA 反应捕获到相应的传感器上, SERS 标签与传感器的 Au/AgNP 涂层表面之间的相互作用产生许多“热点”, 释放强烈的 SERS 信号。基于该策略, 研究人员实现了多种癌症相关 miRNA (miRNA-1246, miRNA-221, miRNA-133a 和 miRNA-21)的检测^[41]。

1.3.4 基于试纸条等的可视化信号输出策略

利用咖啡环效应, 将纸张信号转导与 CHA 结合可实现 miRNA 的定量检测。靶标 miRNA 一旦出现, 就会引发 CHA 反应, 产生大量的 G-四联体, 其与血红素结合形成血红素/G-四联体 DNA 酶。DNAzyme 催化比色反应产生彩色纳米颗粒, 这些纳米颗粒通过蒸发驱动流动到纸张的末端边缘, 形成可见的彩色条带。miRNA 含量越高就会产生越多的纳米颗粒, 带有颜色的条带也就越长, 条带的长度可以简单地用尺子测量^[33]。有研究者把葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD)标记的发夹 DNA 探针作为桥梁, 将 miRNA 与双发射率荧光探针(ratiometric fluorescent, RF)的荧光猝灭信号连接起来, 实现了 miRNA 肉眼可见的检测(图 5)^[42]。过氧化氢(H₂O₂)是由大量 GOD 催化葡萄糖氧化产生的, 可以在不影响 RF 内部红色荧光的情况下猝灭外部绿色荧光。因此, 增加 miRNA 的含量可导致 RF 探针的两种荧光强度比发生变化, 在紫外灯下颜色从绿色连续变为红色, 肉眼即可识别^[42]。

- calized catalytic hairpin assembly and hybridization chain reaction[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 325: 128970.
- [8] WU Y, FU C C, SHI W B, *et al.* Recent advances in catalytic hairpin assembly signal amplification-based sensing strategies for microRNA detection[J]. *Talanta*, 2021, 235: 122735.
- [9] NIU S Y, LI Q Y, REN R, *et al.* Enzyme-enhanced fluorescence detection of DNA on etched optical fibers[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 24(9): 2943–2946.
- [10] CHEN Y, XU J, SU J, *et al.* *In situ* hybridization chain reaction amplification for universal and highly sensitive electrochemiluminescent detection of DNA[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(18): 7750–7755.
- [11] ZHANG D G, WU C, LUAN C X, *et al.* Distance-based quantification of miRNA-21 by the coffee-ring effect using paper devices[J]. *Mikrochimica Acta*, 2020, 187(9): 513.
- [12] BORUM R M, JOKERST J V. Hybridizing clinical translatability with enzyme-free DNA signal amplifiers: recent advances in nucleic acid detection and imaging[J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(2): 347–366.
- [13] YIN P, CHOI H M T, CALVERT C R, *et al.* Programming biomolecular self-assembly pathways[J]. *Nature*, 2008, 451(7176): 318–322.
- [14] ZHU M H, MU X M, DENG H M, *et al.* Ultrasensitive photoelectrochemical biosensor for miRNA-21 assay based on target-catalyzed hairpin assembly coupled with distance-controllable multiple signal amplification[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(65): 9622–9625.
- [15] LI B L, ELLINGTON A D, CHEN X. Rational, modular adaptation of enzyme-free DNA circuits to multiple detection methods[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(16): e110.
- [16] LIU J M, ZHANG Y, XIE H B, *et al.* Applications of catalytic hairpin assembly reaction in biosensing[J]. *Small*, 2019, 15(42): e1902989.
- [17] LI Q, ZENG F P, LYU N, *et al.* Highly sensitive and specific electrochemical biosensor for microRNA-21 detection by coupling catalytic hairpin assembly with rolling circle amplification[J]. *Analyst*, 2018, 143(10): 2304–2309.
- [18] 祁桐, 宋畅, 陈文慧, 等. 双链特异性核酸切割酶等温循环扩增结合高效液相色谱高灵敏检测双目标 microRNA[J]. *分析化学(QI Tong, SONG Chang, CHEN Wenhui, et al. Duplex specific nuclease-enabled isothermal signal amplification combined with high-performance liquid chromatography for highly sensitive detection of dual-target microRNAs as disease biomarkers)*. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2021, 49(2): 216–225.
- [19] CHEN P P, JIANG X, HUANG K, *et al.* Multimode microRNA sensing via multiple enzyme-free signal amplification and cation-exchange reaction[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(40): 36476–36484.
- [20] 吴娟. 基于局域催化发夹组装反应的 DNA 纳米机器用于早期癌症精准诊断的研究[D]. 西安: 西北大学(WU Juan. Research on Localized Catalytic Hairpin Assembly-based DNA Nanomachine for Accurate Diagnosis of Cancer at Early Stage[D]. Xi'an: Northwest University), 2021.
- [21] ZHAO J Y, HE C J, WU W X, *et al.* MXene-MoS₂ heterostructure collaborated with catalyzed hairpin assembly for label-free electrochemical detection of microRNA-21[J]. *Talanta*, 2022, 237: 122927.
- [22] 樊赞, 卞华. miRNA-155 在系统性硬化病中作用的研究进展[J]. 风湿病与关节炎(FAN Yun, BIAN Hua. Research progress of the function of miRNA-155 in systemic sclerosis[J]. *Rheumatism and Arthritis*, 2020, 9(5): 77–80.
- [23] 朱新华, 刘蓓蓓, 侯静雯, 等. 抑制 miR-155 对心肌缺血/再灌注模型心肌细胞凋亡及炎症反应的影响[J]. 基础医学与临床(ZHU Xinhua, LIU Beibei, HOU Jingwen, et al. Effect of inhibiting miR-155 on apoptosis and inflammation reaction in myocardial ischemia-reperfusion model[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2021, 41(12): 1786–1791.
- [24] DU L, ZHANG H X, WANG Z Y, *et al.* Boosting the electrochemiluminescence of luminol by high-intensity focused ultrasound pretreatment combined with 1T/2H MoS₂ catalysis to construct a sensitive sensing platform[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 92: 106264.
- [25] JET T, GINES G, RONDELEZ Y, *et al.* Advances in multiplexed techniques for the detection and quantification of microRNAs[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(6): 4141–4161.
- [26] LI Y L, ZHANG C L, HE Y J, *et al.* A generic and non-enzymatic electrochemical biosensor integrated molecular beacon-like catalyzed hairpin assembly circuit with MOF@Au@G-triplex/hemin nanozyme for ultrasensitive detection of miR-721[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 203: 114051.
- [27] 杨慧, 万广, 高绚照, 等. let-7a 通过抑制 MAP4K3/MKK4/JNK 信号通路减少脑出血大鼠神经元凋亡[J]. 中国病理生理杂志(YANG Hui, WAN Guang, GAO Xuanzhao, et al. let-7a inhibits MAP4K3/MKK4/JNK signaling pathway to decrease neuronal apoptosis in rats with intracerebral hemorrhage[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2020, 36(6): 1055–1062.
- [28] ZHANG S Q, LI K B, SHI W, *et al.* Resettable and enzyme-free molecular logic devices for the intelligent amplification detection of multiple miRNAs via catalyzed hairpin assembly[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(11): 5048–5057.
- [29] 王猛, 胡芳, 曾莉容, 等. 血浆 miR-133、miR-208 及 miR-499 表达与冠状动脉狭窄程度的关系[J]. 中华全科医学(WANG Meng, HU Fang, ZENG Lirong, et al. Study on the relationship between the expression of microRNA-133, microRNA-208 and microRNA-499 in plasma and the severity of coronary artery stenosis[J]. *Chinese Journal of General Practice*, 2020, 18(2): 252–254, 321.
- [30] SUN Y D, LI T. Composition-tunable hollow Au/Ag SERS nanoprobes coupled with target-catalyzed hairpin assembly for triple-amplification detection of miRNA[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(19): 11614–11621.
- [31] FU P, XU M J, XING S, *et al.* Dual cascade isothermal amplification reaction based glucometer sensors for point-of-care diagnostics of cancer-related microRNAs[J]. *Analyst*, 2021, 146(10): 3242–3250.
- [32] YAN Y, SHEN B, WANG H, *et al.* A novel and versatile nanomachine for ultrasensitive and specific detection of microRNAs based on molecular beacon initiated strand displacement amplification coupled with catalytic hairpin assembly with DNzyme formation[J]. *Analyst*, 2015, 140(16): 5469–5474.
- [33] CHAI H, WANG M Y, TANG L H, *et al.* Ultrasensitive electrochemical detection of miRNA coupling tetrahedral DNA modified gold nanoparticles tags and catalyzed hairpin assembly[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1165: 338543.
- [34] YE J W, XU M C, TIAN X K, *et al.* Research advances in the detection of miRNA[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2019, 9(4): 217–226.
- [35] WANG H, WANG H M, WU Q, *et al.* A DNzyme-amplified DNA circuit for highly accurate microRNA detection and intracellular imaging[J]. *Chemical Science*, 2019, 10(41): 9597–9604.
- [36] 汤玉娇, 戴诗岩, 周羽婷, 等. 基于 DNA 模板点击化学和催化发夹型 DNA 自组装反应的新型均相电化学传感器

- 检测 miRNA-21[J]. 分析化学(TANG Yujiao, DAI Shiyan, ZHOU Yuting, *et al.* A homogeneous electrochemical biosensor for detection of miRNA-21 based on DNA-templated click chemistry and catalytic hairpin assembly[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry), 2019, 47(7): 1029-1034.
- [37] 文博, 赵敏, 周晓燕, 等. 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[J]. 重庆医科大学学报(WEN Bo, ZHAO Min, ZHOU Xiaoyan, *et al.* Electrochemical biosensor based on strand displacement amplification and catalytic hairpin assembly strategy for highly sensitive detection of miRNA[J]. Journal of Chongqing Medical University), 2018, 43(9): 1168-1173.
- [38] TANG J, SHI H H, MA G Y, *et al.* Ultrasmall Au and Ag nano-clusters for biomedical applications: a review[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 1019.
- [39] YANG X J, CUI M R, LI X L, *et al.* A self-powered 3D DNA walker with programmability and signal-amplification for illuminating microRNA in living cells[J]. Chemical Communications, 2020, 56(14): 2135-2138.
- [40] 聂阿秀. 催化发卡自组装信号放大试纸条传感器用于癌症标志物快速检测[D]. 武汉: 华中农业大学(NIE Axiu. Catalytic Hairpin Assembly Assisted Lateral Flow Assay for the Rapid Detection of Cancer Biomarker[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University), 2019.
- [41] SI Y M, XU L, DENG T, *et al.* Catalytic hairpin self-assembly-based SERS sensor array for the simultaneous measurement of multiple cancer-associated miRNAs[J]. ACS Sensors, 2020, 5(12): 4009-4016.
- [42] ZHANG W Y, HAO W H, LIU X T, *et al.* Visual detection of miRNAs using enzyme-free amplification reactions and ratio-metric fluorescent probes[J]. Talanta, 2020, 219: 121332.

《生命科学研究》“高校教改研究与实践”栏目征稿启事

《生命科学研究》是由中华人民共和国新闻出版署、科技部批准创办的,国内外公开发行的反映生命科学领域中最新研究成果的综合性学术期刊,是中国高校优秀科技期刊、第三届湖南出版政府奖提名期刊、湖南省“双十佳”期刊以及湖南省重点出版物经费资助刊物。本刊已经进入包括科技期刊世界影响力指数(WJCI)报告(2022)、北大《中文核心期刊要目总览》(2011版)、中国科学引文数据库(CSCD)、中国科技论文与引文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》等在内的国内外多家重要检索数据库,并加入了“中国知网”《中国学术期刊(网络版)》(CAJ-N)网络首发出版平台。

为了交流高等学校在生物学、基础医学、农学等生命科学领域教育教学的研究成果,促进高校教师教育教学水平的提高,本刊决定从2023年开始开设“高校教改研究与实践”栏目,诚邀反映生命科学高等教育领域改革与创新的原创性论文,具体要求如下:

一、刊登范围

1. 高校校本课程开发和国家精品课程建设的研究成果;
2. 高校教育教学改革的新策略、新方法;
3. 高校教育教学实验的创新性设计和实践;
4. 聚焦国家高等教育中的热点问题进行理论探讨的前沿方向性研究成果;
5. 高等教育学科融合或跨学科教学的实践和特色性成果;
6. 反映高校教材理念、结构、内容等方面的创新性研究;等等。

研究内容可从以上几方面考虑(但不局限于此)。

二、来稿要求及权益

1. 投稿本栏目的论文要求第一作者为具有博士学位及高级职称的全日制高等学校教学或实验人员。
2. 来稿均须原创,严禁抄袭,字数控制在6000字以内,要求理论与实践结合,逻辑严谨,行文流畅,数据可靠,图片无版权纠纷,观点鲜明,创新性强,无政治性差错。
3. 来稿须使用规范汉字,严格按本刊格式要求规范撰写。
4. 通过本刊外审和终审的稿件,电子版以最快的方式在“中国知网”网络首发平台全文出版,并予以优先发表。
5. 正式见刊的稿件均由本刊负责付费在同方知网平台上进行大力推广,增加曝光率和引用率。