

· 综述 ·

## 滚环扩增信号放大技术在生物检测中应用的研究进展

占忠旭, 刘巨, 陈博璐, 汤奕舟, 陈官华, 许恒毅

南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047

占忠旭, 刘巨, 陈博璐, 等. 滚环扩增信号放大技术在生物检测中应用的研究进展. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1206-1213.

Zhan ZX, Liu J, Chen BL, et al. Progress in rolling circle amplification in biological detection. Chin J Biotech, 2019, 35(7): 1206-1213.

**摘要:** 滚环扩增 (Rolling circle amplification, RCA) 是一种快速、灵敏且恒温的单链 DNA (Single-stranded DNA, ssDNA) 扩增技术, 与染色或探针联用可实现检测信号的放大, 在生物检测等方面得到广泛的应用。文中对 RCA 的构建方法进行了简介, 综述了近几年其在致病菌、核酸肿瘤标记物、蛋白质、生物小分子和病毒等检测中的研究进展, 并对其未来的发展趋势进行了展望。

**关键词:** 滚环扩增, 恒温, 生物检测

## Progress in rolling circle amplification in biological detection

Zhongxu Zhan, Ju Liu, Bolu Chen, Yizhou Tang, Guanhua Chen, and Hengyi Xu

State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, Jiangxi, China

**Abstract:** Rolling circle amplification is a rapid, sensitive and isothermal single-stranded DNA amplification technique that can be used with staining or probes to amplify the detection signal. This technology has been widely used in biological detection and other aspects. The present paper introduces how to design rolling circle amplification, summarize its application in the detection of pathogens, nucleic acid tumor markers, proteins, biological small biomolecules, and viruses in recent years and prospects for future development.

**Keywords:** rolling circle amplification, isothermal, biological detection

滚环扩增 (Rolling circle amplification, RCA) 是建立于 20 世纪 90 年代中期的 DNA 扩增技术, 该技术是借鉴自然界中环状病原生物体 DNA 分子滚环式复制方式发展的一种恒温扩增技术, 在

研究初期就得到科研人员的高度关注<sup>[1-2]</sup>。RCA 反应发生的关键在于构建一个完整的单链 DNA 环用于后续扩增, RCA 成环方式包括粘性末端成环和平末端成环。RCA 主要有线性 RCA (Linear

**Received:** November 17, 2018; **Accepted:** January 16, 2019

**Supported by:** Research Foundation from State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, China (No. SKLF-ZZB-201720).

**Corresponding author:** Hengyi Xu. Tel: +86-791-88304447/99520; Fax: +86-791-88304400; E-mail: kidyuxu@163.com, HengyiXu@ncu.edu.cn  
南昌大学食品科学与技术国家重点实验室研究基金 (No. SKLF-ZZB-201720) 资助。

网络出版时间: 2019-02-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190218.0957.003.html>

RCA, LRCA)、超分支 RCA (Hyper branched RCA, HRCA) 和多引物 RCA (Multiple primer RCA) 等<sup>[3]</sup>。文中总结了常见的 RCA 构建方法, 综述了其在致病菌、核酸肿瘤标记物、蛋白质、生物小分子和病毒检测中的应用, 并对其未来的发展趋势进行了展望。

## 1 RCA 构建成环分类

### 1.1 锁式 DNA 成环

锁式 DNA 成环方式指运用一条线状的 DNA 为引物将锁式 DNA 的 5'端和 3'端拉近, 从而形成带有缺口的环状 DNA (图 1A)。在 T4 DNA 连接酶的作用下将带缺口 DNA 连接成完整的环状模板, 加入核酸外切酶将引物裂解从而生成一个完整的环状模板用于后期扩增<sup>[4-5]</sup>。

### 1.2 哑铃 DNA 成环

相比锁式 DNA 成环, 哑铃状 DNA 成环方式不需要额外添加引物, 如图 1B 所示, 通过对 DNA 进行设计使其自身杂交成哑铃状模板, 从而将 5'端和 3'端拉近, 进而用 T4 DNA 连接酶直接连接成环状模板。哑铃状 DNA 环虽然设计相对复杂, 但避免了用外切酶将 DNA 裂解的步骤<sup>[6-7]</sup>。

### 1.3 平末端成环

前两者都是将 DNA 的 5'端和 3'端拉近, 形成

粘性末端成环。平末端成环方式异于粘性末端成环, 如图 1C 所示, 将 DNA 设计成含有平末端的发卡结构, 发卡结构的 5'与另外一个发卡的 3'在 T4 DNA 连接酶的作用下连接成完整的哑铃状的环状 DNA<sup>[8]</sup>。平末端成环方式相对哑铃 DNA 成环方式在 DNA 设计上更简单, 但其成环效率不如粘性末端成环方式高。

## 2 滚环扩增信号放大技术的分类

### 2.1 线性 RCA

线性 RCA 也被称为单引物 RCA, 如图 2A 所示, 单链引物与环状模板进行结合, 在 DNA 聚合酶的作用下, 引发链沿着环状模板从 5'-3'方向进行延伸, 催化 dNTPs 合成单链 DNA 分子。当完成一圈复制后, 在 DNA 聚合酶的催化以及核酸链间位移活动的作用下, 新合成的核酸链取代之前的旧链进一步循环延伸。因此, 可在短时间内快速产生大量的与环状模板链完全互补的 DNA<sup>[9]</sup>。

### 2.2 超分支 RCA

超分支 RCA 也被称为指数 RCA 或双引物 RCA, 其原理和线性 RCA 相似, 只是在扩增体系中加入第二条新的引物 (与环状模板序列完全一

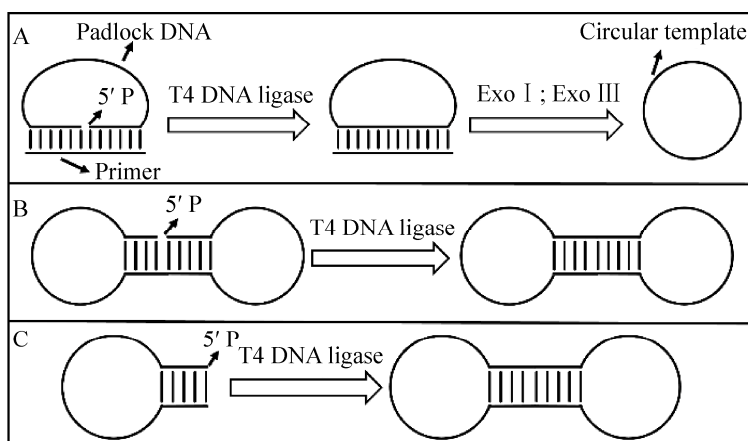


图 1 RCA 构建成环分类

Fig. 1 The classification of RCA loop. (A) Padlock DNA loop. (B) Dumbbell DNA loop. (C) Blunt-end loop.

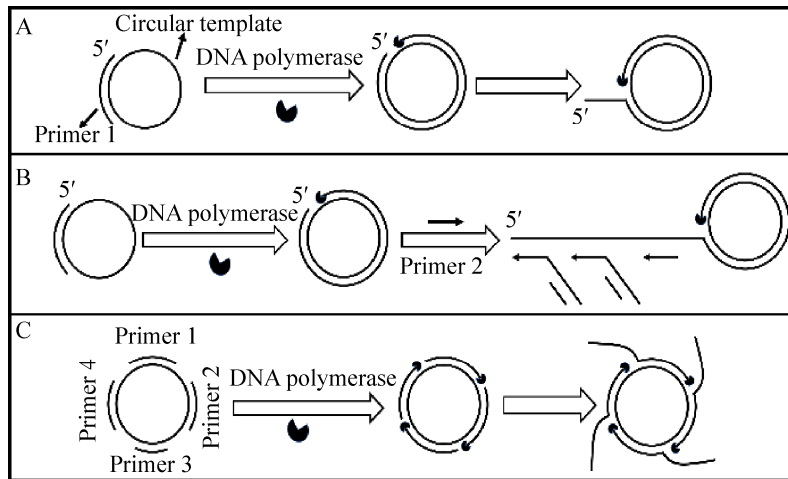


图 2 RCA 的分类

Fig. 2 The classification of RCA. (A) Single primer RCA. (B) Hyper branched RCA. (C) Multiple primer RCA.

致)。如图 2B 所示, 当发生线性 RCA 时第二条引物与其扩增产物结合并酶促延伸, 置换掉下游杂交到扩增产物上的引物延伸链, 之后置换掉的延伸产物又可以作为第一条引物的模板进行扩增, 经过不断的延伸和置换, 在短时间内扩增产物呈指数递增, 最终扩增出不同长度的双链 DNA, 其扩增效率大于  $10^{9[10]}$ 。

### 2.3 多引物 RCA

多引物 RCA, 即在 RCA 反应体系中引入多条引物参与扩增。如图 2C 所示, 在原理上其与线性 RCA 一样, 多条引物与环状模板结合后在聚合酶的作用下进行延伸, 上游引物延伸到下游引物的结合点并置换下游引物, 可在短时间内得到

大量的 DNA<sup>[11]</sup>。

## 3 滚环扩增技术的应用

RCA 具有高扩增效率并且能在恒温条件下进行扩增, 研究者们基于此建立了一系列生物检测方法, 表 1 概括了近年来 RCA 技术在生物检测中的应用。

### 3.1 致病菌的检测

致病菌是能引起疾病的微生物, 也被称为病原微生物。Hao 等<sup>[12]</sup>设计了金黄色葡萄球菌与 RCA 引物竞争适配子序列从而释放出 RCA 引物的反应, 进而引发 RCA, 产生 ssDNA 用于捕获游离的 cDNA-ABEI-AuNFs 复合物, 从而较少量

表 1 RCA 信号放大技术在生物检测物中的应用

Table 1 Application of RCA signal amplification technology in biological detection

Detector	Detection technology	Detection limit	References
<i>Staphylococcus aureus</i>	RCA-Chemiluminescence energy resonance transfer	15 CFU/mL	[12]
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RCA-Surface Enhanced Raman Scattering Technology	2 CFU/mL	[13]
MiR-155	RCA-Surface Enhanced Raman Scattering Technology	70.2 amol/L	[14]
Let-7a	HRCA-G-quadruplex fluorescence method	0.3 fmol/L	[4]
Fetoprotein	RCA-AuNPs colorimetric method	33.45 pg/mL	[15]
Thrombin	RCA-Colorimetric sensor	0.01 fmol/L	[16]
Prostate-specific antigen	RCA-Electrochemical sensors	1.8 pg/mL	[17]
Ochratoxin A	RCA-Electrochemical sensors	0.065 pg/mL	[18]
Influenza virus	PCR-RCA	4.9 amol/L	[19]
Ebola virus	RCA-GO	1.4 pmol/L	[20]

的复合物吸附于 WS<sub>2</sub> 纳米材料,保持原有化学发光,实现信号放大,结果表明在最优条件下该方法对纯培养的金黄色葡萄球菌的检测限可达 15 CFU/mL。Yao 等<sup>[13]</sup>建立了一种基于 RCA 结合表面增强拉曼散射技术用于检测水样本中的副溶血性弧菌,通过双抗夹心的方式将 RCA 引物带入反应体系进行 RCA 反应,从而产生一条很长的含有重复序列的 ssDNA 来捕获 Au@Ag 探针,提高反应体系中纳米粒子的富集量从而增强拉曼信号,该方法的检测限达到 1 CFU/mL。黄梦琪等<sup>[21]</sup>将滚环扩增和试纸条显色相结合用于检测单增李斯特菌,将单增李斯特菌的 *hlyA* mRNA 作为引发链引发 RCA,然后运用酶将扩增的单链产物剪切成短片段的 ssDNA 用于捕获探针和金标探针的“桥梁”,实现比色检测,在最优条件下检测限达到 100 pg/ $\mu$ L。该方法可在几个小时内完成检测,在现场检测中具有较大的应用前景。本实验室前期建立了多个基于分子生物学和核酸信号放大的方法用于致病菌检测<sup>[22-24]</sup>,并建立了基于 LRCA 检测单增李斯特菌的方法。

### 3.2 核酸肿瘤标记物检测

微小核糖核酸 (MiRNAs) 是一类在转录后水平调控基因表达的内源性的非编码单链 RNA 分子<sup>[25]</sup>,研究表明 MiRNAs 的异常表达与一些癌症 (肺癌、胃癌、乳腺癌等) 的发生具有密切联系,已被当作新型的肿瘤标记物,快速、灵敏和准确地检测 MiRNAs,具有很高的应用前景<sup>[26]</sup>。Xu 等<sup>[27]</sup>将回文 DNA 的互补序列设计在 RCA 模板上,通过 Let-7a 引发 RCA 反应产生大量的含有回文序列 ssDNA,回文序列自身折叠形成含有双链结构的发卡 DNA,SYBR Green I 嵌入双链中产生强荧光信号实现检测,结果表明该方法在最佳条件下检测限达 6.4 pmol/L。Jiang 等<sup>[4]</sup>建立了一种基于 G-四链体荧光结合 HRCA 用于检测 Let-7a,通过目的片段设计含有 G-四链体和酶切

位点的锁式探针,加入 Let-7a 引发 RCA 反应,产生大量的单链 DNA 片段并且被限制酶切割成不同的片段进一步引发 RCA 反应,产生大量富含 G-四链体 DNA 片段。THT 嵌入 G-四链体序列产生强荧光信号达到检测的目的,结果表明,该方法对 Let-7a 的检测限为 4 amol/L,线性范围为 10 amol/L-1 nmol/L。Zhou 等<sup>[28]</sup>建立了一种基于链置换反应与 RCA 相结合的双信号放大方法用于检测 MiR-21,通过链置换反应产生大量的 RCA 引发链用于引发 RCA 反应,加入 SYBR Green II 染料与 ssDNA 结合产生荧光实现检测,检测限达到 1.0 fmol/L。

### 3.3 蛋白质的检测

蛋白质作为生命体中重要的生物大分子,既能调控细胞代谢,又能作为目标分子用于监控疾病,因此,对蛋白质进行超灵敏的检测在临床诊断、病理学和遗传学等领域具有重要的作用<sup>[29]</sup>。Huang 等<sup>[11]</sup>建立了一种基于 HRCA 结合 G-四链体荧光传感器方法用于检测 DNA 甲基化酶,平末端发卡探针在 T4 DNA 连接酶作用下连接成哑铃状模板。当体系中不存在 DNA 甲基化酶时,限制性内切酶将哑铃状模板中的双链切割成不完整的环状 DNA 进而限制 RCA 反应,当加入 DNA 甲基化酶后,哑铃状的环状模板保持原有的结构,因而能引发 RCA 反应产生大量的 G-四链体序列用于后续荧光检测。结果表明该方法的线性范围在 0.008-50 U/mL,且检测限达到 0.001 1 U/mL。Chen 等<sup>[15]</sup>建立了一种基于 RCA 结合 AuNPs 比色的方法来检测甲胎蛋白,通过夹心模式将 RCA 体系带入酶标孔中,引发 RCA 反应,吸取上清液中未反应的锁式探针加入到 AuNPs 溶液中进行金保护,测定吸光度 658/520 对目标物进行定量。该方法能够特异性地检测甲胎蛋白且检测限为 33.45 pg/mL,通过改变不同的抗体,该方法可用于检测不同的蛋白和病毒,具有较好的应用前景。

### 3.4 生物小分子检测

生物小分子的灵敏检测在临床检查、环境监测和食品安全等领域极其重要,开发快速高效的检测方法意义重大。Zhang 等<sup>[17]</sup>建立了一种光电化学传感器方法用于快速、灵敏地检测前列腺抗原 (Prostate-specific antigen, PSA),通过免疫学反应将引发链带入反应体系发生 RCA 反应,产生大量的富含 G-四链体序列的 DNA,加入氯化血红素形成过氧化物酶用于催化化学反应,从而使电极板上的电子传递受到阻碍产生电化学信号变化实现检测。在最优条件下该方法对 PSA 的检测限达到 1.8 pg/mL。Lee 等<sup>[30]</sup>将磁分离与 RCA 相结合用于 PSA 检测,特异性的 PSA 适配子作为磁珠和 RCA 产物的“桥梁”,并且引发 RCA 反应产生大量的 G-四链体序列,加入甲基蓝染料结合 G-四链体序列实现检测,该方法在 PSA 浓度为 100 fmol/L–10 nmol/L 时呈现很好的线性关系且检测限达到 22.3 fmol/L。Huang 等<sup>[18]</sup>建立了一种基于 RCA 信号放大的新型的电化学传感器用于快速灵敏地检测赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA),该研究通过引入 RCA 放大体系使得更多的分子信标固定在金电极板上用于电化学检测,在最优的条件下,OTA 的检测限为 0.065 pg/mL,并且该方法能成功应用在酒样本的检测中,通过选用不同的适配子,该方法也能够检测其他的毒素,具有较好的应用前景。

### 3.5 病毒的检测

病毒一直是人类健康的主要威胁之一,病毒的快速检测对预防和控制病毒具有重大意义。Kim 等<sup>[19]</sup>将聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 与 RCA 结合用于超灵敏检测流感病毒,通过设计特异性的针对流感病毒的上下游引物引发 PCR 反应,产生大量的双链 DNA,然后用外切酶对双链 DNA 进行剪切,从而获取 ssDNA。再根据获取的 ssDNA 设计哑铃状探针,

引发 RCA 反应产生大量的 G-四链体序列用于荧光检测。结果表明,将这两种方法结合能明显提高检测灵敏度和特异性,其检测限达到 4.9 amol/L,线性范围在 450 amol/L–450 fmol/L。Huang 等<sup>[31]</sup>建立一种循环链置换反应结合 RCA 电化学传感器用于检测 B 型乙肝病毒,将特异性的 B 型乙肝病毒 DNA 作为金电极板和 RCA 引发链的“桥梁”,在 DNA 聚合酶的作用下引发链延伸将 B 型乙肝病毒 DNA 置换下来从而充当下一个“桥梁”。加入锁式探针引发 RCA 反应产生大量的 ssDNA 固定在金电极板上用于负载大量的亚甲基蓝,实现电化学的检测。结果表明该方法对 B 型乙肝病毒的检测限达 2.6 amol/L,线性范围为 10–700 amol/L。

## 4 讨论

### 4.1 RCA 技术优势与不足

随着分子生物学的快速发展,核酸恒温扩增技术已广泛应用于生物检测,例如杂交链式反应 (Hybridization chain reaction, HCR)、催化型发卡结构自组装反应 (Catalytic hairpin assembly, CHA)、链置换扩增技术 (Strand displacement amplification, SDA) 和环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等<sup>[32-35]</sup>,这些恒温扩增技术各有特点,可根据酶的使用条件分为无酶扩增和耗酶扩增。无酶扩增包括 HCR 和 CHA 等,耗酶扩增包括 SDA 和 LAMP 等。相比无酶扩增,RCA 反应在设计上较前两者简单,且扩增产物 ssDNA 能与探针直接结合实现信号放大。相比耗酶扩增,SDA 产物多样 (单链和双链),电泳检测时有拖尾现象,且 SDA 产物的两端必须带有核酸内切酶的识别序列。而 LAMP 反应对引物要求较高,易形成气溶胶造成假阳性结果,且不适合进行长链 DNA 的扩增。相比之下,LRCA 产物为一条长的 ssDNA,产物较为单一,且反应不需要过多的引物引发。

然而 RCA 也存在一些问题,需要不断改进:

- 1) RCA 反应发生的关键在于构建完整的单链环用于后续扩增,构建成环反应的关键在于运用 DNA 连接酶将 ssDNA 连接成环,然而 DNA 连接酶对反应体系要求较高,当反应体系中 NaCl 或 KCl 的浓度超过 200 mmol/L 时,可强烈抑制 DNA 连接酶活性。因此,预先构建一个完整的环状探针能有效预防后续反应体系对连接酶的影响。
- 2) RCA 操作繁琐,反应中需要磷酸化的 DNA 用于构建环,且反应过程中需要消耗价格昂贵的酶,成本较高,难以满足廉价检测的需求。
- 3) 均相反应体系中多余的锁式探针和模板 DNA 会产生较强的背景信号,对检测限产生影响,使用核酸外切酶能够有效去除部分背景信号,但价格昂贵。
- 4) RCA 反应需要数个小时,难以满足快速检测的需求。因此,作为一种恒温扩增技术,RCA 还应在探针的设计、背景的消除、成本和时间等方面作进一步的探索研究。

## 4.2 RCA 的改进方法

经 RCA 扩增产生的大量 ssDNA,与染色剂或探针联用可实现检测信号的放大。另外,在 RCA 反应体系中采用功能性的 dNTPs 和 DNA 纳米花结构,也对检测的灵敏度和检测时间大有改善。

### 4.2.1 运用功能化的 dNTP

RCA 扩增产物是由多个重复序列的 ssDNA 组成,每段重复序列可以搭载检测探针并固定一个信号分子。为了进一步提高检测的灵敏度,运用功能化的 dNTPs 可以增加信号的负载量<sup>[36]</sup>。如图 3A 所示,通过将 Cy5 标记的 dCTP 运用到反应体系中,经过 RCA 反应后,扩增产物中 C 碱基都带有荧光探针 Cy5,大大提高了检测的灵敏度。

### 4.2.2 构建 DNA 纳米花

RCA 必须经过数小时的反应时间才能产生用于搭载信号探针的 ssDNA,难以满足快速检测的需求。预先构建一个完整的 RCA 产物用于后续信号放大可以减少在实际检测中 RCA 扩增耗费的时间,如图 3B 所示,通过将功能化的 dNTPs 运用到 RCA 反应体系中产生大量富含功能化的 RCA 产物,当产物中 DNA 达到一定浓度时,生成的产物与溶液中不溶的盐离子结合形成结晶,从而得到功能化的 DNA 纳米花<sup>[37]</sup>。所形成的纳米花上富含大量的功能性位点,能够直接用于实际检测,摆脱了反应时间的限制。同时,也可以在 RCA 反应过程中加入蛋白质(图 3C),从而将蛋白质固定在 DNA 纳米花中用于后续的检测<sup>[38-39]</sup>。

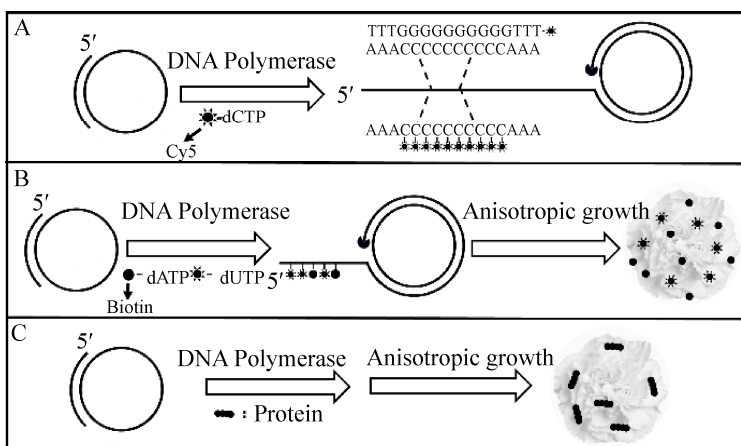


图 3 RCA 方法的改进

Fig. 3 The improvement of RCA. (A) Functionalized RCA product. (B) Functionalized DNA nanoflower. (C) Protein loaded DNA nanoflower.

## 5 结论

作为一种快速且恒温的 DNA 扩增技术, RCA 扩增得到的大量 ssDNA 可用于搭载一系列的信号分子实现检测信号的放大, 在微生物检测、疾病预防和环境监测等领域都得到了广泛应用。相信随着技术水平的不断提高, RCA 定会得到更广泛和实际的应用。

## REFERENCES

- [1] Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, et al. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res*, 2001, 11(6): 1095–1099.
- [2] Lizardi PM, Huang XH, Zhu ZR, et al. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet*, 1998, 19(3): 225–232.
- [3] Zhu XL, Feng C, Zhang B, et al. A netlike rolling circle nucleic acid amplification technique. *Analyst*, 2015, 140(1): 74–78.
- [4] Jiang HX, Liang ZZ, Ma YH, et al. G-quadruplex fluorescent probe-mediated real-time rolling circle amplification strategy for highly sensitive microRNA detection. *Anal Chim Acta*, 2016, 943: 114–122.
- [5] Jiang HX, Xu YP, Dai LH, et al. Ultrasensitive, label-free detection of T4 ligase and T4 polynucleotide kinase based on target-triggered hyper-branched rolling circle amplification. *Sens Actuators B Chem*, 2018, 260: 70–77.
- [6] Qing TP, He XX, He DG, et al. Dumbbell DNA-templated CuNPs as a nano-fluorescent probe for detection of enzymes involved in ligase-mediated DNA repair. *Biosens Bioelectron*, 2017, 94: 456–463.
- [7] Chen JY, Liu YC, Ji XH, et al. Target-protecting dumbbell molecular probe against exonucleases digestion for sensitive detection of ATP and streptavidin. *Biosens Bioelectron*, 2016, 83: 221–228.
- [8] Du YC, Zhu YJ, Li XY, et al. Amplified detection of genome-containing biological targets using terminal deoxynucleotidyl transferase-assisted rolling circle amplification. *Chem Commun*, 2018, 54(6): 682–685.
- [9] Zhao WA, Ali MM, Brook MA, et al. Rolling circle amplification: applications in nanotechnology and biodetection with functional nucleic acids. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47(34): 6330–6337.
- [10] Xue QW, Kong YC, Wang HS, et al. Liposome-encoded magnetic beads initiated by padlock exponential rolling circle amplification for portable and accurate quantification of microRNAs. *Chem Commun*, 2017, 53(78): 10772–10775.
- [11] Huang J, Li XY, Du YC, et al. Sensitive fluorescent detection of DNA methyltransferase using nicking endonuclease-mediated multiple primers-like rolling circle amplification. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 417–423.
- [12] Hao LL, Gu HJ, Duan N, et al. An enhanced chemiluminescence resonance energy transfer aptasensor based on rolling circle amplification and WS<sub>2</sub> nanosheet for *Staphylococcus aureus* detection. *Anal Chim Acta*, 2017, 959: 83–90.
- [13] Yao L, Ye YW, Teng J, et al. *In vitro* isothermal nucleic acid amplification assisted surface-enhanced raman spectroscopic for ultrasensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Anal Chem*, 2017, 89(18): 9775–9780.
- [14] He Y, Yang X, Yuan R, et al. “Off” to “On” surface-enhanced Raman spectroscopy platform with padlock probe-based exponential rolling circle amplification for ultrasensitive detection of microRNA 155. *Anal Chem*, 2017, 89(5): 2866–2872.
- [15] Chen CH, Luo M, Ye T, et al. Sensitive colorimetric detection of protein by gold nanoparticles and rolling circle amplification. *Analyst*, 2015, 140(13): 4515–4520.
- [16] Wang S, Bi S, Wang ZH, et al. A plasmonic aptasensor for ultrasensitive detection of thrombin via arrested rolling circle amplification. *Chem Commun*, 2015, 51(37): 7927–7930.
- [17] Zhang KY, Lv SZ, Lin ZZ, et al. Bio-bar-code-based photoelectrochemical immunoassay for sensitive detection of prostate-specific antigen using rolling circle amplification and enzymatic biocatalytic precipitation. *Biosens Bioelectron*, 2018, 101: 159–166.
- [18] Huang L, Wu JJ, Zheng L, et al. Rolling chain amplification based signal-enhanced electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of ochratoxin A. *Anal Chem*, 2013, 85(22): 10842–10849.
- [19] Kim DM, Seo J, Jun BH, et al. Fluorometric detection of influenza virus RNA by PCR-coupled rolling circle amplification generating G-quadruplex. *Sens Actuators*



- B Chem, 2017, 251: 894–901.
- [20] Wen J, Li WS, Li JQ, et al. Study on rolling circle amplification of Ebola virus and fluorescence detection based on graphene oxide. *Sens Actuators B Chem*, 2016, 227: 655–659.
- [21] Huang MQ, Liu F, Zhou XM. Rapid and isothermal paper-based gene-sensing of viable pathogens with rolling circle amplification. *Acta Laser Biol Sin*, 2017, 26(6): 527–533 (in Chinese).  
黄梦琪, 刘芳, 周小明. 基于滚环扩增技术的纸基显色传感器用于致病菌快速检测. *激光生物学报*, 2017, 26(6): 527–533.
- [22] Li F, Xie GY, Zhou BQ, et al. Rapid and simultaneous detection of viable *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* in infant food products by PMA-mPCR assay with internal amplification control. *LWT*, 2016, 74: 176–182.
- [23] Li FL, Li F, Luo D, et al. Biotin-exposure-based immunomagnetic separation coupled with nucleic acid lateral flow biosensor for visibly detecting viable *Listeria monocytogenes*. *Anal Chim Acta*, 2018, 1017: 48–56.
- [24] Yu B, Li FL, Zhao TC, et al. Hybridization chain reaction-based flow cytometric bead sensor for the detection of emetic *Bacillus cereus* in milk. *Sens Actuators B Chem*, 2018, 256: 624–631.
- [25] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7065–7070.
- [26] Wu H, Liu YL, Wang HY, et al. Label-free and enzyme-free colorimetric detection of microRNA by catalyzed hairpin assembly coupled with hybridization chain reaction. *Biosens Bioelectron*, 2016, 81: 303–308.
- [27] Xu H, Zhang SX, Ouyang CH, et al. DNA nanostructures from palindromic rolling circle amplification for the fluorescent detection of cancer-related microRNAs. *Talanta*, 2019, 192: 175–181.
- [28] Zhou YL, Li BC, Wang MH, et al. Fluorometric determination of microRNA based on strand displacement amplification and rolling circle amplification. *Microchim Acta*, 2017, 184(11): 4359–4365.
- [29] Chen L, Liu MM, Zhang YJ, et al. Indirect protein detection by versatile SERS sensors. *Spectrosc Spect Anal*, 2017, 37(10): 3094–3098 (in Chinese).  
陈雷, 刘毛毛, 张永军, 等. SERS 传感器间接检测蛋白质的研究进展. *光谱学与光谱分析*, 2017, 37(10): 3094–3098.
- [30] Lee CY, Fan HT, Hsieh YZ. Disposable aptasensor combining functional magnetic nanoparticles with rolling circle amplification for the detection of prostate-specific antigen. *Sens Actuators B Chem*, 2018, 255: 341–347.
- [31] Huang S, Feng MM, Li JW, et al. Voltammetric determination of attomolar levels of a sequence derived from the genom of hepatitis B virus by using molecular beacon mediated circular strand displacement and rolling circle amplification. *Microchim Acta*, 2018, 185(3): 206.
- [32] Chen YX, Huang KJ, He LL, et al. Tetrahedral DNA probe coupling with hybridization chain reaction for competitive thrombin aptasensor. *Biosens Bioelectron*, 2018, 100: 274–281.
- [33] Zhang Y, Luo SH, Situ B, et al. A novel electrochemical cytosensor for selective and highly sensitive detection of cancer cells using binding-induced dual catalytic hairpin assembly. *Biosens Bioelectron*, 2018, 102: 568–573.
- [34] Yin JJ, Liu YQ, Wang S, et al. Engineering a universal and label-free evaluation method for mycotoxins detection based on strand displacement amplification and G-quadruplex signal amplification. *Sens Actuators B Chem*, 2018, 256: 573–579.
- [35] Günther S, Felten S, Wess G, et al. Detection of feline Coronavirus in effusions of cats with and without feline infectious peritonitis using loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*, 2018, 256: 32–36.
- [36] Han S, Lee JS, Lee JB. Synthesis of a multi-functional DNA nanosphere barcode system for direct cell detection. *Nanoscale*, 2017, 9(37): 14094–14102.
- [37] Zhu GZ, Hu R, Zhao ZL, et al. Noncanonical self-assembly of multifunctional DNA nanoflowers for biomedical applications. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(44): 16438–16445.
- [38] Kim E, Zwi-Dantsis L, Reznikov N, et al. One-pot synthesis of multiple protein-encapsulated DNA flowers and their application in intracellular protein delivery. *Adv Mater*, 2017, 29(26): 1701086.
- [39] Yan YC, Li J, Li WH, et al. DNA flower-encapsulated horseradish peroxidase with enhanced biocatalytic activity synthesized by an isothermal one-pot method based on rolling circle amplification. *Nanoscale*, 2018, 10(47): 22456–22465.

(本文责编 陈宏宇)