

多聚腺嘌呤 DNA 探针及其生物传感应用*

李兰英^a 陶晴^a 闻艳丽^a 王乐乐^a 郭瑞妍^a
刘刚^{*,a} 左小磊^{*,b}

(^a 上海市计量测试技术研究院 国家市场监督管理总局生物分析计量溯源重点实验室 上海 201203)

(^b 上海交通大学医学院分子医学研究院 上海 200127)

摘要 与传统的巯基 DNA 探针相比, 多聚腺嘌呤 DNA 探针(polyA DNA 探针)无需特别化学修饰, 具有合成简单、成本低、稳定性好等优点, 利用自身 polyA 嵌段与金的相互作用即可达到捕获探针在金表面的紧凑和有序自组装的目的, 实现了识别和探针固定功能的一体化, 在生物传感领域受到广泛关注. 本综述首先介绍了 polyA DNA 探针与金相互作用机理研究, 随后分别介绍了 polyA DNA 探针在比色、荧光、表面增强拉曼散射和电化学生物传感中的研究进展, 并探讨了 polyA DNA 探针在生物传感领域面临的机遇和挑战, 以期为食品安全、环境监控、生物医学等领域的进一步发展提供参考.

关键词 多聚腺嘌呤 DNA 探针; 自组装; 生物传感器; 生物标志物

Poly-adenine-based DNA Probes and Their Applications in Biosensors*

Li, Lanying^a Tao, Qing^a Wen, Yanli^a Wang, Lele^a Guo, Ruiyan^a
Liu, Gang^{*,a} Zuo, Xiaolei^{*,b}

(^a Key Laboratory of Bioanalysis and Metrology for State Market Regulation, Shanghai Institute of Measurement and Testing Technology, Shanghai 201203, China)

(^b Institute of Molecular Medicine, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China)

Abstract Compared to traditional thiolated DNA probes, poly-adenine-based DNA probes (polyA DNA probes) are free of special chemical modifications, and thus exhibit unique advantages of easy synthesis, low economic cost, and excellent stability. Using their intrinsic polyA fragments, polyA DNA probes are combined onto the gold surface to form a compact and ordered monolayer with both anchoring and recognition capabilities. As a result, polyA DNA probes have attracted numerous research interests in biosensing. In this review, we first presented the mechanism of interaction between polyA DNA probes and the gold surface and then reviewed the applications of the polyA DNA probes in the development of biosensors, including colorimetric biosensors, fluorescence biosensors, surface-enhanced Raman scattering (SERS) biosensors, and electrochemical biosensors. We concluded with a discussion of the opportunities and challenges for polyA DNA probes and expected this review to be informative for the development of biosensors in food safety, environmental monitoring, and biomedicine.

Keywords poly-adenine-based DNA probe; self-assembly; biosensor; biomarker

1 引言

DNA 分子因其高度可编程性和多样性、优异的生物相容性与自组装能力、易于合成和修饰等固有特性和优势, 被科学家精确地设计成 DNA 探针, 用于特异性识别目标分析物或信号放大, 实现高灵敏生物传感器的构建, 已经广泛应用于临床诊断、环境监测和食品安全分析等领域^[1-5]. DNA 探针是生物传感器的关键元件, 其在界面上固定密度、反应活性和空间取向直接影响传

感器的选择性和灵敏度等性能指标^[6-10]. 传统金表面(金纳米颗粒、金电极以及金芯片等)上 DNA 探针的固定方法主要有共价键合自组装法^[11-14]和亲和素-生物素特异性结合方法^[15-20]等. 然而, 这些方法中 DNA 探针都需要进行化学修饰, 受到合成效率和经济成本的限制, 同时一维 DNA 探针的界面精确调控一直是一个技术挑战, 因此如何构建简单方便、低成本且可控性高的 DNA 分子传感界面, 是很多生物传感实现应用甚至商品化发展的关键问题.

* Dedicated to the 90th anniversary of *Acta Chimica Sinica*.

* E-mail: liug@sint.com.cn; zuoxiaolei@sjtu.edu.cn

Received April 8, 2023; published May 31, 2023.

Project supported by the National Quality Infrastructure Program of China (No. 2021YFF0600705), the National Natural Science Foundation of China (No. 22074093) and Shanghai Sailing Program (21YF1459500).

* 庆祝《化学学报》创刊 90 周年.

项目受国家质量基础设施体系专项(2021YFF0600705)、国家自然科学基金(22074093)和上海市青年科技英才扬帆计划(21YF1459500)资助.

多聚腺嘌呤 DNA 探针(polyA DNA 探针)具有两个或以上的功能化嵌段: (1) polyA 嵌段中的腺嘌呤(A)碱基和金表面存在固有亲和力, 与 Au—S 键作用力相当^[21-24], 可以将 polyA DNA 探针固定在金表面上, 而且可以通过调控碱基 A 的个数来调节探针相互之间的空间距离和取向; (2) 识别嵌段用于特异性识别. polyA DNA 探针无需末端化学修饰, 不仅合成成本低, 稳定性好, 而且可以设计成多个识别探针, 实现了识别和探针固定功能的一体化, 有利于设计出高选择性、高灵敏度、高重现性及多维靶标检测的生物传感器.

2 聚腺嘌呤 DNA 探针与金的相互作用

早在 2002 年, Jang^[25]利用表面增强拉曼光谱(SERS)首次对 A、T、C、G 四种碱基与金纳米颗粒相互作用进行了系统研究, 结果表明这四种碱基均可以通过各自不同的官能团与金纳米颗粒相互作用(图 1a), 其中碱基 A 通过咪唑环上 6 位环外氨基及 7 位氮原子与金纳米颗粒形成稳定的配位结构, 其结合力最强, 碱基 T 与金纳米颗粒作用力最弱^[26]. 美国国家标准与技术研究院(NIST)的 Tarlov 课题组^[27]采用傅里叶变换红外(FTIR)和 X 射线光电子能谱(XPS)原位定性表征了单链 DNA 探针(ssDNA)与金的吸附作用情况, 发现连续的 A 序列与金的吸附作用明显高于其它序列, 并成功将 polyA DNA 探针组装在金表面. 随后 Tarlov 课题组^[28]又进一步采用 FTIR 和 XPS 对组装在金表面上的 polyA DNA 探针进行定量分析, 揭示了金表面碱基 A 的密度接近饱和, 几乎与 polyA 长度无关, 而且 polyA DNA 探针组装密度与 polyA 长度有明显的负相关性, 随着 polyA 长度的加大, DNA 探针间距增加, 组装密度相应降低(图 1b). 该实验现象在后续的生物传感研究中也得到了相应的印证: Zhu 等^[50]采用巯基乙醇取代金纳米颗粒表面 polyA

DNA 探针的方法测定了 polyA DNA 探针在金纳米颗粒表面的组装密度, 发现 DNA 探针在 13 nm 金纳米颗粒表面的组装量随着 polyA 长度的加大逐渐降低; Liu 课题组^[6]利用计时电量法发现了金电极表面上 polyA DNA 探针密度随着 polyA 长度的加大而逐渐降低, 均与 Tarlov 课题组^[28]的研究结果相符. 我们可以通过简单调节 polyA 长度就可以精准调控探针组装密度, 从而调节探针杂交效率, 为基于 polyA DNA 探针设计素材构建新型的生物传感器奠定了基础.

3 聚腺嘌呤 DNA 探针在生物传感器中的应用进展

polyA DNA 探针兼具表面自组装和分子识别功能, 可以自组装在金纳米颗粒、金芯片以及金电极表面, 结合比色、荧光、表面增强拉曼散射光谱和电化学等检测技术, 成功应用于构建多种类型的生物传感器, 实现 DNA^[29]、microRNAs^[30]、重金属^[31]和蛋白标志物^[32]等目标物的高灵敏度、高重现性的分析检测.

3.1 比色生物传感器

polyA DNA 探针通过 polyA 嵌段自组装在金纳米颗粒上, 无需巯基乙醇等小分子进行位点封闭, 金纳米颗粒表面上的 DNA 探针就能保持直立构象, 降低了识别空间位阻, 响应快速、结果直观、具有现场检测的潜力而广受关注^[33-36]. Fan 课题组^[21]开创了第一代 polyA DNA 比色生物传感器, 将 DNA 探针末端设计为 polyA, 并结合金纳米颗粒较高的消光系数和优异的光学特性, 构建了基于 polyA DNA 探针的比色生物传感器, 首次展现了 polyA DNA 探针优异的生物传感功能(图 2a). 设计的 polyA DNA 探针拥有双嵌段: 识别嵌段用于识别目标 DNA; polyA 嵌段包含 10~30 个连续的 A, 用于自组装在金纳米颗粒表面, 而且由于与金纳米颗粒作用力大于其它碱基, 基本覆盖了大部分金纳米颗粒上的结合位点, 能防止识别嵌段与金纳米颗粒之间的非特异性吸附, 使识别嵌段保持直立构象, 并以 polyA 长度的间隔分散, 降低了识别嵌段杂交时的空间位阻, 随着 polyA 个数的增加, 杂交效率逐渐增加, 比通过 Au—S 键组装的 DNA 探针杂交效率提高一个数量级, 灵敏度提高 20 倍, 可以通过分光光度计检测低至 0.5 nmol/L 的目标 DNA. 该课题组还证明了 polyA 与金纳米颗粒的结合力与 Au—S 键相当, polyA 可以代替修饰在 DNA 末端的巯基, 作为在金纳米颗粒表面自组装的有效锚定嵌段, 这为无需化学修饰的 DNA 分子组装在金纳米颗粒表面提供了新的修饰方法. 为了减少金纳米颗粒表面 DNA 探针的动力学响应时间, Yao 等^[37]深入研究了 polyA DNA 探针在金纳米颗粒上组装情况, 发现 polyA 的长度会影响形成金纳米颗粒表面探针的价态, 当采用 polyA80 时, 其与金纳米颗粒可以形成单价态的金纳米颗粒探针

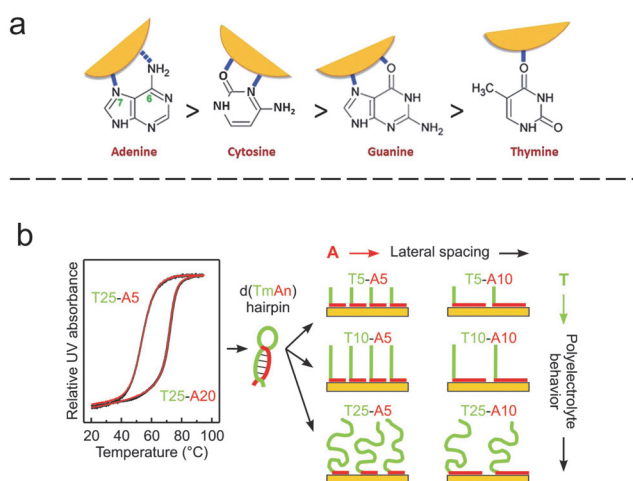


图 1 (a) DNA 的四种碱基分别与金纳米颗粒的吸附位点^[26]. (b) 吸附在金表面的 polyA DNA 探针的理想化示意图^[28]

Figure 1 (a) Bonding of DNA bases and gold nanoparticles^[26]. (b) Idealized schematic of polyA DNA probes on gold^[28]

(mDNA-AuNPs), 即一个金纳米颗粒上只组装一根 DNA 探针, 而且产率接近 90%, mDNA-AuNPs 具有快速的动力学和高效的序列特异性, 发展了第二代高效的 polyA DNA 比色生物传感器. Pan 等^[38]对 polyA DNA 探针在金纳米颗粒上的稳定性进行了直接研究, 系统地解释了 DNA 解离动力学与温度、缓冲液 pH 值、有机溶剂和离子强度的关系, 证明了 polyA20 和 polyA30 的 DNA-AuNPs 偶联物在大多数实验条件下都表现出较好的稳定性. 这些系统的研究都为进一步构建基于 polyA DNA-AuNPs 的比色生物传感器奠定了实验基础.

Nourisacid 等^[39]通过 polyA 末端将一种 L 型 DNA 探针组装在金纳米颗粒表面, 开发了一种高效且简单快速检测转基因植物的比色传感器. L 型 DNA 探针包括三部分: (1) polyA 嵌段, 用于将探针在金纳米颗粒表面自组装, 管控探针间横向间隔; (2) polyT 嵌段, 用于将探针保持直立的状态, 管控探针间的垂直间隔; (3) 识别嵌段, 用于特异性识别含有花椰菜花叶病毒 35S rRNA 基因的转基因植物. 目标 DNA 可以与两种金纳米颗粒表面修饰的互补探针杂交, 交联生成网状聚集体, 从而使金纳米颗粒溶液的颜色由红色变为蓝色, 可用于转基因食品安全监测中, 但是由于检测灵敏度不高, 无法实现准确的定量分析. 虽然该传感器灵敏度需要进一步提升, 但该项工作系统研究了 polyA、polyT 和金纳米颗粒直径对传感器灵敏度的影响, 指出设计类似比色传感器时, 需综合考虑金纳米颗粒直径和探针长度, 设计探针的长度需小于金纳米颗粒的直径, 才能够通过目标 DNA 分子引起的聚集而实现合适的颜色变化. Xie 等^[40]基于类似的原理和 T-Hg²⁺-T 结构, 将识别嵌段设计成 polyT, 成功构建了高灵敏的饮用水中 Hg²⁺残留的比色

传感器, 检测限低至 3.75 nmol/L, 低于世界卫生组织 (WHO) 规定的饮用水中 Hg²⁺含量的最大允许值水平 5 nmol/L, 并应用于实际样品自来水和湖水中 Hg²⁺的测定. Yin 等^[41]将氯霉素 (CAP) 的适配体通过 polyA5 组装在金纳米颗粒表面, 建立了一种竞争性比色传感器, 与直接杂交^[39]或识别^[40]的传感器相比, 具有更好的特异性, 成功应用于环境监控中氯霉素残留检测中, 检测氯霉素的线性范围为 0.20~3.20 $\mu\text{mol/L}$, 检测限为 22 nmol/L, 与现有的氯霉素检测方法相当. 该传感器可以通过改变适配体的种类拓展目标检测范围, 可用于生物医学中凝血酶、血小板凝血因子和 C 反应蛋白等蛋白标志物的检测, 但易受生物样品中复杂基质干扰, 需要对样品进行前处理, 去除干扰的蛋白或脂肪等.

polyA DNA 探针修饰的金纳米颗粒还可以用于信号输出及信号放大元件, Li 等^[32]采用 polyA DNA 探针修饰的金纳米颗粒催化甲基橙 (MO) 产生比色信号, 开发了一种无酶、低成本的比色生物传感器用于凝血酶的检测 (图 2b). 该传感器利用凝血酶适配体偶联磁珠 (MBs) 作为捕获探针, 用于捕获、浓缩和分离凝血酶, 而凝血酶的另一段适配体通过 polyA 组装在金纳米颗粒表面, 与凝血酶采用三明治结构结合, 并催化 MO 产生比色信号, 用于信号输出. 该传感器检测凝血酶的线性范围为 (45.5~455) pmol/L, 检测限为 30 pmol/L, 与传统的基于金纳米颗粒的比色方法相比, 检测限低 1~2 个数量级. 这种新方法可以避免使用各种酶和增强溶液, 在一定程度上减少了现存有限的酶-底物体系的限制, 开辟了一种新的催化体系. Li 等^[42]基于 polyA 与金的相互作用, 巧妙地设计了一种单链 DNA 支架, 通过 polyA 环和双链茎自折叠成纳米结构, 其中 polyA 环作为金纳米

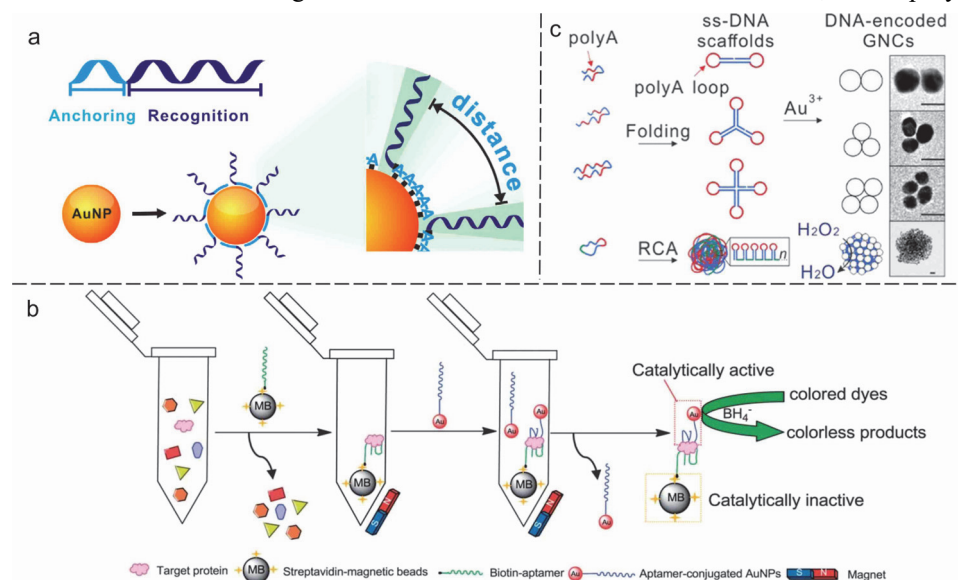


图 2 (a) 通过改变 polyA 的长度来对金纳米颗粒的空间控制示意图^[21]. (b) 基于 polyA DNA 探针修饰的金纳米颗粒催化甲基橙 (MO) 产生比色信号的无酶比色生物传感器^[32]. (c) 基于 polyA 环的可编程纳米酶合成示意图^[42]

Figure 2 (a) Schematic for spatial control on gold nanoparticles by varying the length of polyA blocks^[21]. (b) Enzyme-free colorimetric biosensor based on polyA DNA-conjugated gold nanoparticle-catalyzed color bleaching reaction of methyl orange (MO)^[32]. (c) PolyA DNA scaffolds-encoded gold nanoparticle clusters as programmable enzyme equivalents^[42]

颗粒簇(GNCs)无籽成核和生长的特定位点,原位合成一系列GNCs,从具有明确粒子数2~4个的低聚合物到多聚合物,这些聚合物显示出可编程的过氧化物酶催化活性,可通过支架尺寸和 polyA 间隔区长度进行纳米酶活性调节(图 2c). 本研究为合理设计各种生物和生物医学应用的纳米酶和比色生物传感器开辟了新的途径.

3.2 荧光生物传感器

将 polyA DNA 探针自组装在金纳米颗粒上,不仅可以构建比色生物传感器,而且结合荧光分子修饰的 DNA 探针可以构建灵敏度更高的荧光生物传感器,通过调节 polyA 的长度可以精确控制探针在金纳米颗粒表面构象和密度,扩大传感器的动态检测范围^[30]或增强探针活性^[50],特异性好、可用于细胞成像、细胞内传感和表观遗传学治疗^[43-47]. Chen 等^[48]采用 polyA DNA 探针修饰的金纳米颗粒,构建了用于细胞内三磷酸腺苷(ATP)的高灵敏检测的荧光生物传感器(图 3a). polyA DNA 探针包含用于组装在金纳米颗粒的 polyA 嵌段和用于识别 ATP 的适配体嵌段,荧光基团 Cy3 修饰的信号探针与 ATP 核酸适配体杂交后, Cy3 靠近金纳米颗粒表面,导致荧光猝灭,当 ATP 存在时, ATP 核酸适配体与 ATP 可以特异性结合形成更稳定的发夹结构,将 Cy3 修饰的信号探针从 ATP 核酸适配体上竞争下来, Cy3 远离金纳米颗粒而恢复荧光,实现对 ATP 特异性的定量检测. 通过调节 polyA 的长度可以调控 ATP 和 Cy3 修饰的信号探针与金纳米颗粒表面的 ATP 核酸适配体的竞争性结合能力,当 polyA 长度为 30 时,该传感器检测 ATP

的检测限为 10 $\mu\text{mol/L}$, 比巯基修饰的金纳米颗粒的传感器低 10 倍,实现了对不同细胞 ATP 的实时监测,为构建高效的细胞内分子分析生物传感器提供了一种新思路,在生物分析、分子诊断和治疗方面具有巨大的应用潜力. Mi 课题组^[30]基于链置换反应构建了高灵敏检测 DNA/RNA 的荧光生物传感器,通过调节 polyA 个数扩大了传感器的动态检测范围,用于监测与疾病相关不同的浓度水平的核酸(图 3b). 此外,这种 polyA 设计可以促进血清中 DNA 的可编程检测,并通过在金纳米颗粒表面组装三种荧光探针,实现了检测三种与胰腺癌相关的 microRNA (miRNA-155、miRNA-196a 和 miRNA210) 的多色同时检测,操作简单、快速、成本低,在临床诊断方面具有巨大的潜力,但由于多种荧光分子信号容易存在发射光谱干扰重叠等问题,是临床诊断中多靶标同时检测的挑战. Ye 等^[49]构建了类似的荧光生物传感器,深入研究金纳米颗粒表面适配体密度对适配体结合强度、检测限和结合动力学的影响,通过调节 polyA 的个数,核酸适配体表现出更好的结合特性和动力学,实现了在 60 min 内完成低至 23.6 nmol/L 卡那霉素的快速检测(图 3c). 该荧光生物传感器实现了食品安全牛奶中卡那霉素的高效检测,具有良好的应用前景. 在此基础上, Zhu 等^[50]继续构建了 polyA 介导的 DNA 酶(DNAzyme)纳米探针(图 3d),利用 polyA 嵌段将 DNAzyme 组装在金纳米颗粒表面,将金纳米材料独特的物理化学性质与 DNAzyme 的催化性能相结合,开发了活性可编程的荧光生物传感器. 以特异性识别 Pb^{2+} 的 8-17 DNAzyme 的

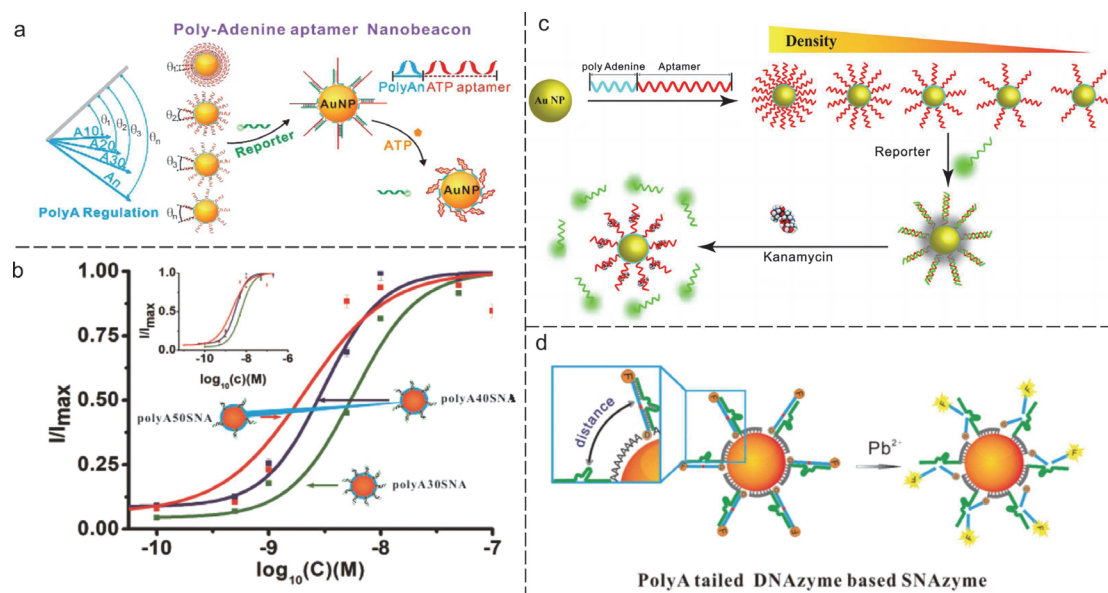


图 3 (a) 通过改变 polyA 的长度可编程调节基于 polyA 核酸适配体的纳米探针活性的示意图^[48]. (b) 采用 polyA50 球形核酸同时多色检测三种 microRNA 的示意图^[30]. (c) 具有可编程表面密度的基于 polyA 核酸适配体的纳米探针制备及其卡那霉素传感应用的示意图^[49]. (d) 基于 polyA 可编程活性的金纳米颗粒球形 DNAzymes 的示意图^[50]

Figure 3 (a) Schematic for the activity of polyA-based aptamer nanobeacon programmably engineered by tuning the length of polyA^[48]. (b) Schematic showing the simultaneous multicolor detection of three microRNAs with polyA50 mediated spherical nucleic acid^[30]. (c) Schematic representation of polyA-based aptamer nanobeacon preparation with programmable surface density and their kanamycin sensing application^[49]. (d) Schematic for polyA-based programmable engineering of gold nanoparticles for highly regulated spherical DNAzymes^[50]

活性作为研究对象,通过调节 polyA 的个数,精确控制金纳米颗粒表面 8-17 DNAzyme 构象和组装密度,深入研究了 8-17 DNAzyme 在金纳米颗粒表面上的催化行为和作用机制,显著增强了金纳米颗粒表面上 8-17 DNAzymes 活性,是采用巯基修饰 DNAzyme 组装的纳米探针活性的 75 倍、溶液中 DNAzyme 活性的 10 倍,直接提高了传感器检测 Pb^{2+} 的灵敏度. 该项研究为开发基于 polyA 的高活性 DNAzymes 新型催化平台提供了理论基础.

此外, polyA DNA 探针修饰的金纳米颗粒可以为细胞成像、细胞内传感和表观遗传学治疗提供一个简单而通用的平台. Zhu 等^[51]制备了基于 polyA 介导的荧光共振能量转移(FRET)纳米探针,应用于内源性肿瘤相关 mRNA 的活细胞成像(图 4a). 13 nm 金纳米颗粒不仅具有优异的荧光猝灭性能,而且易于穿透细胞膜,常被用作 DNA 探针的载体^[52-53]. 因此,他们通过 polyA 嵌段将肿瘤相关的 mRNA (c-Myc mRNA) 的识别探针组装在 13 nm 的金纳米颗粒表面,荧光基团 Cy3 标记的短荧光信号探针通过与识别探针杂交构建了荧光猝灭的荧光球形核酸探针(FSNA). 当目标靶基因存在时,短荧光信号探针通过链置换从 FSNA 中释放出来,荧光恢复,实现对 c-Myc mRNA 的原位荧光成像分析. 通过调节 polyA 的个数调控了金纳米颗粒表面的探针密度,从而提高了 FSNA 的灵敏度和动力学响应,检测限为 0.31 nmol/L,比未经表面密度调控的巯基探针的灵敏度提高了 55 倍,

而且可以快速(2 h)地实现细胞内 mRNA 定量检测和成像分析,在快速和敏感的细胞内靶标成像方面具有潜在的应用价值. Mi 课题组^[54]继续开发了基于 polyA 介导的球形核酸纳米探针(pASNA),用于活细胞中肿瘤相关 miR-155 的高灵敏性成像(图 4b). polyA 探针(包含 polyA 嵌段和识别嵌段)和荧光基团 Cy5 标记的荧光信号探针预杂交并通过 polyA 嵌段组装在金纳米颗粒表面,形成 pASNA 纳米探针. pASNA 纳米探针经细胞吞噬后对 miR-155 产生响应,并释放荧光信号探针,从而恢复荧光,通过荧光显微镜可以观察 miR-155 在活细胞中的不同表达水平. 而且, pASNA 纳米探针在 MCF-7、HeLa 和 LO2 细胞内对 miR-155 进行成像时,具有良好的敏感性、特异性、核酸酶稳定性和低毒性,克服了传统的荧光成像探针灵敏度和稳定性差的问题. 这种纳米探针不仅可以有效区分肿瘤细胞与正常细胞,而且可以精细揭示内源性 miRNA 在活细胞中动态分布和表达,在活细胞成像中显示出广阔的应用前景,但是这些用于成像的荧光染料易被光漂白,影响检测结果的可靠性,仍是生物医学应用的挑战. Jiao 等^[55]构建了一种基于 polyA 程序化球形核酸(SNAs),用于高效捕获活细胞内致癌性 miRNA(图 4c). 他们通过调控 polyA 的长度,精确地设计 polyA-SNAs 中反义 miRNA 序列的空间结构,调控其对 miRNA 的捕获能力,并证明了 polyA-SNAs 可作为高效的 miRNA 海绵,在活细胞和小鼠体内捕获致癌性 miRNA,拯救抑癌基因,可显著抑制体内外肿瘤的生

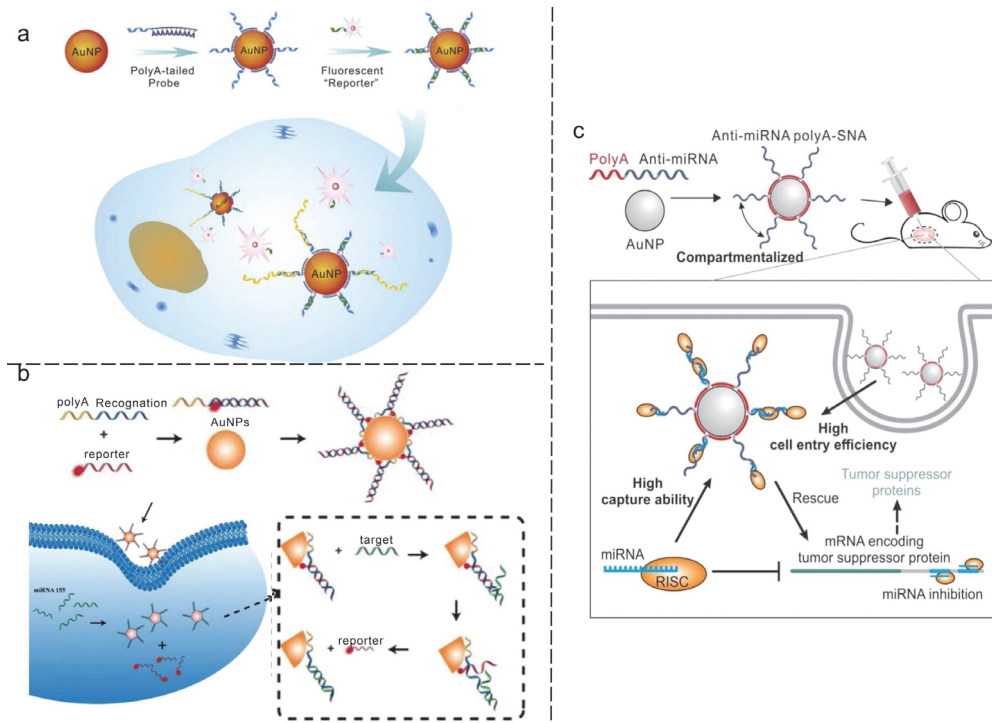


图 4 (a) 基于 polyA 介导的荧光球形核酸探针检测活细胞中 c-Myc mRNA 的示意图^[51]. (b) 基于 polyA 介导的球形核酸纳米探针检测活细胞中 microRNAs 的示意图^[54]. (c) 构建基于 polyA 编程横向间距的球形核酸, 用于拯救抗癌基因表达的示意图^[55]

Figure 4 (a) Schematic illustration of the polyA-mediated fluorescent spherical nucleic acid (FSNA) probes for c-Myc mRNA detection in living cells^[51]. (b) Schematic of the polyA-mediated spherical nucleic acid (pASNA) nanoprobe for microRNAs detection in live cells^[54]. (c) Schematic illustration for the construction of polyA-spherical nucleic acids with polyA-programmed lateral spacing for rescuing the expression of an anti-oncogene^[55]

长. 此外, polyA-SNAs 与非调控密度的 SNAs 相比具有更高的细胞进入效率, 在一定程度上解决了细胞进入和靶向捕获效率之间的冲突; 同时 polyA-SNAs 的直接递送, 避免了使用阳离子载体或病毒载体, 减轻了对毒性、宿主基因组突变或持续表达的担忧, 对合理设计外源性治疗性核酸结构具有重要意义.

3.3 表面增强拉曼散射生物传感器

表面增强拉曼散射光谱(SERS)生物传感器具有高灵敏度、分子级特异性和非侵入性等优点, 广泛用于生物分析和成像中^[56-58]. 开发稳定性和重现性良好的高效 SERS 基底是拓展 SERS 生物传感器应用领域的关键^[59]. 利用 polyA 介导纳米间隙, 间隙大小通过调控 polyA 长度精确控制, 制备通用的表面增强拉曼散射纳米标签, 与荧光生物传感器中荧光分子相比, 不仅具有特征光谱、而且不受光漂白和光谱重叠等外界因素影响. Fan 课题组^[60]开发了 polyA 介导纳米间隙内非荧光小分子编码的核壳金纳米结构, 用作多种生物活性分子识别的通用 SERS 纳米标签(图 5a). 无任何修饰的 polyA DNA 探针通过 polyA 嵌段组装在 13 nm 的金纳米颗粒表面, 非荧光分析拉曼报告分子吸附在上述金纳米颗粒表面裸露的位点, 从而对金纳米颗粒进行 SERS 编码, 并以此为纳米核, 与聚合物(聚乙烯吡咯烷酮, PVP)、还原剂(盐酸羟胺, $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)和氯金酸(HAuCl_4)反应, 在纳米核周边形成金壳, 从而构建了 polyA 非荧光纳米标签(pA-nF-NTs). 由于 polyA 的介导, 金纳米颗粒表面形成

1~2 nm 的 DNA 分子层厚度, 确保了 pA-nF-NTs 具有高度均一且稳定的纳米间隙结构, 该厚度刚好与拉曼增强需要的间隙尺寸一致, 致使 pA-nF-NTs 具有优异的拉曼性能. polyA 探针除了介导 pA-nF-NTs 纳米间隙的形成, 还可以避免对金纳米颗粒等离子体表面的钝化, 有利于非荧光分析拉曼报告分子的负载. 研究者成功合成了 5 种 pA-nF-NTs, 这些纳米标签均具有明显的拉曼光谱特征, 表现出高度均一和高重现性的 SERS 信号. 并根据实际分析应用情况, 通过修饰相应的核酸探针或核酸适配体对 pA-nF-NTs 进行功能化, 实现了对不同类型的目标分子的同时定量分析. 此外, 这种基于 polyA 介导纳米间隙内非荧光小分子编码的纳米标签在荧光-SERS 双模式生物分析和生物成像方面具有很大的应用前景. He 课题组^[61]基于 polyA 介导的组装策略通过 DNA 双链杂交方式构建了 Au-AuNPs “核-卫星” 可控的 SERS 基底(图 5b). 选择 100 nm 的金纳米颗粒作为 “核”, 13 nm 的金纳米颗粒作为 “卫星”, 通过 polyA 嵌段将两种互补的 DNA 分别组装在 “核” 和 “卫星” 上, “核” 和 “卫星” 金纳米颗粒表面的 DNA 杂交形成双链结构促进 “核-卫星” 自组装结构的形成. 其中 “核” 和 “卫星” 的间隙约为 2 nm, 致使 “核-卫星” 自组装结构具有增强的 SERS 信号, 并且通过改变组装在 “核” 上 DNA 中 polyA 的个数, 调控 “核” 表面 DNA 密度, 从而控制 “卫星” 的组装密度, 形成 “卫星” 密度可调的 “核-卫星” 自组装结构, 进而间接调控 “核-卫星” 自组装结构

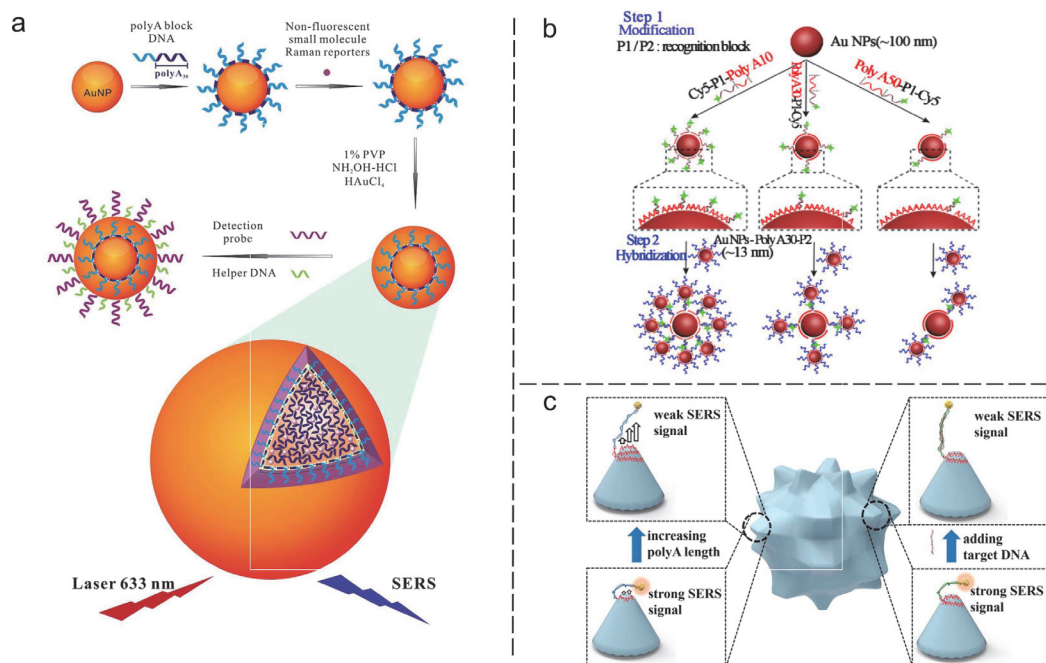


图 5 (a) polyA 非荧光纳米标签的设计示意图^[60]. (b) 基于 polyA 构建胶体状 Au-AuNPs “核-卫星” 可控自组装结构的原理示意图^[61]. (c) polyA 介导的多枝状金纳米颗粒表面 DNA 构象调控及 SERS 原位监测构象转化的示意图^[63]

Figure 5 (a) Schematic illustration of the design of the polyA non-fluorescent nanotags (pA-nF-NTs)^[60]. (b) Schematic illustration of the polyA-assisted self-assembly strategy for the fabrication of symmetric core (Au)-satellite (Au) nanoassemblies (Au-AuNPs) in colloid^[61]. (c) Schematic illustration of DNA conformation modulation with polyA length on multibranch gold nanoparticles (AuNSs) and *in situ* SERS monitoring of conformation transformation^[63]

的 SERS 性能。但是, 由于构建的 Au-AuNPs “核-卫星”可以在溶液中自由运动, 出现不可控的聚集, 导致 SERS 信号重现性较差。为了改善重现性差的问题, 作者将此结构再次采用 DNA 杂交的方式固定在硅基底的银纳米颗粒上, 获得的自组装结构的增强因子 EF 高达 10^7 , SERS 性能更强, 而且重复性好, 为实际样品检测提供了高效的 SERS 基底。多枝状金纳米颗粒(AuNSs)拥有尖端和多枝状结构, 比表面积大, 其表面附近可以产生增强的 SERS 效应^[62]。Guo 等^[63]发展了基于 polyA 探针介导 AuNSs 表面 DNA 构象调控的方法(图 5c), 通过改变 polyA 的长度可以调节探针的直立程度, 随着 polyA 个数的增加, 探针越偏向直立状态。将探针的另一端标记 SERS 信号分子, 探针从倒伏到直立的过程会引起 SERS 信号分子与 AuNSs 距离的变化, 从而产生 SERS 信号变化, 利用其信号变化可以原位监测构象调控过程。以严重急性呼吸系统综合征(SARS)相关的序列作为模型目标, 开发了特异性识别目标 DNA 的 SERS 生物传感器, 检测限低至 45.7 nmol/L, 实现了高效的 DNA 特异性检测。该项研究不仅解决了在纳米级粗糙的 AuNSs 表面上 DNA 空间状态难以控制的问题, 而且为原位研究 DNA 构象提供了强有力的工具。

3.4 电化学生物传感器

基于 polyA DNA 探针的电化学生物传感器采用 polyA 嵌段将捕获探针组装在金电极或芯片表面, polyA 基本覆盖了金电极或金芯片表面上的结合位点, 有效缓解电化学界面非特异性吸附严重的问题, 与光学生物传感器相比, 灵敏度高、成本低、易于微型化和集成化、适合现场分析, 被广泛应用于临床诊断和疾病筛查、环境监测和食品安全等领域^[64-66]。基于 polyA 与金之间的相互作用, Koo 等^[67]开发了一种直接无扩增检测 miRNA 的方法, 磁珠偶联捕获探针, 用于特异性捕获目标 miRNA, 磁分离后通过加热将目标 miRNA 从捕获探针中释放出来, 达到分离、纯化目标 miRNA 的目的, 然后采用 polyA 聚合酶对释放的目标 miRNA 的 3'端进行 polyA 延伸。延伸后的目标 miRNA 由于 polyA 与金之间的高亲和力, 能够有效地吸附在丝网印刷电极的金层表面, 阻碍溶液中 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 在金电极上的电子传递, 产生相对于裸电极较低的法拉第电流, 从而实现目标 miRNA 定量检测。通过对不同乳腺癌和前列腺癌细胞系中特异性 miRNA 的定量检测, 展示了该方法的实际应用效果。Liu 课题组^[6]首次发展了基于 polyA DNA 探针的电化学传感界面组装技术, 经过一系列界面组装条件改良, 突破了 polyA DNA 探针传感界面电子传递效率技术难题, 成功应用于大肠杆菌基因组 DNA 的检测中(图 6a)。不同于传统的巯基修饰的 DNA 探针, 二嵌段 polyA DNA 探针无需特别修饰, 仅依靠末端 polyA 与金电极的共价结合就实现捕获探针在金电极表面的紧凑和有序组装, 通过优化共组装分子、polyA 长度、浓度

等探针组装的关键性实验条件, 提高探针识别效率。两嵌段 polyA DNA 探针的识别嵌段和生物素标记的信号探针一起与目标 DNA 杂交, 形成稳定的“三明治”夹心结构, 然后与 avidin-HRP 酶反应可以产生氧化还原电流信号, 实现目标 DNA 高灵敏的电化学检测, 检出限为 5 fmol/L, 通过对 0.2 pg/ μL 大肠杆菌基因组 DNA 的聚合酶链式反应(PCR)产物进行分析, 证明了该传感器具有良好的实用性。与依靠吸附在电极表面的物质阻碍电解液的电子传递原理的电化学生物传感器^[67]相比, 该传感器具有更好的特异性、重复性和稳定性, 对于广泛用于现场分析具有重要意义。此外, Liu 课题组^[68]将两嵌段 polyA DNA 探针固定在多通道的金芯片电极上, 实现了五种不同细菌 16S rRNA 基因的高灵敏检测(图 6b)。采用两个信号探针的报告系统, 与一个^[6]和三个信号探针的报告系统相比, 信噪比有了较大的提高。采用此传感器检测人工目标 DNA, 检出限达到 10 fmol/L, 当检测细菌基因组实际样品时, 依然具有相同的检测能力。这项工作的成功开展, 为无 PCR 扩增的便携式细菌生物传感器的开发迈开了重要一步。Liu 课题组^[69]进一步构建了三嵌段 polyA DNA 探针, 开发了一种无标记的组装策略, 实现了大肠杆菌基因组的高灵敏度检测(图 6c)。三嵌段 polyA DNA 探针依靠中间 polyA 嵌段与金的共价结合实现捕获探针在金电极表面的紧凑和有序组装, polyA 嵌段两侧设计了两个捕获探针, 能够同时捕获大肠杆菌基因组的两段相邻序列。由于碱基的堆叠效应, 三嵌段 polyA DNA 捕获探针与目标杂交的稳定性得到了显著提高。通过优化 polyA DNA 探针组装的关键性实验条件, 并对该传感器的灵敏度进行了考察, 检出限为 10 fmol/L, 检测范围从 10 fmol/L 到 1 nmol/L, 跨越五个数量级。与基于两嵌段 polyA DNA 探针的电化学生物传感器相比^[6,68], 该传感器具有更高的特异性, 能有效区分单碱基多态性。

4 结论与展望

polyA DNA 探针无需特别修饰, 仅依靠 polyA 嵌段与金的相互作用就实现捕获探针在金表面的紧凑和有序组装, 实现了识别和探针固定功能的一体化, 在生物传感检测领域展现了独特的魅力, 促进了生物传感器的发展。基于 polyA DNA 探针构建的比色、荧光、表面增强拉曼散射、电化学生物传感器在食品安全、环境监控、生物医学等不同领域应用各有千秋, 表 1 对比分析了基于 polyA DNA 探针构建的不同生物传感器类型的优势和不足, 为后续采用 polyA DNA 探针作为构建素材, 研制各类生物传感器提供参考。

尽管 polyA DNA 探针的引入使生物传感器性能得到改善, 但随着检测分析项目日益增多, 以及测量准确度和可靠性需求的提升, polyA DNA 探针仍面临着巨大的机遇和挑战: (1)作为一种无需化学修饰的探针, polyA

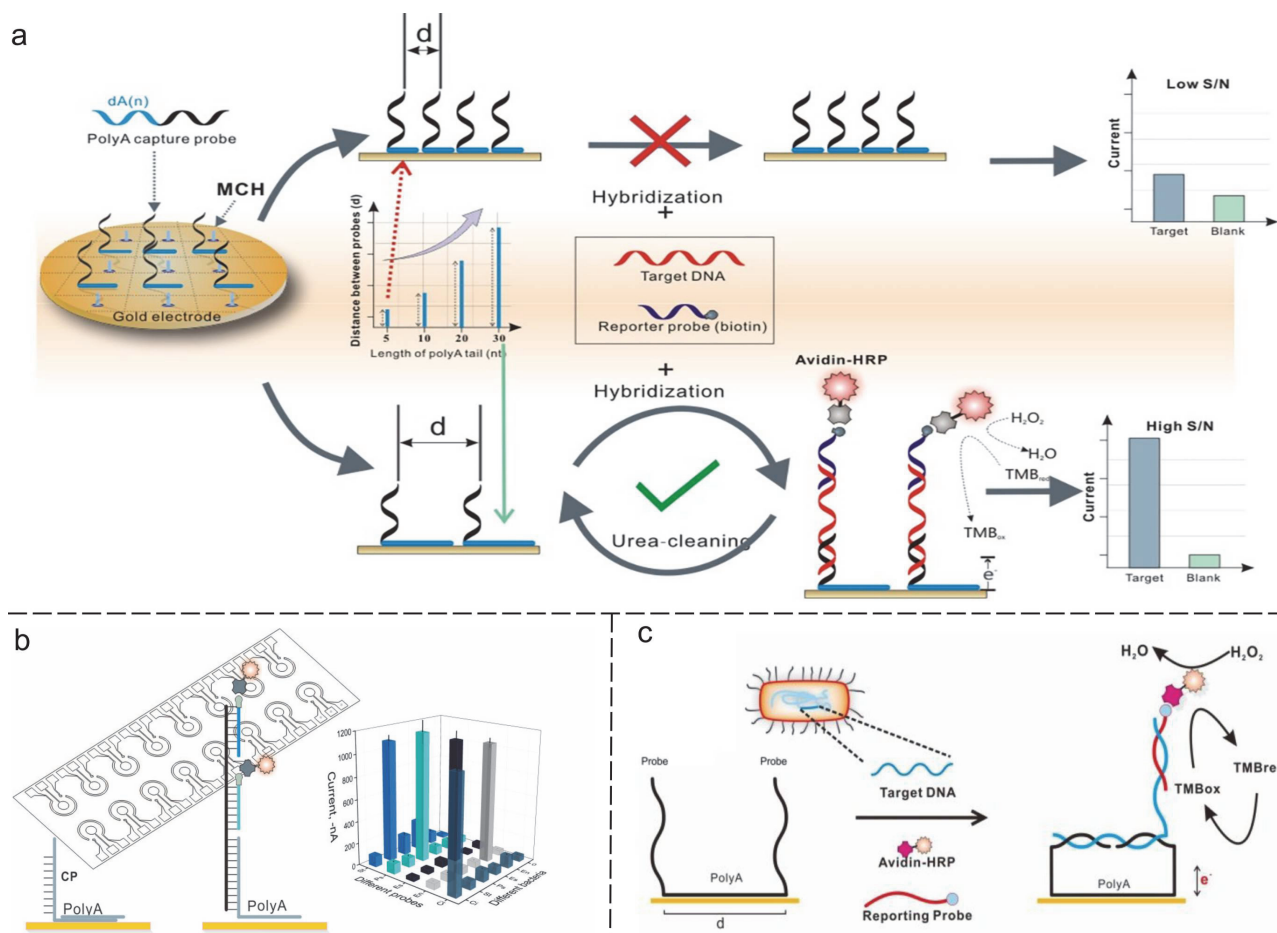


图6 (a) 基于 polyA 的电化学生物传感器示意图^[6]. (b) 利用 polyA 探针构建检测 16S rRNA 基因的生物传感器示意图^[68]. (c) 基于三嵌段 polyA 探针的电化学 DNA 生物传感器示意图^[69]

Figure 6 (a) Schematic illustration of the polyA-based electrochemical DNA biosensor^[6]. (b) Schematic illustration of 16S rRNA gene biosensor using a polyA capture probe^[68]. (c) Schematic illustration of the triblock polyA probe-based electrochemical DNA biosensor^[69]

表1 基于 polyA DNA 探针的生物传感器比较分析

Table 1 Comparison of biosensors based on polyA DNA probes

类型	优势	不足
比色生物传感器	无需巯基乙醇等小分子封闭、响应快速、结果直观、适合环境水样监测现场分析	灵敏度不高、易受食品中蛋白和脂肪等干扰物质影响
荧光生物传感器	灵敏度高、特异性好、适合生物医学中细胞成像、细胞内传感	用于信号输出的荧光染料易被光漂白, 影响检测结果的可靠性
表面增强拉曼散射生物传感器	不受光漂白和光谱重叠等外界因素影响、适合生物医学中原位无损分析和成像	成本高、拉曼检测信号重复性和稳定性差, 准确定量分析困难
电化学生物传感器	成本低、易于微型化和集成化、适合食品安全和环境监控现场分析	响应较慢、无法在活体生物中使用

DNA 探针可以显著降低生物传感器的研发成本, 但能否真正可以取代传统化学修饰探针比较受到关注, 需要

在未来更多的生物传感研究中得到验证; (2)虽然最近的生物传感研究表征了 polyA DNA 探针在金表面形成可控的组装密度这一实验现象, 但其作用机理尚不清晰, 迫切需要选择透射电子显微镜(TEM)或原子力显微镜(AFM)进行原位直观表征, 并深入研究 polyA DNA 探针在金表面的构象和识别能力, 为进一步构建基于 polyA DNA 探针的新型生物传感器奠定理论研究基础; (3)亟需设计开发含有多个识别探针的多嵌段 polyA DNA 探针, 满足生物医学临床检测中多靶标联合同时检测的需求; (4)大多数已报道的基于 polyA DNA 探针的生物传感器仍处在实验阶段, 测量结果准确度低是其最主要的原因, 深度挖掘多嵌段 polyA DNA 探针中精确探针分子比例的优势, 建立自校准的生物传感体系, 实现高精度测量; (5) polyA DNA 探针在生物体的降解风险及生物毒性等研究将是 polyA DNA 探针进一步推广应用的的基础; (6) 由于生物传感器的集成化是未来发展的主流, 亟需结合智能设备, 发展基于 polyA DNA 探针的高通量集成化现场快速检测传感器, 将有利于拓宽生物传感器在智能传感领域中的应用。

作者简介



李兰英, 上海市计量测试技术研究院高级工程师, 主要从事基于 polyA 探针的生物传感器研究, 主持完成科研项目 3 项, 主持和参与省部级以上科研课题 6 项, 在国内外期刊上发表论文 20 余篇, 包含 ACS Appl. Mater. Inter., Biosens. Bioelectron., Anal. Chem. 等, 获得发明专利授权 10 余项。



刘刚, 上海市计量测试技术研究院教授级高工, 研究方向生物标准物质、生物传感方法。美国国家标准化技术研究院 (National Institute of Standard and Technology) 访问学者, 获得上海市青年拔尖人才计划资助, 曾获上海市科技进步二等奖, 研发国家有证标准物质 30 余项, 发表论文 50 余篇, 其中包含 ACS Appl. Mater. Inter., Biosens. Bioelectron., Anal. Chem. 等, 获得发明专利授权 20 余项。



左小磊, 上海交通大学医学院分子医学研究院研究员, 博士生导师, 国家杰出青年科学基金获得者、国家科技部重点专项项目负责人、教育部长江学者奖励计划青年项目获得者、基金委优秀青年科学基金获得者。曾获得中国分析测试协会一等奖 (CAIA 奖)、中科院百人计划等。长期从事框架核酸、生物传感、DNA 存储等领域的研究。在 Nature Nanotechnology、Nature Biomedical Engineering、Nature Protocols、Chem. Rev.、JACS、Angew. Chem. Int. Ed. 等学术期刊上发表论文 150 余篇, 论文 SCI 他引 10000 余次。

References

- [1] Chi, J.; Li, J.; Ren, S.; Su, S.; Wang, L. *Acta Chim. Sinica* **2019**, *77*, 1230 (in Chinese). (迟景元, 李晶, 任少康, 苏邵, 汪联辉, 化学学报, **2019**, *77*, 1230.)
- [2] Yin, F.; Zhao, H.; Lu, S.; Shen, J.; Li, M.; Mao, X.; Li, F.; Shi, J.; Li, J.; Dong, B.; Xue, W.; Zuo, X.; Yang, X.; Fan, C. *Nat. Nanotechnol.* **2023**, <https://doi.org/10.1038/s41565-023-01348-9>.
- [3] Li, F.; Li, J.; Dong, B.; Wang, F.; Fan, C.; Zuo, X. *Chem. Soc. Rev.*

- 2021**, *50*, 5650.
- [4] Zhang, Y.; Mao, X.; Li, F.; Li, M.; Jing, X.; Ge, Z.; Wang, L.; Liu, K.; Zhang, H.; Fan, C.; Zuo, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 4892.
- [5] Li, F.; Mao, X.; Li, F.; Li, M.; Shen, J.; Ge, Z.; Fan, C.; Zuo, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 9975.
- [6] Li, L.; Wang, L.; Xu, Q.; Xu, L.; Liang, W.; Li, Y.; Ding, M.; Aldalbahi, A.; Ge, Z.; Wang, L.; Yan, J.; Lu, N.; Li, J.; Wen, Y.; Liu, G. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 6895.
- [7] Lao, R.; Song, S.; Wu, H.; Wang, L.; Zhang, Z.; He, L.; Fan, C. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6475.
- [8] Lu, N.; Pei, H.; Ge, Z.; Simmons, C. R.; Yan, H.; Fan, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13148.
- [9] Chen, P.; Pan, D.; Fan, C.; Chen, J.; Huang, K.; Wang, D.; Zhang, H.; Li, Y.; Feng, G.; Liang, P.; He, L.; Shi, Y. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 639.
- [10] Liu, G.; Lao, R.; Xu, L.; Xu, Q.; Li, L.; Zhang, M.; Shen, H.; Mathur, S.; Fan, C.; Song, S. *Sensors-basel* **2011**, *11*, 8018.
- [11] Fan, C.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 9134.
- [12] Song, P.; Shen, J.; Ye, D.; Dong, B.; Wang, F.; Pei, H.; Wang, J.; Shi, J.; Wang, L.; Xue, W.; Huang, Y.; Huang, G.; Zuo, X.; Fan, C. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 838.
- [13] Zhang, J.; Wang, L.; Pan, D.; Song, S.; Fan, C. *Chem. Commun. (Camb.)* **2007**, 1154.
- [14] Ye, D.; Zuo, X.; Fan, C. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2018**, *11*, 171.
- [15] Liu, G.; Wan, Y.; Gau, V.; Zhang, J.; Wang, L.; Song, S.; Fan, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6820.
- [16] Wen, Y.; Pei, H.; Shen, Y.; Xi, J.; Lin, M.; Lu, N.; Shen, X.; Li, J.; Fan, C. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 867.
- [17] Wen, Y.; Wang, L.; Xu, L.; Li, L.; Ren, S.; Cao, C.; Jia, N.; Aldalbahi, A.; Song, S.; Shi, J.; Xia, J.; Liu, G.; Zuo, X. *Analyst* **2016**, *141*, 5304.
- [18] Lin, M.; Wen, Y.; Li, L.; Pei, H.; Liu, G.; Song, H.; Zuo, X.; Fan, C.; Huang, Q. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2285.
- [19] Wen, Y.; Liu, G.; Pei, H.; Li, L.; Xu, Q.; Liang, W.; Li, Y.; Xu, L.; Ren, S.; Fan, C. *Methods* **2013**, *64*, 276.
- [20] Wen, Y.; Pei, H.; Wan, Y.; Su, Y.; Huang, Q.; Song, S.; Fan, C. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 7418.
- [21] Pei, H.; Li, F.; Wan, Y.; Wei, M.; Liu, H.; Su, Y.; Chen, N.; Huang, Q.; Fan, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11876.
- [22] Schreiner, S. M.; Hatch, A. L.; Shudy, D. F.; Howard, D. R.; Howell, C.; Zhao, J.; Koelsch, P.; Zhamikov, M.; Petrovykh, D. Y.; Opdahl, A. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4288.
- [23] Schreiner, S. M.; Shudy, D. F.; Hatch, A. L.; Opdahl, A.; Whitman, L. J.; Petrovykh, D. Y. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2803.
- [24] Opdahl, A.; Petrovykh, D. Y.; Kimura-Suda, H.; Tarlov, M. J.; Whitman, L. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 9.
- [25] Jang, N. H. *B. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 1790.
- [26] Koo, K. M.; Sina, A. A. I.; Carrascosa, L. G.; Shiddiky, M. J. A.; Trau, M. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 7042.
- [27] Kimura-Suda, H.; Petrovykh, D. Y.; Tarlov, M. J.; Whitman, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9014.
- [28] Opdahl, A.; Petrovykh, D. Y.; Kimura-Suda, H.; Tarlov, M. J.; Whitman, L. J. *J. PNAS* **2007**, *104*, 9.
- [29] Liu, P.; Wang, D.; Zhou, Y.; Wang, H.; Yin, H.; Ai, S. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *80*, 74.
- [30] Wang, L.; Zhang, H.; Wang, C.; Xu, Y.; Su, J.; Wang, X.; Liu, X.; Feng, D.; Wang, L.; Zuo, X.; Shi, J.; Ge, Z.; Fan, C.; Mi, X. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *127*, 85.
- [31] Zhu, Y.; Jiang, X.; Wang, H.; Wang, S.; Wang, H.; Sun, B.; Su, Y.; He, Y. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6631.
- [32] Li, W.; Li, J.; Qiang, W.; Xu, J.; Xu, D. *Analyst* **2013**, *138*, 760.
- [33] Ou, L. J.; Jin, P. Y.; Chu, X.; Jiang, J. H.; Yu, R. Q. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6015.
- [34] Yang, H.; Xiao, M.; Lai, W.; Wan, Y.; Li, L.; Pei, H. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 4990.
- [35] Zhang, Y.; Jiao, J.; Wei, Y.; Wang, D.; Yang, C.; Xu, Z. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 15244.
- [36] Cai, Y.; Zhu, H.; Zhou, W.; Qiu, Z.; Chen, C.; Qileng, A.; Li, K.; Liu, Y. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 7275.
- [37] Yao, G.; Pei, H.; Li, J.; Zhao, Y.; Zhu, D.; Zhang, Y.; Lin, Y.; Huang, Q.; Fan, C. *NPG Asia Materials* **2015**, *7*, e159.
- [38] Lu, W.; Wang, L.; Li, J.; Zhao, Y.; Zhou, Z.; Shi, J.; Zuo, X.; Pan, D. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10158.
- [39] Nourisaeid, E.; Mousavi, A.; Arpanaei, A. *Physica E* **2016**, *75*, 188.

- [40] Xie, Y.; Huang, Y.; Tang, D.; Cui, H.; Cao, H. *Mikrochim. Acta* **2018**, 185, 534.
- [41] Yin, J.; Wang, J.; Yang, X.; Wu, T.; Wang, H.; Zhou, X. *RSC Adv.* **2019**, 9, 18728.
- [42] Chen, X.; Wang, Y.; Dai, X.; Ding, L.; Chen, J.; Yao, G.; Liu, X.; Luo, S.; Shi, J.; Wang, L.; Nechushtai, R.; Pikarsky, E.; Willner, I.; Fan, C.; Li, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, 144, 6311.
- [43] Zhang, Z.; Ma, J.; Zhang, G.; Ding, X.; Zhang, R.; Zhou, T.; Wang, X.; Wang, F. *Langmuir* **2020**, 36, 10989.
- [44] Wu, Z.; Ke, J.; Liu, Y.; Sun, P.; Hong, M. *Acta Chim. Sinica* **2022**, 80, 542 (in Chinese). (吴志芬, 柯建熙, 刘永升, 孙蓬明, 洪茂椿, 化学学报, **2022**, 80, 542.)
- [45] Zhao, L.-D.; Zuo, P.; Yin, B.-C.; Hong, C.-L.; Ye, B.-C. *Acta Chim. Sinica* **2020**, 78, 1076 (in Chinese). (赵丽东, 左鹏, 尹斌成, 洪成林, 叶邦策, 化学学报, **2020**, 78, 1076.)
- [46] Huang, Y.; Yang, H. Y.; Ai, Y. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 9132.
- [47] Zhang, P.; Chang, L.; Niu, C.; Wang, X.; Li, Z.; Liu, J. *ACS Appl. Polym.* **2022**, 4, 6211.
- [48] Chen, L.; Chao, J.; Qu, X.; Zhang, H.; Zhu, D.; Su, S.; Aldalbahi, A.; Wang, L.; Pei, H. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9, 8014.
- [49] Ye, T.; Zhu, D.; Hao, L.; Yuan, M.; Cao, H.; Wu, X.; Yin, F.; Xu, F. *Mikrochim. Acta* **2022**, 189, 151.
- [50] Zhu, D.; Pei, H.; Chao, J.; Su, S.; Aldalbahi, A.; Rahaman, M.; Wang, L.; Wang, L.; Huang, W.; Fan, C.; Zuo, X. *Nanoscale* **2015**, 7, 18671.
- [51] Zhu, D.; Zhao, D.; Huang, J.; Zhu, Y.; Chao, J.; Su, S.; Li, J.; Wang, L.; Shi, J.; Zuo, X.; Weng, L.; Li, Q.; Wang, L. *Nanomedicine* **2018**, 14, 1797.
- [52] Zheng, D.; Seferos, D. S.; Giljohann, D. A.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. *Nano Lett.* **2009**, 9, 3258.
- [53] Liu, M.; Li, Q.; Liang, L.; Li, J.; Wang, K.; Li, J.; Lv, M.; Chen, N.; Song, H.; Lee, J.; Shi, J.; Wang, L.; Lal, R.; Fan, C. *Nat. Commun.* **2017**, 8, 15646.
- [54] Qian, Q.; He, G.; Wang, C.; Li, S.; Zhao, X.; Xu, Y.; Mi, X. *Mol. Biol. Rep.* **2022**, 49, 3705.
- [55] Jiao, K.; Yan, Q.; Guo, L.; Qu, Z.; Cao, S.; Chen, X.; Li, Q.; Zhu, Y.; Li, J.; Wang, L.; Fan, C.; Wang, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 14438.
- [56] Wang, S.; Zhang, H.; Li, W.; Birech, Z.; Ma, L.; Li, D.; Li, S.; Wang, L.; Shang, J.; Hu, J. *Mikrochim. Acta* **2019**, 187, 20.
- [57] Chen, Q.; Tian, R.; Liu, G.; Wen, Y.; Bian, X.; Luan, D.; Wang, H.; Lai, K.; Yan, J. *Biosens. Bioelectron.* **2022**, 207, 114187.
- [58] Zhou, Y.; Fang, W.; Lai, K.; Zhu, Y.; Bian, X.; Shen, J.; Li, Q.; Wang, L.; Zhang, W.; Yan, J. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, 141, 111419.
- [59] Lim, D. K.; Jeon, K. S.; Hwang, J. H.; Kim, H.; Kwon, S.; Suh, Y. D.; Nam, J. M. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, 6, 452.
- [60] Zhao, B.; Shen, J.; Chen, S.; Wang, D.; Li, F.; Mathur, S.; Song, S.; Fan, C. *Chem. Sci.* **2014**, 5, 4460.
- [61] Zhu, Y.; Jiang, X.; Wang, H.; Wang, S.; Wang, H.; Sun, B.; Su, Y.; He, Y. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 6631.
- [62] Wang, H.; Halas, N. J. *Adv. Mater.* **2008**, 20, 820.
- [63] Guo, J.; Chen, Y.; Jiang, Y.; Ju, H. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 9332.
- [64] Zhou, X.; Sun, Z.; Su, X.; Zheng, K.; Zou, X.; Zhang, W. *Anal. Chem.* **2023**, 95, 1916.
- [65] Khodadoust, A.; Nasirizadeh, N.; Taheri, R. A.; Dehghani, M.; Ghanei, M.; Bagheri, H. *Mikrochim. Acta* **2022**, 189, 213.
- [66] Wang, M.; Cui, H.; Hong, N.; Shu, Q.; Wang, X.; Hu, Y.; Wei, G.; Fan, H.; Zhang, J. *Sens. Actuators B Chem.* **2022**, 358.
- [67] Koo, K. M.; Carrascosa, L. G.; Shiddiky, M. J.; Trau, M. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 2000.
- [68] Wang, Q.; Weng, Y.; Liang, W.; Li, Y.; Wu, J.; Zhu, H.; Zhao, K.; Zhang, J.; Jia, N.; Deng, W.; Liu, G. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 9277.
- [69] Wang, L.; Wen, Y.; Yang, X.; Xu, L.; Liang, W.; Zhu, Y.; Wang, L.; Li, Y.; Li, Y.; Ding, M.; Ren, S.; Yang, Z.; Lv, M.; Zhang, J.; Ma, K.; Liu, G. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 16002.

(Cheng, B.)