

MicroRNA 体外检测的研究进展

汪香君 李 迎 刘墨祎 汪洛卉 刘丽梅*

(北华大学医学技术学院 吉林市 132013)

摘 要 MicroRNA (miRNA) 是一类内源性、进化高度保守的小分子非编码 RNA, 通过识别同源序列及干扰转录、翻译或表观遗传以调节基因的表达。研究发现, 某些 miRNA 的异常表达与疾病相关, 可作为生物标志物或药物靶点为疾病诊断、治疗及预后提供新思路, 而准确测定 miRNA 的表达是其应用于临床的关键。本文结合近年来研究成果对传统检测方法及其改进和等温核酸扩增的新技术进行概述, 分析这些方法的优势与不足。

关键词 miRNA 传统检测方法 等温核酸扩增技术

Research Progress in MicroRNA Detection *in Vitro*

Wang Xiangjun, Li Ying, Liu Moyi, Wang Minghui, Liu Limei*

(College of Medical Technology, Beihua University, Jilin, 132013)

Abstract MicroRNA (miRNA) is a kind of endogenous and highly conserved small non-coding RNA, which regulates gene expression by recognizing homologous sequences and interfering with transcription, translation or epigenetics. Studies have found that the abnormal expression of some miRNAs is related to diseases, which can provide new ideas for disease diagnosis, treatment and prognosis as biomarkers or drug targets, and accurate determination of miRNA expression is the key to its clinical application. In this paper, combined with the research results in recent years, the traditional detection methods and their improvements and new technologies for isothermal nucleic acid amplification are summarized, and the advantages and disadvantages of these methods are analyzed.

Keywords miRNA, Traditional detection methods, Isothermal nucleic acid amplification technique

miRNA 作为长度 18~22 nt 的非编码 RNA, 在动植物、病毒等真核细胞的生物和代谢过程中发挥作用^[1]。初级 miRNA 经微处理器复合物加工为前体 miRNA, RNase III 切割前体 miRNA 产生能够指导 RNA 诱导沉默复合体切割信使 RNA (mRNA) 的成熟 miRNA^[2], miRNA 与 mRNA 作用抑制 mRNA 的水平或翻译效率, 调控靶基因的表达^[3]。已有研究证明 miRNA 的异常表达可作为肾脏^[4]、肝脏^[5]、心血管^[6]、免疫系统^[7]等疾病的诊断、预后及治疗的生物标志物。

miRNA 在疾病的诊断和预后中起着至关重要的作用, 但由于 miRNA 含量低、片段短、家族间相似度高以及易受到前体 miRNA 等问题的影响, 使得 miRNA 的灵敏检测受到严峻的挑战^[8]。针对以上问题科研人员开发了多种方法, 如

Northern 印迹^[9]、微阵列^[10]、qRT-PCR^[11]、等温核酸扩增技术^[12]、基于纳米材料的检测方法^[13]、原位杂交^[14]及高通量测序^[15]等。本文主要结合课题组的研究方向对传统的检测方法和等温核酸扩增技术进行综述。

1 传统方法

1.1 Northern 印迹杂交

Northern 印迹杂交被认为是鉴定 miRNA 的标准方法^[9], 该方法结合分子杂交与凝胶电泳。首先 miRNA 在变性的聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 分离的 miRNA 片段转移至探针杂交的尼龙膜或硝化纤维素膜上, 通过紫外交联或烘烤使其稳固结合在膜上, 当 miRNA 与膜中带有放射性同位素标记的探针互补时, 可杂交形成带有标记的条带, 通

* 联系人, 刘丽梅 女, 博士, 教授, 主要从事分子检测与生化分析研究, E-mail: liulm74@163.com

吉林省科技发展计划项目 (YDZJ2022012YTS515) 资助

2022-06-16 收稿, 2022-09-16 接受

过放射自显影成像技术检测^[16]。该技术存在耗时长、样本需求量大、操作较繁琐且存在放射性危害等缺陷^[17]。

鉴于放射性物质对身体的潜在危害, Hu 等^[18]和 Tomassi 等^[19]分别使用生物素与地高辛代替同位素来标记探针,在保留探针灵敏性的同时,延长了存放时间。Ahmad 等^[20]使用锁式核苷酸(LNA)修饰探针,借助 LNA 的咪唑环缩水形成环状 N-构象可掺入到 DNA 中的性质,通过提高磷酸盐骨架结构的稳定性,以放大探针的特异性,最终提高反应的灵敏性。

传统的印迹技术通过紫外使 RNA 交联到膜上,但 miRNA 的分子量小,紫外交联效果不理想,研究者发现利用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二酰亚胺将 miRNA 结合到膜上,再与地高辛标记的 LNA 探针杂交,0.05fmol 的 miRNA 便可产生清晰的信号^[21]。

1.2 微阵列

微阵列是一种能定时定量检测多个 miRNA、实现高通量分析的方法^[10]。将多种 5' 末端用氨基修饰的探针共价交联固定到载玻片上,荧光标

记的 miRNA 与互补探针杂交,通过检测荧光信号分析 miRNA 的类型及相对含量。然而 miRNA 序列短、样本量少、家族间相似度高,影响了微阵列检测的灵敏度和选择性^[8]。目前对该技术的改进主要在 miRNA 的标记和探针的优化。

化学标记法是对 miRNA 进行烷基化标记^[22],当前体 miRNA 与成熟 miRNA 共存时前体 miRNA 也可能被标记,使背景信号增高^[23]。酶标记法:一种是在 miRNA 的 3' 端用 T4 RNA 连接酶加上荧光标记的核苷酸^[24];另一种利用多聚腺苷酸聚合酶(PAP)在 miRNA 的 3' 端连上 poly(A)尾,与 5' 端连接 poly(T)的寡核苷酸互补,解决 T4 RNA 连接酶出现的环化问题^[22]。Aoki 等^[25]在第二种酶标记方法上加以改进并利用表面等离子体共振 (SPR) 技术检测 miRNA,SPR 信号的增强是基于 miRNA 与探针杂交并在末端连接 poly(A)尾,poly(A)尾与 T30-生物素/辣根过氧化物酶-生物素/链霉亲和素结合,而辣根过氧化物酶使四甲基联苯胺发生氧化反应产生蓝色沉淀,该实验操作简单、经济且易于信号放大,原理如图 1。

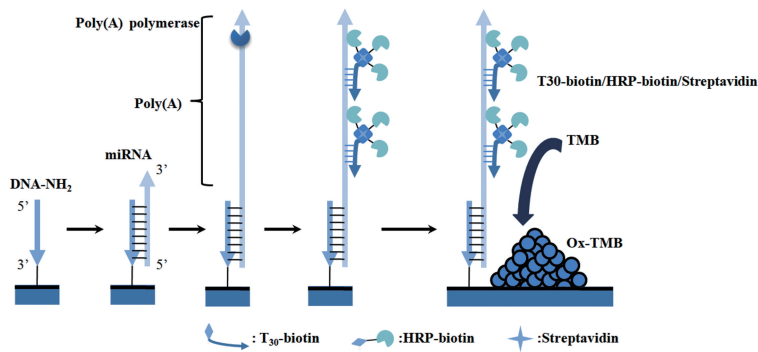


图 1 基于 poly(A) 尾的微阵列反应原理^[25]

Fig. 1 The principle of microarray reaction based on poly(A)^[25]

由于一个芯片只有一个杂交温度,而芯片上不同探针的 T_m 值分布范围较宽,因此易导致信号失真^[26]。Castoldi 等^[24]利用 LNA 设计一高亲和力、均匀的探针集,在不需要 miRNA 富集和扩增的前提下,2.5mg 的总 RNA 在杂交温度为 55℃ 时即可进行高灵敏性、准确性的分析。Beuvink 等^[27]利用 2'-O-(2-甲氧基乙基)修饰寡核糖核苷酸,并设计错配对照补充 miRNA 的互补探针,可精确地对 miRNA 表达谱进行序列测定,通过 Northern 印迹和实时荧光定量 PCR 对所得数据进行确认,证明改进后的微阵列平台展现出高通

量及高保真的优势。

1.3 实时定量 PCR

实时定量 PCR (qRT-PCR) 是一种能准确分析基因表达的方法^[11],将 RNA 逆转录生成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR。由于成熟的 miRNA 从前体 RNA 切割后分子量变小^[28],导致常规的引物不能满足 miRNA 的逆转录。研究发现,在 miRNA 的 3' 端加上 poly(A)尾,与 5' 端带有 oligo-dT 的引物进行逆转录,生成的 cDNA 可用于 PCR 扩增^[29]。也可以使用茎环引物对 miRNA 的 3' 端逆转录,产生的 cDNA 作为

后续扩增模板^[30],Hua 等^[31]将上述的 poly(A)加尾法与茎环法结合构建一灵敏的电化学生物传感器,在 10fmol/L ~ 50nmol/L 范围检测乳腺癌细胞 miRNA let-7a,检测限低至 5. 1fmol/L。Jung 等^[32]报道一种多重 RT-PCR 分析 miRNA 的新方法:将 miRNA 的茎环引物和正向引物固定到颗粒上,实现对高度同源家族的区分且反应交叉率小于 5%。

除加尾法与茎环法,近年来研究人员发现优化 RNA 的提取和 miRNAs 的退火温度,可减少

miRNA 在提取时的损失以获得更可靠的实验结果^[33]。Ahn 等^[34]创新地将 miRNA 逆转录形成的 cDNA 与包含靶 miRNA 的特定延伸序列杂交形成新的 PCR 模板,避免了与其他 miRNA 的非特异性结合,提高了产物的纯度与反应的特异性。氧化石墨烯(GO)作为一种二维碳纳米结构物质具有吸附 ssDNA 的特性,其与引物和 ssDNA 非共价结合,减少非特异性的扩增,提高反应的灵敏度和特异性^[35]。传统 miRNA 检测技术的优缺点及改进方法见表 1。

表 1 传统方法检测 miRNA 的比较
Tab. 1 Comparison of traditional methods for detecting miRNA

方法	原理	优点	缺点	改进	文献
Northern blot	靶 miRNA 与固定在膜上标记的互补探针结合	设别要求低、不需要扩增	灵敏度低、过程繁琐、耗时长、放射性危害、需大量样本	探针标记 RNA 与膜的交联	[16~ 21]
微阵列	微阵列芯片上固定的探针与靶 miRNA 结合	高通量检测、检测速度	灵敏度低、选择性低	miRNA 标记;化学标记法、酶标记法;优化探针修饰	[8, 10] [22~ 26]
qRT-PCR	靶 miRNA 逆转录为 cDNA 后进行 qPCR	高灵敏度、高特异性	复杂的引物设计	引物设计;加尾法、茎环法; RNA 提取;优化退火温度	[28~ 35]

2 等温指数扩增技术

2.1 环介导等温扩增

环介导等温扩增(LAMP)是一种在体外等温的条件下对核酸进行的高效率、高灵敏性的放大^[13],广泛应用于多种遗传标志物及疾病的检测,特别是 COVID-19^[36~38]。研究者通过四条不同的引物在目标 miRNA 结合处产生环状结构, *Bst* DNA 聚合酶引发新链的合成,实现靶基因的扩增^[13]。尽管传统的 LAMP 技术可以扩增少量的靶序列到可检测的水平,但存在复杂的引物设计以及非特异性扩增,阻碍其顺利的应用^[39]。

CRISPR 作为原核生物的适应性免疫系统,可抵抗外来遗传元素的攻击,其与 Cas 蛋白构成的 CRISPR-Cas 系统具有分子剪刀的功能^[40]。CRISPR-Cas 系统分为两类(I 类和 II 类)、六型(I~ VI 型)^[41]。II 类 V 型的 CRISPR/Cas12a 是一种 RNA 引导的核酸内切酶, CRISPR RNA (crRNA)包含针对特定 DNA 序列的信息,可识别与目标 DNA 相邻的 PAM 序列,且 crRNA 和目标序列之间存在互补性干扰^[42]。已有研究表明, CRISPR/Cas12a 可与多种核酸检测技术结合,实现信号的放大与输出^[43~47]。

Zhang 等^[43]利用 CRISPR/Cas12a 辅助 LAMP 反应,有效地消除了引物二聚体及非特异性扩增,可检测低至 0. 1fmol/L 水平的 miRNA,实验原理

如图 2。设计的茎环结构的 DNA 分子探针(SLP)和 SLP-PAM 探针包含通用茎环序列与 miRNA 互补序列,当待测 miRNA 存在时,SLP 和 SLP-PAM 通过 miRNA 连接在一起,随后 Splint RNA 连接酶将 SLP 和 SLP-PAM 连接形成双茎环结构,并作为 LAMP 循环的起始材料,等温扩增后产生长茎、多环状物质,其中包含大量待测的 miRNA 序列。crRNA 介导的 CRISPR/Cas12a 系统特异性识别 miRNA 序列,激活 Cas12a 的侧支裂解活性,导致荧光报告基因的裂解,产生荧光信号。该系统通过一对特异性茎环探针代替传统的线性探针,并在 SLP-PAM 探针的茎环序列和 miRNA 特异性序列之间插入 PAM 位点,使扩增产物被 crRNA/Cas12a 复合物特异性地识别和切割,减少遗留污染的假阳性结果,实现单核苷酸的分离。

2.2 杂交链式反应

等温扩增方法多数需酶的辅助,酶的存在虽放大了反应的灵敏性,也增大了污染的风险,因此研究人员开始致力于无酶等温扩增技术的研发。杂交链式反应(HCR)是 Dirks 等^[48]于 2004 年首次提出,原理如图 3。作为一种无酶自组装反应,存在效率较低、动力学相对较慢、DNA 探针生物稳定性较弱等不可避免的缺点。

CRISPR/Cas12a 可提高检测效率,但 crRNA 需与单链或双链 DNA 结合,因此 Jia 等^[44]提出以 HCR 充当信号转换器,将 miRNA 转化为双链

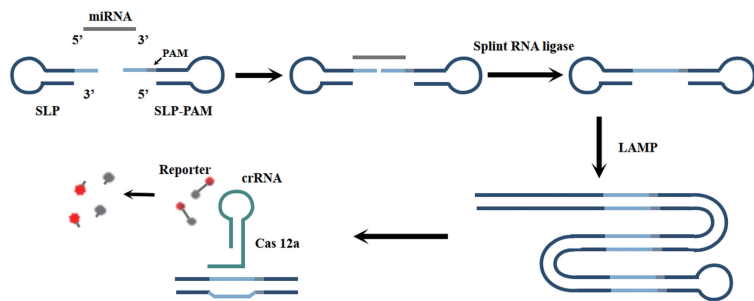


图 2 CRISPR/Cas12a 辅助 LAMP 反应原理^[43]

Fig. 2 CRISPR/Cas12a auxiliary LAMP reaction principle^[43]

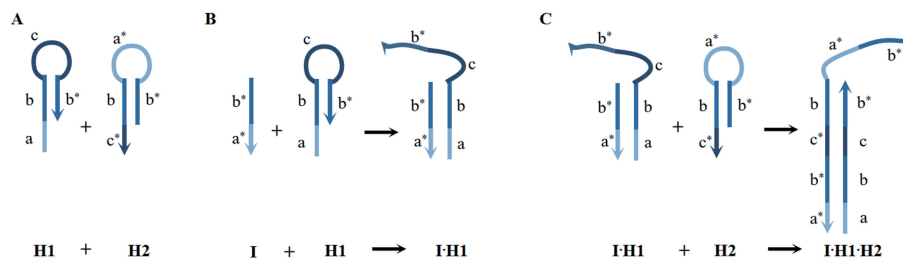


图 3 HCR 反应原理^[48]

Fig. 3 Principle of HCR reaction^[48]

DNA,以激活 Cas12a 的切割活性,实现靶 miRNA 信号的扩增。原理如下:HCR 反应涉及 H1、H2 和 H3,三个发夹在溶液中稳定共存,H1 作为可变发夹,其环状区域是靶 miRNA 特异序列,H2 和 H3 是两种通用发夹;当 miRNA 存在时,miRNA 与 H1 的环状区杂交,打开 H1 并暴露粘性端被 H2 识别,H2 被打开,暴露 H2 的粘性端与 H3 互补,暴露 H3 的粘性端再次被 H2 识别,循环交替形成 DNA 双链即 miRNA/H1/(H2/H3) n ,实现 miRNA 转化为 DNA,可被 CRISPR/Cas12a 特异性识别,激活 Cas12a 的内切酶活性,加入 5'-FAM-TTATT-BHQ-3' 报告物后,Cas12a 裂解报告物,释放荧光信号。

传统的检测方法多采用化学标记进行分析,但存在复杂的标记程序、高成本和非特异性等问题。因此,如表面增强拉曼光谱、电感应耦合等离子体质谱(ICP-MS)和 SPR 等多种无标记技术被研发^[49~51]。其中 ICP-MS 可直接定量检测内同位素,并经研究证明其具有良好无标记的性质^[52,53]。Wei 等^[54]发现在同一系统下连续进行两次 HCR,形成一个叶状分支的 dsDNA,扩增效率较普通 HCR 高出数百倍,此反应称为 C-HCR。Hu 等^[55]将具有优越扩增性能的 C-HCR 和元素分析能力的 ICP-MS 联合,构建无标记的 miRNA 检测系统,磷作为核酸主链及翻译后磷酸化蛋白

的重要组成部分,成为该检测系统的标记元素,最终获得 13fmol/L 的低检测限。

2.3 恒温指数扩增反应

恒温指数扩增反应(EXPAR)是 Galas 团队首次提出的一种适合于短小核酸分子的扩增方法,与 PCR 相比,EXPAN 表现出更高的扩增效率,在几分钟内可扩增 $10^6 \sim 10^9$ 倍的短寡核苷酸^[56,57]。该方法根据待测的 miRNA 设计 EXPAN 反应的模板,该模板的两端是待测 miRNA 的互补序列,中间为核酸内切酶识别序列,当待测 miRNA 识别模板中的触发序列,在 DNA 聚合酶作用下形成包含酶识别位点的双链 DNA,核酸内切酶切割双链,DNA 聚合酶在缺口处合成新链同时置换旧链,释放的旧链与 miRNA 序列一致可与新的模板结合,往复循环后实现扩增,实验原理如图 4^[58]。

然而模板与 DNA 聚合酶的作用导致反应出现非特异性扩增^[59]。Qian 等^[60]发现具有相似热力学的模板却有不同的表现,在分析 384 个模板序列的性能后,发现模板性能的可变性与序列的基序有关,并开发基于序列的计算方法进行预测。研究还发现一些分子增强剂可提高反应的特异性^[61],但扩增速率有待提高。Wang 等^[62]注意到 GO 可阻止 DNA 聚合酶与模板结合,但 GO 导致 ssDNA 释放缓慢,使信号强度减弱,于是加入单链结合蛋白增加模板的释放,提高反应效率。

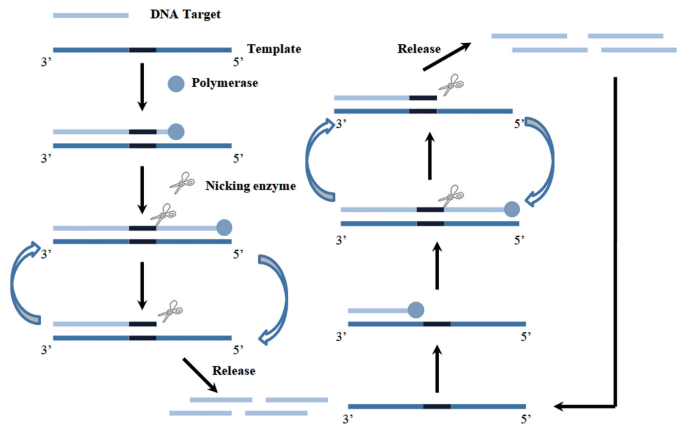


图 4 EXPAR 反应原理^[58]

Fig. 4 The principle of EXPAR reaction^[58]

纳米材料是一种在三维空间中至少有一维处于纳米尺度或以此为基本单元组成的材料^[12], 凭借其高度的敏感性、特异性, 已有多种纳米材料应用于 miRNA 的检测, 例如金纳米粒子、银纳米粒子、铜纳米粒子与碳纳米粒子^[63-66] 等。当其与 EXPAR 联合应用时, 检测结果更为理想^[67]。Wei 等^[68] 利用 EXPAR 的高效扩增与金纳米颗粒聚集 (AuNPs) 后的颜色变化联合检测 miRNA。该反应需要两类 AuNPs: 第一类 AuNPs 与 EXPAR 的探针结合, 在目标 miRNA 存在时引发 EXPAR 反应, 并在 AuNPs 表面形成双链 DNA, 第二类 AuNPs 上的单链 DNA 探针与形成的双链 DNA 相互作用形成三联体 DNA, 导致两类 AuNPs 的聚集, 可通过肉眼观察, 也可在紫外分光光度计下进行定量分析。

3 结语

在人类的发育、代谢与疾病过程中 miRNA 发挥重要的调节作用, 由于成熟 miRNA 具有短序列、低表达、家族间序列高相似性等特点, 因此灵敏、特异地检测 miRNA 对疾病的早期诊断及预后显得尤为重要, 总结部分 miRNA 可用于诊断疾病的生物标志物如表 2。

本文概述 Northern 印迹杂交、微阵列和 qRT-PCR 在内的传统检测方法以及新兴的等温指数扩增技术, 各有优势弊端。Northern 印迹杂交技术作为鉴定 miRNA 的标准方法, 其样本需求量大、耗时长且存在放射性危害, 微阵列技术虽可实现多种 miRNA 同时检测, 但选择性较差、灵敏度低以及检测成本高, 茎环引物加 TaqMan 探针的 qRT-PCR 被认为是检测 miRNA 的金标准, 表现

表 2 可用于疾病诊断的 miRNA (部分)			
Tab. 2 MiRNAs that can be used for disease diagnosis (part)			
疾病	miRNA	上升/下降	参考文献
肾纤维化	miRNA-200b	下降	[4]
肾透明细胞癌	miRNA-21	上升	[69]
肾透明细胞癌	miRNA-221	上升	[69]
狼疮性肾炎	miRNA-146a	下降	[70]
肝纤维化	miRNA-200a-3p	下降	[71]
肝纤维化	miRNA-20a-5p	上升	[71]
丙型肝炎	miRNA-122	上升	[72]
慢性心力衰竭	miRNA-133	上升	[73]
肥厚性心肌病	miRNA-29a	上升	[74]
肥厚性心肌病	miRNA-155	下降	[75]
宫颈癌	miRNA-210-3p	上升	[76]
宫颈癌	miRNA-489	下降	[77]
宫颈癌	miRNA-203	下降	[78]
胃癌	miRNA-383	下降	[79]
胃癌	miRNA-1236-3p	下降	[80]
胃癌	miRNA-25	上升	[81]
非小细胞肺癌	miRNA-185	下降	[82]
非小细胞肺癌	miRNA-195	下降	[83]
肺腺癌	miRNA-488	上升	[84]

出高度的特异性及灵敏性, 但 qRT-PCR 需要复杂的引物设计、易出现非特异性扩增等。于是研究人员开始对传统检测方法改进并研发新的检测方法, 本文介绍的等温核酸扩增技术虽克服了传统检测方法的一些缺点, 但存在扩增效率低等问题。为获得更灵敏、准确的检测, 研究者又将已建立的几种方法相结合。相信在科研人员的不懈钻研下 miRNA 作为生物标志物及药物靶点将在临床工作中发挥巨大的作用。

参 考 文 献

[1] Sabu K K, Nadiya F, Anjali N. Methods Mol Biol., 2017, 1509: 25~36.

[2] Chendrimada T P, Gregory R I, Kumaraswamy E, et al. Nature, 2005, 436(7051): 740~744.

[3] Guo H, Ingolia N T, Weissman J S, et al. Nature, 2010, 466(7308): 835~840.

[4] Yu Y T, Bai F, Qin N, et al. Nephron, 2018, 139(3): 269~282.

[5] Umezu T, Tsuneyama K, Kanekura K, et al. Sci. Rep., 2020, 10(1): 21766.

[6] Çakmak H A, Demir M. Balkan Med. J., 2020, 37(2): 60~71.

[7] Rotival M, Siddle K J, Silvert M, et al. Genome Biol., 2020, 21(1): 187.

[8] Wang B, Xi Y. Microarrays (Basel), 2013, 2(2): 34~50.

[9] Koscianska E, Starega R J, Sznajder L J, et al. BMC Mol. Biol., 2011, 12: 14.

[10] Roy S, Soh J H, Ying J Y. Biosens. Bioelectron., 2016, 75: 238~246.

[11] Zhang L C, Yang X Q, Yin Y Y, et al. Mol. Biol. Rep., 2021, 48(4): 3357~3366.

[12] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Nucl. Acids Res., 2000, 28(12): E63.

[13] Stamm H. Nature, 2011, 476: 399~399.

[14] Cai W L, Huang W D, Li B, et al. Mol. Cancer, 2018, 17(1): 9.

[15] Gonzalez T L, Eisman E, Joshi N V, et al. Epigenomics, 2021, 13(13): 995~1012.

[16] Ye J, Xu M C, Tian X K, et al. J. Pharm. Anal., 2019, 9(4): 217~226.

[17] Hunt E A, Broyles D, Head T, et al. Ann. Rev. Anal. Chem., 2015, 8: 217~237.

[18] Hu J, Zhu Y G. Methods Mol. Biol., 2017, 1640: 211~217.

[19] Tomassi A H, Gagliardi D, Cambiagno D A, et al. Methods Mol. Biol., 2017, 1640: 199~210.

[20] Ahmad W, Gull B, Baby J, et al. Curr. Issues Mol. Biol., 2021, 43(2): 457~484.

[21] Kim S W, Li Z H, Moore P S, et al. Nucl. Acids Res., 2010, 38(7): e98.

[22] Pritchard C C, Cheng H H, Tewari M. Nat. Rev. Genet., 2012, 13(5): 358~369.

[23] Liao T B, Li X R, Tong Q, et al. Anal. Chem., 2017, 89(10): 5511~5518.

[24] Castoldi M, Schmidt S, Benes V, et al. RNA, 2006, 12(5): 913~920.

[25] Aoki H, Corn R M, Matthews B. Biosens. Bioelectron., 2019, 142: 111565.

[26] Li W, Ruan K C. Anal. Bioanal. Chem., 2009, 394(4): 1117~1124.

[27] Beuvink I, Kolb F A, Budach W, et al. Nucl. Acids Res., 2007, 35(7): e52.

[28] Varkonyi G E. Methods Mol. Biol., 2017, 1456: 163~175.

[29] Reichenstein I, Aizenberg N, Goshen M, et al. J. Virol. Methods, 2010, 163(2): 323~328.

[30] Abel Y, Rederstorff M. Methods Mol. Biol., 2021, 2300: 59~64.

[31] Hua X Y, Fan J J, Yang L Z, et al. Biosens. Bioelectron., 2022, 198: 113830.

[32] Jung S G, Kim W J, Kim B K, et al. Biosens. Bioelectron., 2020, 163: 112301.

[33] Ban E, Kwon H, Seo H S, et al. BMC Biotechnol., 2021, 21(1): 50.

[34] Ahn J H, Kwak J, Lee J H, et al. Mol. Biol. Rep., 2018, 45(4): 611~619.

[35] Hu C, Zhang L, Yang Z, et al. Anal. Chim. Acta, 2021, 1174: 338715.

[36] Du T, Pothukuchy A, Gollihar J D, et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2017, 56(4): 992~996.

[37] Carter L J, Garner L V, Smoot J W, et al. ACS Cent. Sci., 2020, 6(5): 591~605.

[38] Pang B, Xu J Y, Liu Y M, et al. Anal. Chem., 2020, 92(24): 16204~16212.

[39] Ho N, Lim G S, Sundah N R, et al. Nat. Commun., 2018, 9(1): 3238.

[40] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Science, 2013, 339(6121): 819~823.

[41] Nishimasu H, Nureki O. Curr. Opin. Struct. Biol., 2017, 43: 68~78.

[42] Stella S, Alcón P, Montoya G. Nat. Struct. Mol. Biol., 2017, 24(11): 882~892.

[43] Zhang M, Wang H H, Wang H, et al. Anal. Chem., 2021, 93(22): 7942~7948.

[44] Jia H Y, Zhao H L, Wang T, et al. Biosens. Bioelectron., 2022, 211: 114382.

[45] Chen P, Wang L, Qin P, et al. Biosens. Bioelectron., 2022, 207: 114152.

[46] Wang X, Qin Y, Huang Y, et al. Spectrochim. Acta A, 2022, 279: 121476.

[47] Yan X, Zhang J, Jiang Q, et al. Anal. Chem., 2022, 94(9): 4119~4125.

[48] Dirs R M, Pierce N A. PNAS, 2004, 101(43): 15275~15278.

[49] Xie W, Walkenfort B, Schlücker S. J. Am. Chem. Soc., 2013, 135(5): 1657~1660.

[50] Liu R, Wang C, Xu Y, et al. Anal. Chem., 2017, 89(24): 13269~13274.

[51] Yang H M, Teoh J Y, Yim G H, et al. ACS Appl. Mater. Interf., 2020, 12(5): 5413~5419.

[52] Yang B, Chen B, He M, et al. Anal. Chem., 2017, 89(3): 1879~1886.

[53] Yan X, Luo Y, Zhang Z, et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 51(14): 3358~3363.

[54] Wei J, Gong X, Wang Q, et al. Chem. Sci., 2017, 9(1): 52~61.

[55] Hu J Y, Li Z Y, Zhang H, et al. Anal. Chem., 2020, 92(12): 8523~8529.

[56] Ness J V, Ness L K V, Galas D J. PNAS, 2003, 100(8):

4504~4509.

[57] Wang K, Zhang K, Lv Z, et al. Biosens. Bioelectron. , 2014, 57: 91~95.

[58] Zhang X, Liu C, Sun L, et al. Chem. Sci. , 2015, 6(11): 6213~6218.

[59] Tan E, Erwin B, Dames S, et al. Biochemistry, 2008, 47(38): 9987~9999.

[60] Qian J, Ferguson T M, Shinde D N, et al. Nucl. Acids Res. , 2012, 40(11): e87.

[61] Mok E, Wee E, Wang Y L, et al. Sci. Rep. , 2016, 6: 37837.

[62] Wang J P, Zou B J, Rui J Z, et al. Microchim. Acta, 2015, 182: 1095~1101.

[63] Jiang C Y, Meng F Y, Mao D S, et al. ChemBioChem, 2021, 22(7): 1302~1306.

[64] Wang M, Chen W, Tang L, et al. Anal. Chim. Acta, 2020, 1107: 23~29.

[65] Miao P, Zhang T, Xu J, et al. Anal. Chem. , 2018, 90(18): 11154~11160.

[66] Li H, Li Y, Li W, et al. Talanta, 2020, 213: 120816.

[67] Jiang J, Zhang B, Zhang C, et al. Int. J. Mol. Sci. , 2018, 19(11): 3374.

[68] Wei S, Chen G, Jia X, et al. Anal. Chim. Acta, 2020, 1095: 179~184.

[69] Szabo Z, Szegedi K, Gombos K, et al. Urol. Oncol. , 2016, 34(12): 533. e21~533. e27.

[70] Hashad D I, Abdelmagid M H, Elsherif S H. J. Clin. Lab. Anal. , 2012, 26(1): 35~40.

[71] Ye M, Wang S, Sun P, et al. Biomed. Res. Int. , 2021: 9583932.

[72] Kunden R D, Khan J Q, Ghezelbash S, et al. Int. J. Mol. Sci. , 2020, 21(16): 5677.

[73] Belevych A E, Sansom S E, Terentyeva R, et al. PLoS One, 2011, 6(12): e28324.

[74] Derda A A, Thum S, Lorenzen J M, et al. Int. J. Cardiol. , 2015, 196: 115~122.

[75] Roncarati R, Viviani Anselmi C, Losi M A, et al. J. Am. Coll. Cardiol. , 2014, 63(9): 920~927.

[76] Shao M X, Qu A Z, Wang Y Q, et al. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. , 2020, 24(12): 6583~6588.

[77] Juan C, Hua Q, Ruping Z, et al. Bratisl. Med. J. , 2018, 119(5): 278~283.

[78] Yin X Z, Zhao D M, Zhang G X, et al. Genet. Mol. Res. , 2016, 15(3): 15038680.

[79] Azarbarzin S, Feizi M A H, Safaralizadeh R, et al. Biochem. Genet. , 017, 55(3): 244~252.

[80] An J X, Ma Z S, Ma M H, et al. Cancer Biomark. , 2019, 25(2): 127~132.

[81] Kong Y, Ning L, Qiu F, et al. Cancer Biomark. , 2019, 24(4): 477~483.

[82] Liu J, Han Y, Liu X, et al. Technol. Cancer Res. Treat. , 2020, 19: 1533033820973276.

[83] Su K, Zhang T, Wang Y, et al. World J. Surg. Oncol. , 2016, 14(1): 224.

[84] Xue X, Wang C, Xue Z, et al. Acta Biochim. Biophys. Sin. , 2020, 52(3): 281~293.

(上接第 464 页)

[56] Mazur-Marzec H, Fidor A, Ceglowska M, et al. Mar. Drugs, 2018, 16(7): 220.

[57] Bister B, Keller S, Baumann H I, et al. J. Nat. Prod, 2004, 67(10): 1755~1757.

[58] Spoof L, Błaszczyk A, Meriluoto J, et al. Mar. Drugs, 2016, 14(1): 8.

[59] Gademann K, Portmann C. Curr. Org. Chem. , 2008, 12(4): 326~341.

[60] Kohler E, Grundler V, Haussinger D, et al. Harmful Algae, 2014, 39: 154~160.

[61] Ishida K, Kato T, Murakami M, et al. Tetrahedron, 2000, 56(44): 8643~8656.

[62] Egli C M, Natumi R S, Jones M R, et al. Chimia, 2020, 74(3): 122~128.

[63] Portmann C, Blom J F, Gademann K, et al. J. Nat. Prod. , 2008, 71(7): 1193~1196.

[64] Chintalapati P, Mohseni M. J. Hazard. Mater. , 2020, 381: 120921.

[65] Wörmer L, Huerta-Fontela M, Cirés S, et al. Environ. Sci. Technol. , 2010, 44(8): 3002~3007.

[66] Zhao Y, Fan Q, Wang X, et al. Chem. Eng. J. , 2019, 368: 968~979.

[67] Welker M, Steinberg C. Environ. Sci. Technol. , 2000, 34(16): 3415~3419.

[68] Yan S, Zhang D, Song W. Environ. Pollut. , 2014, 193: 111~118.

[69] Parker K M, Reichwaldt E S, Ghadouani A, et al. Environ. Sci. Technol. , 2016, 50(16): 8505~8513.

[70] Criado S, Bertolotti S G, García N A. J. Photochem. Photobiol. A, 1996, 34(1): 79~86.