

杂交链反应在生物传感检测技术中的应用

梁栋国¹ 陈星兆¹ 吴宏祥¹ 张 晔^{1,2} 罗世华^{1,2} 综述 郑 磊^{1,2} 审校

摘要 开发功能强大、简单可行且成本低廉的 DNA 扩增技术对生物分析和生物医学研究意义重大。目前已开发出了许多信号放大策略,例如聚合酶链反应(PCR)、滚环扩增(RCA)和 DNA 链置换扩增(SDA)。其中杂交链反应(HCR)是利用一种立足点介导的链置换反应,其具有不需要酶介导、可在等温条件下进行、实验方案简单、扩增效率高等多种优点,引起了研究者的极大兴趣。在典型的 HCR 反应中,靶物质引发两个 DNA 发夹的交叉结合,产生类似于交替共聚物的 DNA 双螺旋结构。作为一个高效的扩增策略,HCR 已被用于检测各种分析物,包括核酸、蛋白质、小分子和细胞。该综述对 HCR 在生物传感检测中的应用进行了总结,同时分析了 HCR 面临的挑战与机遇。

关键词 杂交链反应;生物传感;核酸扩增技术

中图分类号 R 446.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)12-1976-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.035

核酸扩增技术可以分为两类:一类是热循环扩增技术,包括多聚酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和连接酶链式反应(ligase chain reaction, LCR);另一类是等温扩增技术,包括螺旋酶依赖性扩增(helicase-dependent amplification, HDA)、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)和链置换扩增(strand displacement amplification, SDA),如酶介导 SDA(如多聚酶介导 SDA)和无酶 SDA[如立足点介导的链置换(toehold-mediated strand displacement, TMSD)扩增]。与热循环扩增法相比,等温扩增法可在简单条件下(如恒温)进行,而前者往往需要复杂的条件。需要特别指出的是,由于具有无需

酶介导、扩增效率高和反应动力学可控等优点,TMSD 扩增已成为最受欢迎的一种等温扩增法。在一次典型的 TMSD 反应中,扩增反应开始于互补单链的末端(称为立足点),接着一条长单链 DNA 取代一条短链,并通过更多的互补碱基对,与第三条链杂交形成双螺旋结构。已发现,立足点碱基的数目和种类调控链置换反应的动力学。理论上,TMSD 可将链置换速率提升 10^6 倍。在 TMSD 体系中,杂交链反应(hybridization chain reaction, HCR)是于 2004 年由 Dirks et al^[1]提出的一种简单高效的等温扩增技术,以核酸探针之间竞争杂交作为能量来源,自组装成一种核酸纳米结构,实现信号的放大。HCR 的组成元件包括:引发探针和两条可杂交互补并带有粘性末端的发夹型 DNA(H1 和 H2)。若无引发序列存在时,两条发夹型 DNA 可以稳定存在,一旦存在引发探针,发夹 H1 的二级结构被引发探针打开,H1 释放的茎端会将发夹 H2 的二级结构打开,H2 释放出的茎端与引发探针的序列相同,又会打开 H1 的二级结构,H1 和 H2 如此循环往复的被相互打开,最后形成一条含有缺口的杂交长双链共聚。由于具有无需酶介导、等温扩增效率高、灵敏度极高和结构灵活等特点,HCR 已被认为是一种强大的分子工具,并广泛应用在生物传感、生物成像和生物医药等领域。迄今为止,HCR 已用于包括核酸(DNA 或 RNA)、蛋白质、酶活性、生物小分子、金属离子、甚至是肿瘤细胞、在内的多种靶物质的敏感检测。

1 HCR 的基本特征

Dirks et al^[1]引入了一种新的策略,DNA 可以通过与底物结合同时完成识别和信号放大。在典型的 HCR 过程中,靶向的识别启动两个 DNA 发夹的交叉开放以形成 DNA 聚合物纳米线。

2007 年,该课题组提出了一种自主聚合马达,靶触发四向分支迁移以进行 HCR,从而形成长切口双螺旋 DNA。与传统 PCR 分析技术不同,HCR 是一种等温和无酶扩增策略。HCR 和 PCR 之间的另一个显著差异在于 HCR 是一种探针扩增技术,而 PCR 是一种靶向扩增技术。因此,HCR 可有效降低

2018-06-15 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81371901、81672076);广东省省级科技计划项目(编号:2014A050503040);广州市科技计划项目(编号:201510010097)

作者单位:¹南方医科大学第一临床医学院/南方医院,广州 510515

²广东省重大疾病快速诊断生物传感技术工程研究中心,广州 510515

作者简介:梁栋国,男,本科生;

郑磊,男,副教授,副主任技师,博士生导师,责任作者, E-mail: nfyzhenglei@smu.edu.cn

PCR 中常发生的扩增子的假阳性和交叉污染。

HCR 的关键要素是两个辅助发夹,包含三个结构域:立足点、茎和环。在发夹结构中,短环由长茎保护以存储势能。HCR 的动力学可以通过改变立足点序列的长度和结合强度来精确控制。因此,为了可编程地控制 HCR 过程,立足点的序列和长度是 HCR 合理设计的关键因素。一般来说,如果立足点长度太短,HCR 就无法有效启动。当立足点长度约为 6~10 个核苷酸时,反应速率可保持稳定,且几乎不变。最近,Ang et al^[2]设计了一套四点设计方案,用于设计发夹持柄和茎区的长度和碱基对 GC 含量,以提高 HCR 的动力学。到目前为止,已经报道了用于激活和控制 PCR 过程的各种新颖的策略,例如光活化、pH 控制和临近启动。

2 在核酸检测方面的应用

核酸,包含 DNA 和 RNA,作为疾病特别是癌症早期诊断的特异性标志物,是当下热门的生物大分子。因此,具有特异性和灵敏性的核酸检测在生物医药研究及临床诊断中至关重要。为了实现这一目标,人们已经为核酸检测开发出多种基于 HCR 的方法。

2.1 在溶液中检测 在基于均质溶液的 HCR 核酸检测中,靶 DNA 或 RNA 作为起始物触发动力学上相互遏制的发夹结构发生杂交,形成 DNA 纳米线聚合物。通过引入多种标记产生信号,含有上千个重复序列的 HCR 产物成为优质的核酸检测等温扩增平台。Huang et al^[3]提出了基于 HCR 中苾标记发夹结构的 DNA 检测系统。苾基在 3' 和 5' 末端修饰了两个发夹探针 H1 和 H2。在缺乏靶物质的情况下,两个苾基残端在空间上相互分离,出现强单体发射峰(在 375 nm 和 398 nm 处)。靶物质存在时,将启动 HCR 形成有切口双螺旋结构,使两个发夹结构上的苾单位靠近。该方法实现了对浓度低至 256 fmol/L 的 DNA 的测量,并成功用于复杂体液的核酸定量检测。作为无标志物生物传感器的荧光指示剂,发光纳米超微粒(Nano-particles, NP)也成为了当下的热点。将 HCR 扩增法与高荧光银纳米团簇颗粒整合形成新的荧光生物感应平台,用于 microRNA let-7a 检测和 microRNA let-7a 家族中单个核苷酸多态性的鉴别^[4]。

鉴于成本低、操作简单和实用的优点,比色检测法成为了核酸检测的焦点。其中基于金纳米粒子的比色传感器在 DNA 的检测中主要有两种类型:第一

种是三元夹心法,通过粒间的交联机制诱导金纳米粒子间的交联;第二种是根据单链 DNA(ssDNA)和双链 DNA(dsDNA)与未改性的金纳米粒子(Au Nanoparticles, AuNP)特性的差异。由于不需要对 AuNP 进行共价功能化,在核酸的可视分析中该法具有明显优势^[5]。即使靶 DNA 浓度低至 100 pmol/L,也可用肉眼识别,而使用分光光度计可检测到 50 pmol/L 的 DNA。

近期, Lu et al^[6]在 HCR 触发酶级联扩增法的基础上开发出一套超敏比色法。葡萄糖氧化酶(glucose oxidase enzyme, GOx)和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)修饰两个用于此法的 DNA 发夹结构,而后加入靶核酸启动 HCR,形成 GOx/HRP 复合酶。搭载这一特性的 HCR 扩增法将靶核酸检测限降低到 5.2 fmol/L。

2.2 固相检测 在基于 HCR 的固相核酸分析中, HCR 发生在诸如电极、微粒体或纳米粒子(nanoparticles, NP)、微孔板、玻璃芯片或微流体工具表面。固相检测的主要优点是能容易地将分析物从复杂样品矩阵中分离。此外,这些检测可灵活使用于光学或电化学检测中,在即时检测(point-of-care testing, POCT)环境的高通量分析和发展中具有巨大潜力。

作为一种便捷、灵敏和高性价比的检测技术,基于 HCR 的电化学检测技术已引起广泛关注。Yang et al^[7]提出了一种无酶、无共轭的电化学基因检测技术。在该法中,捕获探针经 Au-S 键固定于电极表面。当引入靶 DNA,起始链和靶链发生三联杂交,启动 HCR 形成线性、电负性串联体。此后,电化学指示剂 $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ 通过静电吸附与 DNA 发生反应。基于 HCR 的电化学检测法拥有极高灵敏度(检测限低至 1 amol/L),可精确识别乳腺癌 BRCA1 基因,准确区分单碱基错配序列。

在光学固相检测中,微粒体或 NP、玻片通常作为固定 HCR 产物的载体。Liu et al^[8]报告了一种基于发光半导体量子点(quantum dots, QDs)、磁性微珠(magnetic microspheres, MMP)和 HCR 检测特定序列单链 DNA 的方法:氨基修饰的 DNA(Amino-modified DNA, A DNA)能够与靶 DNA 的 3' 末端杂交以及和 MMP 结合,捕获 DNA 的 3' 末端与靶 DNA 的 5' 末端杂交,其 5' 末端与 H1 杂交, H1 与 H2 杂交以此反复形成循环,以一种复杂的钉复合物($Ru(bpy)_2(dppx)^{2+}$ ($bpy = 2,2'$ -联吡啶, $dppx = 7,8$ -二甲基二吡啶))插入 HCR 产物并且与 QDs 结合改

变其发光波长为原理,达到检测特定序列单链 DNA 的目的,其检测限度低至 6.75×10^{-14} mol/L。类似地, Niu et al^[9] 也报告了一种可在磁性微粒上灵敏并选择性检测 DNA 的扩增法,该法将磁性微粒与 HCR 整合,并引入酶促进反应。由此实现了对靶 DNA 的超敏检测,检测限低至 8.1×10^{-16} mol/L。尽管拥有着极高的灵敏度,该法仍存在标记(如生物素和卵白素修饰)昂贵和信号分子固定过程复杂(如生物素卵白素相互作用)的缺点。此外,研究者^[10]还在分支 HCR 聚合作用与采用 SYBR I 型绿色染料的基础上,提出了一种用于高通量 RNA 检测的无标记荧光法。

3 在蛋白质检测方面的应用

蛋白质是维持生命的基础,已证实蛋白质功能障碍可引起多种疾病^[11]。此外,许多蛋白质在实际样品中的含量极低。因此,蛋白质高灵敏度检测在生物分析中起着重要的作用。HCR,作为当下热门的无酶等温扩增技术,已广泛应用于蛋白质的灵敏检测。根据识别机制,这些方法可分为两类:基于抗体的方法和基于适配体的方法。

3.1 基于抗体的方法 在基础研究和临床诊断中,由于能与抗原表位特异性结合,作为配体的抗体广泛应用于蛋白质的定量检测。在蛋白质检测中最常见的抗体法是 ELISA,其检测灵敏度仍亟待提高。此外,在 HCR 扩增法的基础上将特定 DNA 与抗体结合,诞生了免疫 HCR 法。这些检测法背后的原理主要如下:① 在固体基质(如磁珠、玻片或电极)表面形成捕获抗体(Ab1)/靶蛋白/辅抗体(Ab2)三联免疫复合物;② 利用依附于 Ab2 的寡核苷酸启动 HCR;③ 利用光学或电化学技术定量检测免疫 HCR 产物。基于上述原理,Choi et al^[12]开发出一套荧光检测法,用于检测单个人类单核细胞分泌的细胞因子和趋化因子。相较其它未采用 HCR 扩增的荧光检测法相比,该法的检测限和灵敏度平均提高了 200 倍。Li et al^[13]则基于官能化磁性颗粒富集和杂交链反应(HCR)扩增,开发一种超敏感化学发光生物传感器,以进行蛋白质的检测,其检测限可低至 9.7 fmol/L,并且添加不同的适配体,就可以对相应蛋白进行检测。还可以通过改变添加试剂的顺序,实现处在复杂生物环境的蛋白质的检测。这意味着,该策略有着极大的临床应用价值以及前景。

此外,Zhao et al^[14]研发出一种基于 HCR 反应辅助形成铜纳米颗粒(Cu nanoparticles, CuNPs)的

蛋白电化学检测方法。该团队以叶酸受体作为例子,在叶酸受体和叶酸结合后,探针 DNA 免受核酸外切酶 I 的降解,进而与捕获 DNA 杂交,被固定在电极表面,并促发位于电极表面上的 HCR 反应,生成 CuNPs,随后生成的铜离子催化邻苯二胺的氧化,通过级联反应,实现电化学信号的放大。该法可实现浓度位于 0.01 ng/ml 到 100 ng/ml 的叶酸受体的检测,最低浓度可达 3 pg/ml。另外,以金纳米粒子(AuNP)为信号扩增的 DNA 诱发剂载体,构建出了电化学免疫 HCR 生物传感器^[15]。AuNP 可大幅度增加 DNA 诱发剂剂量,产生更多的 HCR 产物,提升靶蛋白质定量的信号放大能力,将检测浓度阈值降低到 0.1 fg/ml。

3.2 基于适配体的方法 适配体是利用指数富集的配基系统进化技术从随机种群 DNA/RNA 中获得的 ssDNA 或 RNA 分子^[16]。作为另一种亲和配体,具有高亲和力和特异性的适配体广泛用于靶物质如蛋白质、小分子甚至是整个细胞的识别^[17]。与抗体相比,适配体有着诸如合成容易、修饰简单、成本低廉、贮存时间长和无毒等多项优点。

近年来,已开发出多种基于 HCR 的适配体检测方法,用于蛋白质检测。基于靶向促发 HCR 扩增和氧化石墨烯(graphene oxide, GO)的选择性荧光猝灭,Wang et al^[18]已经开发出一种新颖的无酶无标记物的荧光适配体传感策略,并成功应用于血小板衍生生长因子 BB(platelet derived growth factor BB, PDGF-BB)的检测。而 PDGF-BB 在细胞转化肿瘤生长和进展等扮演重要角色。所以,该方法将可以用于肿瘤细胞的早期检测与诊断。用于蛋白质(如 PDGF-BB)检测的经典适配体检测剂由适配体与 HCR 整合获得^[19]。靶适配体首先启动生物素酰化 DNA 发夹结构杂交,形成长 DNA 切口双螺旋,后者再与 SA-QD 反应生成 QD-DNA 共轭。在靶适配体识别的基础上,QD-DNA 共轭与先前抗体捕获的 PDGF-BB 在液面结合,以荧光检测 PDGF-BB,检测限为 50 pmol/L。另外,还有一种以 HCR 为信号扩增,基于适配体的普适表面增强拉曼散射(Surface-enhanced Raman scattering, SERS)生物检测方案^[20]。该法形成了基于 Watson Crick and Hoogsteen 碱基对的 DNA 三螺旋探针设计。靶物质与适配体的结合扰动了三螺旋结构并使得从硅微球体获得的普适诱发剂发生解离,从而启动了 HCR。AuNP 再与 HCR 产物共轭,形成 SERS 活性热点。该 SERS 生物检测剂已用于检测多种靶物质,包括凝血酶、腺苷和癌细

胞。

4 在酶活性检测方面的应用

酶是能够选择性并具有催化活性的特殊蛋白质,在几乎所有的生命活动中发挥着关键作用。研究者已发现一些酶[如端粒酶、DNA 甲基转移酶(methyltransferase, MT 酶)和核苷酸激酶(nucleotide kinase, PNK)]可以作为疾病的生物标志物。因此,开发简便快速敏感的酶活性检测方法有利于推动生物医药和临床研究的发展,有利于疾病的早期诊断。

至今,已出现多种基于 HCR 进行酶活性分析的生物传感策略。Zhang et al^[21]提出了一种基于 HCR 的流式细胞磁珠检测法,用于超敏检测 T4 多聚核苷酸激酶(T4 polynucleotide kinase, T4PNK)的活性。在缺乏 T4PNK 的时候,闭式 DNA 的 5' 羟基末端无法磷酸化。因此,核酸外切酶 I 无法分解闭式 DNA,阻止了 HCR 反应。反之,若样品中存在 T4PNK,将触发磁珠表面 HCR 反应。流式细胞仪可直接分析磁珠上的荧光,良好地实现对 T4PNK 活性的定量分析,检测限达到 4×10^{-6} U/ml。另外,张佳玉等^[22]也利用 HCR 无酶放大检测信号,建立了一种简单、快速的端粒酶活性检测方法。在优化条件下,可以检测到 1.0×10^5 个 HeLa 细胞中的端粒酶活性,进一步推动了肿瘤或癌症的早期临床诊断以及以端粒酶为靶标分子的抗癌药物的筛选。利用 HCR 同样可以检测 DNA 甲基转移酶及其抑制剂的活性^[23]。此外,一套普适核酸酶反应 HCR 法已经问世^[24]。通过对特定核酸酶位点进行合适的三通设计,该法还可用于多种 DNA 修饰酶的检测,未来还可用于构建具有多种用途的靶敏感 DNA 产物。

5 在肿瘤细胞检测方面的应用

肿瘤细胞表面或细胞内某些生物标志物如受体、蛋白质或特异性酶的表达水平,与正常值之间存在显著差异,为癌症的早期诊断和治疗提供了机会^[11]。至今,已有许多研究报道了通过识别包膜表面的生物标志物来检测癌细胞^[25]。其它胞内肿瘤标志物(如核酸、蛋白质)的检测往往涉及到复杂的流程,而对于整个肿瘤细胞的直接检测则相对简单而高效。鉴于细胞表面情况复杂且含有不同分子^[26],特别是蛋白质,非常适合开发出一套用于癌细胞检测的无酶扩增法。为此,人们已经开发出了一套通过识别适配体来检测癌细胞的多分支 HCR(multi-branched HCR, mHCR)法^[27]。mHCR 是利用

经典的 HCR 反应生成产物,带有多个用于信号放大的指示分子和与 DNA 四面体纳米金电极多价结合的支臂。由于 mHCR 扩增和多价结合的协同作用,这套生物传感方案拥有极高的灵敏度,检测限达到了 4 个 MCF-7 细胞的水平。

一种无标记法也是通过在 HCR 产物基础上将 NP 金属化获得^[28]。在该法中,首先将适配体序列(DNAa)和信使 DNA(DNAb)杂交,形成一段部分互补双链。在靶细胞存在时,适配体与之特异性结合,释放 DNAb 从而触发 HCR。所合成的长双链 DNA 低聚体成为原位合成带有强荧光 CuNP 的模板,后者进一步作为输出信号,用于无标记定量检测肿瘤细胞,检测限为 50 个细胞。

6 展望

尽管基于 HCR 的方法已历经了长足的发展,但在生物传感领域的应用仍然面临诸多挑战。①在 HCR 中,发夹结构的设计至关重要。事实上,该结构的微小变化可能导致反应的失败。人们已经为构建创造性的分子设计系统付出了巨大的努力。虽然已经取得了长足的进展,但是仍缺乏能系统地设计发夹序列的指导方针。②一般情况下, HCR 可搭载各种信号显示技术,诸如荧光、化学发光、比色和电化学法,以实现靶物质的灵敏检测。然而,仅依靠 HCR 扩增的策略往往不能为生物传感提供足够的灵敏度。为进一步提高灵敏度,人们提出了多酶 HCR 策略。其灵敏度优于 PCR,检测范围达到了 amol 级别。尽管多酶 HCR 策略有着极高的灵敏度,但是严格的流程和苛刻的反应条件使得在 HCR 中使用酶与提升检测灵敏度相悖,并限制了其在复杂样本分析中的应用。因此,基于 HCR 的理想生物检测方式应当是完全无酶的。此外,尚在研发阶段的功能性核酸,尤其是 DNA 酶,推动无酶 HCR 范式的建立。HCR 介导的诸如血晶素、G-四联体等 DNA 酶产物的合成,不仅提高了检测灵敏度,还克服了酶辅 HCR 策略的缺陷。③针对异质 HCR,由于可能触发非特异性的吸附和空间位阻效应并限制反应效率,调控固体底物表面 DNA 探针的密度和方向成为了当务之急。尽管结构的稳定性和机械刚度,使在固体表面充当支架的 DNA 四面体在一定程度上解决了这个问题,但是在固体底物上可编程地控制固定分子探针仍然充满挑战。④近年来,通过触发启动复杂 DNA 单体的自组装,分支甚至树突状 HCR 系统得以发展,实现了二次甚至是指数增长

机制。然而,这些非线性的 HCR 策略依旧受限。因此,有必要将 HCR 与其他等温机制整合以构建更复杂的 DNA 结构。⑤ 得益于适配体的发展, HCR 扩增法已应用于从小分子、核酸、蛋白质、到细胞水平的大范围检测。然而,数量有限的适配体限制了基于适配体 HCR 法的发展。⑥ 虽然当下多数基于 HCR 的生物分析法仍处于实验阶段,实际应用也面对诸多困难。随着 HCR 研究的不断深入,这些问题都将可以被克服。在物理和工程学等其它领域,应侧重在 HCR 的基础上获得简单但灵敏的“采样-反馈”特性,助力 POCT 的临床应用。

参考文献

- [1] Dirks R M, Pierce N A. Triggered amplification by hybridization chain reaction[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(43): 15275-8.
- [2] Ang Y S, Yung L Y. Rational design of hybridization chain reaction monomers for robust signal amplification[J]. *Chem Commun (Camb)* 2016, 52(22): 4219-22.
- [3] Huang J, Wu Y, Chen Y, et al. Pyrene-excimer probes based on the hybridization chain reaction for the detection of nucleic acids in complex biological fluids[J]. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011, 50(2): 401-4.
- [4] Qiu X, Wang P, Cao Z. Hybridization chain reaction modulated DNA-hosted silver nanoclusters for fluorescent identification of single nucleotide polymorphisms in the let-7 miRNA family[J]. *Biosens Bioelectron* 2014, 60: 351-7.
- [5] Liu P, Yang X, Sun S, et al. Enzyme-free colorimetric detection of DNA by using gold nanoparticles and hybridization chain reaction amplification[J]. *Anal Chem* 2013, 85(16): 7689-95.
- [6] Lu S, Hu T, Wang S, et al. Ultra-sensitive colorimetric assay system based on the hybridization chain reaction-triggered enzyme cascade amplification [J]. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017, 9(1): 167-75.
- [7] Yang H, Gao Y, Wang S, et al. In situ hybridization chain reaction mediated ultrasensitive enzyme-free and conjugation-free electrochemical genosensor for BRCA1 gene in complex matrices[J]. *Biosens Bioelectron* 2016, 80: 450-5.
- [8] Liu Y, Luo M, Yan J, et al. An ultrasensitive biosensor for DNA detection based on hybridization chain reaction coupled with the efficient quenching of a ruthenium complex to CdTe quantum dots [J]. *Chem Commun (Camb)* 2013, 49(67): 7424-6.
- [9] Niu S, Jiang Y, Zhang S. Fluorescence detection for DNA using hybridization chain reaction with enzyme-amplification [J]. *Chem Commun (Camb)* 2010, 46(18): 3089-91.
- [10] Xu Y, Zheng Z. Direct RNA detection without nucleic acid purification and PCR: Combining sandwich hybridization with signal amplification based on branched hybridization chain reaction [J]. *Biosens Bioelectron* 2016, 79: 593-9.
- [11] Wu L, Qu X. Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges[J]. *Chem Soc Rev* 2015, 44(10): 2963-97.
- [12] Choi J, Love K R, Gong Y, et al. Immuno-hybridization chain reaction for enhancing detection of individual cytokine-secreting human peripheral mononuclear cells [J]. *Anal Chem* 2011, 83(17): 6890-5.
- [13] Li N, Chen J, Luo M, et al. Highly sensitive chemiluminescence biosensor for protein detection based on the functionalized magnetic microparticles and the hybridization chain reaction [J]. *Biosens Bioelectron* 2017, 87: 325-31.
- [14] Zhao J, Hu S, Cao Y, et al. Electrochemical detection of protein based on hybridization chain reaction-assisted formation of copper nanoparticles [J]. *Biosens Bioelectron* 2015, 66: 327-31.
- [15] Zhang B, Liu B, Tang D, et al. DNA-based hybridization chain reaction for amplified bioelectronic signal and ultrasensitive detection of proteins [J]. *Anal Chem* 2012, 84(12): 5392-9.
- [16] Liu Q, Jin C, Wang Y, et al. Aptamer-conjugated nanomaterials for specific cancer cell recognition and targeted cancer therapy [J]. *NPG Asia Materials* 2014, 6(4): e95.
- [17] Meng H, Fu T, Zhang X, et al. Cell-SELEX-based aptamer-conjugated nanomaterials for cancer diagnosis and therapy [J]. *National Science Review* 2015, 2(1): 71-84.
- [18] Wang X, Jiang A, Hou T, et al. Enzyme-free and label-free fluorescence aptasensing strategy for highly sensitive detection of protein based on target-triggered hybridization chain reaction amplification [J]. *Biosens Bioelectron* 2015, 70: 324-9.
- [19] Song W, Zhu K, Cao Z, et al. Hybridization chain reaction-based aptameric system for the highly selective and sensitive detection of protein [J]. *Analyst* 2012, 137(6): 1396-401.
- [20] Zheng J, Hu Y, Bai J, et al. Universal surface-enhanced Raman scattering amplification detector for ultrasensitive detection of multiple target analytes [J]. *Anal Chem* 2014, 86(4): 2205-12.
- [21] Zhang Y, Liu C, Sun S, et al. Phosphorylation-induced hybridization chain reaction on beads: an ultrasensitive flow cytometric assay for the detection of T4 polynucleotide kinase activity [J]. *Chem Commun (Camb)* 2015, 51(27): 5832-5.
- [22] 张佳玉, 周晓毓, 周曼, 等. 基于杂交链式反应信号放大和磁分离技术荧光检测端粒酶活性 [J]. *化学学报* 2016, 74(6): 513-7.
- [23] Bi S, Zhao T, Luo B, et al. Hybridization chain reaction-based branched rolling circle amplification for chemiluminescence detection of DNA methylation [J]. *Chem Commun (Camb)* 2013, 49(61): 6906-8.
- [24] Zhu J, Wang L, Xu X, et al. Modular nuclease-responsive DNA three-way junction-based dynamic assembly of a DNA device and its sensing application [J]. *Anal Chem* 2016, 88(7): 3817-25.
- [25] Maltez-De C M, de la Escosura-Muniz A, Nogues C, et al. Simple monitoring of cancer cells using nanoparticles [J]. *Nano Lett* 2012, 12(8): 4164-71.
- [26] Tan W, Donovan M J, Jiang J. Aptamers from cell-based selection for bioanalytical applications [J]. *Chem Rev* 2013, 113(4): 2842-62.
- [27] Zhou G, Lin M, Song P, et al. Multivalent capture and detection of cancer cells with DNA nanostructured biosensors and multi-branched hybridization chain reaction amplification [J]. *Anal Chem* 2014, 86(15): 7843-8.
- [28] Zhang Y, Chen Z, Tao Y, et al. Hybridization chain reaction engineered dsDNA for Cu metallization: an enzyme-free platform for amplified detection of cancer cells and microRNAs [J]. *Chem Commun (Camb)* 2015, 51(57): 11496-9.