

基于核酸酶辅助信号放大的2'-O-甲基修饰分子信标用于高灵敏和特异性外泌体肿瘤microRNA分析

吕天鹏, 柯声锋, 王书皓, 崔亮*

浙江理工大学化学与化工学院, 浙江 杭州

收稿日期: 2024年4月25日; 录用日期: 2024年5月15日; 发布日期: 2024年5月24日

摘要

外泌体是新兴的重要癌症生物标志物。有效检测外泌体和外泌体内容物, 特别是microRNA (miRNA), 对于癌症的诊断和治疗是迫切且具有挑战性的。基于双链特异性核酸酶(Duplex specific nuclease, DSN)的特异性识别和消化能力, 我们设计了一个2'-O-甲基修饰的分子信标(2'-O-methyl-modified molecular beacon, omMB), 并开发了一个高灵敏度和特异性分析外泌体miRNA的信号放大检测平台。该方法以A375细胞分泌的外泌体为模型, 以microRNA-21 (miR-21)为模型miRNA分子, 可以检测到低至37.9 pM的miRNA和2 $\mu\text{g/mL}$ 的裂解外泌体。同时, 与许多已开发的DSN辅助信号放大方法相比, 新方法具有较高的特异性, 可以区分错配miRNA。总之, 这项工作为医学分析、临床应用和疾病诊断中的外泌体检测提供了一种有效的分析策略。

关键词

双链特异性核酸酶, 外泌体, 微小RNA, 分子信标, 信号放大

2'-O-Methyl-Modified Molecular Beacons for Highly Sensitive and Specific Exosomal Tumor microRNA Analysis Based on Nuclease-Assisted Signal Amplification

Tianpeng Lyu, Shengfeng Ke, Shuhao Wang, Liang Cui*

School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou Zhejiang

Received: Apr. 25th, 2024; accepted: May 15th, 2024; published: May 24th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 吕天鹏, 柯声锋, 王书皓, 崔亮. 基于核酸酶辅助信号放大的 2'-O-甲基修饰分子信标用于高灵敏和特异性外泌体肿瘤 microRNA 分析[J]. 分析化学进展, 2024, 14(2): 95-105. DOI: 10.12677/aac.2024.142012

Abstract

Exosomes are emerging important cancer biomarkers. Effective detection of exosome and exosomal contents, especially microRNA (miRNA), is urgent and challenging for cancer diagnosis and treatment. Based on specific recognition and digestion capacity of duplex specific nuclease (DSN), we designed a 2'-O-methyl-modified molecular beacon (omMB) and proposed an amplified detection platform for highly sensitive and specific analysis of exosomal miRNA. Taking A375 cell secreted exosomes as model targets and microRNA-21 (miR-21) as model miRNA molecules, the proposed method can detect miRNA down to 37.9 pM and 2 µg/mL lysed exosomes. Meanwhile, compared with many developed DSN-assisted amplified methods, the new method has high specificity which can distinguish mismatch miRNA. Overall, this work provides an effective analytical strategy for exosome detection in medical analysis, clinic applications and disease diagnosis.

Keywords

Duplex-Specific Nuclease, Exosome, MicroRNA, Molecular Beacons, Signal Amplification

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

外泌体是一类由细胞分泌的细胞外囊泡，大小为 30~150 nm [1]。外泌体丰富且稳定，含有许多母体细胞的重要生物分子，如核酸(DNA、mRNA、miRNA)、蛋白质、糖及其它的大分子和小分子[2]。由于外泌体内容物(如蛋白质和 miRNA)的水平与母体细胞直接相关，因此外泌体被认为是许多重要疾病如癌症的理想生物标志物[3] [4] [5]。在相关文献中已经报道了外泌体 miRNA 作为癌症直接相关的生物标志物。因此，对外泌体 miRNA 的分析成为疾病诊断、治疗监测和药物发现的迫切需要[6] [7] [8]。

目前，关于外泌体 miRNA 检测的工作已经有很多报道[9] [10] [11]。虽然逆转录 PCR (qRT-PCR)、Northern Blot 分析等传统检测方法表现出优异的分析性能，但在实际应用中仍存在成本高、操作复杂、灵敏度低等缺陷[11]。为了克服这些不足，许多等温的、核酸酶辅助的且灵敏度高的外泌体 miRNA 检测方法被相继报道[12]，包括聚合酶辅助的靶标扩增和核酸酶辅助的信号放大。以靶标 miRNA 为引物的聚合酶辅助的靶标扩增，如滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)，可在聚合酶的帮助下形成长单链 DNA [13]。该方法可提高灵敏度，但耗时长，操作复杂。而核酸酶辅助的信号放大方法操作简单，设备便宜，更适合外泌体 miRNA 检测。例如，在之前的工作中，我们提出了一种氧化石墨烯(GO)保护的 DNA 探针用于 miRNA 分析，该探针依赖于 DNase I 和吸附在氧化石墨烯表面的单标记 DNA 荧光探针[14]。DNase I 只能消化游离的 DNA 探针，不能消化 RNA 或氧化石墨烯保护的 DNA 探针。在目标 miRNA 存在的情况下，miRNA 与氧化石墨烯保护的 DNA 探针杂交并从氧化石墨烯表面解吸，从而使 DNA 探针成为 DNase I 的底物并被消化。因此，自由的目标 miRNA 触发另外的混合 - 解吸 - 水解过程，使信号放大。该方法灵敏度高、选择性好、快速简便，可用于外泌体 miRNA 的检测[15] [16]。然而，由于这项工作需要纳米材料作为辅助，这增加了操作的复杂性，从而阻碍了其广泛应用。

相比之下，双特异性核酸酶(DSN)是等温扩增外泌体 miRNA 检测的较优方法。DSN 可识别双链核酸，

且只消化 DNA。因此，它可以用于设计高灵敏的 miRNA 生物传感器。叶邦策教授课题组首次报道了以 TaqMan 探针作为报告信号的 DSN 辅助信号放大检测 miRNA 的方法。在这项工作中，miRNA 与 TaqMan 探针杂交，DSN 只能消化 TaqMan 探针从而释放 miRNA。释放的 miRNA 可以与另一个 TaqMan 探针杂交，并导致其随后被消化。因此 16，这种基于 DSN 的策略可以高灵敏度放大检测外泌体 miRNA [17]。基于其突出的特性，DSN 已被广泛用于 miRNA 生物传感器的设计和外泌体 miRNA 分析。然而，作为线性探针，TaqMan 探针的选择性较弱。例如，第一篇报道的基于 DSN 的信号放大分析方法无法区分单碱基错配的 miRNA [18] [19]。同时，荧光团和猝灭团分别标记在 TaqMan 探针的两端，距离较远会削弱 FRET 效率，增加背景信号，从而影响灵敏度。因此，传统的基于 DSN 的扩增方法需要提高灵敏度和选择性[17]。

在这项工作中，我们利用 2'-O-甲基分子信标(omMB)的特异性序列识别能力和生物稳定性[18] [20] [21] [22]，提出了 DSN 辅助 omMBs 用于高灵敏度和特异性的外泌体 miRNA 分析。omMBs 的发夹结构由于其固有的结构约束提高了特异性识别能力[23]，使该策略具有单碱基错配识别能力。因此，此信号放大方法可以检测低至 37.9 pM 的 miRNA 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 裂解外泌体。总之，该方法为医学分析、临床应用和疾病诊断中的外泌体检测提供了可能性。

2. 材料和方法

2.1. 实验材料

DSN 购自深圳新生物科技有限公司(中国深圳)。RNase 抑制剂购自 Takara 有限公司(中国大连)。2'-O-甲基分子信标及 miRNAs 由生工生物科技有限公司(中国上海)合成，其序列列于表 1。

Table 1. Sequences used in this work

表 1. 本工作中使用的序列

Name	Sequence (5'-3')
2'-O-methyl MB	FAM - <u>CGA GC</u> TCA ACA TCA GTC TGA TAA GCT A <u>GC UCG</u> - Dabcyl
MiR-21	UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A
1-base mismatch	UAG CUU AUC ACA CUG AUG UUG A
3-base mismatch	UAG CUU AUC UUC CUG AUG UUG A

2.2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测 DSN 活性，5 个 Ep 管中先加入 10 μL DSN 缓冲溶液(10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl_2 and 1 mM DTT)，之后在 5 个 Ep 管中分别加入 4 μM omMB (管 1)，4 μM miR-21 (管 2)，4 μM omMB + 0.25 U DSN (管 3)，4 μM miR-21 + 0.25 U DSN (管 4)，4 μM omMB + 4 μM miR-21 + 0.25 U DSN (管 5)。5 个样品在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h 后加入 10 μL 饱和尿素停止反应，再加入 4 μL 6x 上样缓冲液后，样品可用于 PAGE 分析。

实验制备了 15%变性的 PAGE，其中含有 4 ml 30% Acryl/Bis 溶液(29:1)，1.4 ml H_2O ，3.3 g 尿素和 1.6 ml 5 \times TBE。尿素溶解后，加入 20 μL 10%过硫酸铵(APS)和 20 μL 四甲基乙二胺(TEMED)。充分混合后，在垂直平板电泳上加热 30 分钟后制成凝胶。之后，用 Bio-Rad 照射凝胶。

2.3. 可行性分析

使用 RF-5301-PC 荧光分光光度计进行荧光测量(日本岛津)。激发光谱为 485 nm，扫描波长为 500~650 nm。为进行可行性分析，4 个管中先加入 100 μL DSN 缓冲溶液，另外再分别加入 100 nM omMB (管 1)，

100 nM omMB + 10 nM miR-21 (管 2), 100 nM omMB + 0.25 U DSN (管 3), 100 nM omMB + 10 nM miR-21 + 0.25 U DSN (管 4)。37℃ 孵育 1 h 后使用荧光分光光度计进行分析。

2.4. 灵敏度测试

制备 DSN 缓冲液 2.1 mL, 其中含 omMB 和 DSN 的浓度分别为 100 nM 和 5.25 U。将缓冲液平均加入到 21 个 Ep 管中, 21 个样本分为 3 组(3 个平行)。在 1~7 组样品中分别加入不同浓度的 miR-21。37℃ 孵育 1 h 后, 进行荧光测定。

2.5. 细胞培养和外泌体分离

A375 细胞系(人黑色素瘤)在 Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA)中培养, 添加 10% 胎牛血清和 100 U/mL penicillin-streptomycin, 在 37℃ 和 5% CO₂ 环境下进行培养。为了排除外泌体的干扰, 将它们培养在含有外泌体缺失的 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基中, 胎牛血清(FBS)在 100,000 g 下超速离心 18 h 以去除 FBS 中的外泌体。然后将细胞培养上清液分别以 300 g 离心 10 分钟、2000 g 离心 20 分钟、11,000 g 离心 45 分钟, 分别去除完整细胞、细胞碎片和蛋白质。随后, 上清液以 110,000 g 离心 70 min 获得沉积物外泌体。最后, 沉淀物外泌体在 PBS 中重悬, 保存于-80℃。

2.6. 外泌体 miRNA 检测

为了检测外泌体 miRNA, 将外泌体 95℃ 孵育 10 min, 然后 16,500 g 离心 45 min, 去除沉淀, 收集上清。制备 3 组样品(每组 8 管反应缓冲液)后, 在 1 到 8 组样品中分别加入不同浓度的外泌体。37℃ 孵育 1 h 后, 通过荧光测量分析样品。

3. 结果与讨论

3.1. 检测原理

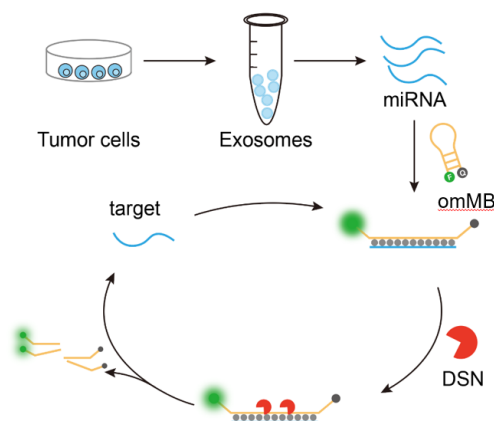


Figure 1. Working principle of DSN-assisted signal amplification for detection of exosome miRNA

图 1. DSN 辅助信号放大检测外泌体 miRNA 的工作原理

DSN 可水解双链 DNA 或 DNA/RNA 杂交双链中的 DNA, 但对 RNA 无活性[23]。同时, 2'-O-甲基修饰的双链可以抵抗核酸酶的酶切[18] [24]。本文合成了一个 2'-O-甲基修饰的分子信标(omMB): 茎部由 2'-O-甲基核苷酸组成, 环部由正常脱氧核苷酸组成。如图 1 所示, 在不存在目标 miRNA 的情况下, 茎-环结构分子信标可以抵抗 DSN 消化并保持完整。在目标 miRNA 存在的情况下, 形成分子信标/miRNA

杂交双链，成为 DSN 的合适底物。DSN 消化了 MBs 的环部分，并导致荧光恢复。与此同时，被释放的 miRNA 可与另一个 omMB 杂交，从而引发下一轮切割。因此，一个 miRNA 分子理论上可以通过循环过程触发无数 omMB 的水解，从而放大荧光信号。同时，由于 omMBs 对目标 miRNA 具有特异性识别能力，因此该方法可以区分单碱基错配序列。总的来说，所提出的策略可以有效地分析外泌体 miRNA，具有高灵敏度和选择性。

3.2. 可行性分析

在这项工作中，我们选择 microRNA-21 (miR-21) 作为模型靶标，这是一种重要的癌症生物标志物，据报道在许多肿瘤中高度过表达[25] [26]。随后，根据 miR-21 的序列设计相应的 MB。首先通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)对该方法的可行性进行了评估。如图 2(a)所示，通道 1~4 分别代表 omMB、miR-21、omMB + DSN 和 miR-21 + DSN。在通道 3 中，与 DSN 孵育后，omMB 仍然完好无损，这表明由于其茎由 DNA 双链组成，omMB 可以抵抗 DSN 的消化，这可能是由于 2'-O-甲基核苷酸的存在。通道 4 为 miR-21 + DSN，由于 DSN 不能消化 RNA，miR-21 也如预期那样保持完整。然而，如通道 5 所示，当 omMB 与 miRNA 杂交时，miR-21 保持完整，MB 消失，说明 MB 在与 miR-21 杂交时被 DSN 消化，说明该方案的可行性。

在此基础上，我们通过荧光实验对比了有无 DSN 时的信号放大性能。如图 2(b)所示，在没有 DSN 的情况下，100 nM MB 在 100 μ L 反应缓冲液中，溶液中的荧光强度较弱(黑线)。在反应缓冲液中加入 10 nM 的 miR-21 后，荧光信号增加 1.4 倍，表明 miR-21 与 MB 杂交成功。在 DSN 存在的情况下，MB 的背景信号略有增加，这可能是由于 omMB 消化较弱造成的。然而，在加入 miR-21 后，由于 DSN 对 MB 的循环水解，观察到明显的 2.1 倍信号增强。这些结果表明，一个 miR-21 分子可以通过循环过程触发许多 MB 的水解，导致荧光信号放大。

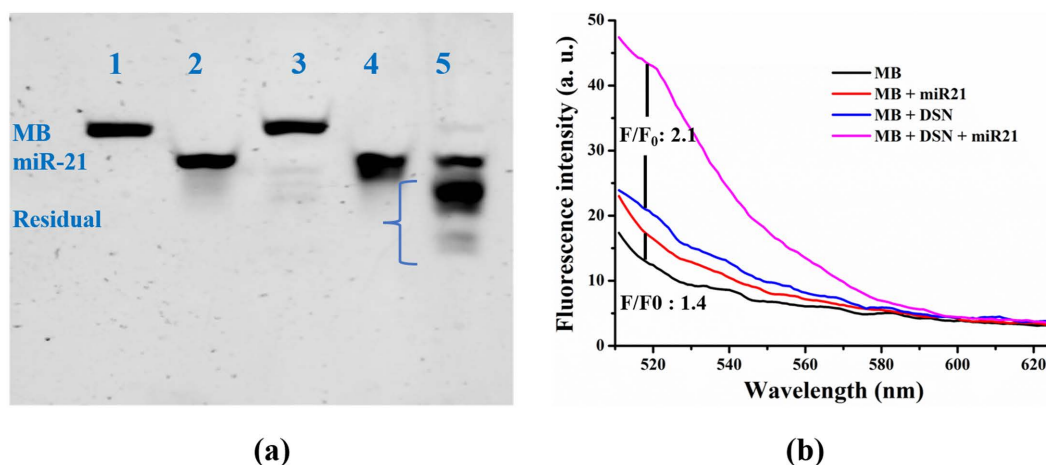


Figure 2. (a) PAGE analysis of DSN activity on omMB/miR-21 double chains channel 1: omMB; channel 2: miR-21; channel 3: omMB + DSN; channel 4: miR-21 + DSN; channel 5: omMB + miR-21 + DSN; (b) DSN-assisted omMB to detect the signal amplification performance of miR-21

图 2. (a) omMB/miR-21 双链上 DSN 活性的 PAGE 分析通道 1: omMB; 通道 2: miR-21; 通道 3: omMB + DSN; 通道 4: miR-21 + DSN; 通道 5: omMB + miR-21 + DSN; (b) DSN 辅助 omMB 检测 miR-21 的信号放大性能

3.3. 温度优化

本工作的实验参数根据文献报道选择，如 0.25 U DSN 在 100 μ L 1x DSN 反应缓冲液中孵育 1 h。但是，文献报道的许多反应温度在 50~60 $^{\circ}$ C，在本实验中可能使 omMB 不稳定。这主要是由于 omMB 的发

夹茎部会发生随机的构象变换, 从而导致高背景信号, 影响检测性能。为了达到最佳性能, 对反应温度进行了评估。如图 3 所示, 我们在含有 100 nM omMB 和 0.25 U DSN 的混合物中添加 100 nM miR-21。之后分别在 37°C、45°C 和 55°C 下对其信噪比(SBR)进行比较。结果表明, 该体系在 37°C 时的信噪比最好, 这可能在 omMB 的结构稳定性和 DSN 的活性之间保持了良好的平衡。同时, 我们也观察到部分文献也使用 37°C 作为反应温度[27] [28] [29]。

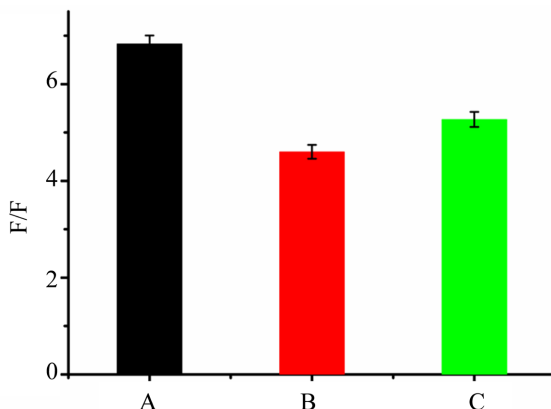


Figure 3. Optimization of reaction temperature A: 37°C; B: 45°C; C: 55°C
图 3. 反应温度的优化 A: 37°C; B: 45°C; C: 55°C

3.4. 检测灵敏度和选择性

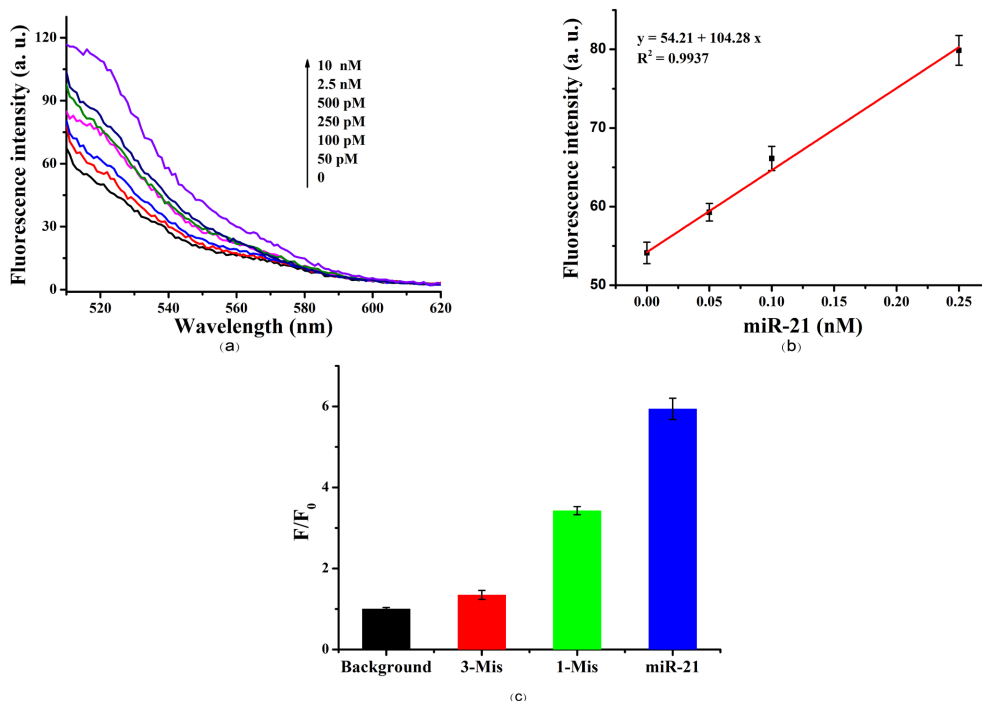


Figure 4. (a) Fluorescence spectra of different concentrations of miR-21; (b) Fluorescence intensity of different concentrations of miR-21; (c) Selective analysis of omMB-assisted signal amplification for detection of miR-21
 F/F₀: signal to background ratio

图 4. (a) 不同浓度 miR-21 的荧光光谱; (b) 不同浓度 miR-21 的荧光强度; (c) omMB 辅助信号放大对 miR-21 检测的选择性分析 F/F₀: 信号与背景比

在验证了该方法的可行性后,我们评估了在最佳实验条件下的检测灵敏度。图 4(a)为加入不同浓度 miRNA 后记录的荧光信号。结果显示,随着 miR-21 浓度的增加,荧光信号逐渐增强。随着 miR-21 浓度的增加,从 0 到 250 pM (见图 4(b)),校准图呈线性,并通过公式拟合得很好: $y = 54.21 + 104.28x$ ($n = 3, R^2 = 0.9937$),其中 y 为荧光信号, x 为 miR-21 的浓度(nM)。计算得到的检出限为 37.9 pM,与包括 DSN 辅助信号放大在内的多种核酸酶辅助信号放大方法相比具有一定的竞争力,具体比较如表 2 所示[30]-[37]。

Table 2. Sensitivity comparison of miRNA analysis methods based on nuclease
表 2. 基于核酸酶的 miRNA 分析方法的灵敏度比较

Nuclease	Detection limit	Ref
Strand displacement (No nuclease)	462 pM (for miR-21)	[30]
Molecular Beacon (No Nuclease)	About 100 pM	[31]
DSN	426 pM	[32]
DSN	50 pM	[33]
DNase I	9 pM	[14]
DNase I	2.3 pM	[34]
Exonuclease III	21.4 pM	[35]
Exonuclease III	6 pM	[36]
T7 Exonuclease	15 pM	[37]
DSN	37.9 pM	This work

接下来,我们还测试了 omMBs 的选择性。如图 4(c)所示,在 MB 体系中,miR-21 的信号是 1-mis miRNA 的 1.7 倍,是 3-mis miRNA 的 4.4 倍,显示出高特异性,可以区分靶标 miRNA 与单碱基错配序列和三碱基错配序列。miRNA 家族具有很高的同源性,区分密切相关的 miRNA 序列是一项具有挑战性的任务。由于其特异性水解,许多 DSN 辅助信号放大工作使用线性探针,如用于 miRNA 检测的 TaqMan 探针[23]。然而, TaqMan 探针作为一种线性探针,对识别靶序列的选择性较弱[38],如表 3 所示。我们的数据表明,通过使用 omMB, DSN 辅助信号放大系统可以对 miRNA 检测具有高选择性,这是相关性较强的 miRNA 序列分析的重要特征。

Table 3. Selectivity of partial DSN auxiliary signal amplification technologies
表 3. 部分的 DSN 辅助信号放大技术的选择性

Probes	Single-base mismatch Specific	Ref
Linear probe	No data	[23]
Linear probe	No data	[39]
Linear probe	No data	[40]
Linear probe	No data	[41]
Linear probe	No data	[42]
Linear probe	No data	[43]
Linear probe	No data	[44]
MB	Yes	[45]
G-triplex based MB	Yes	[46]
omMB	Yes	This work

3.5. 外泌体 miRNA 检测与癌症诊断

在证明 DSN 辅助的 2'-O-甲基扩增方法具有高灵敏度和选择性后,我们直接检测了 A375 外泌体中的 miRNA, 该外泌体已被证明具有 miR-21 的高表达[7]。分离并裂解 A375 外泌体后, 检测加入不同浓度 A375 外泌体后的荧光强度。如图 5 所示, 外泌体浓度的增加与荧光强度的增加是一致的。荧光强度在 2.5~400 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈线性增长, 检出限低至 2 $\mu\text{g/mL}$ 。如表 4 所示, 与已有检测线报道的扩增方法相比略低[30] [31] [32], 表明我们的策略对外泌体 miRNA 分析较为灵敏, 这为之后区分正常及肿瘤患者提供了可能性。

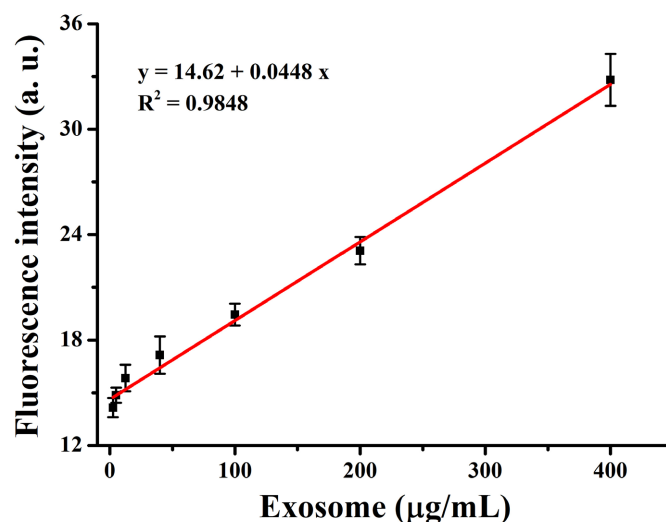


Figure 5. Working curve of fluorescence intensity and exosome concentration
图 5. 荧光强度与外泌体浓度的工作曲线

Table 4. Comparison of exosome detection line with other platforms
表 4. 与其它平台外泌体检测线的对比

Ref	Detection limit
[30]	0.116 $\mu\text{g/mL}$
[31]	无具体的检测线
[32]	无具体的检测线
本文方法	2 $\mu\text{g/mL}$

4. 结果与讨论

我们开发了一种 DSN 辅助的放大分析平台, 使用 2'-O-甲基分子信标作为报告探针, 实现了高灵敏度和特异性的外泌体 miRNA 检测。2'-O-甲基修饰的分子信标具有发夹结构, 能抵抗 DSN 的降解。该方法对 miR-21 的分析检测限(LOD)为 37.9 pM, 并且可以区分错配 miRNA。然后, 利用我们提出的方法检测裂解的外泌体, LOD 为 2 $\mu\text{g/mL}$ 。总之, 所提出的策略简单、灵敏、选择性强。该平台可直接应用于临床, 为疾病诊断和监测提供一种可行的方法。

参考文献

- [1] Kalluri, R. and LeBleu, V.S. (2020) The Biology, Function, and Biomedical Applications of Exosomes. *Science*, **367**,

- eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- [2] Selmaj, I., Cichalewska, M., Namiecinska, M., Galazka, G., Horzelski, W., Selmaj, K.W. and Mycko, M.P. (2017) Global Exosome Transcriptome Profiling Reveals Biomarkers for Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*, **81**, 703-717. <https://doi.org/10.1002/ana.24931>
- [3] Barile, L. and Vassalli, G. (2017) Exosomes: Therapy Delivery Tools and Biomarkers of Diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, **174**, 63-78. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.020>
- [4] Cheng, N., Du, D., Wang, X., Liu, D., Xu, W., Luo, Y. and Lin, Y. (2019) Recent Advances in Biosensors for Detecting Cancer-Derived Exosomes. *Trends in Biotechnology*, **37**, 1236-1254. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.04.008>
- [5] Stobiecka, M., Ratajczak, K. and Jakiela, S. (2019) Toward Early Cancer Detection: Focus on Biosensing Systems and Biosensors for an Anti-Apoptotic Protein Survivin and Survivin mRNA. *Biosensors and Bioelectronics*, **137**, 58-71. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.060>
- [6] Drula, R., Ott, L.F., Berindan-Neagoe, I., Pantel, K. and Calin, G.A. (2020) MicroRNAs from Liquid Biopsy Derived Extracellular Vesicles: Recent Advances in Detection and Characterization Methods. *Cancers*, **12**, Article 2009. <https://doi.org/10.3390/cancers12082009>
- [7] Cui, L., Peng, R.X., Zeng, C.F., Zhang, J.L., Lu, Y.Z., Zhu, L., Huang, M.J., Tian, Q.H., Song, Y.L. and Yang, C.Y. (2022) A General Strategy for Detection of Tumor-Derived Extracellular Vesicle MicroRNAs Using Aptamer-Mediated Vesicle Fusion. *Nano Today*, **46**, Article 101599. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2022.101599>
- [8] Niu, Q., Gao, J., Zhao, K., Chen, X., Lin, X., Huang, C., An, Y., Xiao, X., Wu, Q., Cui, L., Zhang, P., Wu, L. and Yang, C. (2022) Fluid Nanoporous Microinterface Enables Multiscale-Enhanced Affinity Interaction for Tumor-Derived Extracellular Vesicle Detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **119**, e2213236119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2213236119>
- [9] Jet, T., Gines, G., Rondelez, Y. and Taly, V. (2021) Advances in Multiplexed Techniques for the Detection and Quantification of MicroRNAs. *Chemical Society Reviews*, **50**, 4141-4161. <https://doi.org/10.1039/D0CS00609B>
- [10] Wu, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Luo, S., Yan, X., Qiu, Y., Zheng, L. and Li, L. (2021) Research Advances for Exosomal miRNAs Detection in Biosensing: From the Massive Study to the Individual Study. *Biosensors and Bioelectronics*, **177**, Article 112962. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112962>
- [11] Ouyang, T., Liu, Z., Han, Z. and Ge, Q. (2019) MicroRNA Detection Specificity: Recent Advances and Future Perspective. *Analytical Chemistry*, **91**, 3179-3186. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05909>
- [12] Cheng, Y., Dong, L., Zhang, J., Zhao, Y. and Li, Z. (2018) Recent Advances in MicroRNA Detection. *Analyst*, **143**, 1758-1774. <https://doi.org/10.1039/C7AN02001E>
- [13] Zhou, S., Sun, H., Dong, J., Lu, P., Deng, L., Liu, Y., Yang, M., Huo, D. and Hou, C. (2023) Highly Sensitive and Facile MicroRNA Detection Based on Target Triggered Exponential Rolling-Circle Amplification Coupling with CRISPR/Cas12a. *Analytica Chimica Acta*, **1265**, Article 341278. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341278>
- [14] Cui, L., Lin, X., Lin, N., Song, Y., Zhu, Z., Chen, X. and Yang, C.J. (2012) Graphene Oxide-Protected DNA Probes for Multiplex MicroRNA Analysis in Complex Biological Samples Based on a Cyclic Enzymatic Amplification Method. *Chemical Communications*, **48**, 194-196. <https://doi.org/10.1039/C1CC15412E>
- [15] Jin, D., Yang, F., Zhang, Y., Liu, L., Zhou, Y., Wang, F. and Zhang, G.J. (2018) ExoAPP: Exosome-Oriented, Aptamer Nanoprobe-Enabled Surface Proteins Profiling and Detection. *Analytical Chemistry*, **90**, 14402-14411. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03959>
- [16] Wang, H., Chen, H., Huang, Z., Li, T., Deng, A. and Kong, J. (2018) DNase I Enzyme-Aided Fluorescence Signal Amplification Based on Graphene Oxide-DNA Aptamer Interactions for Colorectal Cancer Exosome Detection. *Talanta*, **184**, 219-226. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.083>
- [17] Wu, Y., Cui, S., Li, Q., Zhang, R., Song, Z., Gao, Y., Chen, W. and Xing, D. (2020) Recent Advances in Duplex-Specific Nuclease-Based Signal Amplification Strategies for MicroRNA Detection. *Biosensors and Bioelectronics*, **165**, Article 112449. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112449>
- [18] Lin, X.Y., Zhang, C., Huang, Y.S., Zhu, Z., Chen, X. and Yang, C.J. (2013) Backbone-Modified Molecular Beacons for Highly Sensitive and Selective Detection of MicroRNAs Based on Duplex Specific Nuclease Signal Amplification. *Chemical Communications*, **49**, 7243-7245. <https://doi.org/10.1039/c3cc43224f>
- [19] Li, Y., Zhang, J., Zhao, J., Zhao, L., Cheng, Y. and Li, Z. (2016) A Simple Molecular Beacon with Duplex-Specific Nuclease Amplification for Detection of MicroRNA. *Analyst*, **141**, 1071-1076. <https://doi.org/10.1039/C5AN02312B>
- [20] Gao, J.F., Li, Y., Li, W.Q., Zeng, C.F., Xi, F.N., Huang, J.H. and Cui, L. (2020) 2'-O-Methyl Molecular Beacon: A Promising Molecular Tool That Permits Elimination of Sticky-End Pairing and Improvement of Detection Sensitivity. *RSC Advances*, **10**, 41618-41624. <https://doi.org/10.1039/D0RA07341E>
- [21] Zheng, H.Y., Lin, Q.Y., Zhu, J.C., Rao, Y.M., Cui, L., Bao, Y.Y. and Ji, T.H. (2021) DNase I-Assisted 2'-O-Methyl

- Molecular Beacon for Amplified Detection of Tumor Exosomal MicroRNA-21. *Talanta*, **235**, Article 122727. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122727>
- [22] Sun, X., Ying, N., Ju, C., Li, Z., Xu, N., Qu, G., Liu, W. and Wan, J. (2018) Modified Beacon Probe Assisted Dual Signal Amplification for Visual Detection of MicroRNA. *Analytical Biochemistry*, **550**, 68-71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.04.010>
- [23] Yin, B.C., Liu, Y.Q. and Ye, B.C. (2012) One-Step, Multiplexed Fluorescence Detection of MicroRNAs Based on Duplex-Specific Nuclease Signal Amplification. *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 5064-5067. <https://doi.org/10.1021/ja300721s>
- [24] Tsourkas, A., Behlke, M.A. and Bao, G. (2002) Hybridization of 2'-O-Methyl and 2'-Deoxy Molecular Beacons to RNA and DNA Targets. *Nucleic Acids Research*, **30**, 5168-5174. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf635>
- [25] Wang, Y., Gao, X., Wei, F., Zhang, X., Yu, J., Zhao, H., Sun, Q., Yan, F., Yan, C., Li, H. and Ren, X. (2014) Diagnostic and Prognostic Value of Circulating miR-21 for Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gene*, **533**, 389-397. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.038>
- [26] Calin, G.A. and Croce, C.M. (2006) MicroRNA Signatures in Human Cancers. *Nature Reviews. Cancer*, **6**, 857-866. <https://doi.org/10.1038/nrc1997>
- [27] Wang, Q., Yin, B.C. and Ye, B.C. (2016) A Novel Polydopamine-Based Chemiluminescence Resonance Energy Transfer Method for MicroRNA Detection Coupling Duplex-Specific Nuclease-Aided Target Recycling Strategy. *Biosensors and Bioelectronics*, **80**, 366-372. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.005>
- [28] Yang, C., Dou, B., Shi, K., Chai, Y., Xiang, Y. and Yuan, R. (2014) Multiplexed and Amplified Electronic Sensor for the Detection of MicroRNAs from Cancer Cells. *Analytical Chemistry*, **86**, 11913-11918. <https://doi.org/10.1021/ac503860d>
- [29] Yuan, Y.H., Chi, B.Z., Wen, S.H., Liang, R.P., Li, Z.M. and Qiu, J.D. (2018) Ratiometric Electrochemical Assay for Sensitive Detecting MicroRNA Based on Dual-Amplification Mechanism of Duplex-Specific Nuclease and Hybridization Chain Reaction. *Biosensors and Bioelectronics*, **102**, 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.030>
- [30] Wang, H., He, D., Wan, K., Sheng, X., Cheng, H., Huang, J., Zhou, X., He, X. and Wang, K. (2020) *In situ* Multiplex Detection of Serum Exosomal MicroRNAs Using an All-in-One Biosensor for Breast Cancer Diagnosis. *Analyst*, **145**, 3289-3296. <https://doi.org/10.1039/D0AN00393J>
- [31] Lee, J.H., Kim, J.A., Kwon, M.H., Kang, J.Y. and Rhee, W.J. (2015) *In situ* Single Step Detection of Exosome MicroRNA Using Molecular Beacon. *Biomaterials*, **54**, 116-125. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.03.014>
- [32] Gao, Z., Yuan, H., Mao, Y., Ding, L., Effah, C.Y., He, S., He, L., Liu, L.E., Yu, S., Wang, Y., Wang, J., Tian, Y., Yu, F., Guo, H., Miao, L., Qu, L. and Wu, Y. (2021) *In situ* Detection of Plasma Exosomal MicroRNA for Lung Cancer Diagnosis Using Duplex-Specific Nuclease and MoS₂ Nanosheets. *Analyst*, **146**, 1924-1931. <https://doi.org/10.1039/D0AN02193H>
- [33] Liu, H., Fan, J.L., Liu, W.P., Tong, C.Y., Xie, Z.H., Deng, R.L. and Long, X.Y. (2018) A Dual Signal Amplification Method for miR-204 Assay by Combining Chimeric Molecular Beacon with Double-Stranded Nuclease. *Analytical Methods*, **10**, 5834-5841. <https://doi.org/10.1039/C8AY02147C>
- [34] Xie, Y., Lin, X.Y., Huang, Y.S., Pan, R.J., Zhu, Z., Zhou, L.J. and Yang, C.Y.J. (2015) Highly Sensitive and Selective Detection of miRNA: DNase I-Assisted Target Recycling Using DNA Probes Protected by Polydopamine Nanospheres. *Chemical Communications*, **51**, 2156-2158. <https://doi.org/10.1039/C4CC08912J>
- [35] Tang, Y.F., Liu, M.X., Xu, L.C., Tian, J.N., Yang, X.L., Zhao, Y.C. and Zhao, S.L. (2018) A Simple and Rapid Dual-Cycle Amplification Strategy for MicroRNA Based on Graphene Oxide and Exonuclease III-Assisted Fluorescence Recovery. *Analytical Methods*, **10**, 3777-3782. <https://doi.org/10.1039/C8AY01106K>
- [36] Liu, M.X., Liang, S.P., Tang, Y.F., Tian, J.N., Zhao, Y.C. and Zhao, S.L. (2018) Rapid and Label-Free Fluorescence Bioassay for MicroRNA Based on Exonuclease III-Assisted Cycle Amplification. *RSC Advances*, **8**, 15967-15972. <https://doi.org/10.1039/C8RA01605D>
- [37] Wei, K.J., Zhao, J.J., Qin, Y.F., Li, S.T., Huang, Y. and Zhao, S.L. (2018) A Novel Multiplex Signal Amplification Strategy Based on Microchip Electrophoresis Platform for the Improved Separation and Detection of MicroRNAs. *Talanta*, **189**, 437-441. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.037>
- [38] Bonnet, G., Tyagi, S., Libchaber, A. and Kramer, F.R. (1999) Thermodynamic Basis of the Enhanced Specificity of Structured DNA Probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 6171-6176. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6171>
- [39] Lu, Y.Y., Wang, L. and Chen, H.Q. (2019) Turn-on Detection of MicroRNA155 Based on Simple UCNPs-DNA-AuNPs Luminescence Energy Transfer Probe and Duplex-Specific Nuclease Signal Amplification. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, **223**, Article 117345. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117345>
- [40] Li, Y.T., Tang, D.H., Zhu, L., Cai, J.T., Chu, C.N., Wang, J., Xia, M., Cao, Z.Z. and Zhu, H. (2019) Label-Free Detec-

- tion of miRNA Cancer Markers Based on Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Induced Copper Nanoclusters. *Analytical Biochemistry*, **585**, Article 113346. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113346>
- [41] Liu, Q., Kang, P.J., Chen, Z.P., Shi, C.X., Chen, Y. and Yu, R.Q. (2019) Highly Specific and Sensitive Detection of MicroRNAs by Tandem Signal Amplification Based on Duplex-Specific Nuclease and Strand Displacement. *Chemical Communications*, **55**, 14210-14213. <https://doi.org/10.1039/C9CC06790F>
- [42] Degliangeli, F., Kshirsagar, P., Brunetti, V., Pompa, P.P. and Fiammengio, R. (2014) Absolute and Direct MicroRNA Quantification Using DNA-Gold Nanoparticle Probes. *Journal of the American Chemical Society*, **136**, 2264-2267. <https://doi.org/10.1021/ja412152x>
- [43] Tan, L., Xu, L., Liu, J.W., Tang, L.J., Tang, H. and Yu, R.Q. (2019) Duplex-Specific Nuclease-Mediated Target Recycling Amplification for Fluorescence Detection of MicroRNA. *Analytical Methods*, **11**, 200-204. <https://doi.org/10.1039/C8AY02265H>
- [44] Peng, W.P., Zhao, Q., Piao, J.F., Zhao, M., Huang, Y.W., Zhang, B., Gao, W.C., Zhou, D.M., Shu, G.M., Gong, X.Q. and Chang, J. (2018) Ultra-Sensitive Detection of MicroRNA-21 Based on Duplex-Specific Nuclease-Assisted Target Recycling and Horseradish Peroxidase Cascading Signal Amplification. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **263**, 289-297. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.02.143>
- [45] Xiao, M.S., Chandrasekaran, A.R., Ji, W., Li, F., Man, T.T., Zhu, C.F., Shen, X.Z., Pei, H., Li, Q. and Li, L. (2018) Affinity-Modulated Molecular Beacons on MoS₂ Nanosheets for MicroRNA Detection. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **10**, 35794-35800. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14035>
- [46] Wu, Z.F., Zhou, H., He, J., Li, M., Ma, X.M., Xue, J., Li, X. and Fan, X.T. (2019) G-Triplex Based Molecular Beacon with Duplex-Specific Nuclease Amplification for the Specific Detection of MicroRNA. *Analyst*, **144**, 5201-5206. <https://doi.org/10.1039/C9AN01075K>