

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.07.042

基于核酸适配体的生物分析新方法研究进展

季兆洁 王 雷 陈云娜 张文静 王飘飘 陈卫东[△]

(安徽中医药大学药学院 安徽 合肥 230012)

摘要:核酸适配体是从随机文库中采用 SELEX 技术筛选所得的单链短链寡核苷酸片段(通常为 15-80 个 ssDNA 或 ssRNA)。其能够折叠形成独特稳定的三维结构,通过静电相互作用,氢键,范德华力,碱堆叠或多种作用力组合特异性地与多种靶标结合。适配体因具有构象变化能力而被用作生物分析中的理想识别配体。目前,基于适配体的生物分析新方法得到广泛研究,并用于蛋白多肽类药物分析、疾病标志物诊断、外泌体检测、循环肿瘤细胞检测和病毒检测等方面。本文综述了核酸适配体用于生物分析方法开发的最新进展,比较和讨论不同分析方法,并对基于适配体的生物分析新方法提出了设想和展望,为开发新的生物分析方法和检测技术提供了思路和借鉴。

关键词:核酸适配体;生物分析;纳米金;G-四链体

中图分类号:Q-33;Q527;Q591.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)07-1387-05

Advances in Bioanalysis Methods Based on Aptamers*

Ji Zhao-jie, WANG Lei, CHEN Yun-na, ZHANG Wen-jing, WANG Piao-piao, CHEN Wei-dong[△]

(School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, 230012, China)

ABSTRACT: Aptamers, which are screened from a random library via SELEX, are short (generally 15-80 nucleotides) single-stranded oligonucleotide molecules (ssDNA or ssRNA) with the ability to fold in stable and unique three-dimensional structures that allow them to interact with target molecules through electrostatic interactions, hydrogen bonding, Van der Waals forces, base stacking or a combination of these. Due to the ability of conformational changes, aptamers are used as ideal recognition ligands for bioanalysis, disease diagnosis and cancer diagnosis. New bioanalysis methods based on aptamers has been extensively designed and developed for protein peptide analysis, disease marker diagnosis, exosomes detection, circulating tumor cell and virus detection. This review summarizes the latest achievements of aptamers for bioanalytical methods and highlights the different analytical methods. This article discusses the major different analytical methods and proposes visions for building new methods of bioanalysis based on aptamers. It also provides ideas and references for the development of new biological analysis methods and detection technologies.

Key words: Aptamers, Bioanalysis, Gold nanoparticles, G-quadruplex

Chinese Library Classification(CLC): Q-33; Q527; Q591.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)07-1387-05

前言

核酸适配体(Aptamers, Apt)是一种由体外指数级富集系统进化(Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment, SELEX)技术筛选所得的单链寡核苷酸片段(DNA 或 RNA)可以折叠成独特的二级或三级结构,通过氢键,盐桥,范德华力,疏水和静电等相互作用特异性与蛋白质,小分子,离子,有毒分子甚至全细胞等靶标结合^[1-5,12]。与抗体与靶目标的选择 151 性和亲和力相似,有时被称为“化学抗体”。然而适配体因分子量比较小,可化学合成宏量制备,在一定的温度、溶剂和 pH 范围内更稳定^[5],而被应用于各种分析方法的开发。

由于适配体特异性非常精确,可以区分结构上仅有单一基团变化的两个分子,如茶碱和咖啡因在结构上仅有一个甲基的区别,但是茶碱适配体不能结合咖啡因^[46]。基于上述特性,适配

体被认为是生物分析,疾病诊断和癌症诊疗等方面的理想识别配体;在蛋白多肽分析、分子标记、疾病诊断、外泌体检测、循环肿瘤细胞检测和病毒检测等方面,是代替抗体用于分析的最佳替代者^[7]。适配体属于柔性分子,在不同的条件下,其亲和力和特异性是可以调节的。因此,基于适配体构象变化的能力,发夹、假基因等多种结构已被设计开发用于多种生物分析和生物传感^[8-10]。

纳米技术的快速发展也为生物分析增添了新的研究方向,将适配体修饰在各种纳米材料上可以显著提高灵敏度和选择性^[11]。纳米材料独特的物理化学性质为化学和生物检测提供了理想和无与伦比特性,如显著的表面积与体积比,信号强度高,表面可修饰,尺寸和形状所致的光学性质和催化活性等对信号产生和信号放大具有显著意义^[12-14]。通过化学方法进行功能化修饰,可实现极低浓度靶标分析物的检测以及多参数多个

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81773988);安徽中医药大学 2018 年科学研究基金项目(2018zrzd04)

作者简介:季兆洁(1989-),硕士,助教,主要研究方向:药物制剂,体内药物分析,电话:13856966893, E-mail:13856966893@163.com

△ 通讯作者:陈卫东(1965-),博士,教授,主要研究方向:药物代谢动力学,纳米药物动力学, E-mail:anzhongdong@126.com

(收稿日期:2018-06-24 接受日期:2018-07-19)

靶标实时定量。

1 基于“核酸适配体-纳米金”的生物分析方法

与其他纳米材料相比,AuNP 具有适于分析的特殊优点^[15-19]: (1) 化学合成制备 AuNP 十分简便;(2) 巯基分子可通过形成 Au-S 键对 AuNP 表面改性,从而提高稳定性,并增加其多种功能性;(3) 可精细调整 AuNP 的大小、形状、聚集状态和表面性质,从而使其在可见区域中产生的吸收带偏移,引起颜色变化;(4) 具有优异的生物相容性。

基于 AuNP 的比色分析法由 Mirkin 等^[20]率先提出,通常采用酶级联扩增策略以检测实际样品中低水平的生物分子。目前,生物测定中使用的大多数酶是大分子生物催化剂,其催化活性由其三维结构决定,因此必须保证维持酶的活性。为了突破这个局限,人工酶因具有具有稳定活性而得到广泛研究,其不仅使检测简单且成本低廉,而且具有较高消光系数,因此能够提高检测灵敏度^[21]。如 AuNP 具有超高的消光系数,比有机染料高出 1000 倍以上,这使得 AuNP 比色测定的检测限低至 nM 水平,远远低于使用有机分子作为底物的测定水平^[22]。采用 AuNP 比色法测定核酸、蛋白质、糖类、离子、有机分子、病原体,甚至细胞等各种物质均得到广泛报道。基于“核酸适配体-纳米金”的生物分析方法主要分为两类:(1) 通过形成无信号放大的交联组件,AuNP 直接用于测定;(2) AuNP 替代常规小有机分子作为酶催化反应中的底物,以提高灵敏度。

AuNP 直接用于测定主要依据靶标分析物以直接或间接的方式触发 AuNP 聚集,导致可见区域的波长红移。通过 AuNP 由红到蓝(或紫色)的颜色变化可证实 LSPR 位移,这为比色法提供了检测平台,可以通过紫外可见光谱或甚至肉眼进行测定,如 AuNP 直接用于测定 DNA。若待测 DNA 分子会引起 AuNP 上两条互补 DNA 链的杂交(如图 1 所示),形成交联的 AuNP 聚集体,AuNP 颜色由红变为蓝(或紫色),也可以升高孵育温度至杂交 DNA 解链温度以上,实现 AuNP 聚集体的解离^[23]。

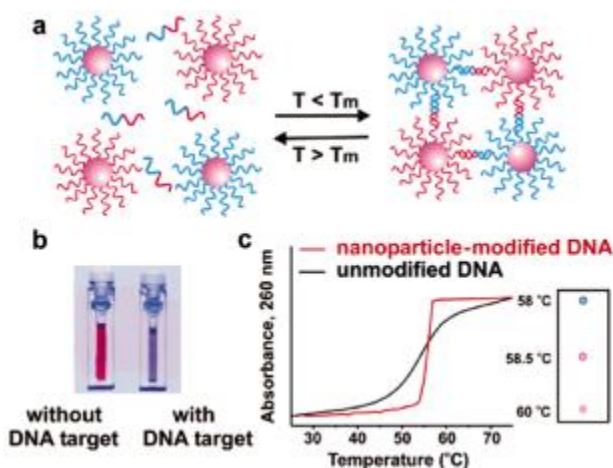


图 1 目标 DNA 引起纳米金聚集

Fig.1 Complementary target DNA can induce the aggregation of AuNP

AuNP 表面配体的紊乱也可用于构建比色法,如单链 DNA (Single-stranded DNA, ssDNA) 可以通过 DNA-碱金属相互作用而结合到柠檬酸盐包被的 AuNP 表面,以防止 AuNP 聚集^[24]。由于杂交 DNA 的碱基与 Au 之间的相互作用非常弱,与柠檬

酸盐-AuNP 的亲合力相比可忽略不计。因此,向柠檬酸盐包被的 AuNP 和双链 DNA 的混合物中加入适量浓度的盐(如 300 mM NaCl)可引起 AuNP 的聚集,而与 ssDNA 混合的 AuNP 则仍然是单分散的,这种非交联聚合策略也特别适合用于检测其他生物分子^[25]。如 ATP 适配体与其互补寡核苷酸杂交以形成双链 DNA,其不能稳定高浓度盐溶液中未修饰的 AuNP。而在 ATP 的存在下,ATP 与其适配体相互作用以释放无规卷曲的 ssDNA,其可稳定 AuNP 并防止盐诱导的聚集^[26]。

然而,由 AuNP 聚集引起颜色变化而直接用于 DNA 检测的比色测定法灵敏度较低,通常在 nM 水平。这不能满足大多数临床样品中的 DNA 生物标志物(浓度通常在从 aM 到 pM 的范围内)的分析检测。为了提高检测灵敏度,可将基于酶的扩增策略用于 AuNP 比色法,检测限可低至 50 pM,远低于直接使用 AuNP 测定的检测限,且不需要昂贵的仪器和试剂,操作程序简单方便^[27]。除此以外,连接酶链反应(Ligase chain reaction, LCR)也可以显著提高检测灵敏度^[28,29]。在扩增链存在时,靶 DNA 作为模板与包被在 AuNP 上的捕获序列杂交,并引导捕获序列形成 DNA-AuNP 组件,溶液的变性能够释放靶 DNA 和连接的 AuNP,从而使 AuNP 数量指数扩增,最终导致溶液从红色变为紫色,实现超高灵敏(aM 水平)检测。

除了检测灵敏度外,AuNP 比色法还需考虑其稳定性。核算适配体修饰的 AuNP 在血清等生物样品中通常是不稳定的,其中高浓度盐会诱导 AuNP 的聚集,从而产生非特异性信号;同时生物硫醇(例如半胱氨酸和高半胱氨酸)可能取代 Au 表面上的生物识别元素,从而降低 AuNP 比色法的检测限和灵敏度。为解决上述问题,Guo 等^[30,31]提出了一种稳定性好,动态检测范围广,灵敏度高的 AuNP 比色法,如图 2 所示,该方法主要依靠不对称官能团修饰的 AuNP 的定向聚集形成二聚体,其中颗粒间间距小于 1 nm,二聚体间的小间隙通常产生较大的峰值偏移而显示明显的红-蓝颜色变化。不对称聚乙二醇修饰的 AuNP 提高了在复杂样品中稳定性,从而避免出现假阳性信号,同时避免了多聚体和大聚集体的形成,灵敏度达到 pM 级。

2 基于核酸适配体“G-quadruplexes”结构的生物分析方法

G-四链体(G-quadruplex)是由富含鸟嘌呤的 DNA 或 RNA 序列形成的四链非标准序列,首次在人类癌基因的启动子区域中被发现,G-quadruplex 参与维持与生物过程相关的基因的表达,如与肿瘤生长相关的基因表达^[32]。通常 G-quadruplex 包含两个或更多个 π - π 堆叠的 G4 平面,其通过 Hoogsteen 氢键稳定四个鸟嘌呤碱基,如图 3 所示。与双链 DNA 的标准型相反,G-quadruplex 因鸟嘌呤区的数量和长度的变化而显现出丰富的结构多态性。此外,G-quadruplex 序列的拓扑结构也取决于稳定离子的性质^[33]。如 Na^+ 存在时,人类端粒序列 d [AG₃(TTAGGG)₃]被诱导成反向平行的 G-quadruplex^[34],而 K^+ 诱导形成杂合型 G-quadruplex^[35]。同时, Na^+ 有利于 G-quadruplex 的平行折叠,而 Pb^{2+} 对相同的 G-quadruplex 序列产生反向平行构象^[36]。

核酸适配体通常使用 DNA 而不是 RNA,因为 RNA 在生物环境中不太稳定。与成本相对较高的蛋白抗体相比,DNA 可以灵活性的大规模生产,同时在 95°C 以及较宽的 pH 范围内稳定,因此可以经历可逆的变性-复性循环而不失功能活性^[37]。特别是 G-quadruplex 结构多态性使得它们被用于分析检测各种

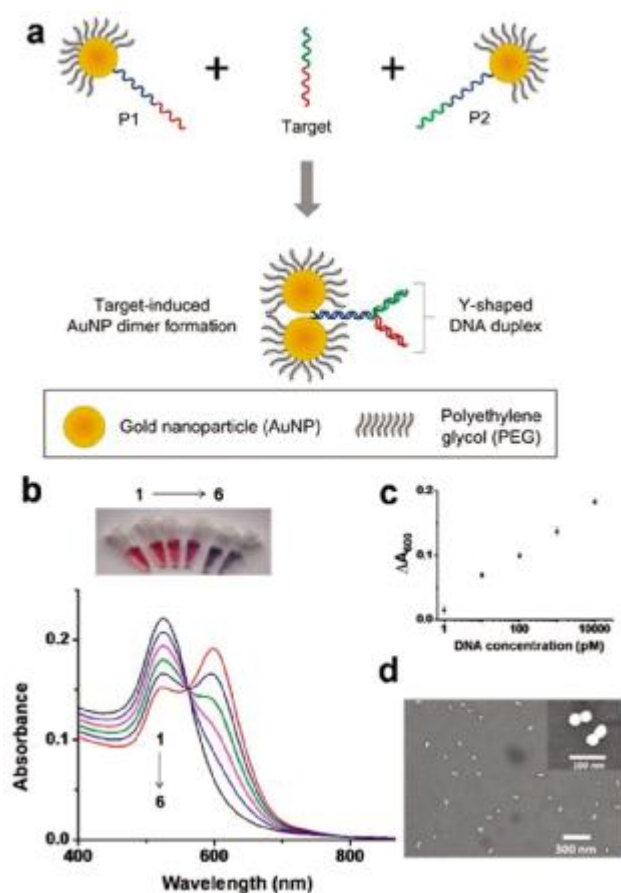
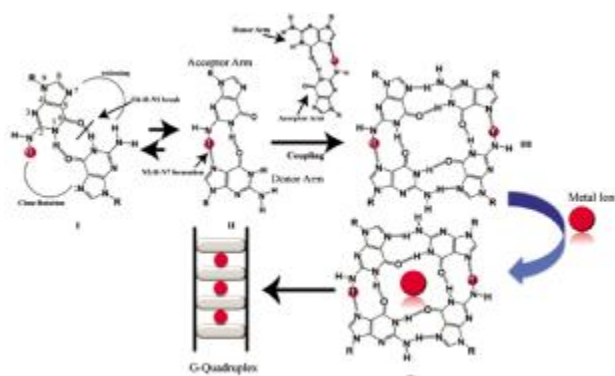


图2 基于不对称修饰的纳米金比色法

Fig.2 The colorimetric assay based on asymmetrically functionalized AuNP

图3 四个鸟嘌呤碱基通过 Hoogsteen 氢键形成稳定的 G-quadruplex
Fig.3 The four guanine bases form a stable G-quadruplex by Hoogsteen hydrogen bond

分析物(如金属离子,小分子,蛋白质,DNA,RNA 或酶)^[38,39]。与基于双链 DNA 的分析方法相比,基于 G-quadruplex 的检测方法不易受到样品基质中的外源 DNA 的干扰。除此之外,DNA 修饰酶也可开发用于 DNA 检测,特别是用感知检测信号的关键组分,以提高现有的基于 DNA 分析检测的灵敏度。

2.1 基于 G-quadruplexes 检测分析的原理

基于 G-quadruplex 的比色^[40,41]和发光^[24,41]检测策略因其成本相对较低、操作灵活、灵敏度高而被广泛使用。采用供体和受体或荧光基团和猝灭基团共价标记的 DNA 分子开发分析方法,已有大量研究^[37,38,42-46]。然而标记是耗时且昂贵的,同时用荧光基团共价标记寡核苷酸可能影响其与靶标的相互作用或影

响信号转导^[2,47]。相比之下,“无标记”方法因方法简单、成本低廉而成为共价标记 DNA 的替代方案^[43,48]。在“无标记”方法中,G-quadruplex 探针与 G-quadruplex 结构通过各种结合模式(如嵌入,末端堆叠,槽结合,静电相互作用)可逆地结合,而不与其他 DNA 共价结合。另一类光学测定法是比色传感法,可以用肉眼直接观察到由分析物结合产生的颜色变化,因此可以在没有任何仪器的情况下操作。其中,基于 G-quadruplex 过氧化物酶模拟 DNA 酶系统最为成熟。

2.2 酶依赖的 G-quadruplex 的分析平台

DNA 修饰酶参与分析检测的关键核心是辅助靶标分析物触发 DNA 构象变化。多核苷酸激酶 (Polynucleotide Kinase, PNK)催化寡核苷酸在 5'-羟基末端的磷酸化,这种酶在修复由内源和外源因子诱导的 DNA 链断裂中起重要作用^[49,50]。因此,准确检测 PNK 活性对生物化学和分子生物学领域具有重要的意义。采用 G-quadruplex-铱(III)复合物,构建无标记的 G-quadruplex 分析方法可用于检测 T4 多核苷酸激酶活性^[51]。首先设计一个发夹序列,3'末端为人类端粒 G-quadruplex 序列,5'端为富含互补胞嘧啶的序列,两者通过短链连接。通过 T4 PNK 催化该发夹 5'-羟基末端的磷酸化进而使外切酶消化 5'末端底物(图 4 中的蓝色线),当外切酶到连接区(红线)处时,会在此处停止,因为它不能处理单链 DNA。然后,将完整的富含 3'-鸟嘌呤的序列(绿线)释放,并在 K^+ 离子存在下折叠成 G-quadruplex,并由发光铱(III)络合物检测。也利用 T4 PNK 的磷酸化特性和 λ exo 的切割来释放 G-quadruplex 序列用于信号转导^[52]。

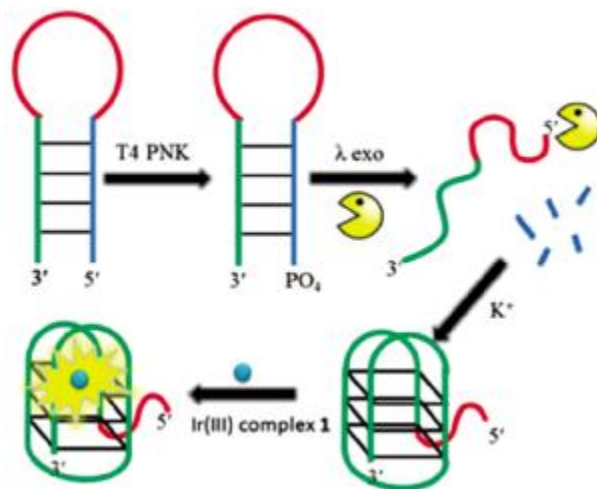


图4 基于 G-四链-铱(III)络合物的发光开关检测示意图

Fig.4 The G-quadruplex-based luminescence switch-on detection strategy using a G-quadruplex-selective iridium(III) complex

2.3 酶辅助的 G-quadruplex 的分析策略

Exo III 是从双链 DNA 的 3'-末端进行逐步消化的酶,可以选择性的去除一定数量的核苷酸。采用 Exo III 有两种策略:首先是增强输出信号,其次是降低背景噪声。基于 Exo III 辅助 G-quadruplex 的无标记方法可用于检测银离子,如图 5 所示。首先,通过反义序列(绿线)杂交的 G-quadruplex 序列(黑线)制备具有 3'和 5'突出的发夹探针 DNA。由于 Exo III 只能消化双链 DNA,当不添加银离子时,它不能切割发夹探针 DNA,因此不能形成 G-quadruplex 结构。相反,银离子的添加将形成

C-Ag⁺-C 的错配,并且在此条件下,Exo III 可以从双链体底物的 3' 端(绿线)切割。消化过程将释放 G-quadruplex 序列,然后转化为 G-quadruplex 结构,并且可以通过具有发光响应的 G-quadruplex 选择性铈(III)复合物鉴定。在 Exo III 切割后,Ag⁺ 离子从 dsDNA 中游离出来,重新进入扩增循环并产生更多的 C-Ag⁺-C 的错配碱基对,导致下一轮 Exo III 消化。除了 C-Ag⁺-C 的错配碱基对外,Exo III 还可以消化 T-Hg²⁺-T 不匹配的碱基对。Exo III 也可用于消化反义链以释放输入 DNA,导致进一步的 Exo III 辅助扩增,形成更多的 G-quadruplex^[56]。

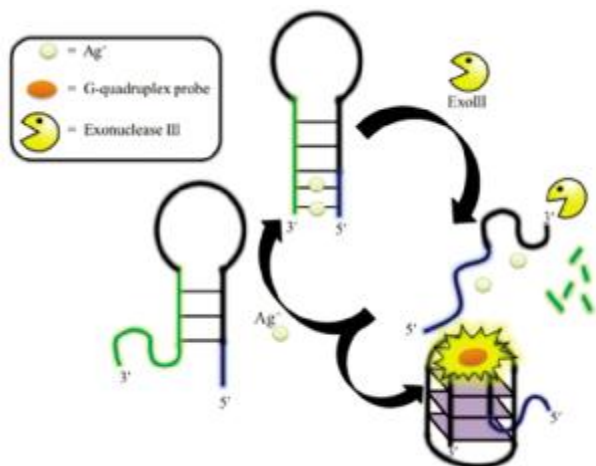


图 5 Exo III 辅助无标记的基于 G-quadruplex 的银离子检测示意图
Fig.5 Schematic representation of the Exo III-assisted label-free G-quadruplex-based assay for Ag⁺ ions

核酸切割酶(Nicking Endonuclease)可以识别目标 DNA 与探针杂交区域中限制性位点的特定核苷酸序列,切割 DNA 双链的一条链,产生“切口”DNA 分子,从而产生检测信号,而游离出的目标 DNA 又可以与下一个探针杂交,最终通过核酸切割酶的循环切割放大检测信号,从而提高检测灵敏度^[39]。与传统的核酸扩增技术相比,该方法更加简便,快捷,且反应体系简单,并避免了核酸扩增技术中的非特异性扩增干扰。核酸切割酶信号传导扩增对于检测单碱基错配具有高特异性和高灵敏度,目前基于核酸切割酶的测定法广泛用于 DNA 敏感检测。

2.4 基于 G-quadruplex 序列产生酶的分析平台

富含鸟嘌呤的核酸适配体序列能够产生被称为 G-quadruplex 的四方结构;它们通过 Hoogsteen 氢键配对组成平面 G-quadruplex 结构,可以作为金属离子和适配体等各种分子的配体。更重要的是 G-quadruplex 可与阴离子卟啉血红素组成复合物并显示过氧化物酶样活性。因此,G-quadruplex/卟啉血红素复合物可用于检测 K⁺,Ca²⁺,Ag⁺,Hg²⁺,Cu²⁺,Pb²⁺,核酸,多肽和蛋白质等各种分析物。分析物的存在引起的核酸适配体 DNA 构象变化,进而改变 G-quadruplex/卟啉血红素复合物的过氧化物酶活性,最终用于比色、荧光或电化学等检测。Abdollah 等^[20]以 Fe₃O₄ MNP 作为载体,并以血红素/G-quadruplex DNA 酶作为信号放大器,用于测定乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg),如图 6 所示。首先将 HBs(Ab1)一抗固定在羧基修饰的 MNP 表面。然后将抗体和烷基硫醇/G-quadruplex/血红素组装在 AuNP 上,用作生物条带探针;加入靶蛋白标后形成三明治夹心结构。G-quadruplex/血红素作为 HRP 模拟 DNA 酶显著增强甲基蓝一过氧化氢氧化还原反应,进而提高电信号。结果显示 HBsAg 检出限低至 0.19 pg/mL,灵敏度较高。

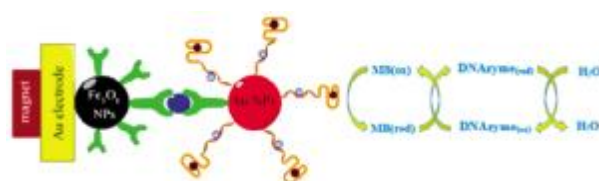


图 6 基于 Hemin / G-quadruplex 辣根过氧化物酶模拟 DNA 酶信号扩
增的乙肝病毒表面抗原电化学检测

Fig.6 The electrochemical immunosensor for hepatitis B virus surface antigen detection based on Hemin/G-quadruplex horseradish peroxidase-mimicking DNAzyme-signal amplification

3 小结与展望

核酸适配体凭借高选择性、区分单一基团、制备成本低、小免疫源性、高稳定性等优点,可作为识别单元和信号放大分子广泛应用于特定分析物鉴定和定量分析,分子诊断以及传感器的设计等方面。与抗体相比,适配体可以识别具有高亲和力和特异性的小分子物质,因此可用于药物,疾病标志物和环境污染物等高灵敏检测;此外,适配体可用于细胞内的传感器。

然而基于核酸适配体的生物分析方法依然面临很多问题,其中最主要的是适配体对环境条件(如样品的盐浓度,pH 值和蛋白质含量等)变化敏感,虽然这可以通过信号放大或减少背景噪声来提高检测灵敏度,但同时也增加了分析检测重现性的难度,也消耗了更多的时间和资源用于感测过程。除了分析测定体系之外,样品预处理过程还需考虑保留分析物的同时去除干扰物。随着这些问题的成功解决,基于核酸适配体的分析测定方法会得到更广泛的应用。核酸适配体技术为开发新的分析方法和检测诊断技术提供了许多机遇和挑战,同时也可拓展至目前无法被分离的分析物的分析检测和量化。

参考文献(References)

- [1] Gotrik M R, Feagin T A, Csordas A T, et al. Advancements in aptamer discovery technologies[J]. Acc Chem Res, 2016, 49(9): 1903-1910
- [2] Liang H, Zhang X B, Lv Y, et al. Functional DNA-containing nanomaterials: cellular applications in biosensing, imaging, and targeted therapy[J]. Acc Chem Res, 2014, 47(6): 1891-901
- [3] Zhang H, Zhou L, Zhu Z, et al. Recent progress in aptamer-based functional probes for bioanalysis and biomedicine[J]. Chemistry, 2016, 22 (29): 9886-9900
- [4] Ilgu M, Nilsen-Hamilton M. Aptamers in analytics [J]. Analyst, 2016, 141(5): 1551-1568
- [5] Mayer G. The chemical biology of aptamers [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2009, 48(15): 2672-2689
- [6] Da Costa J B, Dieckmann T. Structure and thermodynamics of drug-rna aptamer interactions [J]. Mini Rev Med Chem, 2013, 13(4): 467-477
- [7] Liu R, Huang Y, Ma Y, et al. Design and synthesis of target-responsive aptamer-cross-linked hydrogel for visual quantitative detection of ochratoxin A[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(12): 6982-6990
- [8] Liu Y, Tuleouva N, Ramanculov E, et al. Aptamer-based electrochemical biosensor for interferon gamma detection [J]. Anal Chem, 2010, 82(19): 8131-8136
- [9] Jiang B, Li F, Yang C, et al. Aptamer pseudoknot-functionalized electronic sensor for reagentless and single-step detection of immunoglobulin e in human serum[J]. Anal Chem, 2015, 87(5): 3094-3098
- [10] Gao N, Gao T, Yang X, et al. Specific detection of biomolecules in physiological solutions using graphene transistor biosensors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(51): 14633-14638

- [11] Yang L, Zhang X, Ye M, et al. Aptamer-conjugated nanomaterials and their applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63 (14-15): 1361-1370
- [12] Zhang Y, Guo Y, Xianyu Y, et al. Nanomaterials for ultrasensitive protein detection[J]. *Adv Mater*, 2013, 25(28): 3802-3819
- [13] Stratakis M, Garcia H. Catalysis by supported gold nanoparticles: Beyond aerobic oxidative processes [J]. *Chem Rev*, 2012, 112 (8): 4469-4506
- [14] Konvalina G, Haick H. Sensors for breath testing: From nanomaterials to comprehensive disease detection [J]. *Acc Chem Res*, 2014, 47(1): 66-76
- [15] Boisselier E. Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity[J]. *Chem Soc Rev*, 2009, 38(6): 1759-1782
- [16] Giljohann D A, Seferos D S, Daniel W L, et al. Gold nanoparticles for biology and medicine [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49(19): 3280-3294
- [17] Yang X, Yang M, Pang B, et al. Gold nanomaterials at work in biomedicine[J]. *Chem Rev*, 2015, 115(19): 10410-10488
- [18] Jin R, Zeng C, Zhou M, et al. Atomically precise colloidal metal nanoclusters and nanoparticles: Fundamentals and opportunities [J]. *Chem Rev*, 2016, 116(18): 10346-10413
- [19] Zhou W, Gao X, Liu D, et al. Gold nanoparticles for in vitro diagnostics[J]. *Chem Rev*, 2015, 115(19): 10575-10636
- [20] Elghanian R, Storhoff J, Mucic R, et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles[J]. *Science*, 1997, 277(5329): 1078-1081
- [21] Wei H, Wang E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes [J]. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(14): 6060-6093
- [22] Liu X, Atwater M, Wang J, et al. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands [J]. *Colloid Surface B*, 2007, 58(1): 3-7
- [23] Rosi N L, Mirkin C A. Nanostructures in biodiagnostics [J]. *Chem Rev*, 2005, 105(4): 1547-1562
- [24] Saha K, Agasti S S, Kim C, et al. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing[J]. *Chem Rev*, 2012, 112(5): 2739-2779
- [25] Li H, Rothberg L J. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(35): 10958-10961
- [26] Wang J, Wang L, Liu X, et al. A gold nanoparticle-based aptamer target binding readout for atp assay [J]. *Adv Mater*, 2007, 19 (22): 3943-3946
- [27] Zagorovsky K, Chan W C. A plasmonic dnzyme strategy for point-of-care genetic detection of infectious pathogens [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(11): 3168-3171
- [28] Kato D, Oishi M. Ultrasensitive detection of DNA and rna based on enzyme-free click chemical ligation chain reaction on dispersed gold nanoparticles[J]. *ACS nano*, 2014, 8(10): 9988-9997
- [29] Shen W, Deng H, Gao Z. Gold nanoparticle-enabled real-time ligation chain reaction for ultrasensitive detection of DNA [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(36): 14678-14681
- [30] Guo L, Xu Y, Ferhan A R, et al. Oriented gold nanoparticle aggregation for colorimetric sensors with surprisingly high analytical figures of merit[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(33): 12338-12345
- [31] Liu D, Yang J, Wang H F, et al. Glucose oxidase-catalyzed growth of gold nanoparticles enables quantitative detection of attomolar cancer biomarkers[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(12): 5800-5806
- [32] Huppert J L, Balasubramanian S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(2): 406-413
- [33] Burge S, Parkinson G, Hazel P, et al. Quadruplex DNA: Sequence, topology and structure [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34 (19): 5402-5415
- [34] Ma D L, Wang W, Mao Z, et al. A tutorial review for employing enzymes for the construction of g-quadruplex-based sensing platforms [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 913: 41-54
- [35] Liu W, Zhu H, Zheng B, et al. Kinetics and mechanism of g-quadruplex formation and conformational switch in a g-quadruplex of ps2.M induced by pb2?[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(9): 4229-4236
- [36] Deng B, Lin Y, Wang C, et al. Aptamer binding assays for proteins: The thrombin example--a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2014, 837: 1-15
- [37] Wu L, Qu X. Cancer biomarker detection: Recent achievements and challenges[J]. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(10): 2963-2997
- [38] Li D, Song S, Fan C. Target-responsive structural switching for nucleic acid-based sensors[J]. *Acc Chem Res*, 2010, 43(5): 631-641
- [39] Liu X, Lu C H, Willner I. Switchable reconfiguration of nucleic acid nanostructures by stimuli-responsive DNA machines [J]. *Acc Chem Res*, 2014, 47(6): 1673-1680
- [40] Xia F, Zuo X, Yang R, et al. Colorimetric detection of DNA, small molecules, proteins, and ions using unmodified gold nanoparticles and conjugated polyelectrolytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(24): 10837-10841
- [41] Saha K, Agasti S S, Kim C, et al. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing[J]. *Chem Rev*, 2012, 112(5): 2739
- [42] Wang F, Liu X, Willner I. DNA switches: From principles to applications[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(4): 1098-1129
- [43] Ren J, Wang T, Wang E, et al. Versatile g-quadruplex-mediated strategies in label-free biosensors and logic systems [J]. *The Analyst*, 2015, 140(8): 2556-2572
- [44] Du Y, Li B, Wang E. "Fitting" makes "sensing" simple: Label-free detection strategies based on nucleic acid aptamers[J]. *Acc Chem Res*, 2013, 46(2): 203-213
- [45] Zhao Y, Chen F, Li Q, et al. Isothermal amplification of nucleic acids [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(22): 12491-12545
- [46] Xu J J, Zhao W W, Song S, et al. Functional nanoprobe for ultrasensitive detection of biomolecules: An update [J]. *Chem Soc Rev*, 2010, 45(18): 4234-4243
- [47] Zhang X B, Kong R M, Lu Y. Metal ion sensors based on dnzymes and related DNA molecules [J]. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2011, 4: 105-128
- [48] Ma D L, He H Z, Leung K H, et al. Label-free luminescent oligonucleotide-based probes[J]. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(8): 3427-3440
- [49] Pugliese K M, Gul O T, Choi Y, et al. Processive incorporation of deoxynucleoside triphosphate analogs by single-molecule DNA polymerase (klenow fragment) nanocircuits [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(30): 9587-9594
- [50] Liu H, Ma C, Wang J, et al. Label-free colorimetric assay for t4 polynucleotide kinase/phosphatase activity and its inhibitors based on g-quadruplex/hemin dnzyme[J]. *Anal. Biochem*, 2017, 517: 18-21
- [51] Song C, Yang X, Wang K, et al. A sensitive detection of t4 polynucleotide kinase activity based on beta-cyclodextrin polymer enhanced fluorescence combined with an exonuclease reaction [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2015, 51(10): 1815-1818
- [52] Alizadeh N, Hallaj R, Salimi A. A highly sensitive electrochemical immunosensor for hepatitis b virus surface antigen detection based on hemin/g-quadruplex horseradish peroxidase-mimicking dnzyme-signal amplification[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 94: 184-192