

基于催化发夹自组装技术构建信号放大的电化学生物传感器检测miRNA

江玉敏, 李 燕, 袁婷婷, 丁英琼

贵州工程应用技术学院化学工程学院, 贵州 毕节

收稿日期: 2025年4月26日; 录用日期: 2025年5月18日; 发布日期: 2025年5月28日

摘 要

本研究旨在开发一种基于等温无酶式的催化发夹自组装技术(catalytic hairpin assembly, CHA)构建新型信号放大的电化学生物传感器, 以DNA为模版制备的银纳米簇(DNA-AgNCs)作为信号探针, 特异性的检测miRNA。首先研究选择以let-7a miRNA为分析对象, 设计一对与目标物let-7a miRNA部分碱基互补的发夹链H1和H2, 其中H1链富含胞嘧啶, 可作为模板合成具有良好导电性的DNA-AgNCs, 而H2则被设计为端基带有氨基的发夹结构, 作为捕获探针H2能够借助Au-NH键, 修饰在经过纳米金修饰的玻碳电极(dpAu/GCE)表面, 实现对目标物let-7a miRNA的特异性识别与捕获。当目标物let-7a miRNA和DNA-AgNCs滴涂在修饰电极表面时, H1和H2发夹打开, 引发CHA反应, 将导电性能好的DNA-AgNCs (荧光基团)修饰在电极表面, 可显著增强的电流信号。实验结果表明, 该生物传感器在50 pM~1 μ M浓度范围内, 对let-7a miRNA具有良好的线性响应, 测限低至16.67 pM, 且具有优异的特异性, 为电化学生物传感器在miRNA检测领域的应用提供了新的策略。

关键词

DNA-银纳米簇, 催化发夹自组装技术, miRNA, 电化学生物传感器, 灵敏度

Development of a Catalytic Hairpin Self-Assembly-Based for Electrochemical Biosensors with Signal Amplification for miRNA Detection

Yumin Jiang, Yan Li, Tingting Yuan, Yingqiong Ding

College of Chemistry Engineering, Guizhou University of Engineering Science, Bijie Guizhou

Received: Apr. 26th, 2025; accepted: May 18th, 2025; published: May 28th, 2025

文章引用: 江玉敏, 李燕, 袁婷婷, 丁英琼. 基于催化发夹自组装技术构建信号放大的电化学生物传感器检测miRNA [J]. 分析化学进展, 2025, 15(2): 239-247. DOI: 10.12677/aac.2025.152023

Abstract

This study aims to develop a novel electrochemical biosensor with signal amplification based on isothermal enzyme-free catalytic hairpin assembly (CHA) technology. Silver nanoclusters prepared using DNA as a template (DNA-AgNCs) are used as signal probes to specifically detect miRNA. Firstly, let-7a miRNA is selected as the analysis object. A pair of hairpin strands H1 and H2 that are partially complementary to the target let-7a miRNA in terms of base sequence are designed. Among them, strand H1 is rich in cytosine and can serve as a template for synthesizing DNA-AgNCs with good electrical conductivity. Hairpin strand H2 is designed to have an amino group at the end. As a capture probe, H2 can be modified on the surface of a glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles (dpAu/GCE) through the Au-NH bond, enabling specific recognition and capture of the target let-7a miRNA. When the target let-7a miRNA and DNA-AgNCs are drop-coated on the surface of the modified electrode, hairpins H1 and H2 open, triggering the CHA reaction. DNA-AgNCs (fluorescent groups) with good electrical conductivity are modified on the electrode surface, which can significantly enhance the current signal. The experimental results show that this biosensor exhibits a good linear response to let-7a miRNA within the concentration range of 50 pM to 1000 nM, with a detection limit as low as 16.67 pM, and has excellent specificity. It provides a new strategy for the application of electrochemical biosensors in the field of miRNA detection.

Keywords

DNA-Silver Nanoclusters, Catalytic Hairpin Self-Assembly Technology, miRNA, Electrochemical Biosensors, Sensitivity

Copyright © 2025 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

miRNA 作为一类在生物基因组中广泛存在的非编码蛋白 RNA，长度约为 20~24 个核苷酸[1]，许多报道证实了 miRNA 在生物学成长过程中发挥必要的调节控制功能[2]，miRNA 在细胞中的异常表达会导致病症发生，是病变的重要因素，如癌症[3][4]、心血管类疾病[5]、糖尿病[6]等，故此，将 miRNA 作为疾病诊断的重要标志物，检测 miRNA 在细胞内的表达水平在疾病早期的诊断中具有重大研究价值。但由于 miRNA 存在序列少、同源性高和含量低等特点[7]，是定量分析检测 miRNA 的一大难点，检测 miRNA 的主要方法有实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR 法) [8] [9]、微阵列法[10] [11]和 Northern 印迹法[12]等，由于其操作复杂、耗时长且试验成本高等局限性，因此需要建立一种简单快速有效的 miRNA 检测方法。

催化发夹自组装(CHA)技术于 2008 年由 YIN 等提出[13]，是一种无需酶的新型等温核酸扩增方法，室温下不经人工干预，仅可通过一对发夹探针与靶目标物 DNA 链结合即可实现 N 倍信号扩增[14]。其优势包括反应体系简单、高灵敏度、高特异性、低成本及常温自动化操作，克服了传统技术复杂、成本高和易受环境影响等问题。目前该技术已衍生出荧光[15]、电化学[16]、比色法[17]等多种检测手段，是一种多功能化可靠的技术。本研究以 AgNCs 纳米复合材料[18]作为电极修饰材料，结合 CHA 技术构建出信号放大策略为目的的电化学生物传感器，用于检测 let-7amiRNA。验证了 CHA 结合电化学传感检测 miRNA 的可行性，有望为疾病快速诊断提供新思路。

基于此,设计出一对部分碱基互补的发夹探针链 H1、H2,二者可在同一溶液中自由游离。当目标物 let-7amiRNA 存在时,即可触发 CHA 反应。H1 发夹柄的 3'端富含胞嘧啶,可用于探针银纳米簇(DNA-AgNCs),而 H2 发夹的末端带有氨基。以 let-7amiRNA 作为目标物,首先在玻碳电极表面修饰一层导电性良好的纳米金,后借助 Au-NH 键将 H2 修饰至电极表面,使其作为捕获探针。封闭修饰电极的活性位点后,当目标物显现,便会立即形成 DNA-AgNCs-H2 双链复合物,进而引发 CHA 反应。此时,具有良好导电性的 DNA-AgNCs(荧光基团)会被修饰到电极表面,增强电流信号,并引发链置换,促使反应不断连续进行,最终实现信号的扩增。

2. 实验部分

2.1. 主要仪器与试剂

SVC-SOOOVR 高精度全自动交流稳压器(上海弘乐电气有限公司); JA1203N 电子天平(上海菁海仪器有限公司); CHI660E 电化学工作站(上海辰华科技有限公司); JEM-2100 透射电子显微镜(日本 JEOL)。硝酸银(AgNO₃)和硼氢化钠(NaBH₄)购自国药集团化学实际有限公司;氯化钾(KCl)购自天津市永大化学试剂有限公司;亚铁氰化钾(K₄Fe(CN)₆·3H₂O)购自天津市大茂化学试剂厂;铁氰化钾(K₃Fe(CN)₃)购自湖南湘中地质实验研究所; 6-巯基己-1-醇(MCH)购自上海茂克林生化科技有限公司;氧化铝(Al₂O₃, 50 nm)抛光粉购自上海勒顿实业有限公司,所用化学试剂均为分析级试剂,未经再次纯化。溶液采用纯净水水配制。实验用水均为纯净水。

寡核苷酸序列均购自上海生工生物技术有限公司合成和纯化所得。所需核酸序列均已进行纯化。序列如表 1 所示,所用单链 DNA/RNA 均为冻干粉形式存在,使用前先用离心机以 4000 rpm 的转速离心后,加入适量的纯净水制备不同浓度溶液,置于漩涡震荡仪充分混匀备用。不使用时低温避光保存。实验中所用到的 PBS 均自行配置。

Table 1. Base sequences of the designed DNA oligonucleotides
表 1. DNA 寡核苷酸链碱基序列

寡核苷酸	序列(5'~3')
DNA	AACT ATAC AACC TACT AC TTGTATAGTT GCT AATCG TG CCAC CCAC CCTT
H ₂	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -GGGG TGGG GTGG GGTG GGA GA CGATT AACT ATAC AACC TACT AC TTGT ATAG TT GCT
let-7a	UGAG GUAG UAGG UUGU AUAG UU
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miR-221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
miR-378	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG

2.2. DNA 发夹模板合成银纳米簇

以 DNA 链为模板,用化学还原法制备银纳米簇。首先,取 15 μL DNA (200 μM)、30 μL 的 Mg(NO₃)₂ (90 mM)和 200 μL 的 20 mM PBS (pH = 7.0)缓冲液中混合,再加入新鲜配置的 10μL AgNO₃ (600 μM)溶液,在 4℃下孵育 30 min,使 Ag⁺与发夹 DNA 链上的氨基互补配对后充分结合。然后将现配置的 30 μL NaBH₄ (600 μM)加入混合物中,剧烈震荡 2 分钟,混匀后在 4℃下避光下放置 2 h 后得到有荧光性质的 DNA-AgNCs,不使用此溶液时,放置恒温 4℃下避光保存即可。

2.3. 电化学生物传感器的制备

电化学生物传感器的制备如图 1 所示, 首先将玻碳电极(GCE, 半径 1 mm)用氧化铝细粉打磨抛光至电极表面光滑一致, 蒸馏水清洗后室温下自然晾干, 用循环伏安法测定其电化学性能, 使氧化还原电位峰差值在 0.1 V 以内, 说明电极处理干净。接着将电极浸入浓度为 3% 的氯金酸溶液中, 在 -0.2 V 电压沉积 30 秒, 使电极表面修饰得到一层均匀的纳米金, 在去离子水中蘸洗, 制得 dpAu/GCE; 然后用移液枪取 $5\ \mu\text{L}$ 浓度为 $0.5\ \mu\text{mol/L}$ H₂ 溶液滴落于电极表面, 盖帽, 并于 4°C 下孵育过夜, 制得 H₂/dpAu/GCE; 然后, 取 $5\ \mu\text{L}$ $1\ \text{mmol/L}$ 的 MCH 滴涂在修饰电极表面上, 孵育 60 min, 得到 MCH/H₂/dpAu/GCE; 最后在修饰电极表面滴涂各 $5\ \mu\text{L}$ 的 DNA-AgNCs 和 let-7amiRNA, 室温孵育 60 min。传感器制备成功, 过程中每一步都需要在清水中蘸洗, 以除去未反应的滴涂物。

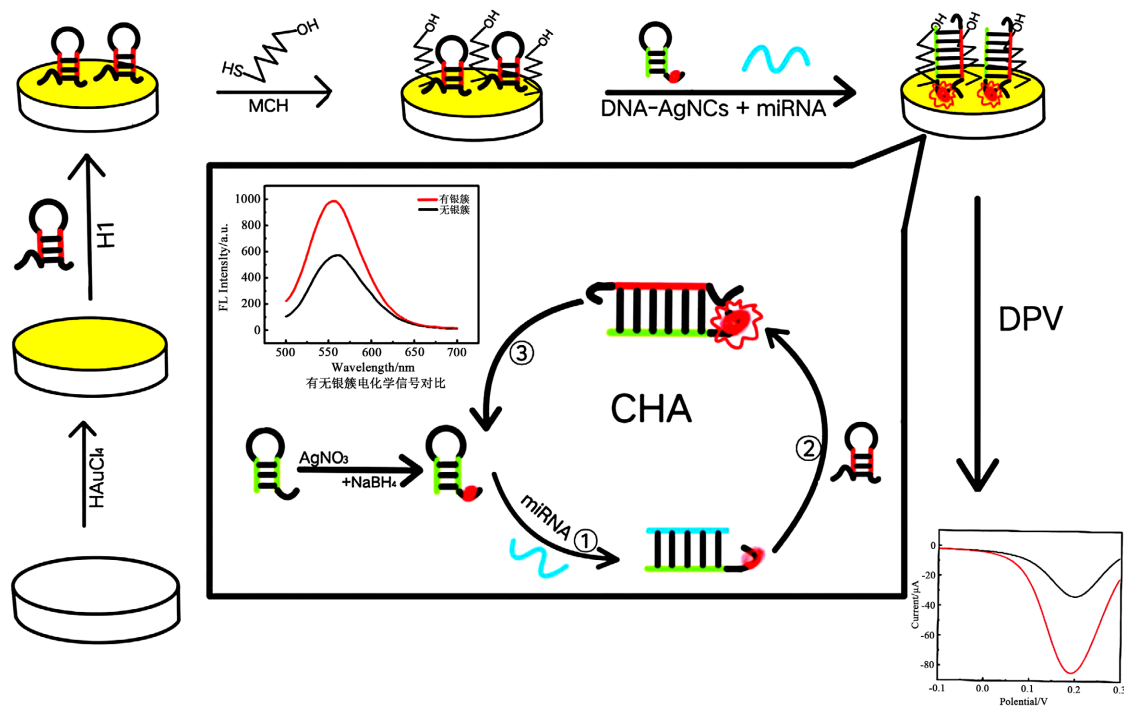


Figure 1. Schematic diagram of the sensor preparation
图 1. 实验步骤原理简示

2.4. 电化学测量

采用循环伏安法(CV)测定电化学特性, 对修饰的电极进行表征即进行以下操作, 用修饰后的玻碳电极为工作电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极作为对电极。设置参数: 电位范围为 -0.2 V~ 0.6 V, 扫描速度为 $0.1\ \text{V/s}$, 扫描段为 4 次。利用差分脉冲伏安法(DPV)在铁氰化钾溶液中进行定量检测, 增加电化学检测灵敏度, DPV 电位扫描范围为 $0.3\ \text{V}$ ~ $-0.1\ \text{V}$, 振幅设置为 $0.01\ \text{V}$, 调制时间为 $2\ \text{s}$ 。DNA-AgNCs 纳米材料使用 TEM 进行形貌表征。

3. 结果与讨论

3.1. DNA-AgNCs 的电镜表征

使用透射电子显微镜(TEM)对荧光基团 DNA-AgNCs 的形貌和特征进行表征(图 2)。DNA-AgNCs 拥

有良好的光稳定性和生物相容性。DNA-AgNCs 纳米粒子的形状与大小受 DNA 的限制, 所制备的银纳米簇表现出圆球形结构和尺寸分散均匀, 适用于生物传感。

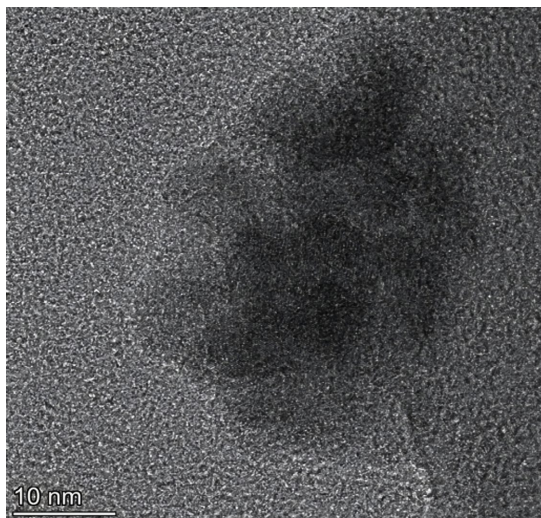
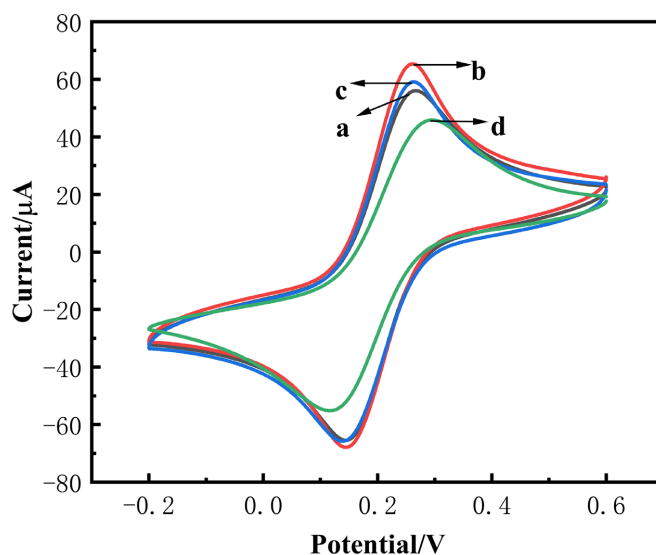


Figure 2. TEM image of DNA-AgNCs

图 2. DNA-AgNCs 的透射电镜图

3.2. 修饰电极的表征和原理

采用循环伏安法(CV)对所制备的生物传感器进行电化学表征, 如图 3 所示。GCE (曲线 a)为裸电极未修饰任意活性物质, 引入一层纳米金后, 由于其优良导电率和催化活性, 得到了电流信号相对于裸电极有明显的升高(曲线 b)。利用 Au-NH 键将 H2 固载到修饰电极表面后, 因 DNA 生物大分子, 阻抗较大, 因此 CV 电化学信号降低(曲线 c)。同理, 使用 MCH 来封闭非特异性结合位点时, 信号大幅度下降(曲线 d)。以上实验结果符合预期设想, 证明该传感器制备成功。



a: GCE, b: DpAu/GCE, c: H2/DpAu/GCE, d: MCH/H2/DpAu/GCE.

Figure 3. CV curves of different modified electrodes

图 3. 不同修饰电极的循环伏安图

3.3. 实验条件优化

为实现传感器在传感分析检测中性能的最大化,本研究对传感器的制备流程及测试条件展开了全面优化。着重探究目标物对所制备的电化学传感器电信号的作用,测定了在有无目标物 miRNA 情况下的差分脉冲伏安法(DPV)电流响应。

为了确定最佳实验条件,本研究系统考察了不同催化发夹自组装(CHA)反应时间(5、10、30、45、60、90、120 分钟)对传感器性能的影响。实验数据如图 4(B)所示,随着孵育时间的延长,电流响应值逐渐上升。当孵育时间达到 60 分钟时,电流响应值达到稳定状态且为最大值。这表明在该时间点,CHA 反应充分进行,DNA-银纳米簇(DNA-AgNCs)与目标物 let-7amiRNA (物料比 1:1)在电极表面的反应达到最佳平衡。

基于上述实验结果,本实验最终选择将 DNA-AgNCs 和 let-7amiRNA (1:1)滴加于电极表面后,电极孵育 60 分钟作为最优实验条件。在该条件下,传感器展现出最为优异的检测分析性能,能够为后续的检测工作提供稳定、可靠的数据支持。

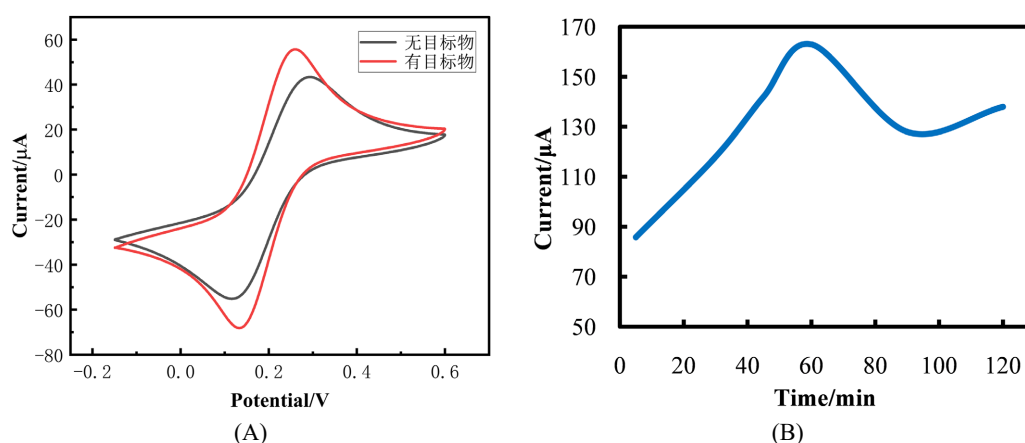


Figure 4. Optimization of experimental conditions. (A) Effect of target; (B) Effect of reaction time
图 4. 实验条件优化(A)目标物的影响(B)反应时间的影响

3.4. 原理讨论

本研究构建信号放大的传感器检测 miRNA,主要依托催化发夹自组装(CHA)技术。其核心原理在于验证反应前后目标物对所制备的电化学传感器电信号产生的作用。差分脉冲伏安法(DPV)具有较高的灵敏度,采用 DPV 测定有无目标物 miRNA 时的电流响应。

从图 4(A)的实验数据能够直观地看出,在未添加目标物的情况下,传感器仅呈现出极为微弱的电流信号,表明此时电极表面的电化学反应程度很低。而当向体系中加入物料比为 1:1 的 DNA-银纳米簇(DNA-AgNCs)和任意浓度的 let-7a 类 miRNA 后,峰响应电流值显著增强,产生了较强的信号。这一现象充分说明,目标物的加入促使电极表面发生了更为活跃的电化学反应,引发了显著的电流变化。此次实验结果不仅明确了目标物对传感器电信号具有显著影响,同时也验证了在有目标物存在的情况下,利用该电化学生物传感器进行检测实验具备可行性,为后续基于 CHA 技术的 miRNA 检测研究提供了有力的实验依据和方向指引。

进一步深入探究该传感器的工作机制,研究出其关键在于巧妙设计的核酸结构与 CHA 反应的协同作用,CHA 技术原理初步于 2008 年被提出,优势在于与其他技术结合得到更高性能的检测传感,成为一大热点。如图 1 所示,设计一对部分碱基互补配对的特异性发夹链 H1、H2,同时以单链 let-7amiRNA 为

引发链。利用 H1 发夹末 3'端富含胞嘧啶这一独特的结构特征,通过一系列化学合成得到簇状结构且带有荧光性质的 DNA-AgNCs;而 H2 则被设计为 5'端为富含鸟嘌呤,另一发夹端带有氨基的特殊结构。在初始状态下, DNA-AgNCs 和 H2 两端发夹未打开时可稳定存在同一溶液体系中,当靶目标物 miRNA 出现时, miRNA 凭借碱基互补配对原则与 DNA-AgNCs 实现特异性结合, DNA-AgNCs 原本茎环结构被打开后暴露出 teoheld 区呈链状,形成 miRNA-DNA-AgNCs 的复合物,如图 1 中①;而后 DNA-AgNCs 暴露出与 H2 互补的序列,与 H2 粘性末端链杂交,形成 DNA-AgNCs-H2 杂交双链,如②进行;此时靶标 miRNA 被释放出参与下一轮 CHA 反应,随后进行一轮链置换反应,同时将导电性能好的 DNA-AgNCs 被修饰在电极表面,于③所示。

如图 5 所示,经历多次循环,催化出大量的 DNA-AgNCs-H2 链,更多 miRNA 链被持续激活,固载在电极表面的 DNA-AgNCs 被多次激发,达到信号扩增的目的。此机理工作中,无需酶催化、常温即可发生自发系数扩增反应,具有较强的灵敏度与特异性。

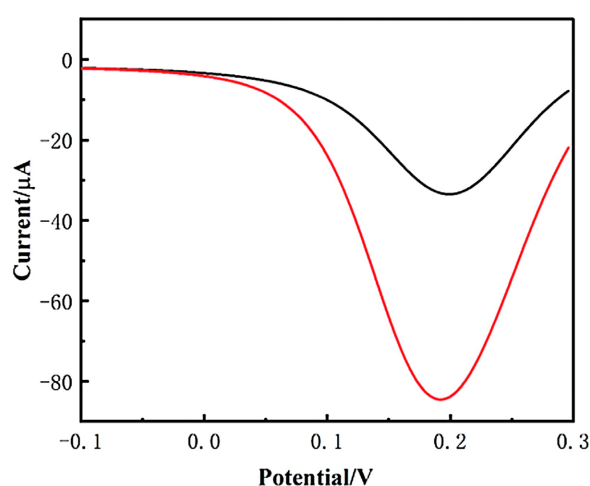


Figure 5. Comparison of signals before and after CHA's autonomic response
图 5. CHA 自主反应前后信号对比

3.5. 线性响应

选择上述最优实验条件下,测定系列浓度内 miRNA 的响应峰电流,采用 DPV 法进而探究所构建化学传感器的灵敏度。在 50 pM~100 nM 范围浓度内, DPV 的还原峰峰值持续增大(图 6(A)),并呈现良好线性关系(图 6(B)),线性方程为 $I(\mu A) = 19.271 \lg C(\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}) + 1.6592$,这是由于 miRNA 不断置换引发更多的 CHA 反应,修饰电极上更多的 DNA-AgNCs 被固载,电流信号相继提升,在 100 nM 浓度下达到最高信号。经计算,检出限($S/N = 3$)为 16.67 pM,相关系数(R)为 0.9715。该检测策略拥有较低的检测限和较宽数量级的检测范围,显示了优良的检测性能。

3.6. 选择性研究

为评估该体系是否能特异性识别目标物 let-7amiRNA 的序列,在不改变其他实验条件下,选用三组不同序列组的 miRNA(miR-21, mi-221, miR-378)进行选择实验,与目标物相比,其他三组非靶标链的目标物电流信号强度无显著性变化(图 7)。此项数据表明,基于 CHA 反应原理制备的电化学生物传感器只有 let-7amiRNA 能够触发并产生强电流响应,而其他 miRNA 目标物检测的信号强度无法实现相应高度,该方法证实了制备的电化学传感器对 let-7amiRNA 实施的选择性研究表现出良好的结果。

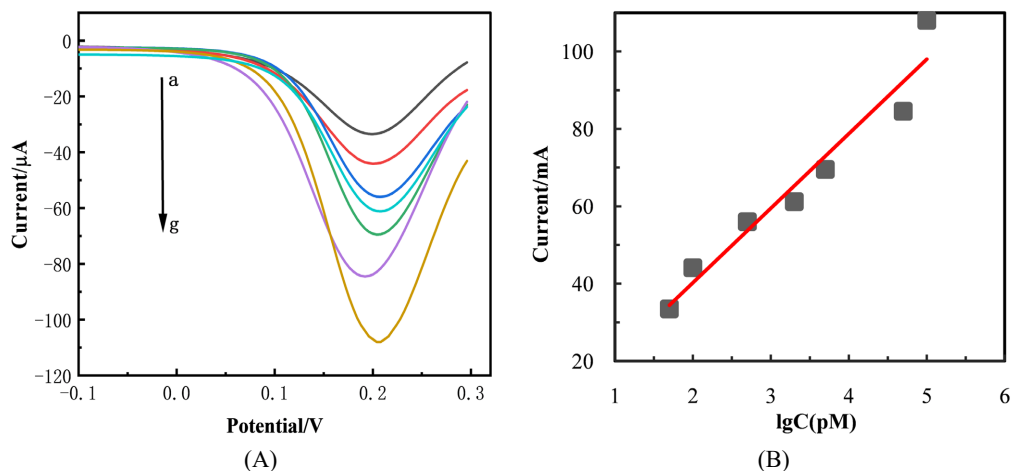


Figure 6. (A) Electrochemical signal in the concentration range of 50 pM~100 nM (a-g: 0.05, 0.1, 0.5, 2, 5, 50, 100 nM); (B) Calibration curve between the current peak and the logarithm of the concentration of miRNA in the concentration range of 50 pM~100 nM

图 6. (A) 50 pM~100 nM 浓度范围内(a-g: 0.05, 0.1, 0.5, 2, 5, 50, 100 nM)的电化学信号; (B) 50 pM~100 nM 浓度范围内电流峰值与 miRNA 的浓度对数之间的校准曲线

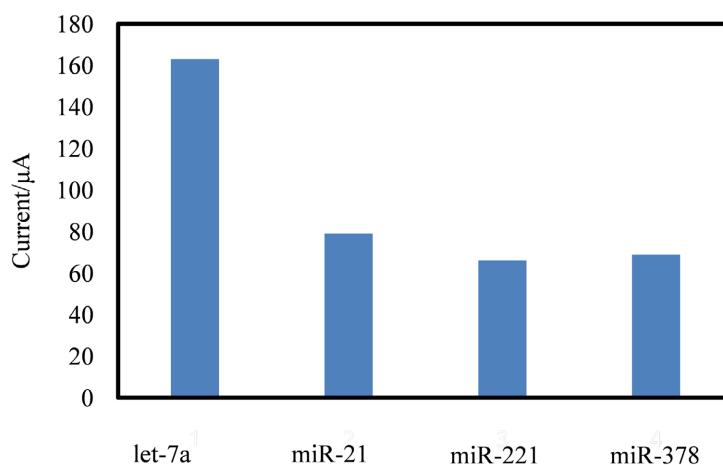


Figure 7. Study of the selectivity of the CHA method

图 7. CHA 方法的选择性研究

4. 结论与分析

综上所述, 本研究成功结合本研究成功构建了一种基于 DNA-银纳米簇和等温无酶催化发夹自组装技术的新型电化学生物传感器, 用于 let-7a miRNA 的检测。通过合理设计发夹链和巧妙利用 DNA-AgNCs 的优异性能, 实现了对目标 miRNA 的特异性捕获和信号放大。该生物传感器在 0.5 nM~1000 nM 浓度范围内对 let-7a miRNA 具有良好的线性响应, 检测限低至 16.67 pM, 且具有良好的特异性、稳定性和重复性。即设计一对部分碱基互补的发夹链 H1 和 H2。H1 用以合成 DNA-AgNCs (信号探针), 在玻碳电极表面沉积一层 dpAu, 增加电活性。H2 (捕获探针) 通过 Au-NH 键固载到修饰电极表面, 存在目标物 let-7a miRNA 和 DNA-AgNCs 时, 诱发 CHA 反应, 将 DNA-AgNCs 置换到电极表面, 产生电化学响应值放大的信号。该电化学传感器具有较低的检出限和良好的灵敏度与特异性、常温下自动化操作的特性, 本文的研究为更快检测体内微量的 let-7a miRNA 目标物提供了线索, 有望在未来的医学领域检测得到更广泛的研究和应用。

参考文献

- [1] Kamalidehghan, B., Habibi, M., Afjeh, S.S., Shuai, M., Alidoost, S., Almasi Ghale, R., *et al.* (2020) The Importance of Small Non-Coding RNAs in Human Reproduction: A Review Article. *The Application of Clinical Genetics*, **13**, 1-11. <https://doi.org/10.2147/tacg.s207491>
- [2] Chen, K. and Rajewsky, N. (2007) The Evolution of Gene Regulation by Transcription Factors and MicroRNAs. *Nature Reviews Genetics*, **8**, 93-103. <https://doi.org/10.1038/nrg1990>
- [3] Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., *et al.* (2005) MicroRNA Expression Profiles Classify Human Cancers. *Nature*, **435**, 834-838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>
- [4] Porkka, K.P., Pfeiffer, M.J., Waltering, K.K., Vessella, R.L., Tammela, T.L.J. and Visakorpi, T. (2007) MicroRNA Expression Profiling in Prostate Cancer. *Cancer Research*, **67**, 6130-6135. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-0533>
- [5] Mellis, D. and Caporali, A. (2017) MicroRNA-Based Therapeutics in Cardiovascular Disease: Screening and Delivery to the Target. *Biochemical Society Transactions*, **46**, 11-21. <https://doi.org/10.1042/bst20170037>
- [6] Snowwhite, I.V., Allende, G., Sosenko, J., Pastori, R.L., Messinger Cayetano, S. and Pugliese, A. (2017) Association of Serum Micrornas with Islet Autoimmunity, Disease Progression and Metabolic Impairment in Relatives at Risk of Type 1 Diabetes. *Diabetologia*, **60**, 1409-1422. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4294-3>
- [7] 李敬文. 基于银纳米簇和核酸等温扩增策略的 microRNA 检测[D]: [硕士学位论文]. 济南: 济南大学, 2022.
- [8] Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E.F. and Hellens, R.P. (2007) Protocol: A Highly Sensitive RT-PCR Method for Detection and Quantification of MicroRNAs. *Plant Methods*, **3**, 12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
- [9] Freeman, W.M., Walker, S.J. and Vrana, K.E. (1999) Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. *BioTechniques*, **26**, 112-125. <https://doi.org/10.2144/99261rv01>
- [10] Gerry, N.P., Witowski, N.E., Day, J., Hammer, R.P., Barany, G. and Barany, F. (1999) Universal DNA Microarray Method for Multiplex Detection of Low Abundance Point Mutations. *Journal of Molecular Biology*, **292**, 251-262. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3063>
- [11] Workman, C., Jensen, L.J., Jarmer, H., Berka, R., Gautier, L., *et al.* (2002) A New Non-Linear Normalization Method for Reducing Variability in DNA Microarray Experiments. *Genome Biology*, **3**, Article No. research0048.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-9-research0048>
- [12] He, S.L. and Green, R. (2013) Northern Blotting. *Methods in Enzymology*, **530**, 75-87. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420037-1.00003-8>
- [13] Yin, P., Choi, H.M.T., Calvert, C.R. and Pierce, N.A. (2008) Programming Biomolecular Self-Assembly Pathways. *Nature*, **451**, 318-322. <https://doi.org/10.1038/nature06451>
- [14] Li, B., Jiang, Y., Chen, X. and Ellington, A.D. (2012) Probing Spatial Organization of DNA Strands Using Enzyme-Free Hairpin Assembly Circuits. *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 13918-13921. <https://doi.org/10.1021/ja300984b>
- [15] Duan, Z., Li, Z., Dai, J., He, H. and Xiao, D. (2017) Nucleotide Base Analog Pyrrolo-Deoxycytidine as Fluorescent Probe Signal for Enzyme-Free and Signal Amplified Nucleic Acids Detection. *Talanta*, **164**, 34-38. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.079>
- [16] Li, Q., Zeng, F., Lyu, N. and Liang, J. (2018) Highly Sensitive and Specific Electrochemical Biosensor for Microrna-21 Detection by Coupling Catalytic Hairpin Assembly with Rolling Circle Amplification. *The Analyst*, **143**, 2304-2309. <https://doi.org/10.1039/c8an00437d>
- [17] Chen, C., Li, N., Lan, J., Ji, X. and He, Z. (2016) A Label-Free Colorimetric Platform for DNA via Target-Catalyzed Hairpin Assembly and the Peroxidase-Like Catalytic of Graphene/Au-NPs Hybrids. *Analytica Chimica Acta*, **902**, 154-159. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.030>
- [18] Xu, H. and Suslick, K.S. (2010) Water-Soluble Fluorescent Silver Nanoclusters. *Advanced Materials*, **22**, 1078-1082. <https://doi.org/10.1002/adma.200904199>