XXXX DOI:

# 基于滚环扩增的信号放大和输出策略

徐含青[1],吴显兰[1],肖 婷[1],高铭萱[2]
(1.陆军军医大学第一附属医院检验科,重庆 400038;2.陆军军医大学第一附属医院临床医学研究中心,重庆 400038)

【摘 要】滚环扩增(rolling circle amplification,RCA)作为一种高效的等温核酸扩增技术,已成为生物传感与分子诊断领域的核心工具之一。通过对RCA信号放大和信号输出的灵活设计,可明显提升扩增效率,提高检测灵敏度,还可以通过不同的信号转换策略满足不同的应用需求。本综述从核酸扩增和信号输出两个维度,系统梳理了改良RCA扩增、RCA协同其他等温扩增以及RCA协同成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins,CRISPR/Cas)系统的设计策略,并剖析了各种输出模式的信号转换设计思路,以期为基于RCA的生物分子检测体系的设计与优化提供思路与指导。

【关键词】滚环扩增;信号放大;信号输出;设计策略
【中图分类号】R331 【文献标志码】A

# Signal amplification and output strategies based on rolling circle amplification

*Xu Hanqing[1], Wu Xianlan[1], Xiao Ting[1], Gao Mingxuan[2]*
*(1.Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Army Medical University)*

**【Abstract】**Rolling circle amplification (RCA), as a highly efficient isothermal nucleic acid amplification technique, has become one of the core tools in the field of biosensing and molecular diagnostics. Through flexible engineering of RCA signal amplification and signal transduction, this approach not only significantly enhances amplification efficiency and detection sensitivity, but also caters to diverse application requirements via distinct signal conversion strategies. Starting from the two dimensions of nucleic acid amplification and signal output, this article systematically reviews the design strategies for modified RCA amplification, RCA combined with other isothermal amplification methods, and RCA combined with clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins (CRISPR/Cas) systems, and it also summarizes and analyzes the ideas of signal conversion design for various output modes, in order to provide insights and guidance for the design and optimization of RCA-based biomolecular detection systems.

**【Key words】**rolling circle amplification; signal amplification; signal output; design strategies

滚环扩增(rolling circle amplification,RCA)是生物传感与分子诊断的核心工具,其反应体系仅需1条引物和1个环形模板,原理简单:在恒温条件下,引物在DNA聚合酶作用下沿环形模板循环复制延伸,最终生成与模板序列互补、包含成千上万个重复单元的不间断长链产物。该技术的核心优势之一源于其高可编程性——引物和模板的灵活设计赋予了RCA操作简便、高效扩增、易与其他技术对接、信号输出多样等诸多优势。然而,传统RCA的线性扩增仍无法满足痕量靶标检测的高要求。因此,大量研究在构建基于RCA的生物分子检测体系时常基于以上技术优势去提升其扩增效率,包括通过对RCA引物和模板的设计将线性RCA扩增改良为指数RCA扩增;将RCA与其他等温扩增结合实现双重或多重扩增;与信号放大策略结合提高信号转化效率等。此外,RCA的信号输出方式可根据不同应用场景灵活设计。目前荧光、颜色、电化学、化学发光、拉曼、太赫兹(terahertz,THz)乃至光声、光热等信号都可有效接入,为其在不同领域的应用提供了广泛适配性。

本综述从核酸扩增和信号输出两个维度切入,聚焦扩增效能的提升策略、多技术协同的范式设计以及多种信号输出的实践应用,对信号扩增和输出过程中的设计思路进行了系统的梳理与分析。

## 1 信号扩增过程的设计

RCA扩增分为改良RCA扩增和协同RCA扩增两大类。前者是对RCA的引物或环形模板进行设计,将传统线性RCA扩增改良为指数RCA扩增;后者是将RCA与其他等温扩增或信号放大策略结合,提高信号放大效率。

作者介绍:徐含青,Email:22554227@qq.com,
研究方向:核酸纳米技术、分子诊断。
通信作者:高铭萱,Email:mingxuan_gao@tmmu.edu.cn。
基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:32371473);重庆市自然基金面上资助项目(编号:CSTB2023NSCQ-MSX0819)。

### 1.1 改良RCA扩增

改良RCA分为针对引物和针对模板两类设计。针对引物的设计中，超分支滚环扩增（hyperbranched rolling circle amplification，HRCA）应用最为广泛。其通过增加一条反向引物，使RCA产物链上形成超分支扩增，可显著提升扩增效率[1]。在此基础上，Dean FB等[2]设计了多条引物同步启动的HRCA（图1A），进一步提高了扩增效率。基于相同原理，将反向引物设计为发夹探针，发夹通过与RCA产物结合而打开，并作为引物与环形模板结合继续触发RCA，由此可形成多重RCA扩增（图1B）[3]。

针对模板的设计中，引入限制性内切酶或切刻酶位点十分常用。在模板链中引入一个或多个酶切位点，可使RCA产生的串联重复单链在指定位点断开，形成大量短单链序列。如图1C，RCA产物在限制性内切酶作用下断开，并被连接成大量单体环，继而以单体环为模板进行下一轮RCA，由此形成大量平行扩增，产物浓度比聚合酶链式反应高约100倍[4]。更常用的策略是在环形模板中引入切刻酶位点。环形模板中的切刻酶位点，通常是与之互补的RCA产物链断裂，而环形模板保持完整。断裂的RCA产物可作为引物与环形模板结合进一步引发RCA，实现信号指数放大[5-6]。若在环形模板中设计多个切刻酶位点，RCA产物可被切割成多条具有不同功能的DNA单链。这些单链除了作为引物触发RCA外，还可作为信号分子进行信号输出或触发下游实验设计的启动。如图1D，切割RCA产物产生的大量单链通过链置换移除了金纳米粒子（gold nanoparticle，AuNP）表面脱氧核酶（deoxyribozyme，DNAzyme）步行器的阻滞链L，从而激活其酶切活性，实现了同一DNAzyme组件对多靶标的高灵敏、高特异分析[7]。

引入酶切位点的设计需在RCA体系中加入限制性内切酶或切刻酶。若将DNAzyme设计到RCA产物中，RCA产物在无蛋白酶参与下就具有酶切活性，这类设计也被广泛应用到模板的设计中[8-9]。如图1E，DNAzyme反馈扩增（DNAzyme feedback amplification，DFA）系统由引物（DNA primer，DP）、环形模板（circular DNA template，CDT）和作为DNAzyme底物的含RNA的DNA序列（RNA-containing DNA sequence，RDS）组成，其中CDT中设计了DNAzyme的反义序列。DFA中包含2种特殊编程的DNA复合物，一种是DP和CDT组成的复合物Ⅰ，另一种是RDS和CDT组成的复合物Ⅱ。RCA在复合物Ⅰ中启动，其产物含重复串联DNAzyme元件，这些元件切割复合物Ⅱ的RDS，触发复合物Ⅱ的RCA启动。该反应回路循环进行，实现了RCA的指数扩增，灵敏度比传统方法提高3~6个数量级。

### 1.2 RCA协同其他等温扩增技术

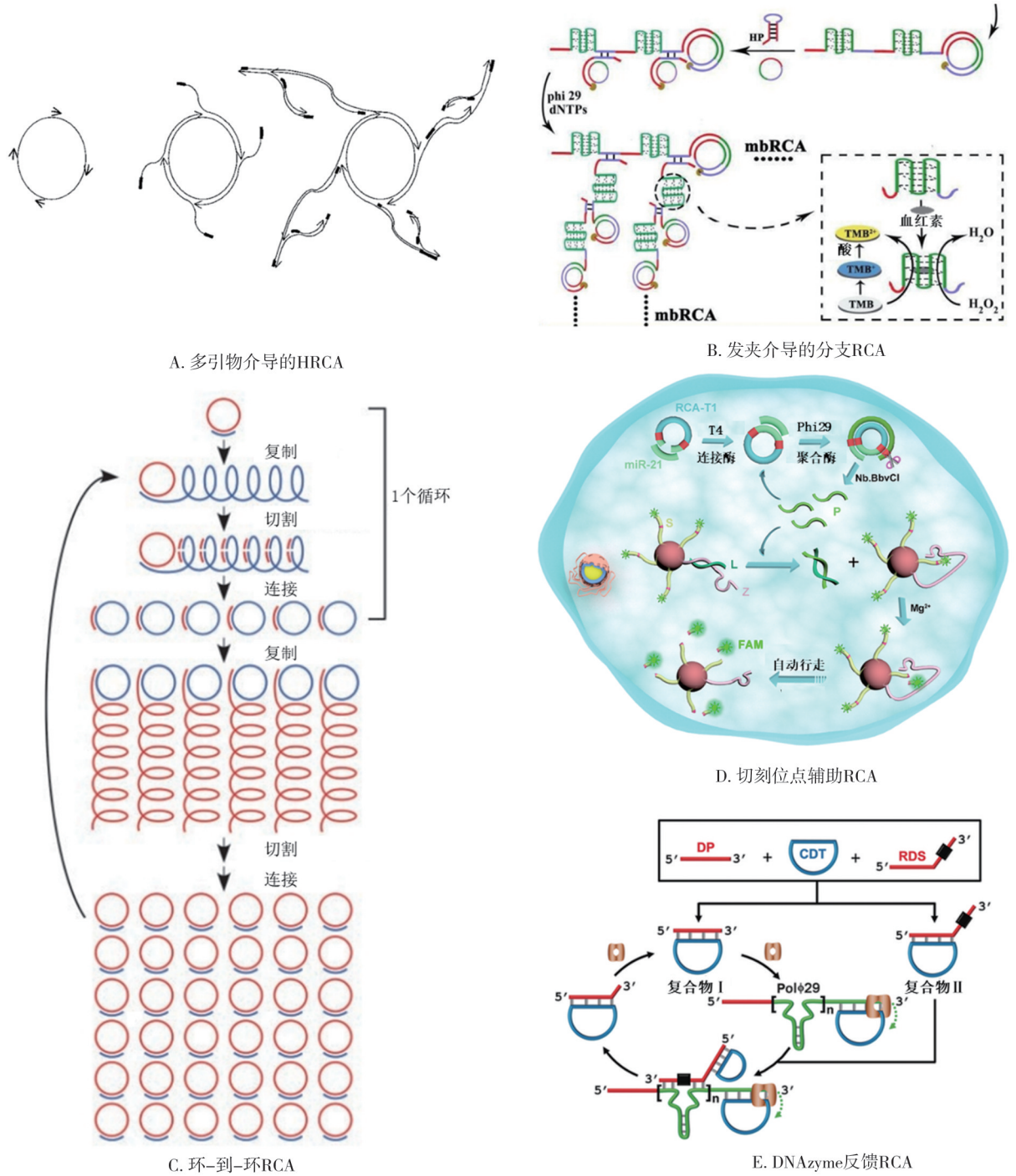
RCA具有良好的兼容性，能与各种等温扩增技术协同，其中结合最多的是链置换扩增（strand displacement amplification，SDA）。RCA与SDA的协同扩增分为SDA触发RCA和RCA触发SDA两种策略。前者由SDA产生的DNA单链作为引物触发RCA[10-11]或调节RCA引物的可用性[12]。如图2A，磁珠表面的SDA反应启动后产生大量单链ST，在电极上打开发夹H2以触发RCA，实现了对靶标的灵敏检测。后者由RCA产物作为SDA的扩增模板，设计原理与切刻位点辅助RCA类似，需要在环形模板上设计切刻酶位点。当RCA产生带有切刻位点的长重复串联序列后，其可作为模板链启动SDA[13]。

环介导恒温扩增（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）在靶向特定RNA位点时具有挑战性，而RCA的高特异性正好弥补其不足。如图2B，锁式探针可有效识别无N6-甲基腺苷（N6-methyladenosine，m6A）修饰的RNA靶标，并有效环化启动RCA，随后以RCA产物为模板触发LAMP。RCA和LAMP两种扩增技术结合，实现了等温条件下低至100 aM的目标RNA上m6A修饰的超灵敏定量测定[14]。

RCA与重组酶聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification，RPA）的协同常伴随成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白（clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins，CRISPR/Cas）系统的参与[15-16]。如图2C，靶标存在时RPA产生大量双链DNA序列激活CRISPR/Cas12a，活化的Cas12a不仅顺式切割激活物（RPA产物），而且反式切割RCA引物，阻止RCA的发生。有研究报道的RPA与RCA协同检测单碱基突变的策略中，将RPA扩增产物与CRISPR/Cas9系统结合，激活的Cas9切割双链RPA产物，释放单链DNA作为锁式探针的引物触发RCA[17]。

与催化发夹自组装（catalytic hairpin assembly，CHA）的协同可以是CHA触发RCA[17-18]，也可以是RCA触发CHA[19-21]，也是RCA触发CHA，CHA再触发RCA的循环过程[22]。CHA触发RCA的设计如图2D：靶标触发CHA产生Y形纳米结构（Y-shaped DNA nanostructure，YSDN），该YSDN的3个末端作为锁式探针的引物触发RCA，产生大量以YSDN为核心，RCA产物为长足的步行器（Y-shaped walker with abundant recognition domains，YSWARD）。因RCA模板中设计了DNAzyme互补序列，步行器的长足可自主移动并切割底物产生电信号。RCA触发CHA的设计，常为RCA的产物链打开H1发夹，继而打开H2实现信号输出或循环触发RCA。如Li YM等设计的RCA与CHA自发交叉激活自催化DNA电路，RCA触发CHA产生大量H1-H2双链，其一端产生荧光信号，另一端形成与环形模板互补的T形序列持续触发RCA，RCA和CHA的交叉启动获得了指数信号增益。

与杂交链式反应（hybridization chain reaction，HCR）的协同扩增中，以RCA触发HCR的设计为主。此类设计中，可将RCA产物切割成打开H1发夹的短链[23]，也可直接使用RCA产物打开发夹，使HCR产物在RCA产物链上生长[24]。较创新的设计（图2E），以脂质胶束表面的DNA链为引物触发RCA，并以此RCA长链产物为反应轨道，由靶标触发固定在轨道上的H1和H2发夹发生HCR。该设计显著增加了HCR探针的局部浓度，为其反应提供了有效的空间限制[25]。HCR触发RCA时常在HCR产物中设计RCA的引物。如Li WN等[26]设计的HCR触发RCA的双重扩增，H1和H2发夹级联打开，其中H1发夹打开后，其一端游离到H1-H2双链骨架之外成为引物触发RCA。




A. 多引物介导的HRCA　　B. 发夹介导的分支RCA

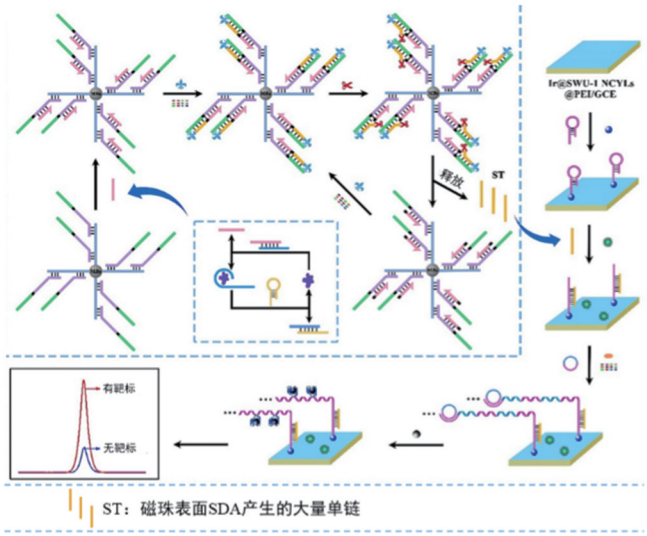
C. 环-到-环RCA　　D. 切刻位点辅助RCA

E. DNAzyme反馈RCA

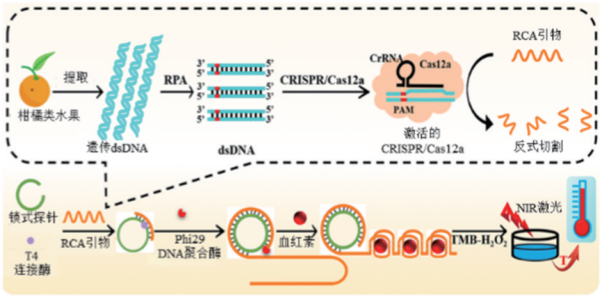
**图1　改良RCA扩增策略**

### 1.3　RCA协同CRISPR/Cas系统

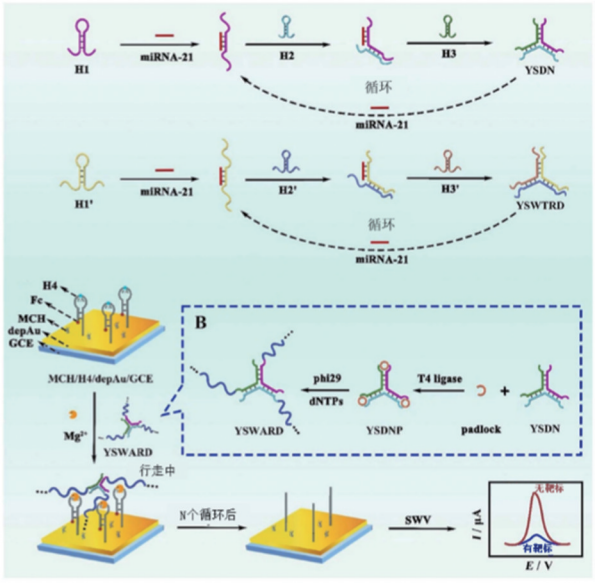
CRISPR/Cas系统的切割功能可通过调节引物的可用性触发RCA。Liu J等[27]利用CRISPR/Cas9切割循环肿瘤DNA，暴露单链DNA末端作为引物启动RCA（图3A）。Ma LR等[28]将与RCA引物互补的单链DNA指定为CRISPR-Cas12a的反式切割底物。当靶标存在时，其激活CRISPR-Cas12a导致底物单链DNA被切割，引物得以启动RCA（图3B）。更多时候，CRISPR/Cas系统作为信号报告策略参与RCA。RCA产物可直接作为CRISPR/Cas的底物激活其切割活性，实现信号探针的切割和信号输出。为了获得更佳的灵敏度，Zhou SY等[29]将切刻酶辅助的RCA与CRISPR/Cas12a结合，如图3C，RCA的短链DNA产物不但可触发RCA的指数扩增，还可同时激活CRISPR/Cas12a切割荧光探针。Liu RF等[30]利用切刻酶辅助RCA的短链产物S打开电极表面标记有信号淬灭剂的发夹H1，形成SH1双链DNA。SH1与CRISPR/Cas12a结合并激活其顺式和反式切割活性，电极表面SH1和H1被同时切割，信号淬灭剂从电极表面分离，光电信号显著升高，实现对靶标的检测（图3D）。



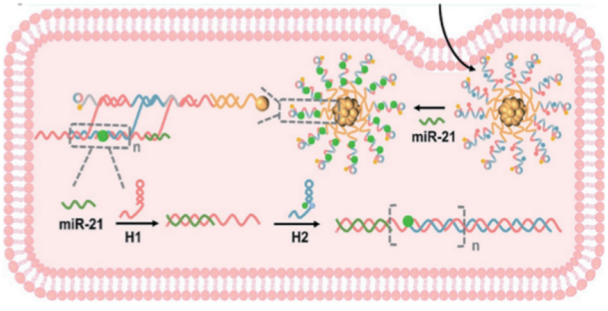

A. RCA协同SDA



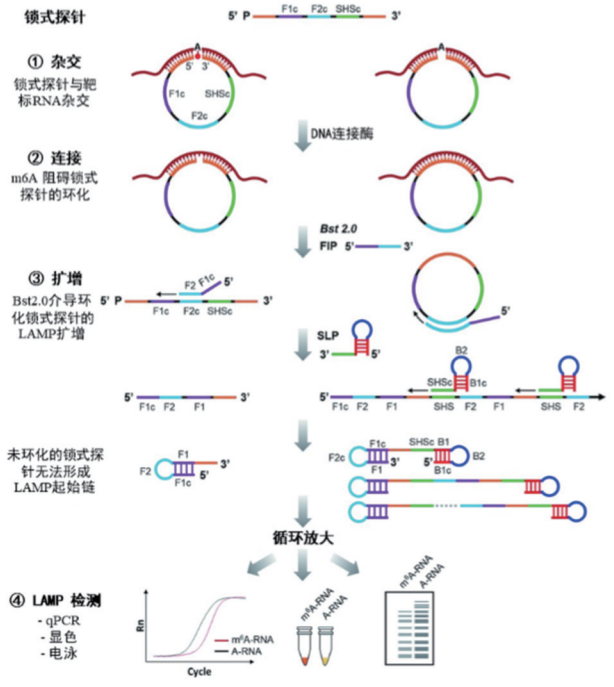

C. RCA协同RPA




D. RCA协同CHA




E. RCA协同HCR




B. RCA协同LAMP

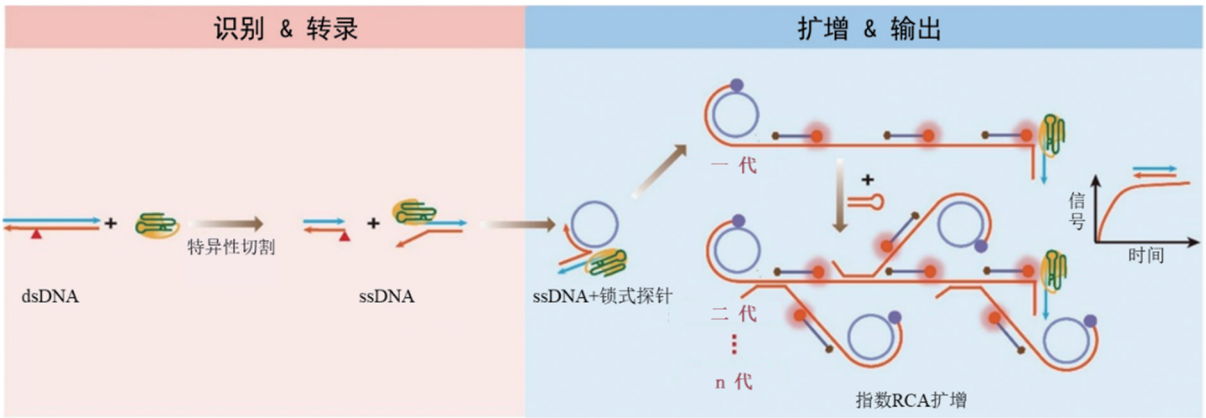
图2 RCA协同其他等温扩增技术

## 2 信号输出过程的设计

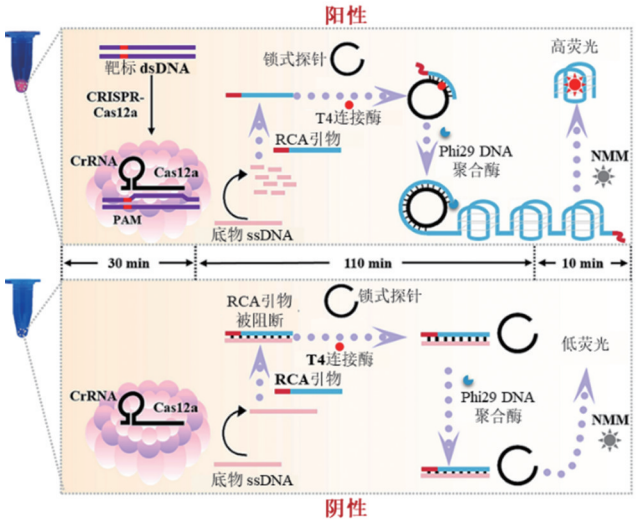
### 2.1 荧光信号输出

荧光信号是最常用的输出信号之一。将核酸荧光探针与RCA产物链杂交是一种简单而有效的荧光输出策略[31-32]。该策略使RCA产物呈现强荧光信号，可直接通过荧光仪检测，也可与微球或磁珠结合，用流式细胞分析仪进行高通量分析。如图4A，特异性抗体偶联的磁珠捕获外泌体，随后被捕获的外泌体与包含其适配体的DNA引物结合并触发RCA，其产物与荧光探针杂交后使用流式细胞仪进行分析，实现了外泌体表面蛋白标志物的检测。将荧光分子直接标记在合成RCA的dNTP上，是与荧光探针类似的点亮RCA产物的方式，由此合成的RCA产物将自带强荧光信号[33-34]。

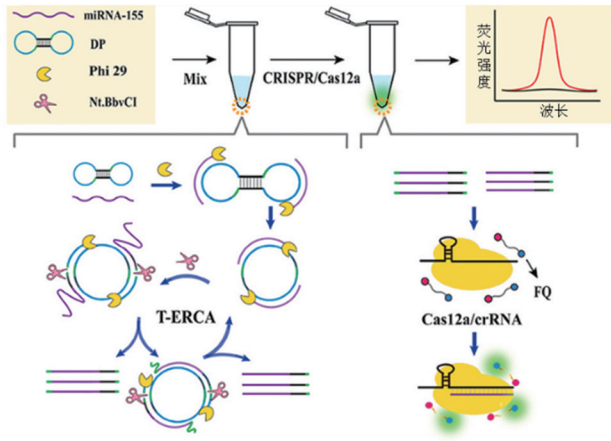
将RCA产物设计成串联的DNAzyme，通过裂解荧光探针实现荧光信号的恢复也是输出荧光信号的有效方式[35-36]。如图4B，当靶标存在时，m6A-RNA被特异性去甲基化并作为引物触发RCA，产生大量$Mg^{2+}$依赖性DNAzyme，将同时标



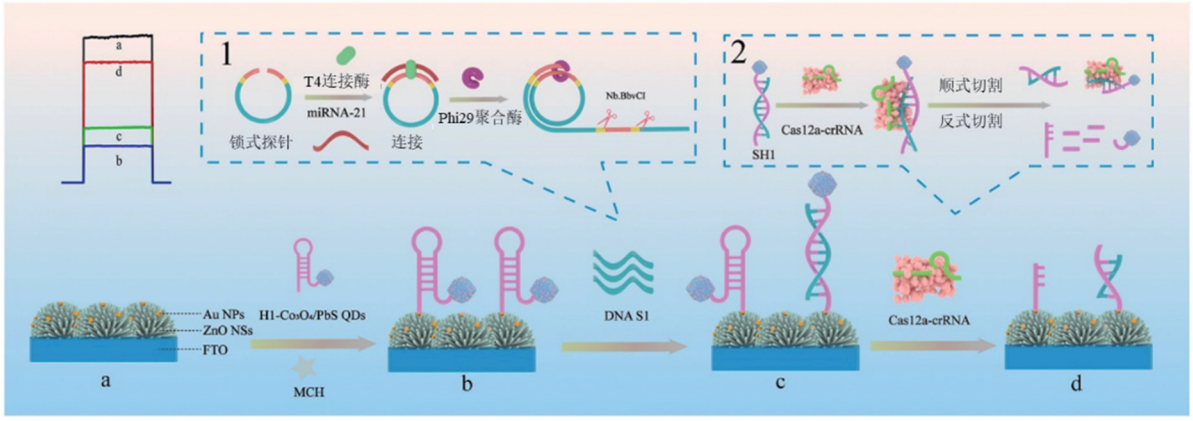

A. CRISPR/Cas9切割靶标触发RCA




B. 靶标激活CRISPR/Cas12a切割引物阻断剂触发RCA




C. 切刻酶辅助RCA激活CRISPR/Cas12a切割信号探针




D. 切刻酶辅助RCA触发CRISPR/Cas12a双切割信号放大

**图3 RCA协同CRISPR/Cas系统**

有猝灭基团和荧光基团的信号探针进行裂解，释放的荧光分子通过单分子成像精确计数，实现了阿摩尔级的高灵敏检测。

将RCA产物设计成G四链体（G-quadruplex，G4）也可实现荧光信号的输出。硫黄素T（thioflavin T，ThT）是一种苯并噻唑染料，可与具有β片结构的生物分子特异结合并产生强荧光信号[37-38]。为实现信号增强，Peng YB等[39]在RCA产物中设计了G4二聚体。如图4C，DNAzyme在$Pb^{2+}$存在时切割底物链释放其酶链（E-DNA）以启动RCA，产生大量G4二聚体作为信号换能器。与G4单体相比，G4二聚体在与ThT结合时表现出显著增强的荧光信号。G4可以产生荧光，也可以猝灭荧光。如Ge J等[40]将G4与血红素结合，催化邻苯二胺氧化成有色产物2,3-二氨基吩嗪，通过$MoS_2$量子点（quantum dot，QD）的荧光猝灭进行信号输出。

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer,FRET)是一种基于分子间距离和方向依赖性的能量传递现象,由此构建的荧光信号输出策略已被广泛使用[11,41-42]。大多FRET的荧光信号输出都基于1个供体和1个受体间的能量转移,聚芴衍生物可与作为FRET受体的多个染料分子偶联,同时实现多个FRET过程(图4D),RCA产物同时与氨基标记的辅助探针和荧光探针结合。辅助探针上的氨基用于与羧基化的聚芴衍生物结合,使荧光标记的RCA产物固定于聚芴衍生物上。当两种靶标触发的RCA产物标记着不同的荧光探针(受体)与聚芴衍生物(供体)结合时,聚芴衍生物的激发光可以同时激发两种荧光探针,实现对两种靶标荧光信号的同时分析。

### 2.2 颜色信号输出

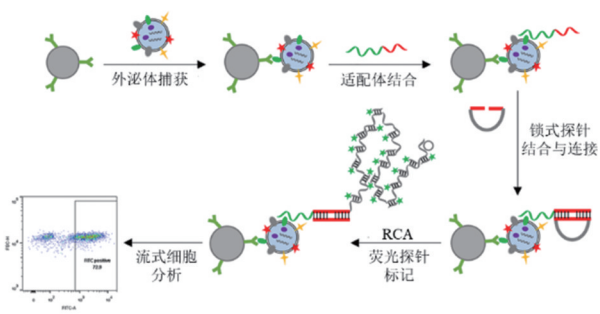
颜色信号可直接用肉眼进行观察,该输出模式可用于快速即时检验(point-of-care testing,POCT)的设计。RCA产物形成的G4与血红素结合可形成具有类过氧化物酶活性的复合物,以此催化底物显色是最常见的显色方式之一[26,43-44]。如图5A,靶标触发RCA产生串联G4,其形成的类过氧化物酶可催化3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine,TMB)显色,通过颜色变化可实现靶标的可视化和半定量检测。此外,还可用具有催化功能的蛋白酶标记RCA产物,使其具有催化显色功能。如图5B,RCA产物先与生物素标记的核酸探针杂交,随后链霉亲和素标记的蛋白酶与之结合,实现了对底物的催化显色[45]。

除了催化显色,利用AuNPs聚集过程中颗粒间等离子体耦合导致的颜色变化也很受欢迎。Xia S等[46]利用阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide,CTAB)会导致带负电荷的AuNPs聚集的特性,设计了腺苷检测体系。该设计中,腺苷与适配体结合后释放锁式探针末端,触发磁珠表面的RCA。CTAB通过静电相互作用与RCA产物链结合并被移除,抑制了其对AuNPs的聚集作用,使AuNPs保持分散而呈红色(图5C)。除了调控AuNPs的聚集,直接用商业胶体金试纸条检测的方式也被开发出来。如图5D,以HCG-探针为信号探针,在靶标触发RCA-HCR双重扩增后,CRISPR/Cas系统识别扩增产物,对信号探针进行切割,释放HCG用于标准商业HCG试纸条检测。

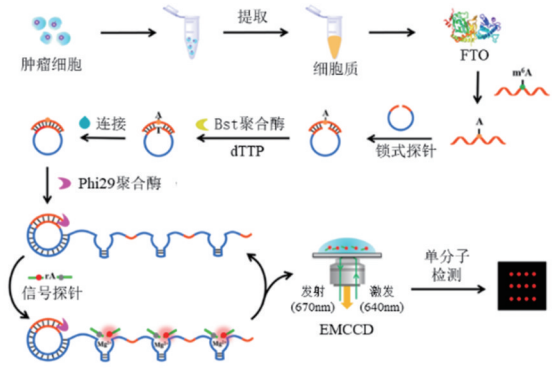
### 2.3 电化学和电化学发光信号输出

基于RCA的电化学信号设计,最简单的方式是在RCA产物中直接掺入电化学信号分子。如将二茂铁-酪胺探针与RCA产物结合[47]、将亚甲蓝(methylene blue,MB)嵌入双螺旋RCA产物中[48]。基于MB信号,Kong LQ等[49]设计了一种比率电化学传感器。如图6A,靶标触发的SDA产生大量S1和过量$Zn^{2+}$。当S1通过Au-S键合修饰到电极上时,功能化的DNA纳米球(DSP)可通过RCA原位生成,以捕获丰富的MB信标,产生显著的电化学信号(强信号,$I_1$)。随后,在过量$Zn^{2+}$的存在下,由DNAzyme和底物序列组装的功能性DSP被降解,以释放MB并获得低电化学响应(弱信号,$I_2$)。因此,通过测量$I_1/I_2$的比率,可以灵敏和准确地检测靶标。

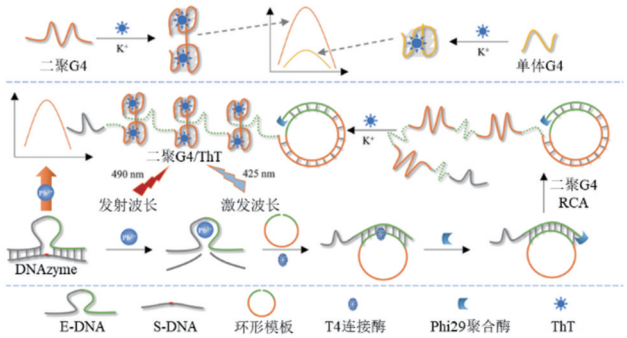
电极表面氧化还原反应也是产生电化学信号的有效途径。如图6B,被检测的2条靶基因分别用于锁式探针的环化



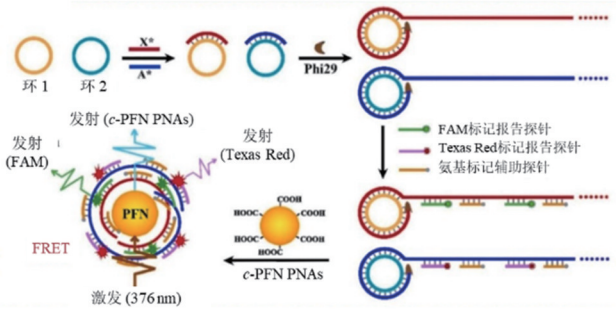

A. 流式细胞术分析固相RCA信号




B. DNAzyme辅助RCA的荧光单分子监测

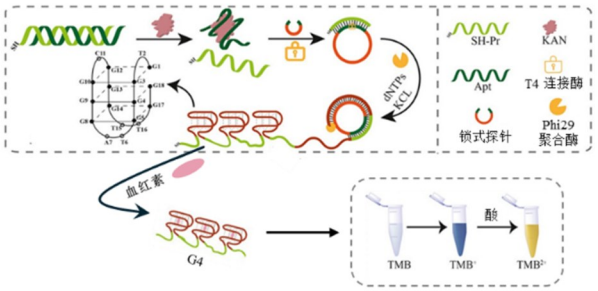



C. 基于RCA的二聚体G4荧光检测

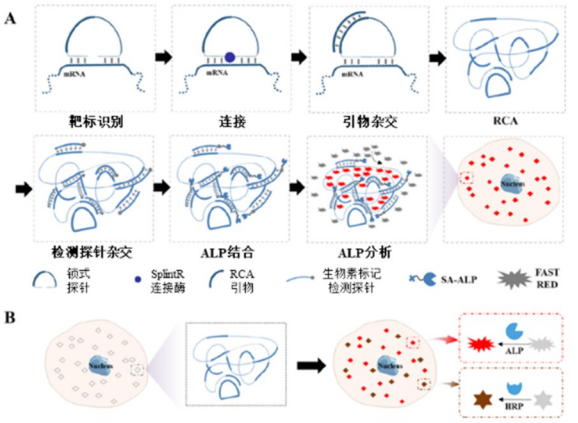



D. 基于聚芴衍生物的多重FRET同步分析

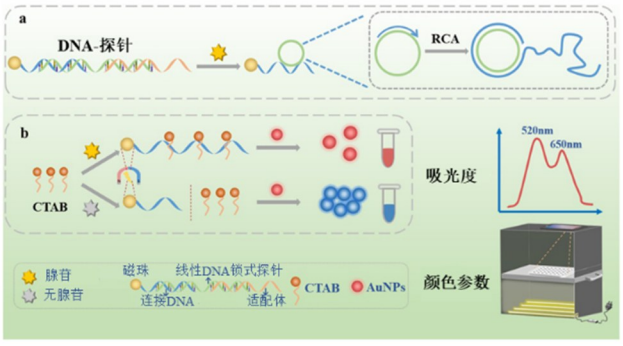
图4 荧光信号输出



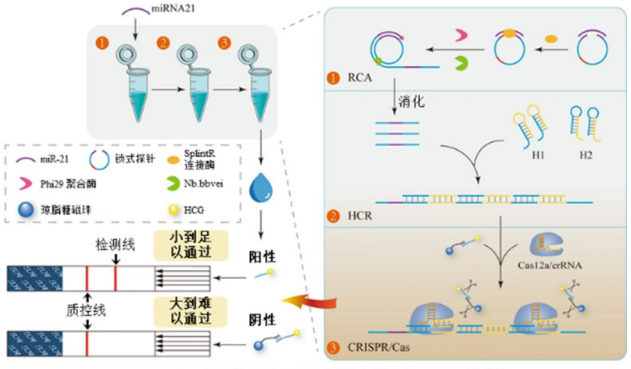

A. 基于G4结构的催化显色




B. 基于酶标记探针的RNA原位显色




C. 表面活性剂介导的AuNPs比色




D. 基于商业HCG试纸条的POCT检测

**图5 颜色信号输出**

反应和电极上探针的结合。2条靶基因共存时触发RCA产生串联的G4，G4与血红素结合后可催化TMB与过氧化氢产生显著增强的电化学电流响应[50]。快速检测血糖仪是基于葡萄糖氧化酶(glucose oxidase，GOx)的商品化电化学POCT设备。GOx催化葡萄糖生成葡萄糖酸和过氧化氢，后者在电极表面发生氧化反应，产生的电流大小与葡萄糖的浓度成正比。将靶标与葡萄糖浓度关联，即可利用血糖仪对靶标定量检测。转化酶是一种能催化蔗糖水解为葡萄糖和果糖的酶。将其与DNA探针连接，可建立靶标与葡萄糖的关联，用于各种靶标的检测。如图6C，靶标与包被有抗原的磁珠(magnetic microparticle probes，MMPs)竞争结合AuNP复合物(gold nanoparticle probes，GNPrs)，随后用外部磁场将GNPr-MMP复合物分离，并触发其表面的RCA反应。RCA产物与偶联转化酶的DNA探针杂交，使转化酶富集。此时加入蔗糖，其可被水解为葡萄糖用血糖仪定量分析[51]。

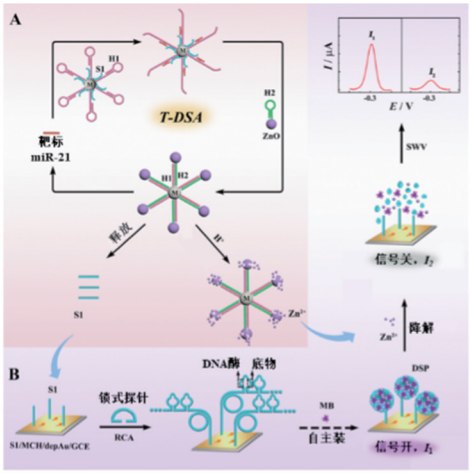
电化学发光(electrochemiluminescence，ECL)是通过电化学反应产生激发态物质，这些物质在返回基态时释放荧光光子。贵金属纳米团簇因低生物毒性、良好生物相容性和优异光电化学性能，被广泛用于ECL生物传感领域中。Hong LR等[52]将RCA产物设计为富胞嘧啶序列，吸附银离子形成银纳米簇(silver nanoclusters，Ag NCs)，并采用铜基金属有机框架作为Ag NCs的共反应促进剂，显著改善了Ag NCs的电化学发光信号。Zhang YT等[53]将金-银合金纳米簇(gold-silver alloy nanoclusters，AuAg NCs)作为发光体预先封装于固定在电极上的DNA水凝胶中。靶标触发的RCA产物可激活CRISPR/Cas12a的反式切割活性，实现对水凝胶中DNA链的切割，释放封装其中的AuAg NCs，使ECL信号降低(图6D)。此外，将具有高稳定性的碳氮化物(carbon nitride，$C_3N_4$)与QD偶联也是开发高性能ECL材料的有效策略。如Zhang LN等[19]提出了一种将高结晶$C_3N_4$纳米花与$C_3N_4$量子点结合的方法，通过高度结晶的$C_3N_4$纳米材料的掺入显著增强了光电信号。

### 2.4 其他信号输出

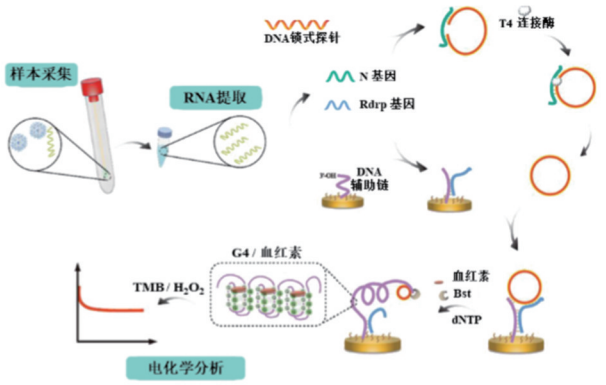
表面增强拉曼散射(surface-enhanced raman scattering，SERS)是超灵敏的非侵入性检测指纹光谱。Li JX等[54]使用具有优异光学性能和稳定性的罗丹明X探针标记RCA产物，用于SERS信号的增强和检测。Li GH等[55]将具有过氧化物酶样活性的铁基纳米酶与AuNPs形成纳米杂化物，使其表现出显著的SERS活性和过氧化物酶催化活性，实现了SERS和比色双信号检测。

THz波是频率在0.1~10 THz的电磁波，其对生物分子相互作用具有高敏感性和高信噪比。Zhan XY等[56]用生物素修饰的dUTP作为RCA扩增原料，使其产物与链霉亲和素功能化的THz超材料结合，通过THz波的频移实现了对外泌体miRNA的超灵敏检测。

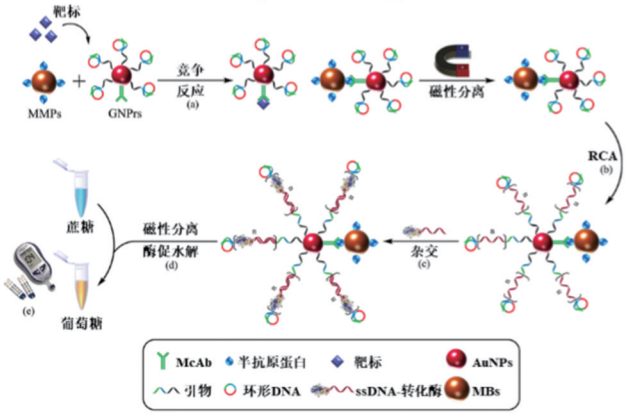
此外，基于RCA的信号输出还包括上转换发光、光声、光热等。Zhan Y等[57]将上转换纳米颗粒与核酸探针结合用于标记RCA产物，实现了肿瘤抗原的特异性细胞成像。



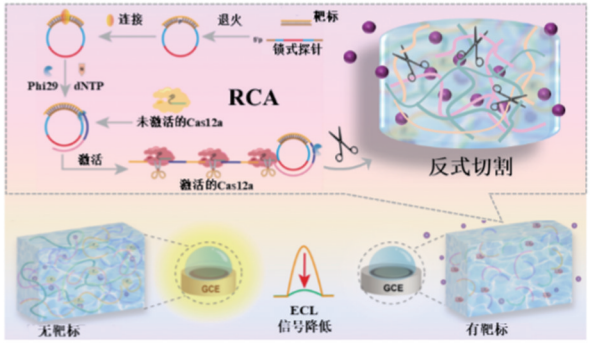

A. 基于MB信号的电化学传感




B. G4/血红素催化TMB的电化学传感




C 基于血糖仪的电化学传感




D. 基于DNA水凝胶的ECL传感

**图6 电化学和电化学发光信号输出**

Xiao JY 等[58]利用HRCA产生的单链扩增子聚集核酸探针修饰的AuNPs，由于表面等离子体共振偏移和激光诱导纳米气泡的大小依赖性效应，其在640 nm处诱导出强光声信号。TMB的单电子氧化产物（oxidized 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine，oxTMB）在近红外（near-infrared，NIR）激光照射下表现出很强的光热效应。Long XQ 等[59]将RCA产物中的G4与血红素结合，催化TMB为oxTMB，根据NIR激光照射后溶液的不同温度，实现了赭曲霉毒素A的定量检测。

## 3 总结与思考

传统线性RCA扩增效率有限，常不能很好满足痕量分析物对检测灵敏度的高需求，因此，基于RCA的改良和协同扩增策略被广泛开发出来。改良RCA扩增可通过增加引物触发HRCA或多引物RCA；也可以通过在环形模板中设计酶切位点，将连续线性的RCA产物切割成短链模板或引物，触发多重RCA。协同RCA扩增常将RCA与其他一种或多种等温扩增技术结合，或（和）协同CRISPR/Cas进行信号放大。通过巧妙的设计，多种扩增策略间可相互触发，构建超灵敏的检测系统。但值得注意的是，当检测体系中并存多个扩增系统的元件时，序列间的结构串扰常难以避免，显著增加探针设计的复杂性。通过深度学习和建模辅助多重扩增体系的探针设计，可有效借助AI赋能提高设计的效率和成功率[60]，加速精准诊疗技术的发展。

基于RCA的信号输出方式灵活、多样，选择何种信号取决于检测体系的应用场景。如，偶联微球的固相RCA通过标记荧光标签可以使用流式细胞仪实现高通量快速检测；将RCA产物中的G4与血红素结合催化TMB显色可实现肉眼判读结果的现场检测；将转化酶与RCA产物结合，可用血糖仪实现POCT的精准定量。锚定实践应用中的痛点问题，将精准高效的体系设计与灵活多样的信号设计相结合，可有效推动分子诊断技术在癌症早筛、感染性疾病联合诊断、食品安全监测等领域的应用转化。

**利益冲突：**

**作者贡献声明：**

## 参 考 文 献

[1] Wang K, Bai XN, Xue YY, et al. Absolute quantification of circRNA using digital reverse transcription-hyperbranched rolling circle amplification[J]. Sens Actuat B Chem, 2023, 375: 132893.

[2] Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, et al. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-

primed rolling circle amplification[J]. Genome Res, 2001, 11(6): 1095-1099.

[3] Liu XX, Yang F, Li DX, et al. A ternary probe for target-triggered autonomous multi-branch rolling circle amplification for highly sensitive colorimetric sensing of platelet-derived growth factor BB[J]. Sens Actuat B Chem, 2020, 305: 127405.

[4] Dahl F, Banér J, Gullberg M, et al. Circle-to-circle amplification for precise and sensitive DNA analysis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(13): 4548-4553.

[5] Li XY, Du YC, Zhang YP, et al. Dual functional Phi29 DNA polymerase-triggered exponential rolling circle amplification for sequence-specific detection of target DNA embedded in long-stranded genomic DNA[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6263.

[6] He L, Yu XC, Huang RR, et al. A novel specific and ultrasensitive method detecting extracellular vesicles secreted from lung cancer by padlock probe-based exponential rolling circle amplification[J]. Nano Today, 2022, 42: 101334.

[7] Qi LJ, Zhang XJ, Wu R, et al. Universal detection and imaging for multiple targets by coupling target-primed nicking-enhanced rolling circle amplification with self-powered DNAzyme walker[J]. Anal Chem, 2023, 95(15): 6433-6440.

[8] Liu M, Zhang Q, Chang DR, et al. A DNAzyme feedback amplification strategy for biosensing[J]. Angew Chem, 2017, 129(22): 6238-6242.

[9] Gu Y, Zhang TT, Huang ZF, et al. An exploration of nucleic acid liquid biopsy using a glucose meter[J]. Chem Sci, 2018, 9(14): 3517-3522.

[10] Li CC, Chen HY, Luo XL, et al. Multicolor fluorescence encoding of different microRNAs in lung cancer tissues at the single-molecule level[J]. Chem Sci, 2021, 12(37): 12407-12418.

[11] Zhang YY, Wei J, Zhao JW, et al. Quadruple cascade strand displacement amplification reaction mediated polyfluorene derivative-based multiple FRET for synchronous determination of multiple biomarkers[J]. Sens Actuat B Chem, 2023, 380: 133373.

[12] Yang GM, Zhang JM, Hu SS, et al. Calixarene-based porous coordination compound as microreactors: Enrichment-enhanced electrochemiluminescence of iridium(III) complex for bioanalysis[J]. Chem Eng J, 2023, 465: 142812.

[13] Lee H, Lee H, Hwang SH, et al. Detection of *SARS*-CoV-2 RNA through tandem isothermal gene amplification without reverse transcription[J]. Anal Chim Acta, 2022, 1212: 339909.

[14] Li JX, Zhou JW, Xia Y, et al. Rolling circle extension-assisted loop-mediated isothermal amplification (Rol-LAMP) method for locus-specific and visible detection of RNA N6-methyladenosine[J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(9): e51.

[15] Liu YL, Ma LR, Liu WJ, et al. RPA-CRISPR/Cas12a combined with rolling circle amplification-enriched DNAzyme: a homogeneous photothermal sensing strategy for plant pathogens[J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(11): 4736-4744.

[16] Zhou MY, Wang HY, Li Chao, et al. CRISPR/Cas9 mediated triple signal amplification platform for high selective and sensitive detection of single base mutations[J]. Analytica Chimica Acta, 2022, 1230: 340421.

[17] Zhu L, Zhang XL, Yuan R, et al. Y-shaped walker with abundant recognition domians mediated ultrasensitive electrochemical biosensor for miRNA-21 detection[J]. Sens Actuat B Chem, 2023, 375: 132901.

[18] Zhao JW, Guo Q, Li RF, et al. Step pulse-mediated low-triggering potential electrochemiluminescence of polyfluorene nanoparticles for bioassay[J]. Anal Chem, 2024, 96(45): 17993-18001.

[19] Zhang LN, Zhang ZH, Zheng Y, et al. Cascade nucleic acid amplification - assisted CRISPR/Cas12a electrochemiluminescence biosensor using $C_3N_4$ nanomaterials for sensitive detection of microRNA-320d[J]. Sens Actuat B Chem, 2025, 426: 137140.

[20] Zhang LY, Jin HL, Zhang Z, et al. Triple-helix molecular-switch-actuated rolling circle amplification and catalytic hairpin assembly multistage signal amplified fluorescent aptasensor for detection of aflatoxin B1[J]. Anal Chim Acta, 2024, 1323: 343072.

[21] Liang ZX, Huang X, Tong YL, et al. Engineering an endonuclease-assisted rolling circle amplification synergistically catalyzing hairpin assembly mediated fluorescence platform for miR-21 detection[J]. Talanta, 2022, 247: 123568.

[22] Li YM, Liu CY, Si QY, et al. Construction of an autocatalysis-driven DNA circuit for highly efficient detection of H5N1 oligonucleotide[J]. Sens Actuat B Chem, 2023, 394: 134393.

[23] Li Y, Zeng ZH, Lv XF, et al. A POCT assay based on commercial HCG strip for miRNA21 detection by integrating with RCA-HCR cascade amplification and CRISPR/Cas12a[J]. Mikrochim Acta, 2025, 192(2): 73.

[24] Zhu YQ, Zhou JM, Liang YX, et al. Cas-Rainbow: Cas12a-driven single-reaction multiplex detection system[J]. Chem Eng J, 2024, 480: 148212.

[25] Wei XL, Ye ML, Jia HY, et al. RCA-mediated tandem assembly of DNA molecular probes on lipid particles surface for efficient detection and imaging of intracellular miRNA[J]. Biosens Bioelectron, 2025, 271: 116975.

[26] Li WN, Peng WP, Zhang YT, et al. A lateral flow strip biosensor platform based on cascade nucleic acid amplification technology for ultrasensitive detection of OSCC-associated salivary microRNA[J]. Anal Chim Acta, 2022, 1221: 340112.

[27] Liu J, Wu S, Zhang C, et al. Integrated dual-biomarker detection: Transforming proteins and nucleic acids into ssDNA for enhanced disease diagnosis[J]. Chem Eng J, 2024, 502: 157910.

[28] Ma LR, Xie L, Wu Q, et al. Integrating CRISPR-Cas12a and rolling circle-amplified G-quadruplex for naked-eye fluorescent "off-on" detection of *Citrus Alternaria*[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 262(Pt 2): 129983.

[29] Zhou SY, Sun HM, Dong JB, et al. Highly sensitive and facile microRNA detection based on target triggered exponential rolling-circle amplification coupling with CRISPR/Cas12a[J]. Anal Chim Acta, 2023, 1265: 341278.

[30] Liu RF, Wang XF, Wang SJ, et al. Rolling circle amplification assisted CRISPR/Cas12a dual-cleavage photoelectrochemical biosensor for highly sensitive detection of miRNA-21[J]. Anal Chim Acta, 2024, 1287: 342125.

[31] Chen J, Zhang YF, Chen DP, et al. Toehold-mediated ligation-free rolling circle amplification enables sensitive and rapid imaging of messenger RNAs *in situ* in cells[J]. Anal Chim Acta, 2021, 1160: 338463.

[32] Gao XY, Teng XC, Dai YC, et al. Rolling circle amplification-assisted flow cytometry approach for simultaneous profiling of exosomal surface proteins[J]. ACS Sens, 2021, 6(10): 3611-3620.

[33] Li CC, Chen HY, Hu J, et al. Rolling circle amplification-driven encoding of different fluorescent molecules for simultaneous detection of multiple DNA repair enzymes at the single-molecule level[J]. Chem Sci, 2020, 11(22): 5724-5734.

[34] Liu JY, Zhang LM, Zeng WT, et al. High-throughput quantitative detection of triple-negative breast cancer-associated expressed miRNAs by rolling circle amplification on fluorescence-encoded microspheres[J]. Chin Chem Lett, 2023, 34(9): 108141.

[35] Chen MJ, Li Y, Li P, et al. Ligation-dependent rolling circle amplification method for ATP determination with high selectivity and sensitivity[J]. Analyst, 2021, 146(21): 6605-6614.

[36] Zhao NN, Liu YZ, Zhang LF, et al. Construction of multiple DNAzymes driven by single base elongation and ligation for single-molecule monitoring of FTO in cancer tissues[J]. Anal Chem, 2023, 95(34): 12974-12981.

[37] Sulatskaya AI, Kuznetsova IM, Turoverov KK. Interaction of thioflavin T with amyloid fibrils: fluorescence quantum yield of bound dye [J]. J Phys Chem B, 2012, 116(8): 2538-2544.

[38] Wen J, Fan YY, Li J, et al. A G-triplex and G-quadruplex concatemer-enhanced fluorescence probe coupled with hybridization chain reaction for ultrasensitive aptasensing of ochratoxin A[J]. Anal Chim Acta, 2023, 1272: 341503.

[39] Peng YB, Xue PP, Chen W, et al. Engineering of a DNAzyme-Based dimeric G-quadruplex rolling circle amplification for robust analysis of lead ion[J]. Talanta, 2024, 274: 126029.

[40] Ge J, Hu Y, Deng RJ, et al. Highly sensitive microRNA detection by coupling nicking-enhanced rolling circle amplification with $MoS_2$ quantum dots[J]. Anal Chem, 2020, 92(19): 13588-13594.

[41] Li HK, Cai QQ, Wu D, et al. Fluorescence energy transfer biosensing platform based on hyperbranched rolling circle amplification and multi-site strand displacement for ultrasensitive detection of miRNA[J]. Anal Chim Acta, 2022, 1222: 340190.

[42] Zhang YN, Hou DJ, Wang ZL, et al. Nanomaterial-based dual-emission ratiometric fluorescent sensors for biosensing and cell imaging [J]. Polymers, 2021, 13(15): 2540.

[43] Yu JL, Wu HH, He LY, et al. The universal dual-mode aptasensor for simultaneous determination of different bacteria based on naked eyes and microfluidic-chip together with magnetic DNA encoded probes [J]. Talanta, 2021, 225: 122062.

[44] Gao XL, Sun ZC, Wang XY, et al. Construction of a dual-model aptasensor based on G-quadruplexes generated *via* rolling circle amplification for visual/sensitive detection of kanamycin[J]. Sci Total Environ, 2022, 839: 156276.

[45] Huang RL, Liu K, Yue C, et al. Chromogenic visualization of single RNA molecules *in situ* with duplex capability by rolling circle amplification with alkaline phosphatase[J]. Anal Chem, 2023, 95(32): 12161-12168.

[46] Xia S, Wu WL, Yin FC, et al. Surfactant-mediated colorimetric assay assisted with *in situ* rolling circle amplification on magnetic beads [J]. Anal Chim Acta, 2023, 1278: 341709.

[47] Li HP, Xie XX, Liu XY, et al. Ultrasensitive biosensors detecting m(6)a in blood: achieving early screening and typing of tumors[J]. ACS Sens, 2024, 9(11): 6011-6021.

[48] Niazi M, Azizi A, Khajavi Z, et al. A universal ratiometric method for Micro-RNA detection based on the ratio of electrochemical/electrochemiluminescence signal, and toehold-mediated strand displacement amplification[J]. Anal Chim Acta, 2023, 1257: 341119.

[49] Kong LQ, Li H, Zhang XL, et al. A novel ratiometric electrochemical biosensor using only one signal tag for highly reliable and ultrasensitive detection of miRNA-21[J]. Anal Chem, 2022, 94(12): 5167-5172.

[50] Deng Y, Zhou TC, Peng Y, et al. Dual-gene-controlled rolling circle amplification strategy for SARS-CoV-2 analysis[J]. Anal Chem, 2023, 95(6): 3358-3362.

[51] He F, Li TF, Wang HJ, et al. Glucometer-based biosensor for the determination of ractopamine in animal-derived foods using rolling circle amplification[J]. Mikrochim Acta, 2023, 190(4): 121.

[52] Hong LR, Li W, Lu MY, et al. Simplified rolling circle amplification driven *in situ* generation of electrochemiluminescent silver nanoclusters for APE1 activity monitoring[J]. Sens Actuat B Chem, 2023, 397: 134699.

[53] Zhang YT, Hu C, Yin YS, et al. CRISPR/Cas12a-responsive smart DNA hydrogel for sensitive electrochemiluminescence detection of the huanglongbing outer membrane protein gene[J]. Anal Chem, 2024, 96(28): 11611-11618.

[54] Li JX, Dong C, Gan HY, et al. Nondestructive separation/enrichment and rolling circle amplification-powered sensitive SERS enumeration of circulating tumor cells *via* aptamer recognition[J]. Biosens Bioelectron, 2023, 231: 115273.

[55] Li GH, Pang W, Bian YL, et al. A surface-enhanced Raman scattering and colorimetric dual-mode aptasensor for ultrasensitive detection of kanamycin based on DNA hydrogel network fishing the MIL-101@AuNP nanohybrids[J]. Sens Actuat B Chem, 2024, 414: 135937.

[56] Zhan XY, Yang S, Huang GR, et al. Streptavidin-functionalized terahertz metamaterials for attomolar exosomal microRNA assay in pancreatic cancer based on duplex-specific nuclease-triggered rolling circle amplification[J]. Biosens Bioelectron, 2021, 188: 113314.

[57] Zhan Y, Mao YC, Sun P, et al. Tumor-associated antigen-specific cell imaging based on upconversion luminescence and nucleic acid rolling circle amplification[J]. Mikrochim Acta, 2024, 191(5): 248.

[58] Xiao JY, Yuan CQ, Ding MM, et al. Photoacoustic detection of SARS-CoV-2 spike N501Y single-nucleotide polymorphism based on branched rolling circle amplification[J]. Talanta, 2023, 253: 124047.

[59] Long XQ, Wu Q, Yang L, et al. A photothermal aptasensor based on rolling circle amplification-enriched DNAzyme for portable detection of ochratoxin A in grape juice[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 269(Pt 2): 132279.

[60] Deng BG, Zhang YQ, Qiu GY, et al. NIR-II surface-enhanced Raman scattering nanoprobes in biomedicine: current impact and future directions[J]. Small, 2024, 20(40): e2402235.

(收稿:2025-08-13;修回:2025-11-19;录用:2025-11-19)

(责任编辑:周一青)

本文引用格式:

徐含青,吴显兰,肖婷,等.基于滚环扩增的信号放大和输出策略[J].重庆医科大学学报,DOI:10.13406/j.cnki.cyxb..