

文章编号 1006-8147(2015)06-0521-04

论 著

基于纳米粒子的 TR-FRET 传感器用于 miRNAs 的无扩增检测

张毅, 谭加兴, 叶彦恺, 姜炜, 孙艳华, 沈万秋, 曹海燕, 靳美娜, 秦楠, 段宏泉

(天津医科大学药学院医用化学教研室, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070)

摘要 目的: 建立一种基于纳米粒子的时间分辨(TR)荧光共振能量转移(FRET)生物传感器用于 miRNAs 的无扩增检测。方法: 以寡核苷酸单链 probe I 偶联 $GdF_3:Tb^{3+}$ 纳米粒子作为供体, 以寡核苷酸单链 probe II 偶联金(Au)纳米粒子作为受体, 利用供体与受体之间的 FRET 检测目标 miRNA hsa-miR-122-5p 浓度, 并通过设置多功能酶标仪的检测延迟去除自发荧光背景以提高灵敏度。结果: 该传感器能够高灵敏度、高特异性地检测目标分子, 并且对于光照有良好的耐受性, 而且能够避免自发荧光干扰。对 hsa-miR-122-5p 的检测线性范围为 0.1 fmol/L~100 pmol/L, 与同类型的 RNA 荧光传感器的检测限具有可比性。结论: 基于纳米粒子的 TR-FRET 生物传感器用于 miRNAs 的无扩增检测具有良好的灵敏度和特异性。

关键词 镧系金属掺杂; 纳米粒子; 时间分辨; 荧光共振能量转移; miRNA; 传感器; 无扩增检测

中图分类号 R9

文献标志码 A

Direct non-amplification detection of miRNAs by time-resolved FRET sensor based on lanthanide-doped nanocrystals

ZHANG Yi, TAN Jia-xing, YE Yan-kai, JIANG Wei, SUN Yan-hua, SHEN Wan-qiu, CAO Hai-yan, JIN Mei-na, QIN Nan, DUAN Hong-quan
(Department of Medical Chemistry, College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To develop a miRNA detection method based on the time-resolved (TR) fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay. **Methods:** The $GdF_3:Tb^{3+}$ nanocrystals were coupled with nucleotide probe I as donor, and gold nanocrystals with nucleotide probe II as acceptor. miRNA hsa-miR-122-5p was detected by time-resolved FRET assay, and the short lived background luminescence such as auto-fluorescence was suppressed when determining the long lived fluorescence of Tb^{3+} by setting appropriate delay time and gate time. **Results:** The TR-FRET based miRNA sensor was sensitive and selective to hsa-miR-122-5p with a dynamic linear range of 0.1 fmol/L~100 pmol/L, which was compatible with that of the same type of sensors. Furthermore, the $GdF_3:Tb^{3+}$ nanocrystals were stable to light irradiation and their lifetime was long enough to avoid autofluorescence. **Conclusion:** The TR-FRET miRNA sensor for non-amplification detection of hsa-miR-122-5p based on $GdF_3:Tb^{3+}$ nanocrystals, is sensitive and selective.

Key words lanthanide-doped; nanocrystals; time-resolved; fluorescence resonance energy transfer; miRNA; sensor; non-amplification detection

微核糖核酸(miRNAs)是一类由内源基因编码的、长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,它在细胞分化、增殖和凋亡以及肿瘤的发生和发展等病理过程中都起到非常重要的调控作用^[1]。有研究表明,某些 miRNAs 可以介导肿瘤的扩增和扩散,与多药耐药密切相关,可以调节癌症转移过程中多个基因的表达,这些 miRNAs 很有可能成为预测癌症的重要指标^[2-3]。目前,miRNAs 的检测手段主要包括反转录聚合酶链反应^[4]、微阵列^[5]、电化学^[6]、荧光法^[7-8]等。其中,相比其他 3 种方法,荧光法具有

成本低廉、灵敏度高、操作简单等明显优势。本文旨在报道一种基于镧系金属掺杂纳米粒子的时间分辨(TR)型荧光共振能量转移(FRET)生物传感器用于检测 miRNAs。该传感器的优势在于其能够有效地避免来自体液、细胞和组织样本的散射光以及自发荧光干扰,无需扩增 miRNAs,无需避光保存。

1 材料与方法

1.1 试剂及样本 所有合成 RNA 及 DNA 均购于金唯智生物科技有限公司(北京)。其他所用试剂均为分析纯,实验用水由 Labconco WaterPro 水系统制备。 $GdCl_3 \cdot 6H_2O$, $TbCl_3 \cdot 6H_2O$, NH_4F , 聚丙烯酸(PAA, 分子量~2 000), 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC), N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自上海阿拉丁试剂有限公司。盐酸, EDTA, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$,

基金项目 国家自然科学基金资助项目(21305103, 21373151, 31200753, 21205087)

作者简介 张毅(1982-),女,博士,研究方向:纳米材料于生化分析的应用;通信作者:段宏泉, E-mail: duanhq@tjmu.edu.cn。

NaH₂PO₄×2H₂O, NaOH, NaCl, MgCl₂, 柠檬酸钠购自天津光复试剂有限公司。酵母 tRNA 购自北京华越洋生物科技有限公司。RNA 提取试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司。qRT-PCR 试剂盒为 TaqMan[®] MicroRNA Assay, SM, 货号 4427975。一位健康人和一位慢性淋巴性白血病(CCL)患者血清各两份, 购于中国医学科学院血液学研究所血液病医院(天津)。本工作所涉及的核苷酸序列见表 1。

表 1 核苷酸序列

Tab 1 Sequences of RNA and DNA

核酸	核苷酸序列(5'-3')
hsa-miR-122-5p	UGG AGU GUG ACA AUG GUG UUU G TGGAGTGTGACAATGGTGTTC CCU UAG CAG AGC UGU GGA GUG UGA CAA
Pre-hsa-miR-122	UGG UGU UUG UGU CUA AAC UAU CAA ACG CCA UUA UCA CAC UAAUA GCU ACU GCU AGG C
5p-1x	A*GG AGU GUG ACA AUG GUG UUU G
5p-1y	UGG AGU GUG GCA AUG GUG UUU G
5p-1z	UGG AGU GUG ACA AUG GUA UUU G
Probe I	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -TGG AGT GTG AC
Probe II	AAT GGT GTT TG-(CH ₂) ₆ -SH
Probe III	CAA ACA CCA TTG TCA CAC TCC A

* 下划线: 差异碱基

1.2 仪器 Thermo Scientific Varioskan Flash 光谱扫描多功能读数仪, 雷勃尔 LG16-A 高速台式离心机, 荧光定量 PCR 仪 ABI7000。

1.3 实验方法

1.3.1 PAA-GdF₃:Tb³⁺纳米粒子的合成 本合成参考了文献方法^[9], 并做了部分改动。具体步骤如下: 在 50 mL 圆底烧瓶中, 向 12 mL 超纯水和 4.0 mL 乙二醇混合溶剂中加入 0.1 mmol GdCl₃×6H₂O、80 mg PAA、2.0 μmol TbCl₃×6H₂O, 搅拌至均匀透明后加热至 50 ℃。另取一支 15 mL 试管中加入 2.0 mL 乙二醇、5.0 mL 超纯水和 0.3 mmol NH₄F, 室温搅拌至均匀透明后加热至 50 ℃, 趁热将此 NH₄F 溶液滴加入上述圆底烧瓶中, 持续反应 30 min 后 2 000 r/min 离心 5 min, 收集固体产物, 并分别用超纯水和乙醇各洗涤两遍, 真空干燥过夜。最后得到 PAA 修饰的 GdF₃:Tb³⁺纳米粒子白色粉末状产物。

1.3.2 寡核苷酸单链 probe I 与 PAA-GdF₃:Tb³⁺纳米粒子偶联 寡核苷酸单链 probe I 的 5' 端带有氨基, GdF₃:Tb³⁺纳米粒子表面有大量羧基, 可以通过 EDC 和 NHS 催化于水相中实现氨基和羧基的缩合^[10]。将步骤 1.3.1 所得粉末配制成 5% w/v 水溶液, 取 100 μL 上述水溶液、5 nmol 寡核苷酸单链 probe I (5'-

NH₂-(CH₂)₆-TGGAGTGTG AC-3')、30 mg EDC、5 mg NHS 加入到 1 mL PBS(0.1 mol/L, pH 7.4)中, 混合均匀后室温下电磁搅拌反应 24 h。产物以 2 000 r/min 离心 5 min 后以 PBS(0.1 mol/L, pH 7.4)洗涤 2 次, 并于 PBS(10 mmol/L, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl)中 4 ℃ 储存, 此溶液为偶联有寡核苷酸单链 probe I 的 GdF₃:Tb³⁺纳米粒子溶液。

1.3.3 制备寡核苷酸单链 probe II 修饰的金纳米粒子 参考文献方法^[11], 利用柠檬酸钠还原 HAuCl₄ 制备新鲜的胶体金纳米粒子溶液并将寡核苷酸单链 probe II (5'-AATGCTGTTTG-(CH₂)₆-SH-3') 与金纳米粒子偶联, 最后将其分散于 PBS(10 mmol/L, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂) 的缓冲溶液中, 储存于 4 ℃ 备用。

1.3.4 FRET 传感器构建 参考文献实验条件^[12], 通过核酸杂交反应偶联上述两种纳米粒子。取 100 μL 偶联有寡核苷酸单链 probe I 的 GdF₃:Tb³⁺纳米粒子溶液, 加入 200 μL 寡核苷酸单链 probe II 修饰的金纳米粒子溶液和 5 nmol probe III (5'-CAAACACC ATTGTCACACTCCA-3'), 37 ℃、3 000 r/min 振荡约 1 h, 以荧光光度计监测 543 nm 处的荧光变化直至降低至不再变化。2 000 r/min 离心 5 min, 小心弃去上清液, 以 PBS (10 mmol/L, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂) 洗涤, 再重复两次上述离心和洗涤过程以去除未结合的 probe III 和金纳米粒子, 得到 FRET 传感器的 PBS 溶液。

1.3.5 检测原理 图 1 显示了本传感器的工作原理如下: 以寡核苷酸单链 probe I 偶联 GdF₃:Tb³⁺纳米粒子作为 FRET 供体, 以寡核苷酸单链 probe II 偶联金 (Au) 纳米粒子作为 FRET 受体, 先利用 probe III 与 probe I 和 II 的碱基互补作用将供体与受体连接并建立高效的 FRET, 使 GdF₃:Tb³⁺纳米粒子荧光淬灭, 此混合体系即为检测混合液。以 hsa-miR-122-5p 为模式目标分子, 当向上述检测混合液中加入含有目标 RNA 的待测样本后, probe III 与目标 RNA 结合, 原有的 FRET 被打破, GdF₃:Tb³⁺纳米粒子荧光恢复, 即实现 off-on 检测模式。通过设置多功能酶标仪的检测模式为 time-resolve spectra, 延迟时间为 100 μs、门时间为 1 ms, 去除短寿命的自发荧光背景, 检测 GdF₃:Tb³⁺纳米粒子在 543 nm 处的荧光发射强度, 利用标准曲线法和标准加入法计算样本中目标分子浓度。表 1 中列出了实验所涉及核酸序列, 其中 5p-1x、5p-1y 及 5p-1z 均为目标 miRNA hsa-miR-122-5p 的单碱基差异核酸序列。

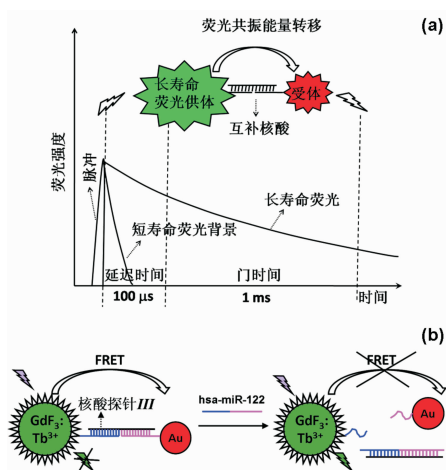


图1 基于镧系金属掺杂纳米粒子的时间分辨 FRET 生物传感器用于 has-miR-122 的无扩增检测原理示意图

Fig 1 Schematic diagram of the direct non-amplification detection of miRNAs by time-resolved FRET assay based on lanthanide-doped nanocrystals

1.3.6 样品准备 (a)用于 TR-FRET 检测的血清处理^[13]:实验前,1.0 mL 血清样本中加入 100 μ L 100 mg/mL 酵母 tRNA 以保护内源 miRNAs 不被核酶降解。以 PBS(25 mmol/L, pH 7.0, 25 mmol/L NaCl)将血清样本稀释 10 倍,95 $^{\circ}$ C 加热 15 min 以释放 miRNAs。在 96 孔板的样品孔内,加入 90 μ L 人工合成 hsa-miR-122-5p 的 PBS 溶液或稀释血清,再加入 10 μ L FRET 传感器,于室温下震荡孵育 1 h 后检测。(b)阴性对照实验:以 5.1 mg/mL 人血清白蛋白代替血清,后续处理同上。(c)对照方法:qRT-PCR,利用 RNA 提取试剂盒提取血清全部 RNA,并以 qRT-PCR 试剂盒检测 hsa-miR-122-5p。

1.3.7 光谱扫描条件 以 272 nm 为激发波长,扫描 400~700 nm 的荧光发射光谱;以 543 nm 作为发射波长,扫描 220~400 nm 的荧光激发光谱。TRFL (时间分辨荧光)分析测试:以 272 nm 为激发波长,测定 543 nm 处的荧光,延迟时间(delay time)为 100 μ s,检测门时间(gate time)为 1 ms。

2 结果

2.1 PAA-GdF₃:Tb³⁺纳米粒子的荧光性质 本工作通过一步溶剂热法制备了 PAA-GdF₃:Tb³⁺纳米粒子。使用分子量为 2 000 的 PAA 作为表面封端剂以控制粒子生长,并藉此赋予纳米粒子水溶性及生物相容性。本工作中所合成的 PAA-GdF₃:Tb³⁺纳米粒子易溶于水,水溶液澄清透明。该纳米粒子在水溶液、300 mmol/L NaCl 溶液及 pH 5.0~12.0 磷酸盐缓冲液中,在室温下、空气中、不避光保存 1 个月,既没有发生絮凝也没有沉淀,说明此纳米粒子可以耐受多种生理条件。

图 2a 为 PAA-GdF₃:Tb³⁺纳米粒子水溶液的荧光激发光谱、发射光谱。该纳米粒子在 272 nm 处有尖锐激发线,对应 Gd³⁺离子 ⁸S_{7/2} 向 ⁶I_{7/2} 的跃迁,相比之下 Tb³⁺的激发线非常微弱。在 543 nm 处有最大荧光发射,对应 Tb³⁺离子 ⁵D₄ 向 ⁷F₅ 的特征跃迁发射,紫外灯照射下该溶液发射绿色荧光(图 2a)。上述结果说明,GdF₃:Tb³⁺纳米粒子主体 Gd³⁺吸收光子,并向掺杂 Tb³⁺转移能量,进而实现掺杂元素 Tb³⁺的荧光发射。本工作检测了 PAA-GdF₃:Tb³⁺纳米粒子水溶液在 543 nm 的荧光衰减曲线(图 2b),经拟合该荧光衰减曲线符合双指数函数,所制备纳米粒子的平均荧光寿命为 1.2 ms,此荧光寿命远大于生物样本自发荧光寿命,足以利用时间分辨技术扣除短寿命荧光背景干扰。金纳米粒子在 400 nm 到 600 nm 范围内有广泛吸收,与 PAA-GdF₃:Tb³⁺纳米粒子的发射光谱有较好的交叠,表明二者之间有实现 FRET 的条件。

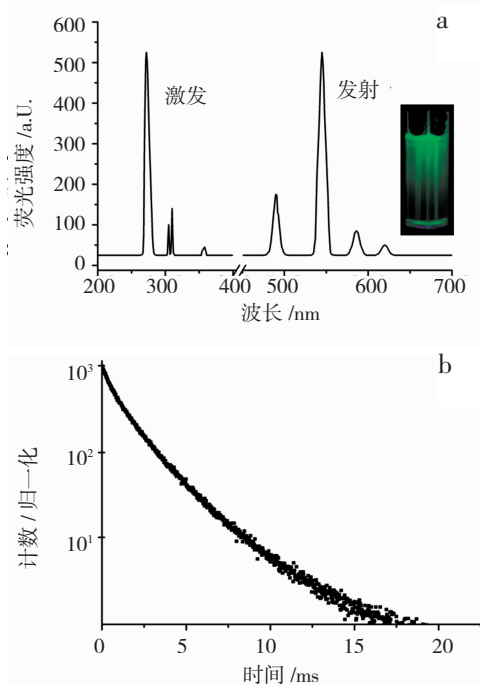


图2 PAA-GdF₃:Tb³⁺纳米粒子水溶液的荧光激发光谱、发射光谱以及荧光衰减曲线

Fig 2 Excitation spectra, emission spectra and decay curve of the as-prepared PAA-GdF₃:Tb³⁺ nanocrystals solution

2.2 线性范围及特异性 向检测混合液中加入人工合成目标 miRNA hsa-miR-122-5p, 检测混合液在 543 nm 处的荧光发射强度发生了有规律的增加。在 0.1 fmol/L~100 pmol/L 浓度范围内, 所加入 miRNA 浓度的负对数(-logC_{miRNA})与检测混合液的荧光强度呈线性关系, 并且相关系数 $r^2 > 0.99$ (图3)。

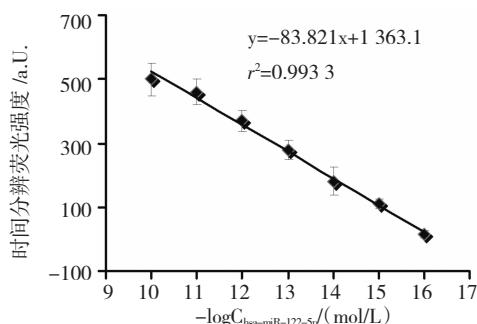


图 3 目标 miRNA hsa-miR-122-5p 对检测混合液荧光强度 (543 nm) 的影响

Fig 3 Effect of target miRNA hsa-miR-122-5p on the fluorescence intensity at 543 nm of detecting mixture

由于 miRNA 家族成员之间具有高度的序列相似性,因此,本工作还考察了检测体系的特异性,包括对单碱基差异的识别能力和前体 miRNA 的交叉杂交(图 4a),各寡核苷酸链的碱基序列见表 1。向检测混合液中分别加入目标 miRNA hsa-miR-122-5p 及其单碱基差异核酸序列 5p-1x、5p-1y 及 5p-1z 各 200 pmol/L,检测混合液在 543 nm 处的荧光发射强度均有增加,但单碱基差异类似物与 probe III 交叉杂交所引起的信号变化不足 20%,其中 5p-1y 引起的交叉杂交最大,为 18.2%。前体 miRNA 是一种含有成熟 miRNA 序列的稳定发卡结构 RNA,也可能对成熟 miRNAs 检测产生一定的干扰,因此,本工作中对 pre-hsa-miR-122-5p 的干扰做了进一步考察。200 pmol/L pre-hsa-miR-122-5p 产生的信号与 hsa-miR-122-5p 相比为 10.2%。以上结果说明本方法不仅能够区分单碱基差异序列,而且能够有效区分成熟 miRNAs 与其前体 miRNAs。

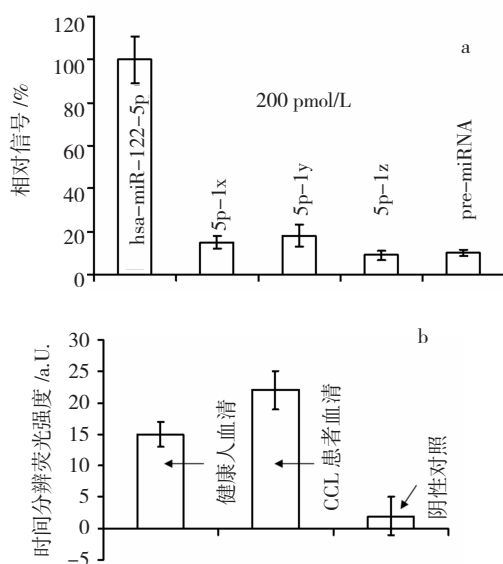


图 4 miRNA 荧光传感器对不同样本的时间分辨荧光信号响应

Fig 4 TR-fluorescence response of miRNA sensor to different samples

2.3 血清内源 hsa-miR-122 检测 将本文所开发的荧光传感器应用于人血清内源 hsa-miR-122 的检测。图 4b 显示,CCL 患者血清内源 hsa-miR-122 稍多于健康人,与 qRT-PCR 分析结果一致。以上试验说明:本传感器能够从血清背景中成功检出目标 miRNAs 的丰度。

3 讨论

荧光共振能量转移(FRET)是在荧光供体的激发状态下由一对偶极子介导的能量从供体向受体转移的非辐射过程^[14]。FRET 受体和供体之间依靠生物偶联作用相结合时,彼此间距只有几个纳米,二者之间的能量转移过程可以通过扫描供体和受体的荧光光谱得以检测^[15-16]。FRET 效率对因目标分子浓度变化引起的受体-供体间距在纳米尺度的差异具有优越的灵敏度,因此,近年来在生物分析领域,尤其是在核酸杂交的检测中,FRET 技术发挥了巨大的作用。然而,目前 FRET 技术普遍应用的有机小分子荧光供体光漂白严重;而且,基于稳态荧光的传统 FRET 分析中,当以紫外光激发时,生物样本的自发光干扰十分严重^[15,17]。

稀土掺杂纳米粒子是一类新兴的荧光传感器材料,与有机染料和半导体量子点相比,稀土掺杂纳米粒子有很多更优越的化学和光学性质,例如:生物毒性低、有效 Stokes 位移大、发射峰狭窄、荧光寿命长以及耐光漂白能力强。由于稀土掺杂纳米粒子适用于时间分辨荧光检测技术,因此,有望将此材料应用于非侵袭性、无损伤的实时在体疾病监测^[18-19]。

本工作以寡核苷酸单链 probe I 偶联 GdF₃:Tb³⁺ 纳米粒子作为 FRET 供体,以寡核苷酸单链 probe II 偶联金纳米粒子作为 FRET 受体,以 hsa-miR-122-5p 为模式目标分子,通过设置多功能酶标仪的检测延迟去除自发光背景,利用供体与受体之间的 FRET 检测样本中目标分子浓度。该传感器能够高灵敏度、高特异性地检测目标分子,并且对于光照有良好的耐受性,能够避免自发光干扰。对 hsa-miR-122-5p 的检测线性范围为 0.1 fmol/L~100 pmol/L,与同类型的 RNA 荧光传感器的检测限具有可比性。将该传感器应用于血清内源 hsa-miR-122 检测时,能够有效检出样本中目标物的丰度差异。

参考文献:

- [1] Petri A, Lindow M, Kauppinen S. MicroRNA silencing in primates: towards development of novel therapeutics[J]. Cancer Res, 2009, 69 (2): 393
- [2] Lowery A J, Miller N, McNeill R E, et al. MicroRNAs as prognostic indicators and therapeutic targets: potential effect on breast Cancer

(下转第 529 页)

骨和成软骨分化)来鉴定^[11]。因此,我们利用 MB-MSCs 可分化为成软骨细胞这一特点^[9],采用阿尔辛兰染色对成软骨诱导的 MB-MSCs 进行了比较,检测其细胞功能,结果表明这两种方法分离的细胞在阿尔辛兰染色阳性细胞基本一致。

以上结果均表明,采用贴壁法与密度梯度离心法分离 MB-MSCs 效果相似,但贴壁法更适用于早期快速获得纯度较高的细胞。

参考文献:

- [1] Fridenshtein A J, Petrakova K V, Kuralesova A I, et al. Heterotopic transplants of bone marrow, analysis of precursors cells, for osteogenic and hematopoietic tissues [J]. Transplantation, 1968,6(2):230
- [2] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryo[J]. Nature, 1981, 292(5819):154
- [3] Erices A, Conget P, Minguell J J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood[J]. Br J haematol, 2000,109(1):235
- [4] Zvaifler N J, Marinova M L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals[J]. Arthritis Res, 2000, 2(6):477
- [5] Meng X, Ichim T E, Zhong J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population[J]. J Transl Med, 2007, 5:57
- [6] Zhong Z, Patel A N, Ichim T E, et al. Feasibility investigation of allogenic endometrial regenerative cells[J]. J Transl Med, 2009, 7:15
- [7] Prianishnikov V A. On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium[J]. Contraception, 1978, 18(3):213
- [8] Patel A N, Park E, Kuzman M, et al. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation[J]. Cell Transplant, 2008,17(3):303
- [9] Musina R A, Belyavski A V, Tarusova O V, et al. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood[J]. Bull Exp Biol Med, 2008, 145(4):539
- [10] Kazemnejad S, Najafi R, Zarnani A H. Comparative effect of human platelet derivatives on proliferation and osteogenic differentiation of menstrual[J]. Mol Biotechnol, 2014, 56(3):223
- [11] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4):315
- [12] Toyoda M, Cui Ch, Umezawa A. Myogenic transdifferentiation of menstrual blood-derived cells[J]. Acta Myol, 2007, 12, 26(3):176
- [13] Borlongan C V, Kaneko Y, Maki M, et al. Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke[J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(4):439

(2015-04-03 收稿)

(上接第 524 页)

- management[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(2): 360
- [3] Shi W, Gerster K, Alajez N M, et al. MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(8): 2926
- [4] McDonald J S, Milosevic D, Reddi H V, et al. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges[J]. Clin Chem, 2011, 57(6): 833
- [5] Qavi A J, Kindt J T, Gleeson M A, et al. Anti-DNA:RNA antibodies and Silicon photonic microring resonators: increased sensitivity for multiplexed microRNA detection[J]. Anal Chem, 2011, 83(13): 5949
- [6] Poehlmann C, Sprinzl M. Electrochemical detection of microRNAs via gap hybridization assay[J]. Anal Chem, 2010, 82(11): 4434
- [7] Chan H M, Chan L S, Wong R N, et al. Direct quantification of single molecules of microRNA by total internal reflection fluorescence microscopy[J]. Anal Chem, 2010, 82(16): 6911
- [8] Broyles D, Cissell K, Kumar M, et al. Solution-phase detection of dual microRNA biomarkers in serum[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402(1): 543
- [9] Ju Q, Liu Y S, Tu D T, et al. Lanthanide-Doped multicolor GdF₃ nanocrystals for Time-Resolved photoluminescent biodetection[J]. Chem Eur J, 2011, 17(31): 8549
- [10] Li J S, Schachermeyer S, Wang Y, et al. Detection of microRNA by fluorescence amplification based on cation-exchange in nanocrystals[J]. Anal Chem, 2009, 81(23): 9723
- [11] Tu Y Q, Wu P, Zhang H, et al. Fluorescence quenching of Gold nanoparticles integrating with a conformation-switched hairpin oligonucleotide probe for microRNA detection[J]. Chem Commun, 2012, 48(87): 10718
- [12] Baker M B, Bao G, Searles C D. In vitro quantification of specific microRNA using molecular beacons[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(2): e13
- [13] Labib M, Ghobadloo S M, Khan N, et al. Four-way junction formation promoting ultrasensitive electrochemical detection of microRNA[J]. Anal Chem, 2013, 85(20): 9422
- [14] Gu J Q, Shen J, Sun L D, et al. Resonance energy transfer in steady-state and time-decay fluoro-immunoassays for lanthanide nanoparticles based on biotin and avidin affinity[J]. J Phys Chem C, 2008, 112(17): 6589
- [15] Tu D T, Liu L Q, Ju Q, et al. Time-resolved FRET biosensor based on amine-functionalized lanthanide-doped NaYF₄ nanocrystals[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2011, 50(28): 6306
- [16] Hu S, Yang H, Cai R X, et al. Biotin induced fluorescence enhancement in resonance energy transfer and application for bioassay[J]. Talanta, 2009, 80(2): 454
- [17] Jiang L, Duan D M, Shen Y, et al. Direct microRNA detection with Universal tagged probe and time-resolved fluorescence technology[J]. Biosens Bioelectron, 2012, 34(1): 291
- [18] Yang Y H, Tu D T, Zheng W, et al. Lanthanide-doped Sr₂YF₇ nanoparticles: controlled synthesis, optical spectroscopy and biodetection[J]. Nanoscale, 2014, 6(19): 11098
- [19] Zheng W, Zhou S Y, Chen Z, et al. Sub-10 nm lanthanide-doped CaF₂ nanoprobe for time-resolved luminescent biodetection[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2013, 52(26): 6671

(2015-08-06 收稿)