

综述专论

环状 RNA 检测方法研究进展*

陈中强¹, 袁发洙¹, 李莹¹, 施璐¹, 曹晓琴¹, 刘巍^{2**}, 刘亮^{2**}

(1. 江汉大学医学院, 武汉 430026; 2. 武汉大学中南医院, 武汉 430071)

摘要:环状 RNA(circRNA)是一大类内源性单链 RNA,不同于其他线性 RNA,circRNA 通过外显子、内含子或 2 个外显子-内含子的反向剪接和融合形成共价闭环而产生,在高度分化的真核生物中普遍表达,并且与生物体的多种发育和代谢疾病过程密切相关。circRNA 具有结构稳定、抗 RNA 酶降解、高度保守以及组织特异性表达等特点,是诊断和预后的理想生物标志物。传统方法如 Northern 印迹法、qRT-PCR 和微阵列分析虽然提供了一定有用的信息,但是依旧受制于各自的缺点,无法在临床检验中大规模推广。近年来,为了解决这些问题,出现了一些新的检测方法。本文总结了目前 circRNA 检测方法的相关进展,阐述其优点和局限性,并讨论面临的挑战以及未来的发展方向。

关键词:环状 RNA 检测;新方法;生物标志物;扩增;优点和缺点

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)02-0185-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.02.01

Research progress of circRNA detection methods*

CHEN Zhong-qiang¹, YUAN Fa-hu¹, LI Ying¹, SHI Lu¹,
CAO Xiao-qin¹, LIU Wei^{2**}, LIU Liang^{2**}

(1. School of Medicine, Jianghan University, Wuhan 430026, China;

2. Department of Pharmacy, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: CircRNAs are a large class of endogenous single-stranded RNAs that are different from other linear RNAs, which are produced by back-splicing and fusion of either exons, introns, or both exon-intron into covalently closed loops. They are widely expressed in highly differentiated eukaryotes, and are closely related to various development and metabolic disease processes of organisms. They are characterized by stable structure, resistant to RNA degradation, conservation, and tissue-specific expression, making them ideal biomarkers for diagnosis and prognosis. Traditional methods such as Northern blotting, qRT-PCR and microarray analysis provide useful information, however, they are subject to their own shortcomings. Traditional methods are restricted in large-scale promotion in clinical trials. In recent years, in order to solve these problems, some new detection methods have emerged. In this article, we reviewed the relevant progress of all current circRNA detection methods, expounded their advantages and limitations, and discussed the challenges and future development directions.

Keywords: circRNA detection; new method; biomarkers; amplification; merits and demerits

* 国家自然科学基金(No. 82002252);中华国际医学交流基金会

** 通信作者 刘巍 Tel:(027)67813548;E-mail:13006132756@163.com

刘亮 Tel:(027)67812902;E-mail:liuliang1@whu.edu.cn

第一作者 Tel:(027)84225149;E-mail:563132816@qq.com

环状 RNA (circRNA) 是一种特殊类型的 RNA, 在生物体内通过特定 RNA 反向剪接形成, 由至少几百个核苷酸从 5' 至 3' 端形成共价闭环, 不存在 5' - 3' 极性和 poly - A 尾部^[1-3]。长期以来, circRNA 被误认为是基因组中异常 RNA 剪接或噪声导致的低丰度副产物^[4], 但高通量测序技术和新型生物信息学算法的巨大进步, 使研究人员能够在多种模型生物中发现更多类型的 circRNA, 从而能够研究它们在各种疾病中的潜在作用^[5]。2012 年, Salzman 等^[6]首次提出, 大部分已知的非编码 RNA 都是环状的, 这些 circRNA 不仅仅是 RNA 剪接的副产物; 之后, Jeck 等^[7]从蛋白质编码基因的外显子中鉴定了 25 000 多种 circRNA, 这些 circRNA 可以通过 RNase R (一种 RNA 内切核酸酶) 酶切来重复富集。因为 RNase R 能够降解所有具有短 3' 末端的线性 RNA, 但不降解套索或环状 RNA, 这使得 circRNA 无法被 RNase R 酶切。迄今为止, RNase R 酶切仍然是验证和富集 circRNA 的金标准。

越来越多的证据表明, circRNA 可以充当 miRNA (miRNA) 的“海绵”, 为 RNA 结合蛋白的组装提供平台, 并与 mRNA 相互作用, 在转录后调节其表达^[8]。circRNA 具有高表达、组织特异性、结构稳定性和高度保守性^[4]。基于这些特征, circRNA 有潜力作为诊断和预测疾病进展和预后的重要生物标志物^[1, 5-9]。为了在临床应用中使用, 有必要评估特定疾病中哪些 circRNA 发生了变化, 以确保这些变化是否能代表该疾病发生发展的变化。

由于其环状结构, circRNA 很难通过常用的技术 (如电泳或靶向 poly - A 尾部的的方法) 与其他种类 RNA 分离^[10]; 此外, 与线性对应物相比, 内源性 circRNA 的丰度相对较低^[11], 给检测 circRNA 提出了挑战。传统检测 circRNA 的方法, 如 Northern 印迹法、逆转录定量 PCR (qRT - PCR)、微阵列分析和 RNA 测序, 都不能满足现代研究的需要: Northern 印迹法可用于评估 circRNA 的存在和大小, 但灵敏度低, 工作量大且耗时^[12]; qRT - PCR 是实验室常用的定量 circRNA 的检测方法, 然而, 在 circRNA 反转录生成互补 DNA (cDNA) 的过程中, 由于过度转录, 可能会导致 circRNA 的浓度被高估^[13-15]; RNA 测序是 circRNA 研究中另 1 种广泛使用的方法, 但需要耗费大量时间和精力对数据进行整理分析, 且试剂和设备昂贵, 这些都限制了它在常规诊断中的使用^[16-17];

基于微阵列的检测方法产生的数据很难在研究之间进行比较, 此技术更适合作为筛选工具, 而非用于定量^[18]。因此, 迫切需要开发简单、灵敏、准确和有效的 circRNA 分析定量方法。

circRNA 的检测技术已经成为了近年来重点研究的方向之一, 目前正在研究的新方法包括荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 和数字化等温扩增技术 (digital LAMP) 等, 如图 1 所示。为了促进和帮助 circRNA 检测技术的发展, 本文概述了几种检测 circRNA 的新方法, 并讨论了其优势和局限性, 希望为开发出更高效、低成本的 circRNA 检测方法提供参考。

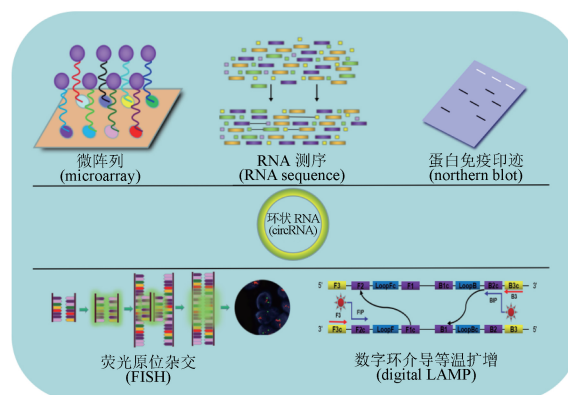


图 1 环状 RNA 的检测方法示意图

Fig. 1 Schematic representation of different circRNA profiling methods

circRNA 的异常表达与疾病的发生和发展之间有非常密切的联系, 这种联系得到了多数学者的认可与验证^[19-21]。circRNA 的结构特点使其成为临床应用中良好的生物标记物, 但由于其环状结构、缺乏 5' - 3' 极性和 poly - A 尾部, 以及浓度较低的特点, 想要更深入地分析检测 circRNA 还存在较大的挑战性^[22]。考虑到 circRNA 在不同应用中发挥的关键作用, 过去 10 年在其新的检测手段方面的研究取得了重大进展。

1 传统方法

1.1 Northern 印迹法 在用 qRT - PCR 方法研究 circRNA 时, 往往是先使用 RNase R 来酶切和去除线性 RNA, RNase R 可以酶切分子量很大的 circRNA, 但无法酶切结构稳定的线性 RNA, 因此验证特定 circRNA 的存在非常重要^[23]。Northern 印迹法能准确地验证 RNA 的大小和环状结构^[24], 是目前公认证明

circRNA 存在的金标准,但这种检测方式灵敏度低,效率低,步骤烦琐耗时,实际使用受限^[25]。

许多研究团队试图提高 circRNA Northern 印迹法检测的灵敏度并缩短总分析时间。例如,Wang 和 Shan 报道了使用地高辛(DIG)标记系统检测 circRNA,与传统同位素标记系统(³²P)相比,该检测系统具有以下几个优点:灵敏度高,暴露时间短,保存时间长以及安全性高^[26]。其他探针设计策略,例如使用锁定核酸(LNA)寡核苷酸探针替代传统的 DNA 寡核苷酸探针。LNA 寡核苷酸是一类新的双环 RNA 类似物,对其 cDNA 或 RNA 靶点具有高亲和力,已证明对于 miRNA 而言,其效率至少是传统 DNA 探针的 10 倍^[27-28]。该策略也适用于提高环状 circRNA Northern 杂交检测的灵敏度。

1.2 基于 PCR 的方法 qRT-PCR 是 circRNA 分析的最常用方法,在 RNA 测序中首先被应用于验证 circRNA 的存在。qRT-PCR 是 circRNA 定量的“金标准”,其检测定量浓度范围宽,比基于杂交的方法的灵敏度约高 1 000 倍^[29-30]。在常见的 qRT-PCR 步骤中,从细胞或组织中分离出总 RNA,然后用 RNase R 处理以去除线性 RNA,再通过 RT 获得 circRNA 的 cDNA,用引物对该 cDNA 特定的剪接连接进行 PCR 扩增,最后,对荧光信号进行测定和分析。这项技术体现了灵敏度、特异性、时间效率、成本和操作难易之间的平衡,使得基于 qRT-PCR 的技术在临床实验室中易于推广实施^[30]。qRT-PCR 的这些优点为其在临床疾病早期诊断和监测治疗方面发挥了重要作用。虽然 qRT-PCR 技术已经实现了对 circRNA 的高敏测定,但核酸外切酶 RNase R 可能对具有二级结构的 3' 末端线性 RNA 酶切不足^[31]。此外,由于逆转录过程中的链移位和滚动循环复制,单个 circRNA 分子可以产生多个重复的 cDNA 拷贝,这些假似物可能占检测到的 RNA 的 34%~55%,导致 circRNA 浓度被过高估计^[20]。

为了克服逆转录中的滚动扩增问题,Chen 等^[32]开发了一种基于逆转录液滴数字聚合酶链反应(RT ddPCR)的检测方法。RT ddPCR 是一种新兴的核酸定量技术,比传统 PCR 具有更高的灵敏度和准确性^[33]。该分析的算法基于泊松分布,消除了滚动 RT 产物对 circRNA 定量的影响^[34]。与传统的 qRT-PCR 分析类似,总 RNA 首先从血清中分离和纯化,但与 qRT-PCR 不同的是,总 RNA 未经 RNase R 处

理。通过逆转录获得 cDNA 后用 RNase H 处理,以特异性降解 DNA-RNA 双链中的 RNA 链,使用 RT ddPCR 进行热循环。Guo 等^[35]使用该方法对血浆中的 circRNA 进行分析,发现胃癌患者的总体存活率与血浆中 has-circ-0001017 或 has-circ-0061276 的水平呈正相关。此外,血浆 has-circ-0001017 或 has-circ-0061276 水平在手术后恢复正常的患者,其无病生存期比未恢复正常的病人长。与 qRT-PCR 不同,RT ddPCR 不需要校准,使实验过程更加简便。此外,其灵敏度适用于检测低拷贝数的目标,无需预放大步骤^[36]。但这种技术需要的检测设备比较昂贵,若能被普通医学实验室接受,这项技术将很有前景。

2020 年,Li 等^[37]开发了另一种基于 PCR 的检测方法,避免了线性 RNA 干扰和滚动扩增的问题。该方法使用一对 DNA 探针用于补充靶 circRNA 的后拼接连接位,每个 DNA 探针都包含一个引物特异性序列和一个靶标特异性识别序列,该序列与 circRNA 后剪接连接位点的一侧互补。在存在 circRNA 的情况下,2 个探针在后剪接连接位点的两侧杂交,允许其末端被 spart R 连接酶连接,从而产生一条长 DNA 链^[38-39]。长 DNA 链一旦形成,两端的引物特异序列将允许 PCR 扩增。在线性 RNA 中,2 个探针分别识别其 3' 和 5' 末端的边界位置,阻止连接和随后的 PCR 扩增。该方法可达到 $1 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的定量限(LOQ),动态范围为 5 个数量级^[37]。与传统的 qRT-PCR 相比,该方法避免了滚环放大的问题,并且由于其快速、简单和高性价比,更易于在普通实验室中使用。

1.3 基于微阵列的 circRNA 检测 随着新技术的发展,越来越多的 circRNA 被发现。在将这些 circRNA 用作临床实践中的生物标记物之前,需要对这些 circRNA 在疾病中的特征进行系统研究,这就需要一种方法来同时检测大量的 circRNA。基于微阵列的方法是特别有效的高通量检测工具,可以同时检测多种 circRNA^[18,40]。circRNA 的微阵列分析与线性 mRNA 的分析类似,仅在探针序列的设计上有所不同,其探针序列以靶向 circRNA 内的“反向拼接”连接位点序列为目标^[41-42]。

为了对 circRNA 进行微阵列分析,从组织或细胞中分离出总 RNA,然后用 RNase R 酶切以去除线性 RNA。酶切后进行转录和扩增,然后将标记的 cRNA

杂交到 circRNA 阵列上。通过荧光扫描仪可以得到 circRNA 的类型和相对数量。

circRNA 微阵列是规模化鉴别评估 circRNA 差异表达的有力工具。circRNA 微阵列的检测效率优于 RNA 测序,因为微阵列几乎 100% 的检测信号都可用于分析 circRNA^[43]。然而,这项技术需要总 RNA 的量较大,并且只能测量 RNA 的相对浓度,所以产生的结果很难在不同研究之间进行比较。因此,微阵列分析通常用于筛选,不用于量化 circRNA。理论上,非标记和非扩增反应检测方法更简单,所得结果更可靠,特别是对于诊断目标。因此,未来的工作应主要集中在 2 个方面:第一,标记二级探针而不是 circRNA,以提高灵敏度;第二,利用特殊设备减少总 RNA 的需要量。

1.4 二代测序(next-generation sequencing, NGS)

NGS 又称为高通量测序,其开创性地引入了可逆终止末端,从而实现边合成边测序,在 DNA 复制过程中通过捕捉新添加的碱基所携带的特殊标记来确定 DNA 序列。由于 circRNA 在疾病诊断和预后方面潜在的重要作用,研究人员对其全基因组表达模式越来越感兴趣。测序技术的进步,特别是更深入测序和更长读取片段的发展,加速了对 circRNA 的全基因组研究^[44]。此外,将 RNA 定位到其基因组来源的算法和核糖体 RNA (rRNA) 缺乏的策略使得非聚腺苷酸 RNA 的测序成为可能^[45]。通过测序检测 circRNA 的方法通常可分为 2 大策略^[46-47]。第一种即基于候选的方法,使用现有的转录模型生成候选连接接头^[48-49]。该方法已被使用并获得了可靠的结果,此外,它在缺乏核糖体 RNA 的库中实现速度最快,但不能用于检测样本中存在的新的 circRNA。第二种方法通过将 RNA 测序读数与基因组序列相匹配来识别连接,正如拼接对齐算法所做的那样^[50]。在这种方法中,在高通量测序之前,对库进行 rRNA 缺失和 RNase R 处理。序列读取直接映射到从头开始的基因组位置,允许识别特定序列中的反向拼接。第二种方法避免了使用现有模型生成候选列表所带来的偏差,并允许通过检测未标记的拼接连接来识别新的 circRNA。然而,与基于候选者的方法相比,其准确度不高,敏感度也不够,并且需要更多的总 RNA。此外,它更容易受到核酸内切酶污染的影响。

随着 RNA 序列数据的丰富,最近开发了许多计算和可视化 circRNA 的程序。例如,Chen 等^[51]在分

析拟南芥和水稻模拟和真实 rRNA -/RNase R RNA Seq 数据的基础上,构建了 PcircRNA_finder 软件,在检测植物 circRNA 方面显示出良好的综合能力以及较高的灵敏度和精度。PcircRNA_finder 主要用于外显子 circRNA 预测,由 3 个模块组成:catcher、annotator 和 filter。Niu 等^[52]开发了 CirRNAPL 的分类系统,该系统提取了 circRNA 序列的核酸组成和结构特征,与 blast 相比,识别精度显著提高。其他可用的计算方法,如 CIRCexplorer 和 CIRI,用户可以选择不同的软件来分析 circRNA^[53-54]。2022 年,Gaffo 等^[55]发明了 CirComPara2 的计算方法,它通过结合多种 circRNA 检测方法,在不损失精度的情况下始终实现高的召回率。这些新方法发现的不同 circRNA,需要通过公认的检测方法进行验证,这是生物信息算法检测假定 circRNA 的关键步骤。

与微阵列不同,深度测序揭示了 circRNA 的实际结构,允许发现以前没有发现的新 circRNA,并且不受交叉杂交或背景噪声问题的影响。此外,可以从福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)标本中得到深度测序数据,使大规模临床样本测定成为可能。遗憾的是,RNA 测序效率很低,只有 0.1% 的读数可用于解释特定的剪接连接^[49,56],在常见的测序深度中,低丰度 circRNA 容易被忽略^[57]。幸运的是,对 circRNA 分析需求的增加推动了这项技术的进步,未来 circRNA 深度测序分析服务的成本和价格可能会降低。

1.5 FISH FISH 是一种强大的 circRNA 检测工具,可以实现 RNA 的亚细胞定位^[58-59]。在这种技术中,固定后的细胞或组织暴露于高浓度短荧光标记的 DNA 探针里,形成稳定的 DNA - RNA 杂交。杂交后,用荧光显微镜观察荧光信号。针对不同目标分子的 DNA 探针,每一个都标有一个独特的荧光团,可以在使用前汇集起来^[59]。创建靶向 circRNA 反向剪切连接的探针是一项挑战,该探针应拥有 22 ~ 24 个核苷酸,以减少非特异性杂交,并应与后剪接连接位点的两侧形成互补^[60]。此外,探针的 GC 含量应在 40% ~ 60% 之间^[61]。值得注意的是,靶拷贝数、探针修饰和严格的条件都会影响原位杂交的信号。在临床环境中应用基于 FISH 的 circRNA 检测之前,需要进行验证,包括能力测试、员工能力评估、仪器校准以及与临床发现的相关性。扩展重标记探针的方法或使用酶标记荧光探针可能是未来的方向。然而,这项技术不仅耗时,还需要昂贵的信号检测设

备,这可能会阻碍其在常规诊断实验室中的应用。

2 新型方法

2.1 基于滚环扩增(RCA)的方法 RCA是最近发展起来的一种技术,可以从DNA模板中生成单链DNA或RNA产物^[62]。这种简单有效的DNA扩增技术已被广泛应用于生物医学研究中,以建立各种生物材料的敏感诊断分析,包括DNA和RNA,以及蛋白质、小分子和细胞^[63-64]。circRNA的环形结构是启动滚环循环扩增过程的理想模板,这使得该技术特别适用于对circRNA进行分析。

2020年,Liu等^[65]设计了一种逆转录滚环扩增(RTRCA)方法,选择性地扩增目标circRNA。该系统使用单个cDNA引物和分子信标进行信号检测。DNA引物结合到目标circRNA的连接位点,允许逆转录酶开始滚动形成周期扩增。扩增后,分子信标杂交到反向扩增DNA链上的一个位点,从而使荧光信号释放。该方法的校准曲线显示了4个数量级的检测范围,从 $2\text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $50\text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与传统的qRT-PCR相比,该方法具有操作简单,成本低,不需要高精度的温度循环和额外的分离步骤等优点。

2023年,Wang等^[66]设计了一种叫做数字反转录超分支滚环扩增法(digital reverse transcription-hyperbranched rolling circle amplification, dHRCA)的检测方法。该方法设计了一对横跨目标circRNA反向剪切位点的引物,引物1能够对靶标circRNA进行反向转录形成滚环扩增生成cDNA,然后引物2再结合到生成的长链cDNA上进行延伸和链替换,从而达到指数等温扩增。利用这个设计能够有效区分线性和环状RNA,因为即使引物1也可以结合到类似的线性RNA上,但是扩增出来的cDNA不能结合到引物2上。这个方法的优点是不需要严苛的温度或者样本处理,还能够适用于数字平台使检测限度达到单分子级别^[66],也不需要RNase R来消除线性RNA。

除了发现circRNA外,新发现的circRNA亚细胞定位同样十分重要。传统基于PCR的方法可以分析样本中circRNA的基因表达,但无法给出其形态学特征。最近,Li等^[67]建立了一种新的分析方法,将RCA与线性DNA纳米结构(LDN)相结合,用于原位circRNA分析。在其研究中,RCA从一个包含2种不同发夹探针的多个结合位点的circRNA中生成了

一个长线性DNA支架。发夹状探针(H_1 和 H_2 探针)与DNA支架杂交,组装成完整的LDN。一旦LDN形成,靶标circRNA与LDN上的 H_1 探针杂交,触发2个探针的构象变化,从而使 H_2 发出荧光信号,然后释放靶标circRNA。circRNA沿着LDN支架又与其他 H_1 探针反应,进一步使 H_2 发出荧光信号,如此循环形成无酶作用的信号放大反应,使整个LDN发光。单个靶点circRNA可以催化多个LDN,从而使信号放大。该试验的检测限(LOD)约为 $1\text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。然而,在他们的研究中,没有考虑影响探针穿透的因素。探针对单个靶circRNA具有特异性,必须仔细设计 H_1 和 H_2 探针或 H_1/H_2 基团之间的距离。这些因素增加了此方法的复杂性,并且增加了该方法的耗时。

2.2 基于链式杂交反应的方法 杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)是Dirks和Pierce^[68]于2004年提出的一种新型无酶参与的核酸聚合反应,仅由目标分子引发若干种自身稳定的DNA茎环结构发生级联反应产生具有切口的长链DNA结构。每一个起始目标分子可以触发一个杂交链式反应形成一个超长链DNA,运用杂交链式反应可以实现目标分子的信号放大。该反应属于等温扩增技术,对仪器的要求大大简化,只需要简单的控温设备即可完成反应。此外,该技术不需要辅助酶的参与,可以极大地降低实验成本,反应的重现性好。

2021年,Zhu团队^[69]利用网状HCR和RTRCA构建了双重选择和双重扩增的circRNA检测方法。这种二维网状HCR由一个巧妙设计的触发链和2个发夹形燃料探针组成,可以生成稳定的网络结构,qRT-RCA产物在恒定温度下包含多组重复,从而产生增强的荧光信号。首先,对目标circRNA进行特异性qRT-RCA,获得具有多组重复序列的长单链cDNA,实现了首次选择和信号放大。接下来,为HCR工艺巧妙地设计了一个触发探针和2个发夹形探针。反向剪切连接位点的存在改变了触发探针的构象,暴露了启动子链,然后触发了2个亚稳态发夹探针 H_1 和 H_2 之间的连续链置换过程,实现了二次选择和信号放大。在该策略中,重复靶序列的存在使HCR系统在一维上延伸,而相邻的HCR系统形成了稳定的二维网状DNA纳米结构。在该研究中,通过2种特异性选择和2种核酸扩增过程实现了circRNA检测的高特异性和敏感性。

这种检测方法消除了端到端连接的线性 RNA 同种型的干扰,并且不需要严格的温度变化过程或复杂的电极制备步骤。这种网状 HCR 系统对具有多组重复序列的 DNA 具有更高的响应效率,优化的网状 HCR 系统对包含多组重复序列的 DNA 链具有更高的检测效率,可以检测低至 $0.1 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 circRNA,并且具有优异的选择性。

2.3 基于茎环引物(SLP)或茎环探针的 circRNA 检测 随着 circRNA 应用的不断发展,迫切需要为诊断或治疗中的 circRNA 分析制定高效可靠的检测策略。茎环的探针或引物由于能够在靶标 circRNA 结合时产生结构的变化,因此在 circRNA 检测中具有十分广泛的应用。

2022 年, Wu 等^[70]利用分子信标和 T7 核酸外切酶设计了一种简单有效的检测方法。该方法设计了 1 个分子信标,该分子信标在没有靶标的情况下为茎环结构,并且 5' 端有未形成配对的 3 个碱基,这样在 T7 存在的时候不被酶切,因为 T7 只从 5' 末端降解双链 DNA 或者 RNA。当靶标存在时,分子信标与靶标结合后打开茎环,分子信标的 5' 端与靶标形成双链, T7 切割分子信标释放出荧光探针,然后靶标 circRNA 又可以和其他分子信标结合进行下一波剪切从而形成循环。该方法操作简单,在 $1 \sim 100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性良好,并且检测费用低。

Zhu 等^[71]在 2022 年构建了具有催化功能的茎环自组装(catalyzed hairpin self-assembly, CHA)调控可变的银纳米簇(DNA AgNC)体系,从而能够用比色法检测 circRNA,其体系利用 2 个具有催化功能的发卡自组装结构和银纳米簇组成等温扩增体系。具体来讲,上游 CHA1 经过分析物特异性触发,形成双链 DNA(dsDNA)产物,导致发夹 DNA AgNC 的红色荧光由于发夹结构的破坏而降低。产生的具有触发序列的 dsDNA 然后可以进一步激活下游的 CHA2 以产生另一个 dsDNA 复合物,这诱导其他暗 AgNC 生成多 G 序列,从而导致绿色荧光的显著增加。因此,通过测量绿色和红色荧光强度比率的明显变化,比率测量系统可用于灵敏地检测和区分 circRNA。该方法能够达到 $1 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的检测限,该方法设计较为复杂,步骤较为复杂。

环介导等温扩增(LAMP)是一种具有优异的特异识别能力,优越的扩增效率和低背景信号的 DNA 扩增方法^[72],已广泛应用于测定 miRNAs、病毒和特

定 DNA 序列^[73-74],这项技术由 Notomi 等^[75]于 2000 年开发,需要 1 种具有链置换能力的 DNA 聚合酶和 3 对引物,可以结合目标 DNA 上的 6 个不同区域,确保高序列选择性。DNA 聚合酶具有独特的链置换特性,与靶 DNA 上 6 个不同区域结合的引物对可确保高序列选择性。这项技术利用特定位点的序列扩展和缺口,以指数方式生成和释放目标产品。使用这种方法,微量目标可以在单个扩增步骤中生成大量产物,而不需要修改或标记 DNA 探针,因此,它是一种高度特异的检测方法^[76]。

2020 年, Li 等^[77]开发了一种超灵敏的环状 RNA 检测方法,该方法使用 SLP 诱导指数扩增。SLP 识别并结合 circRNA 的后剪接连接,从而仅在存在目标 circRNA 时形成双茎环 DNA 结构。一旦双茎环结构形成,2 个内引物就可以启动自动循环链置换 DNA 合成。这种设计直接将 circRNA 与相应的线性 RNA 区分开来,排除了 RNase R 的使用,避免了由于滚环扩增而导致对 circRNA 的过高估计,提高了测量精度。基于 SLP 的技术具有非常高的灵敏度, LOQ 低至 $10 \text{ amol} \cdot \text{L}^{-1}$,并且,由于双指数放大具有较高的灵敏度,其动态范围为 7 个数量级,从 $10 \text{ amol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在他们提出的分析中,可以准确检测到低至 $10 \text{ amol} \cdot \text{L}^{-1}$ sub - ciRS - 7, 对应于 $10 \mu\text{L}$ 反应体积中约 60 个拷贝。这是目前 circRNA 分析最灵敏的方法。在他们的研究中,从细胞中提取的 100 ng 总 RNA 中 ciRS - 7 的量在 K562 细胞中为 $36.26 \text{ amol} \cdot \text{L}^{-1}$,在 HT29 细胞中为 $19.03 \text{ amol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。事实上,这种方法的灵敏度使其可以应用到临床样本的检测中。目前对基因组的几乎所有知识都来源于在人类层面上进行的研究,通常涉及数千或更多的批量分析细胞,虽然结果可以提供有价值的信息,但它往往忽略了细胞群体中出现的异质性^[78-79]。了解 circRNA 的生理功能需要在单细胞水平量化 circRNA 表达^[80]。对于单细胞或循环肿瘤细胞分析,样本的总大小与常用大小有很大不同,因此,仍然需要开发更灵敏的分析方法。对于此分析方法,模板和引物仅针对单个靶点,与 qRT - PCR 相比,引物需要精心设计,在临床应用中复杂且成本高昂。

2.4 基于酶的 circRNA 检测 RCA 和 LAMP 由于能够从微量的靶 circRNA 中产生可检测信号而受到了广泛关注。然而,这 2 种方法都依赖于一组必须精心设计的探针序列或引物。此外,这些检测系统

很复杂,可能会产生其他产物影响检测的精度。因此,核酸酶辅助扩增方法已发展成为一种替代 circRNA 分析的方法。

2018年,Li等^[81]利用 circRNA 作为 miRNA 海绵以及双链特异核酸酶(DSN)扩增的能力,创建了一种量化 circRNA 的方法。DSN 是一种核酸酶,可降解双链 DNA 或 DNA:RNA 杂交双链中的 DNA,但不能切割单链 DNA、单链 RNA 或双链 RNA^[82-83]。在其研究中,分子信标探针被设计成能够与目标 circRNA 上的 7 个结合位点杂交。分子信标与靶标的结合诱导其茎环结构的构象变化,触发荧光猝灭剂的离开并释放出探针的荧光。然后 DSN 酶解掉 DNA/circRNA 杂交的 DNA 链,释放荧光探针片段和 circRNA,circRNA 然后与新的分子信标探针杂交。DSN 对探针的这种循环裂解在靶环 RNA 存在的情况下大大增强了荧光信号。

Li等^[84]进一步简化了 circRNA 检测,开发了一种具有后剪接位点识别和 DSN 辅助扩增的电化学检测方法。在这个系统中,发夹式探针与目标 circRNA 的后剪接位点杂交。然后用 DSN 对样本进行酶切,该 DSN 可以切割长 DNA/RNA 杂交链(20 bp)中的 DNA,但当杂交链较短(<15 bp)时,它将不起作用。只有那些结合了 circRNA 而不是线性 RNA 的探针才能被 DSN 切割并触发循环扩增,从而使 MB 标签从金电极表面移除,最终降低电流响应。该方法可以在 LOD 低至 $3.5 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的复杂生物样品中直接检测 circRNA,并且不需要用 RNase R 进行预处理。因此,该电化学平台提供了一种简单的分析 circRNA 的策略,无需昂贵的设备或复杂的操作。

基于 DSN 的分析,虽然在目标 circRNA 存在的情况下放大信号,但与没有 DSN 的对照相比,荧光仅增强了 35 倍。DSN 的扩增效率无法与 PCR 或 RCA 相比。寻找或设计具有更好扩增效率的新酶,或其他等温扩增相结合,将有助于核酸酶辅助扩增方法在 circRNA 检测中的实际应用。

2021,Zhou等^[85]利用切口核酸内切酶构建了可测定 miRNA 和 circRNA 的方法。切口核酸内切酶能够识别双链 DNA 或 RNA 的特异性位点,并切割某一条链。在他们的的方法中,利用捕获探针和报告探针 2 种探针。捕获探针为茎环状的探针,有部分序列可以和靶标 circRNA 结合。报告探针为分子信标探针,两端有荧光基团和猝灭基团。首先在靶标 circRNA

存在的情况下,茎环捕获探针与靶标 circRNA 部分结合形成双链,并且捕获探针的多余链能够和报告探针进行结合,报告探针结构后暴露出切口酶结合位点,从而能够切割报告探针释放出荧光。被切割后留下的空位又可以结合报告探针,从而形成循环。该方法能够达到 $100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的检测限,并且不需要复杂的设计。2022年,Liang等^[86]进一步深化了此体系,同时借助 2 个茎环探针以及 DSN 酶和核酸内切酶。捕获探针首先识别和结合靶标 circRNA,捕获探针多余部分激活 DSN 酶可切割捕获探针的结合部分,捕获探针另外和报告探针结合部分在切口酶的作用下切割。这样,捕获探针和报告探针都被切割并形成循环,大大加强了循环。该方法在 $100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性良好。但这 2 种方法检测的灵敏度均为 $100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$,相较其他方法灵敏度较低。

3 总结与展望

过去十几年的研究表明,circRNA 在病变组织中异常表达,这使得它们在常规临床诊断和治疗中具有潜在的应用价值。circRNA 的保守性、多样性、组织特异性表达和稳定性等特点使其成为理想的生物标记物。迄今为止,研究主要集中在揭示 circRNA 表达谱与特定疾病之间的相关性。鉴于 circRNA 作为一种无创诊断和预后生物标记物的潜在用途,准确分析 circRNA 是临床应用的必要前提。

尽管已经发展了许多种 circRNA 分析方法,但仍存在一些问题。(1)一般来说,体外 circRNA 分析需要 RNA 提取和线性 RNA 中分离,通常是通过用核酸外切酶(通常是 RNA 酶 R)处理 RNA 样本。因此,线性 RNA 被处理,而 circRNA 保持完整。然而,最近有研究表明,一些 circRNA 也对这种酶敏感。目前急需进一步开发一种简单、低成本、高效的 circRNA 分离前处理方法。(2)通常,一个 circRNA 可以调节许多功能,并与许多疾病相关。一种疾病通常与多种 circRNA 的表达有关。因此,开发一种可同时高通量的检测 circRNA 的方法具有重要意义。(3)目前大多数检测方法的 LOD 都是在 $\text{fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平,追求超灵敏方法对于分析低丰度 circRNA 至关重要,特别是对于单细胞或循环肿瘤细胞 circRNA 分析。一个方向可能是使用新型的纳米材料,由于纳米材料独特的光学、电子和磁性,采用全内反射荧光显微镜、拉曼散射和表面等离子体共振的新型物理生物传感器被

认为是一种替代的 circRNA 分析技术。(4) 直接检测组织中特定 circRNA 的时空表达序列的技术对于阐明 circRNA 生物学极其重要。由于细胞中的 circRNA 水平较低, 因此有必要进一步开发一种更有效、更灵敏的体内 circRNA 检测方法。新的分析技术的发展将为研究者提供更多的 circRNA 定量检测选择。从实践的角度来看, 应该考虑每种方法的优点和局限性, 以获得最经济有效的实验方法。未来, circRNA 分析的新方法将为改善早期诊断中的人类健康提供更强大的工具。

参考文献

- [1] KULCHESKI FR, CHRISTOFF AP, MARGIS R. Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker [J]. *Biotechnol*, 2016, 238: 42
- [2] KRISTENSEN LS, ANDERSEN MS, STAGSTED L, *et al*. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675
- [3] LIANG Y, LIU N, YANG L, *et al*. A brief review of circRNA biogenesis, detection and function[J]. *Curr Genomics*, 2021, 22(7): 1
- [4] BARRETT SP, SALZMAN J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions[J]. *Development*, 2016, 143(11): 1838
- [5] ABU N, JAMAL R. Circular RNAs as promising biomarkers: a mini-review[J]. *Front Physiol*, 2016(7): 355
- [6] CHAICHIAN S, SHAFABAKHSH R, MIRHASHEMI SM, *et al*. Circular RNAs: a novel biomarker for cervical cancer[J]. *Cell Physio*, 2020, 235(2): 718
- [7] ZHANG HD, JIANG LH, SUN DW, *et al*. CircRNA: a novel type of biomarker for cancer[J]. *Breast Cancer*, 2018, 25(1): 1
- [8] LIU L, ZANG M, CHEN ZQ, *et al*. Circular RNA detection methods: a minireview[J]. *Talanta*, 2022, 238(Pt 2): 123066
- [9] ZHANG Z, YANG T, XIAO J. Circular RNAs: promising biomarkers for human diseases[J]. *EBioMedicine*, 2018, 34: 267
- [10] TABAK H, SMIT J, WINTER A, *et al*. Discrimination between RNA circles, interlocked RNA circles and lariats using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(14A): 6597
- [11] JECK WR, SHARPLESS NE. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5): 453
- [12] KHANDJIAN EW, MÉRIC C. A procedure for Northern blot analysis of native RNA[J]. *Anal Biochem*, 1986, 159(1): 227
- [13] COCQUET J, CHONG A, ZHANG G, *et al*. Reverse transcriptase template switching and false alternative transcripts[J]. *Genomics*, 2006, 88(1): 127
- [14] YU CY, LIU HJ, HUNG LY, *et al*. Is an observed non-co-linear RNA product spliced in trans, in cis or just *in vitro* [J]. *Nucleic acids Res*, 2014, 42(14): 9410
- [15] BARRETT SP, WANG PL, SALZMAN J. Circular RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor[J]. *Elife*, 2015, 4: e07540
- [16] COOPER DA, CORTÉS-LÓPEZ M, MIURA P. Genome-wide circRNA profiling from RNA-seq data[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1724: 27
- [17] LI Y, ZHAO J, YU S, *et al*. Extracellular vesicles long RNA sequencing reveals abundant mRNA, circRNA, and lncRNA in human blood as potential biomarkers for cancer diagnosis[J]. *Clin Chem*, 2019, 65(6): 798
- [18] LI S, TENG S, XU J, *et al*. Microarray is an efficient tool for circRNA profiling[J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(4): 1420
- [19] XI Y, FOWDUR M, LIU Y, *et al*. Differential expression and bioinformatics analysis of circRNA in osteosarcoma [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(5): BSR20181514
- [20] MAO J, LI T, FAN D, *et al*. Abnormal expression of rno_circRNA_014900 and rno_circRNA_005442 induced by ketamine in the rat hippocampus[J]. *BMC Psychiatry*, 2020, 20(1): 1
- [21] WANG M, SU P, LIU Y, *et al*. Abnormal expression of circRNA_089763 in the plasma exosomes of patients with postoperative cognitive dysfunction after coronary artery bypass grafting[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(3): 2549
- [22] SALZMAN J. Circular RNA expression: its potential regulation and function[J]. *Trends Genet*, 2016, 32(5): 309
- [23] SCHNEIDER T, SCHREINER S, PREUER C, *et al*. Northern blot analysis of circular RNAs [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1724: 119
- [24] BURNETT WV. Northern blotting of RNA denatured in glyoxal without buffer recirculation [J]. *Biotechniques*, 1997, 22(4): 668
- [25] D'AMBRA E, MORLANDO M. Study of circular RNA expression by nonradioactive northern blot procedure[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2348: 371
- [26] WANG X, GE S. Nonradioactive northern blot of circRNAs [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1724: 135
- [27] VÁRALLYAY É, BURGYÁN J, HAVELDA Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 190
- [28] DAMM K, BACH S, MÜLLER K HARTMANN, *et al*. Improved northern blot detection of small RNAs using EDC crosslinking and DNA/LNA probes[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1296: 41
- [29] PANDA AC, GOROSPE M. Detection and analysis of circular RNAs by RT-PCR[J]. *Bio Protoc*, 2018, 8(6): e2775
- [30] JINEK M, DOUDNA JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference [J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 405
- [31] SUZUKI H, TSUKAHARA T. A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6): 9331

- [32] CHEN DF, ZHANG LJ, TAN K, JING Q. Application of droplet digital PCR in quantitative detection of the cell-free circulating circRNAs[J]. *Biotechnol Biotech*, 2018, 32(1): 116
- [33] SEDLAK RH, KUYPERS J, JEROME KR. A multiplexed droplet digital PCR assay performs better than qPCR on inhibition prone samples[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 80(4): 285
- [34] UCHIYAMA Y, NAKASHIMA M, WATANABE S, *et al.* Ultra-sensitive droplet digital PCR for detecting a low-prevalence somatic GNAQ mutation in Sturge-Weber syndrome[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39897
- [35] LI T, SHAO Y, FU L, *et al.* Plasma circular RNA profiling of patients with gastric cancer and their droplet digital RT-PCR detection[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2018, 96(1): 85
- [36] LI H, BAI R, ZHAO Z, *et al.* Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases[J]. *Bioscience Reports*, 2018, 38(6): BSR20181170
- [37] ZHANG P, GUO N, GAO K, *et al.* Direct recognition and sensitive detection of circular RNA with ligation-based PCR[J]. *Org Biomol Chem*, 2020, 18(17): 3269
- [38] LOHMAN G, ZHANG Y, ZHELKOVSKY AM, *et al.* Efficient DNA ligation in DNA-RNA hybrid helices by chlorella virus DNA ligase[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(3): 1831
- [39] WANG H, WANG H, LIU C, *et al.* Ultrasensitive detection of telomerase activity in a single cell using stem-loop primer-mediated exponential amplification (SPEA) with near zero nonspecific signal[J]. *Chem Sci*, 2016, 7(8): 4945
- [40] TANG W, FU K, SUN H, *et al.* CircRNA microarray profiling identifies a novel circulating biomarker for detection of gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 1
- [41] WANG Z, XU P, CHEN B, *et al.* Identifying circRNA-associated ceRNA networks in the hippocampus of A β 1-42-induced Alzheimer's disease-like rats using microarray analysis[J]. *Aging*, 2018, 10(4): 775
- [42] ZHOU YF, SHI LJ, YAO J, *et al.* Microarray analysis of circRNA expression pattern in corneal neovascularization[J]. *Cornea*, 2019, 38(11): 1443
- [43] LIU W, ZHANG J, ZOU C, *et al.* Microarray expression profile and functional analysis of circular RNAs in osteosarcoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(3): 969
- [44] WU Q, WANG Y, CAO M, *et al.* Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(10): 3938
- [45] XIN R, GAO Y, Y. GAO Y, *et al.* isoCirc catalogs full-length circular RNA isoforms in human transcriptomes[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1
- [46] WESTHOLM JO, MIURA P, OLSON S, *et al.* Genome-wide analysis of drosophila circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation[J]. *Cell Rep*, 2014, 9(5): 1966
- [47] DANAN M, SCHWARTZ S, EDELHEIT S, *et al.* Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in archaea[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(7): 3131
- [48] SALZMAN J, GAWAD C, WANG PL, *et al.* Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30733
- [49] YANG X, YE T, LIU H, *et al.* Expression profiles, biological functions and clinical significance of circRNAs in bladder cancer[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 1
- [50] FONSECA, NUNO A, RUNG, *et al.* Tools for mapping high-throughput sequencing data[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(24): 3169
- [51] CHEN L, YU Y, ZHANG X, *et al.* PcircRNA_finder; a software for circRNA prediction in plants[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(22): 3528
- [52] NIU M, ZHANG J, LI Y, *et al.* CirRNAPL: a web server for the identification of circRNA based on extreme learning machine[J]. *Comput Struct Biotech*, 2020, 18: 834
- [53] ZHANG X, WANG H, ZHANG Y, *et al.* Complementary sequence-mediated exon circularization[J]. *Cell*, 2014, 159(1): 134
- [54] GAO Y, WANG J, ZHAO F. CIRI: an efficient and unbiased algorithm for *de novo* circular RNA identification[J]. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 4
- [55] GAFFO E, BURATIN A, DAL MOLIN A, *et al.* Sensitive, reliable and robust circRNA detection from RNA-seq with CirComPara2[J]. *Brief Bioinform*, 2022, 23(1): bbab418
- [56] ZHANG Y, ZHANG XO, CHEN T, *et al.* Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2013, 51(6): 792
- [57] LI Z, HUANG C, BAO C, *et al.* Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3): 256
- [58] CHRZANOWSKA NM, KOWALEWSKI J, LEWANDOWSKA MA. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) in diagnosis and tailored therapies in solid tumors[J]. *Molecules*, 2020, 25(8): 1864
- [59] LIM AS, LIM TH. Fluorescence *in situ* hybridization on tissue sections[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1541: 119
- [60] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333
- [61] WADA Y, OHTA Y, XU M, *et al.* A wave of nascent transcription on activated human genes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(43): 18357
- [62] GOO NI, KIM DE. Rolling circle amplification as isothermal gene amplification in molecular diagnostics[J]. *Biochip J*, 2016, 10(4): 262
- [63] ALI MM, LI F, ZHANG Z, *et al.* Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine[J]. *Chem Soc Rev*, 2014, 43(10): 3324
- [64] YAO C, ZHANG R, TANG J, *et al.* Rolling circle amplification

- (RCA) – based DNA hydrogel[J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(12): 5460
- [65] LIU Y, ZHANG X, LIU M, *et al.* Direct detection of circRNA in real samples using reverse transcription – rolling circle amplification[J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1101: 169
- [66] WANG K, BAI X, XUE Y, *et al.* Absolute quantification of circRNA using digital reverse transcription – hyperbranched rolling circle amplification [J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2023, 375: 132893
- [67] JIAO J, XIANG Y, DUAN C, *et al.* Lighting up circRNA using a linear DNA nanostructure [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(18): 12394
- [68] DIRKS RM, PIERCE NA. Triggered amplification by hybridization chain reaction[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(43): 15275
- [69] DONG J, ZENG Z, SUN R, *et al.* Specific and sensitive detection of circRNA based on netlike hybridization chain reaction[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 192: 113508
- [70] QU H, CHEN M, GE J, *et al.* A fluorescence strategy for circRNA quantification in tumor cells based on T7 nuclease – assisted cycling enzymatic amplification [J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1189: 339210
- [71] YANG M, LI H, LI X, *et al.* Catalytic hairpin self – assembly regulated chameleon silver nanoclusters for the ratiometric detection of circRNA[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 209: 114258
- [72] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, *et al.* Loop – mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects[J]. *Microbiol*, 2015, 53(1): 1
- [73] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop – mediated isothermal amplification using loop primers[J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16(3): 223
- [74] TOMITA N, MORI Y, KANDA H, *et al.* Loop – mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(5): 877
- [75] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, *et al.* Loop – mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): e63
- [76] WONG YP, OTHMAN S, LAU YL, *et al.* Loop – mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro – organisms[J]. *Appl Microbiol*, 2018, 124(3): 626
- [77] ZHANG P, GAO K, LIANG Y, *et al.* Ultrasensitive detection of circular RNA by accurate recognition of the specific junction site using stem – loop primer induced double exponential amplification [J]. *Talanta*, 2020, 217: 121021
- [78] PAOLILLO C, LONDIN E, FORTINA P. Single – cell genomics [J]. *Clin Chem*, 2019, 65(8): 972
- [79] LIM B, LIN Y, NAVIN N. Advancing cancer research and medicine with single – cell genomics[J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(4): 456
- [80] NISAR S, BHAT AA, SINGH M, *et al.* Insights into the role of circRNAs: biogenesis, characterization, functional, and clinical impact in human malignancies[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 0617281
- [81] JIAO J, GAO T, SHI H, *et al.* A method to directly assay circRNA in real samples [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2018, 54(95): 13451
- [82] ANISIMOVA VE, REBRIKOV DV, SHAGIN DA, *et al.* Isolation, characterization and molecular cloning of duplex – specific nuclease from the hepatopancreas of the Kamchatka crab[J]. *BMC Biochem*, 2008, 9: 14
- [83] HIRAKAWA Y, OHISO I. Cloning, expression, and characterization of thermostable duplex – specific nuclease from snow crab (*Chionoecetes opilio*) [C]//. *The 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology of Japan*, 2009
- [84] JIN J, CHAO L, NING L, *et al.* Electrochemical detection of circRNAs based on the combination of back – splice junction and duplex – specific nuclease[J]. *Sensor Actuat B Chem*, 2020, 302: 127166
- [85] ZHANG Y, ZHANG Q, WENG X, *et al.* NEase – based amplification for detection of miRNA, multiple miRNAs and circRNA [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1145: 52
- [86] ZHAO G, YAN X, ZHANG Y, *et al.* Sensitive detection of miRNA and circRNA through DSN enzyme cooperating NEase assisted dual signal amplification[J]. *Anal Biochem*, 2022, 654: 114744

(本文于2023年4月25日收到)