

• 综 述 •

生物正交点击化学在体外诊断技术中的应用与进展^{*}

雷经纬, 刘泳渝, 曹雪艳, 童学东 综述, 邓 昆[△]审校
重庆医科大学附属第三医院检验科, 重庆 401120

摘 要:生物正交点击化学是一类能够在复杂生物体系中快速、选择性发生而不受内源性生化过程干扰的反应, 因其高效、温和与特异性, 引起生命科学与医学研究领域的关注。近年来, 该技术逐渐渗透到体外诊断领域, 成为构建新型检测方法与多重诊断平台的重要工具。该文综述了生物正交点击化学的发展历程、基本类型, 并阐述其反应机制, 重点探讨其在信号标记与放大、多重检测与分析、循环肿瘤细胞与细胞外囊泡捕获与检测等体外诊断平台中的应用进展, 特别关注其与微流控、纳米材料及数字化技术的融合。最后分析了其在成本、标准化与临床转化方面的挑战与前景。

关键词:生物正交化学; 点击化学; 体外诊断; 细胞外囊泡; 微流控

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.14.014 **中图法分类号:**R446

文章编号:1673-4130(2026)14-1749-07

文献标志码:A

Application and progress of bioorthogonal click chemistry in in vitro diagnostic techniques^{*}

Lei Jingwei, Liu Yongyu, Cao Xueyan, Tong Xuedong, Deng Kun[△]

Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China

Abstract: Bioorthogonal click chemistry is a class of reactions that can occur rapidly and selectively in complex biological systems without interference from endogenous biochemical processes. Because of its high efficiency, mildness and specificity, it has attracted the attention of life science and medical research. In recent years, this technology has gradually penetrated into the field of in vitro diagnosis and has become an important tool for constructing new detection methods and multiple diagnostic platforms. This paper reviews the development history and basic types of bioorthogonal click chemistry, and expounds its reaction mechanism. It focuses on its application in in vitro diagnostic platforms such as signal labeling and amplification, multiple detection and analysis, capture and detection of circulating tumor cells and extracellular vesicles, with special attention to its integration with microfluidics, nanomaterials and digital technology. Finally, its challenges and prospects in cost, standardization and clinical transformation are analysed.

Key words: bioorthogonal chemistry; click chemistry; in vitro diagnosis; extracellular vesicles; microfluidic

体外诊断是现代医学体系的重要组成部分, 承担着疾病预防、早期发现、个体化治疗决策及疗效评估等核心任务^[1-3]。随着分子诊断与精准医学的发展, 为实现对多样生物分子(包括核酸、蛋白质、细胞、代谢物等)的特异性捕获与精准检测, 临床检验亟须更高灵敏度、特异度和可多重化的新型捕获与检测平台^[4]。

生物正交点击化学的出现, 为解决这些问题提供了新思路。所谓“生物正交”, 即该类反应在生物体复杂环境中不会与天然分子发生非特异性反应, 而能选择性地完成标记或连接操作, 在体外诊断、成像和药物递送等方面展现潜力^[5-7]。特别是在体外诊断领域, 生物正交点击化学凭借快速、特异和可控的特性, 成为构建新一代分子检测工具的有力支撑。此类反

应能够在温和条件下于复杂生物环境中特异地高效进行, 并且不受内源性蛋白质、核酸或代谢物等分子的干扰^[8]。基于此, 生物正交点击化学近年来逐渐被应用于多类检测场景, 包括核酸与蛋白质探针的稳定构建、循环肿瘤细胞(CTCs)与细胞外囊泡(EVs)的无损捕获、免疫检测平台的信号标记与放大, 以及智能材料与生物传感器的集成等。其模块化和正交性特征, 也为多重标记与多功能体系的开发提供了可能。

尽管已有一定进展, 但该交叉领域的系统性综述仍然有限。本文将从反应机制与主流体系出发, 系统梳理生物正交点击化学在体外诊断中的最新研究进展, 重点探讨其技术优势、典型应用场景及临床转化中面临的挑战, 旨在为未来体外诊断方法学创新与临

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82372357, 82172365)。

[△] 通信作者, E-mail: dengkun@hospital.cqmu.edu.cn。

床应用提供理论依据与实践参考。

1 生物正交点击化学的基本原理与主流体系

“点击化学”由 Sharpless 提出,生物正交点击化学是其在生物学领域中的分枝应用,由一些研究者推动发展^[9-12]。随后以铜催化的叠氮化物-炔烃环加成反应(CuAAC)、应变促进叠氮化物-炔烃环加成反应(SPAAC)与反电子需求 Diels-Alder 反应(iEDDA)为代表的生物正交点击化学反应体系相继出现,并在生命科学领域广泛应用。2022 年诺贝尔化学奖授予“点击化学与生物正交化学”,肯定了其科学与转化价值。以下为生物正交点击化学的主要反应体系及其特点对比,见表 1。

1.1 CuAAC 有研究在 2002 年报道了 CuAAC,其反应机理为在 Cu⁺ 催化下,炔基与叠氮基发生 1,3-偶极环加成反应,选择性生成 1,4-二取代的 1,2,3-三唑结构(图 1A)。该反应操作简便、反应条件温和,产率高,被称为“原型点击反应”,可以在没有任何有机助溶剂的情况下在各种溶剂中发生,此反应的一大特点就是需要 Cu⁺ 作为催化剂,点击反应的速率与 Cu⁺ 浓度与之间存在密切关联^[13-14]。然而,Cu⁺ 在生物体系中的毒性会诱导氧化应激与细胞损伤,从而限制了 CuAAC 在活细胞和生物样本研究中的应用^[15]。为了解决这个问题,科学家们也做出了努力,探索了几种方法来开发生物相容性催化剂,包括利用配体螯合或载体稳定的 Cu⁺,通过添加抗坏血酸钠、金属铜纳米颗粒和纳米结构氧化铜原位还原 Cu²⁺ 盐等,在一定程度上能减弱铜毒性,确保 CuAAC 反应下细胞的活性^[15-17]。尽管铜对细胞具有毒性,但 CuAAC 的快速反应速率使其在点击化学应用中的地位不可撼动,在传感器的构建上,也能够发挥很好的作用。

1.2 SPAAC 为克服生物毒性问题,Dommerholt 团队^[18]于 2004 年提出 SPAAC,其原理是利用环辛炔等张力炔烃与叠氮基团发生偶极环加成,无需金属催化即可形成三唑结构,被认为是 CuAAC 的替代反应

(图 1B)。SPAAC 避免了铜毒性,具有良好的生物相容性,可直接用于蛋白质标记、活细胞分析和动物模型,尽管其反应速率较 CuAAC 慢,但通过设计更高反应活性的衍生物(如二苯并环辛炔,DBCO),已明显提升了效率。SPAAC 反应在生物活性分子表面修饰方面的应用已取得较大进展,可以使用脂质标记或者代谢标记的方式安全有效地将叠氮化物插入到生物膜上,随后利用 SPAAC 反应可以快速捕获到具有生物活性的目标分子,这对与疾病诊断方法的开发具有重要意义^[19-21]。

1.3 iEDDA 有团队于 2008 年开发了 iEDDA,其反应机理为四嗪(Tz)作为亲二烯体与反式环辛烯(TCO)作为二烯体发生[4+2]环加成,生成稳定的二氢嘧啶产物(图 1C)^[22]。iEDDA 具有极高的选择性和超快的反应动力学,能够在极低浓度下快速偶联,因此被认为是第三代生物正交反应^[23]。如今,大多数涉及生物正交反应的生物学研究都是基于 iEDDA。人们借助 iEDDA 反应的快速动力学,通过 Tz 或者 TCO 的活性基团与生物活性分子偶联,从而快速地促进生物活性分子的聚集,起到信号放大的作用。此外,研究者们可以利用这种快速反应动力学在体外构建快速稳定的 EVs 或 CTCs 捕获平台。然而,TCO 的体内稳定性在酸性条件下,或当生物系统中存在铜离子及亲核试剂时,可能会受到损害。为了克服这些限制,已经合成了多种二烯和亲二烯来优化点击反应的效率^[24-25]。在未来,将能看到 iEDDA 反应更多的应用。

1.4 其他新兴反应 除了以上经典的生物正交点击化学反应外,还有如硫氟交换反应,具有高稳定性,适合构建长期保存的诊断试剂,“可切换/可脱保护”的 Tz 触发释放化学,以及对 Tz 活性的可逆调控策略,为可编程诊断反应学提供化学基元^[26]。另外还有光控点击化学,通过光照触发反应,提高空间与时间分辨率^[27]。

表 1 主流生物正交点击化学反应的特点

点击化学反应	k[mol/(L·s)]	催化剂	生物相容性	基团大小	应用场景	参考文献
CuAAC	10~100	Cu ⁺	低(铜毒性)	小	固定探针、表面修饰	[10][28]
SPAAC	1~60	无	高	小	蛋白质标记、细胞分析	[18][29]
iEDDA	1~10 ⁶	无	高	大	稀有标志物捕获	[12]

2 生物正交点击化学的特点及在生物体外诊断技术中的优势

生物正交点击化学反应通常具有以下几种特点^[9,30]:(1)生物正交性,反应在生物水溶液中进行、条件包括生理 pH、温度等,且不与生物体系中的内源性分子(如蛋白质、核酸、代谢物等)发生非特异性反应;(2)高效性,反应速率快,通常具有高选择性和高产率;(3)稳定性,反应物和产物在生物环境中稳定,不

易降解或引发毒性;(4)模块化,反应通常具有模块化的特性,允许灵活地设计和引入不同的功能基团。见表 2。

2.1 高选择性与特异性,降低背景信号 生物正交反应仅在特定反应物间发生,反应物在生物环境中稳定,避免非特异性信号干扰,背景噪声低,适合复杂生物样本(如血清、尿液)的检测。通过设计反应对可实现生物分子温和条件下的探针标记、信号放大、高效

固定与特异性捕获。当前基于抗原抗体或生物素亲和素系统的 EVs 捕获方法虽应用广泛,但存在反应时间长、步骤烦琐及易受干扰的问题^[31-33]。与之相比,生物正交点击化学优势显著,在反应特异性、速度、副产物等多方面优于其他生物偶联反应,是极具潜力的分离技术,见表 2。

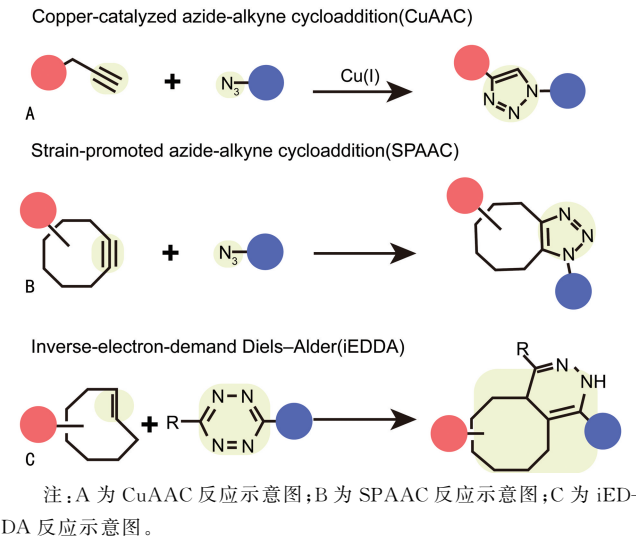


图 1 主流生物正交点击化学反应示意图

2.2 温和反应条件,保持检测靶标生物活性 生物正交点击化学反应条件温和,并且高度兼容复杂生物样本,为体外诊断平台的构建提供了关键技术支撑。与传统化学反应常常需要有机溶剂、高温或极端 pH 条件不同,点击反应通常在水相环境、25~37 ℃ 的近生理温度及 pH 6.5~7.5 的弱中性条件下即可高效进行。这种温和的反应环境不仅避免了对核酸、蛋白质等敏感生物大分子的破坏,而且最大限度地保留了被检测物的天然构象和生物学活性。生物正交点击化学能够在不改变这些活性状态的前提下完成标记、

固定或信号放大过程,使检测结果更真实地反映样本的原始状态。这一特征为在临床复杂环境下实现快速、简便的液体活检或床旁检测提供了更大的可能性^[33-34]。

2.3 模块化反应,便于多重标记和方法学构建 在体外诊断中,生物标志物的多重检测变得越来越重要。生物正交点击化学凭借其可控的反应设计与灵活的分子对接模式,可灵活引入不同功能基团(如荧光团、酶、纳米颗粒),适配多种检测平台。生物正交反应对(如叠氮-炔基、四嗪-反式环辛烯、硫代酯-氨基氧化物)彼此独立且正交,能够在同一反应体系中并行发生而互不干扰。这种“互不交叉”的特性为多重标记提供了清晰的化学逻辑框架,使得研究者可以通过预设反应位点的精准对接,实现不同探针或信号放大模块的定向组装^[7,35]。这种模块化、可扩展的反应体系,不仅提升了多重检测的灵活性和效率,还进一步拓展了不同功能单元的組合空间,使研究者能够根据临床需求自由设计检测策略。通过在同一平台上实现不同模块的并行或串联反应,可以灵活构建多标志物检测、信号放大与结果校正等多模块化体系。

2.4 信号增强与可视化能力 信号增强通常是生物传感器在检测疾病靶标时达到理想灵敏度的重要挑战。生物正交点击化学分子(TCO 和 Tz)可以提供官能团,与 BSA 或酶等蛋白质的氨基反应形成 Tz 或 TCO 功能化蛋白质,通过点击反应,可使单分散的小蛋白质颗粒聚集成大蛋白质组装体,从而极大增强信号^[36-37]。此外,通过在 DNA 探针上使用叠氮化物或 DBCO 修饰以提供一种稳定特异的连接,结合无酶扩增策略,能设计出稳定信号放大、高灵敏度和特异度的非酶、指数扩增方法,实现对目标分子的 fmol/L 级别灵敏检测。

表 2 常见生物偶联技术特征对比

特性	碳二亚胺结合	抗原抗体结合	生物素-亲和素系统	生物正交点击化学
结合机制	共价键结合	非共价键	超高亲和力	生物正交共价键
结合强度	中	中	高	高
反应条件	pH 4.0~6.0, 37 ℃	pH 7.4, 25~37 ℃	pH 2.0~13.0, 耐高温	pH 7.0~9.0, 25~37 ℃
反应特异性	低	中	中	高
反应速度	慢	慢	快	快
反应副产物	含硫杂质	无	无	N ₂
产物均一性	低	高	高	高
产物稳定性	酰胺键稳定,但偶联位点易降解	易受 pH、离子强度影响	稳定	稳定
模块化程度	低	低	中	高

3 生物正交点击化学在体外诊断技术中的应用

3.1 信号标记、放大与超灵敏检测 生物正交点击化学为生物分子标记与信号放大提供了高效工具,其核心在于通过高度选择性的化学反应,将荧光基团、

酶或其他信号分子稳定偶联至目标生物分子(如蛋白质、核酸或代谢物),以增强检测灵敏度与特异性。Jia 等^[38]将高亮度荧光二氧化硅纳米颗粒(SiNPs)与生物正交点击化学结合,构建了一种超灵敏磁珠免疫分

析平台。其借 Tz-TCO 的特异反应,让荧光 SiNPs 在 p24 抗原-抗体复合物上可控多层堆叠成“信号塔”,将单个抗原结合事件转化为指数级荧光信号,最终在人血清中实现 46 fg/mL 的检测限。有研究团队^[39]开发了动态化学标记策略用于检测微小 RNA(miRNA)单碱差异。其设计的一对可点击纳米颗粒探针,仅当靶标序列完全匹配时,两探针才能通过点击反应连接并发出信号。该团队以肝癌相关的 miR-122 为模型,在无需任何酶扩增的情况下,通过点击化学在流式细胞仪上成功检测并区分 miR-122 及其单碱基变异体,灵敏度和特异度与 TaqMan qPCR 相当,还可直接检测血清样本,有望发展为简便的体外诊断工具。有研究提出点击扩增 FISH 技术,探针与目的序列杂交形成“C”构型,借 CuAAC 反应连接探针末端并锁定靶标,经多轮杂交与点击反应放大荧光,实现高特异性、高增益核酸检测^[40]。有研究将叠氮-DNA 适配体探针与目标 miRNA 杂交形成双股,然后引入带炔基的引物,通过点击使其连接在 miRNA 上作为延伸起点,触发后续信号放大环节^[41]。此过程中点击反应极大地提高了体系的特异性,避免了错配引物的非特异扩增。这些无酶或等温核酸检测技术结合点击化学后,简化了操作步骤,并降低了对精密热循环仪的依赖,在现场快速核酸诊断(如传染病现场检测)中具有吸引力。

3.2 多重检测与高通量分析 疾病的复杂性使得单一生物标志物的诊断价值有限,多重检测是发展趋势。生物正交反应的“正交性”即多对不同的点击化学反应可以在同一体系中互不干扰地进行,通过在不同靶标上引入互不交叉的化学手柄,可以在同一体系中实现多重标记与并行检测,从而显著提升检测通量并减少操作步骤,为多重诊断提供了理想的解决方案。近年来,研究者们基于生物正交点击化学开发了多种多重检测策略,并在细胞成像、核酸检测和电化学传感等方面取得了进展。Karver 等^[42]则将 iEDDA 反应(Tz-TCO)与 SPAAC 反应(叠氮-环炔)组合应用,成功在同一细胞体系中同时标记不同靶分子,证明了两类反应在活体环境下的化学正交性,为多重化学标记提供了经典范例。有研究报道了一种基于 Tz-TCO 点击化学的活体类器官循环成像方法^[43]。该体系通过抗体-TCO-荧光基团与 Tz 偶联猝灭剂的快速反应,可在数秒内实现信号完全清除并进行多轮循环标记。在患者来源的胶质母细胞瘤类器官中,研究实现了对 CD9、CD81、CD133 等 9 种关键标志物的并行检测,展示了其在多重成像中的高灵敏度与生物相容性。该策略避免了传统光漂白和酶切的不足,为复杂组织的空间多维分析及临床转化提供了新工具。进一步,有研究基于 Tz 与异肟之间[4+1]环加成反应(生成吡唑加合物),开发了一种创新的生物正交荧光探针体系,实现对活细胞中多种细胞器(如细胞核、

线粒体、溶酶体、内质网)同时、免洗、高分辨成像,为亚细胞多靶点检测奠定了方法学基础^[44]。

3.3 循环靶标的捕获与分离 利用生物正交点击化学的高效性和特异性,已开发出多种创新平台用于捕获特定的循环靶标(如 EVs 或 CTCs)用于下游分析。有研究团队开发了基于生物正交点击化学反应的芯片平台(Click Chips)^[45]。核心策略涉及在硅纳米线基底(SiNWS)上修饰 Tz,并将 TCO 共价连接到靶向特定 EV 表面标志物的抗体。当样品流过芯片时,通过 Tz-TCO 点击反应不可逆捕获 EVs,加双硫苏糖醇(DTT)裂解释放活性 EVs 用于后续诊断和功能研究^[45-46]。除芯片策略外,磁珠平台也得到广泛应用。基于磁珠的 Mag-Click-Capture-Release 技术允许利用靶向抗体在磁珠上选择性捕获特定来源 EVs,经磁性分离后用 DTT 处理后释放 EVs 用于分析,提供了高度可定制的 EV 亚型分选能力^[47]。有研究利用 DBCO 功能化的磁性囊泡(Fe_3O_4 -MVs-DBCO)识别叠氮标记的 CTCs,为癌症的诊断和治疗提供了新的平台^[48]。微流控技术结合点击化学进一步提升了 EVs 捕获的效率和灵活性。按需细胞外囊泡(EVOD)芯片利用 TCO 修饰的捕获表面,从复杂样本中特异性分离 Tz 偶联的 EVs,是一个通用性强的液体活检平台^[49]。EVs 捕获后的“温和释放”是后续功能研究的关键。上述研究多借助 DTT 介导二硫键裂解释放 EVs,DTT 可选择性还原交联剂(如 DTSSP)的二硫键,室温下快速反应,能近乎 100%分离收集 EVs 且保持其生物活性。综上所述,点击化学与 DTT 二硫键裂解协同,可实现 EVs 分离中“高特异性捕获”与“零损伤释放”。

3.4 代谢标记与小分子检测 利用生物正交反应标记代谢物或小分子,可用于代谢组学研究或疾病相关小分子的检测。有研究团队构建了一种利用叠氮脂肪酸代谢掺入结合细胞器选择性点击化学反应的技术,实现了亚细胞水平的脂肪酸代谢分析^[50]。其首先在活细胞代谢中掺入叠氮修饰的棕榈酸和油酸,随后使用不同的细胞器靶向点击染料,与代谢掺入的叠氮脂肪酸发生点击反应,可以使用共聚焦显微镜进行成像,或者使用薄层色谱层析(TLC)或 LC-MS 进行分析。另外,使用非天然糖进行代谢聚糖标记与点击化学结合能显著改善标记的特异性和免疫原性,非常适用于生物标记应用。有研究团队开发的 Melac-Chip 策略整合代谢标记(使用非天然糖标记新生 EVs)和点击化学(SPAAC 反应),将叠氮基团引入 EVs 膜表面,通过微流控芯片特异地富集新产生的 EV 亚群,为动态监测疾病(如肿瘤的免疫治疗响应)提供了新途径^[51]。

3.5 生物正交点击化学与新型纳米材料的结合 新型纳米材料已成为疾病诊断领域新兴趋势,生物正交点击化学为其结构设计、功能调控和性能优化提供关

键技术支撑。近年来,研究者利用点击化学结合新型纳米材料(如量子点、DNA 水凝胶等)设计开发了多种检测策略,在检测肿瘤进展、核酸检测和智能传感等方面取得了进展。有研究开发了一种基于金纳米颗粒(AuNP)和量子点(QDs)的生物正交点击化学肿瘤传感系统^[52]。研究中在 AuNP 表面修饰硫醇化 PEG(SH-PEG-COOH 和 SH-PEG-N₃),QDs 共价连接 DBCO 基团(QD-DBCO)。在肿瘤部位时,AuNP 保护层可被丰富的基质金属蛋白酶(MMP)酶解,随后暴露的 SH-PEG-N₃ 与 QD-DBCO 发生 SPAAC 反应,触发 FRET 效应导致 QDs 荧光猝灭,猝灭速率与

肿瘤 MMP 水平呈正相关,为动态监测肿瘤进展提供量化指标。有研究开发了一种基于 DNA 水凝胶与 SPAAC 反应的光电化学学生物传感器^[53]。该技术通过多级信号放大策略和智能材料设计,实现了复杂生物样本中微量 miRNA 的精准捕获与定量分析。有研究以多聚体低聚倍半硅氧烷(POSS)为无机核心,通过 SPAAC 反应连接罗丹明 B 衍生物(RHB)作为荧光探针,用聚乙二醇进行表面修饰,开发了一种智能有机-无机纳米混合传感器(IHNS),通过有机-无机杂化设计实现对内源性 Al³⁺ 的高灵敏、特异性检测^[54]。见图 2。

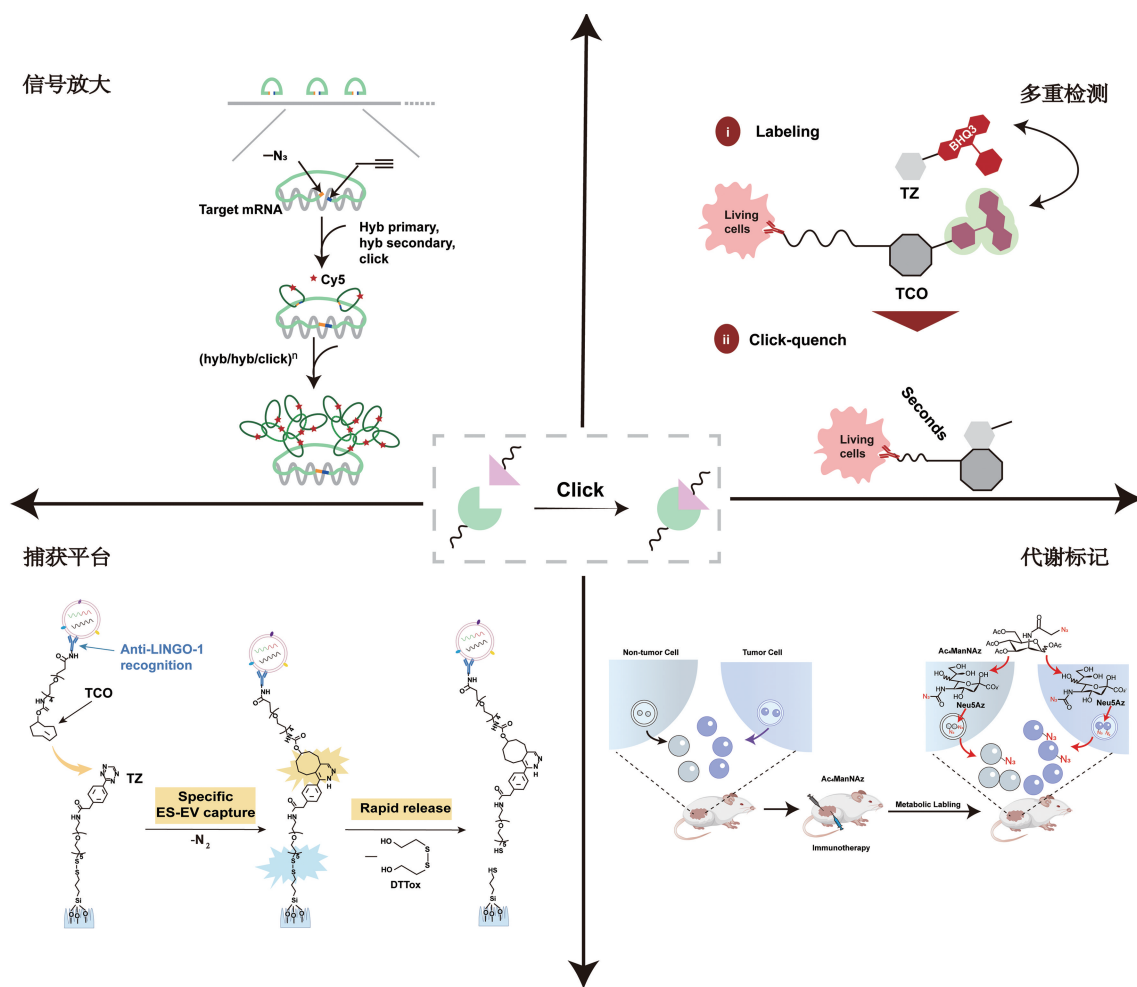


图 2 生物正交点击化学在体外诊断中的应用示意图

4 挑战与展望

综上所述,笔者介绍了生物正交点击化学在体外诊断领域的最新应用进展。借助生物正交点击化学,研究者开发了一系列适配疾病检测复杂需求的高灵敏度、特异度和可多重化的检测平台,表明其在体外诊断领域的巨大潜力。然而,将生物正交点击化学从实验室转移至临床应用还需要克服一些障碍。目前市售的生物正交反应试剂存在批次间差异大、储存稳定性差等问题。特别是荧光标记的叠氮化物探针易发生光降解,需要严格的避光保存条件。在质量控制方面,缺乏统一的效价测定标准,不同厂商采用

HPLC、质谱或荧光读数等不同方法评估试剂活性,导致结果难以横向比较。针对这些问题。有研究建议建立基于标准细胞模型的参照体系,通过流式细胞术定量检测标记效率作为统一质控指标,但具体的实施还面临诸多挑战。此外,还有一个重要问题是当前生物正交试剂的高成本制约了临床推广。

展望未来,生物正交点击化学在体外诊断中的应用将呈现出多重化、便携化、跨学科融合和标准化发展的趋势。(1)在多重化与数字化方向上,点击化学的模块化特点使其能够与 DNA 纳米条形码技术深度结合,实现上百种生物标志物的并行检测,并通过引

入机器学习与人工智能算法对检测结果进行高维度解析。(2)在便携化与家庭化诊断方面,点击化学反应的快速和高效特性非常适合集成入纸基传感器、微流控芯片以及智能手机读出系统,从而推动床旁检测与家庭健康管理的普及。(3)在跨学科融合层面,点击化学与新型功能材料的结合将成为重要方向,例如与石墨烯、量子点及其他纳米材料的协同应用,有望显著提升信号放大与检测灵敏度;(4)在临床转化与标准化方面,未来亟须推动高质量试剂的产业化与规模化生产,建立统一的质控标准和方法学评价体系。这不仅有助于解决目前技术中存在的监管与一致性难题,也将为加速监管审批提供坚实保障。

5 结 语

从体内标记到体外诊断的应用拓展,生物正交点击化学正逐渐成为连接基础生物化学研究与临床检验技术的重要桥梁。生物正交点击化学以其独特优势,为体外诊断技术突破瓶颈提供无限可能,虽存挑战,但未来融合多技术后,将助力精准医疗发展。

参考文献

- [1] Wu J, Liu H, Chen W, et al. Device integration of electrochemical biosensors[J]. *Nat Rev Bioeng*, 2023, 1(5): 346-360.
- [2] Bruckschlegel C, Fleischmann V, Gajovic-Eichelmann N, et al. Non-enzymatic electrochemical sensors for point-of-care testing: current status, challenges, and future prospects[J]. *Talanta*, 2025, 291: 127850.
- [3] Xu Y, Zhu S, Xia C, et al. Liquid biopsy-based multi-cancer early detection: an exploration road from evidence to implementation[J]. *Sci Bull*, 2025, 70(17): 2852-2867.
- [4] Hu J, Gao D. Recent advances in aptamer-based microfluidic biosensors for the isolation, signal amplification and detection of exosomes[J]. *Sensors*, 2025, 25(3): 848.
- [5] Scinto S L, Bilodeau D A, Hincapie R, et al. Bioorthogonal chemistry[J]. *Nat Rev Meth Primers*, 2021, 1: 30.
- [6] Bird R E, Lemmel S A, Yu X, et al. Bioorthogonal chemistry and its applications[J]. *Bioconjugate Chem*, 2021, 32(12): 2457-2479.
- [7] Lang K, Chin J W. Bioorthogonal reactions for labeling proteins[J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(1): 16-20.
- [8] Wu D, Yang K, Zhang Z, et al. Metal-free bioorthogonal click chemistry in cancer theranostics[J]. *Chem Soc Rev*, 2022, 51(4): 1336-1376.
- [9] Sletten E M, Bertozzi C R. From mechanism to mouse: a tale of two bioorthogonal reactions[J]. *Acc Chem Res*, 2011, 44(9): 666-676.
- [10] Meldal M, Tornøe C W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition[J]. *Chem Rev*, 2008, 108(8): 2952-3015.
- [11] Li S, Zhu H, Wang J, et al. Comparative analysis of Cu(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) and strain-promoted alkyne-azide cycloaddition (SPAAC) in O-GlcNAc proteomics[J]. *Electrophoresis*, 2016, 37(11): 1431-1436.
- [12] Oliveira B L, Guo Z, Bernardes G J L. Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology[J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(16): 4895-4950.
- [13] Tornøe C W, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides[J]. *J Org Chem*, 2002, 67(9): 3057-3064.
- [14] Clavadetscher J, Hoffmann S, Lilienkamp A, et al. Copper catalysis in living systems and in situ drug synthesis[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55(50): 15662-15666.
- [15] Kennedy D C, McKay C S, Legault M C, et al. Cellular consequences of copper complexes used to catalyze bioorthogonal click reactions[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(44): 17993-18001.
- [16] Uttamapinant C, Tangpeerachaikul A, Grecian S, et al. Fast, cell-compatible click chemistry with copper-chelating azides for biomolecular labeling[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51(24): 5852-5856.
- [17] Neumann S, Biewend M, Rana S, et al. The CuAAC: principles, homogeneous and heterogeneous catalysts, and novel developments and applications[J]. *Macromol Rapid Commun*, 2020, 41(1): e1900359.
- [18] Dommerholt J, Rutjes F P J T, van Delft F L. Strain-promoted 1,3-dipolar cycloaddition of cycloalkynes and organic azides[J]. *Top Curr Chem (Cham)*, 2016, 374(2): 16.
- [19] Wang H, Sobral M C, Zhang D K Y, et al. Metabolic labeling and targeted modulation of dendritic cells[J]. *Nat Mater*, 2020, 19(11): 1244-1252.
- [20] Baskin J M, Prescher J A, Laughlin S T, et al. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(43): 16793-16797.
- [21] Sun N, Tran B V, Peng Z, et al. Coupling lipid labeling and click chemistry enables isolation of extracellular vesicles for noninvasive detection of oncogenic gene alterations[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(14): e2105853.
- [22] Blackman M L, Royzen M, Fox J M. Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(41): 13518-13519.
- [23] Selvaraj R, Fox J M. Trans-Cyclooctene-a stable, voracious dienophile for bioorthogonal labeling[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17(5): 753-760.
- [24] Rossin R, van den Bosch S M, Ten Hoeve W, et al. Highly reactive trans-cyclooctene tags with improved stability for Diels-Alder chemistry in living systems[J]. *Bioconjug Chem*, 2013, 24(7): 1210-1217.
- [25] Rahim M K, Kota R, Haun J B. Enhancing reactivity for bioorthogonal pretargeting by unmasking antibody-conjugated trans-cyclooctenes[J]. *Bioconjug Chem*, 2015, 26(2): 352-360.
- [26] Dong J, Sharpless K B, Kwisnek L, et al. SuFEx-based synthesis of polysulfates[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53(36): 9466-9470.

- [27] Kumar G S, Lin Q. Light-triggered click chemistry[J]. Chem Rev, 2021, 121(12): 6991-7031.
- [28] Mehak, Singh G, Singh R, et al. Clicking in harmony: exploring the bio-orthogonal overlap in click chemistry[J]. RSC Adv, 2024, 14(11): 7383-7413.
- [29] Debets M F, van Berkel S S, Schoffelen S, et al. Azadibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3 + 2) cycloaddition[J]. Chem Commun (Camb), 2010, 46(1): 97-99.
- [30] Patterson D M, Nazarova L A, Prescher J A. Finding the right (bioorthogonal) chemistry[J]. ACS Chem Biol, 2014, 9(3): 592-605.
- [31] Chen J, Xu Y, Wang X, et al. Rapid and efficient isolation and detection of extracellular vesicles from plasma for lung cancer diagnosis[J]. Lab Chip, 2019, 19(3): 432-443.
- [32] Abreu C M, Costa-Silva B, Reis R L, et al. Microfluidic platforms for extracellular vesicle isolation, analysis and therapy in cancer[J]. Lab Chip, 2022, 22(6): 1093-1125.
- [33] Liu Z, Sun M, Zhang W, et al. Target-specific bioorthogonal reactions for precise biomedical applications[J]. Angew Chem Int Ed, 2023, 62(49): e202308396.
- [34] Kim E, Koo H. Biomedical applications of copper-free click chemistry: in vitro, in vivo, and ex vivo[J]. Chem Sci, 2019, 10(34): 7835-7851.
- [35] Kolb H C, Finn M G, Sharpless K B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions[J]. Angew Chem Int Ed, 2001, 40(11): 2004-2021.
- [36] Huang F, Xue L, Zhang H, et al. An enzyme-free biosensor for sensitive detection of Salmonella using curcumin as signal reporter and click chemistry for signal amplification[J]. Theranostics, 2018, 8(22): 6263-6273.
- [37] Xianyu Y, Wu J, Chen Y, et al. Controllable assembly of enzymes for multiplexed lab-on-a-chip bioassays with a tunable detection range[J]. Angew Chem Int Ed, 2018, 57(25): 7503-7507.
- [38] Jia T, Saikam V, Luo Y, et al. Combining bioorthogonal chemistry with fluorescent silica nanoparticles for the ultrasensitive detection of the HIV-1 p24 antigen[J]. ACS Omega, 2024, 9(12): 14604-14612.
- [39] Robles-Remacho A, Martos-Jamai I, Tabraue-Chávez M, et al. Click chemistry-based dual nanosystem for microRNA-122 detection with single-base specificity from tumour cells[J]. J Nanobiotechnol, 2024, 22(1): 791.
- [40] Rouhanifard S H, Mellis I A, Dunagin M, et al. Clamp FISH detects individual nucleic acid molecules using click chemistry-based amplification[J]. Nat Biotechnol, 2019, 37(1): 84-89.
- [41] Yu S, Zhang J, Hu Y, et al. Ultrasensitive detection of miRNA-21 by click chemistry and fluorescein-mediated photo-ATRP signal amplification[J]. Anal Chim Acta, 2023, 1277: 341661.
- [42] Karver M R, Weissleder R, Hilderbrand S A. Bioorthogonal reaction pairs enable simultaneous, selective, multi-target imaging[J]. Angew Chem Int Ed, 2012, 51(4): 920-922.
- [43] Reynolds D E, Sun Y, Wang X, et al. Live organoid cyclic imaging[J]. Adv Sci, 2024, 11(14): 2309289.
- [44] Deng Y, Shen T, Yu X, et al. Tetrazine-isonitrile bioorthogonal fluorogenic reactions enable multiplex labeling and wash-free bioimaging of live cells[J]. Angew Chem Int Ed, 2024, 63(10): e202319853.
- [45] Dong J, Zhang R Y, Sun N, et al. Coupling nanostructured microchips with covalent chemistry enables purification of sarcoma-derived extracellular vesicles for downstream functional studies[J]. Adv Funct Mater, 2020, 30(49): 2003237.
- [46] Sun N, Lee Y T, Zhang R Y, et al. Purification of HCC-specific extracellular vesicles on nanosubstrates for early HCC detection by digital scoring[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4489.
- [47] Mentink S, Booiyink R, Brusse M, et al. Immunomagnetic enrichment of hepatocyte-specific extracellular vesicles using magnetic beads and click chemistry[J]. J Hepatol, 2023, 78: S553.
- [48] Kang K, Zhou X, Zhang Y, et al. Cell-released magnetic vesicles capturing metabolic labeled rare circulating tumor cells based on bioorthogonal chemistry[J]. Small, 2021, 17(18): 2007796.
- [49] Kang Y T, Hadlock T, Jolly S, et al. Extracellular vesicles on demand (EVOD) chip for screening and quantification of cancer-associated extracellular vesicles[J]. Biosens Bioelectron, 2020, 168: 112535.
- [50] Kimura T, Kawamoto S, Fujisawa A, et al. Subcellular analysis of fatty acid metabolism using organelle-selective click chemistry[J]. J Am Chem Soc, 2025, 147(26): 22284-22289.
- [51] Wu Q, Wang W, Zhang C, et al. Capturing nascent extracellular vesicles by metabolic glycan labeling-assisted microfluidics[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 6541.
- [52] Pham-Nguyen O V, Shin J, Park Y, et al. Fluorescence-shadowing nanoparticle clusters for real-time monitoring of tumor progression[J]. Biomacromolecules, 2022, 23(8): 3130-3141.
- [53] Liu M, Ma W, Zhou Y, et al. A label-free photoelectrochemical biosensor based on CRISPR/Cas12a system responsive deoxyribonucleic acid hydrogel and "click" chemistry[J]. ACS Sens, 2022, 7(10): 3153-3160.
- [54] Zhao G, Xu P, Wei G, et al. A novel intelligent hybrid nano-sensor (IHNS) for detection and clearance of Al(III) prepared via "click chemistry"[J]. Chem Eng J, 2023, 476: 146293.