



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104878078 B

(45) 授权公告日 2021.01.12

(21) 申请号 201410073730.4

CN 1610013 A,2005.04.27

(22) 申请日 2014.02.28

CN 1477994 A,2004.02.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104878078 A

CN 102169119 A,2011.08.31

(43) 申请公布日 2015.09.02

T. Kaewphinit等.Colorimetric DNA based biosensor combined with loop-mediated isothermal amplification for detection of Mycobacterium tuberculosis by using gold nanoprobe aggregation.《Sensors & Transducers》.2013,第142卷

(73) 专利权人 香港理工大学
地址 中国香港九龙红磡

Dong Xiang Li, et al..Plasmonic-coupling-based sensing by the assembly and disassembly of dipicolylamine-tagged gold nanoparticles induced by complexing with cations and anions.《Small》.2012, 1442-1446.

(72) 发明人 李铭鸿 黄冠锋 叶社平

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

代理人 吴小瑛 王芝艳

审查员 田颖

(51) Int.Cl.

G12Q 1/6844 (2018.01)

权利要求书1页 说明书11页
序列表2页 附图7页

(56) 对比文件

CN 103071156 A,2013.05.01

CN 103575875 A,2014.02.12

(54) 发明名称

使用羧基修饰的金纳米颗粒的超灵敏闭管式比色环介导等温扩增法

(57) 摘要

本发明涉及使用羧基修饰的金纳米颗粒的超灵敏闭管式比色环介导等温扩增法。具体而言,本发明将MUA-AuNP的由Mg²⁺和P₂O₇⁴⁻控制的颜色变化的新检测机制与LAMP结合,首次建立并结合了基于AuNP的比色和闭管式等温扩增的核酸检测平台,使可以用肉眼检测少至200个拷贝的靶DNA序列。由镁离子模板聚集控制颜色,并且在存在靶时,LAMP反应的副产物焦磷酸离子导致颗粒解聚。该平台具备高灵敏度、无残留污染、低成本等优点。

1. 一种试剂盒,其包括:1) 功能化的颗粒,其为11-巯基十一烷酸功能化的金纳米颗粒(MUA-AuNP),2) 用于通过能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系检测样品中特定核酸序列存在的扩增引物,其中能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系是环介导等温扩增(LAMP),其阳性样本形成反应副产物焦磷酸离子($P_2O_7^{4-}$),3) 用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的其他组分和装置,其中MUA-AuNP表面的羧基官能团可以与 Mg^{2+} 形成螯合复合物且螯合的 Mg^{2+} 可被 $P_2O_7^{4-}$ 提取出,阳性与阴性样本从而可通过比色区分,并且其中金纳米颗粒粒径范围为10-30纳米。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其中金纳米颗粒具有因粒子间距离不同而颜色不同的性质。

3. 如权利要求1所述的试剂盒,其中金纳米颗粒的粒径为15纳米。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其中用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的其他组分和装置是本领域已知的用于LAMP的其他组分和装置。

5. 如权利要求1到4任一项所述的试剂盒在制备用于现场护理和现场核酸检测的试剂盒中的用途。

6. 如权利要求5所述的用途,其中所述用途包括在制备用于临床诊断、食品安全检测、环境监测和生物武器剂检测的试剂盒中的用途。

7. 如权利要求1到4任一项中所限定的11-巯基十一烷酸功能化的金纳米颗粒(MUA-AuNP)在制备用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系以闭管式检测样品中特定核酸序列的试剂盒中的用途,其中能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系是环介导等温扩增(LAMP)。

8. 下述组合在制备用于检测样品中特定核酸序列的试剂盒中的用途,其中所述组合包括:

a) 针对待检测样品中的特定核酸序列设计的用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系等温扩增的引物,或者已知的用于该特定核酸序列的用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的引物,其中能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系是环介导等温扩增(LAMP),其阳性样本形成反应副产物焦磷酸离子($P_2O_7^{4-}$);

b) 功能化的颗粒、用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的其他组分,其中功能化的颗粒为11-巯基十一烷酸功能化的金纳米颗粒(MUA-AuNP),其中MUA-AuNP表面的羧基官能团可以与 Mg^{2+} 形成螯合复合物且螯合的 Mg^{2+} 可被 $P_2O_7^{4-}$ 提取出,阳性与阴性样本从而可通过比色区分,并且其中金纳米颗粒粒径范围为10-30纳米。

9. 如权利要求8所述的用途,其中金纳米颗粒具有因粒子间距离不同而颜色不同的性质。

10. 如权利要求8所述的用途,其中金纳米颗粒的粒径为15纳米。

11. 如权利要求8所述的用途,其中用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的其他组分和装置是用于LAMP的其他组分和装置。

使用羧基修饰的金纳米颗粒的超灵敏闭管式比色环介导等温扩增法

技术领域

[0001] 本发明涉及特定核酸序列的简单检测方法。具体而言,本发明涉及将功能化的颗粒,如羧基修饰的金纳米颗粒,用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系中,如用于环介导的等温扩增方法中,以高灵敏度、低成本检测特定核酸序列的方法。

背景技术

[0002] 用简单方式对特定核酸序列进行检测,可以赋予现场护理(point-of-care)诊断和现场病原体检测更大的价值。^[1]具有独特的比色性质的金纳米颗粒(AuNP)非常适合这项任务。^[2]AuNP在可见光区域表现出特有的表面等离子体共振(SPR)吸收带并且确切的频谱依赖于颗粒间的距离。具体地,颗粒凝集引起SPR吸收带红移并伴随红色到紫色的颜色变化。这一性质已用于特定核酸序列的液相比色检测。^[3-6]然而,先前所报道的检测平台并不具备实际应用所需要的所有基本属性,包括高灵敏度、简单温度控制、低成本以及无携带污染。这些平台绝大多数都使用寡核苷酸修饰的AuNP,^[3a-d,4a,b,5a-g,6]影响可见颜色变化的一个关键方面是靶序列的浓度必须在纳摩尔水平。^[3a-d]对于实际应用,需要更高的灵敏度。因此一直努力致力于将基于AuNP的比色检测与靶扩增相耦合。在扩增方面,涉及简单温度控制的等温技术^[5a-g]比热循环技术更可取。^[4a,b,6]另一个主要问题是,对于所有的等温^[5]辅助扩增平台和大多数热循环^[4](存在3个例外^[6])辅助扩增平台而言,扩增后不可避免地会开管添加AuNP探针(寡核苷酸修饰的和未修饰的两种),这存在高风险的携带污染。AuNP探针与扩增反应的不相容性是由于热^[6b,7]和/或二硫苏糖醇诱导的^[8]寡核苷酸从AuNP上解吸,之后酶非特异性地吸附到AuNP表面上(或只是后者作用于未修饰的AuNP^[6b,9])。在3个闭管平台(全部是基于热循环和寡核苷酸修饰的AuNP)中,具有实用灵敏度的2个需要特别制备的寡核苷酸修饰的AuNP(二氧化硅包被的^[6b]或三硫醇化(trithiolated)的寡核苷酸^[6c])。另外,寡核苷酸修饰的AuNP的另一个问题是巯基修饰的寡核苷酸成本高。

[0003] 环介导等温扩增法,英文名称为loop-mediated isothermal amplification,是一种新型的核酸扩增方法,其特点是针对靶基因的6个区域设计4种或者6种特定引物,在链置换DNA聚合酶的作用下,60-65°C恒温扩增,15-60分钟左右即可实现 10^9 - 10^{10} 倍的核酸扩增,具有操作简单、特异性强、产物易检测等特点。然而,环介导等温扩增方法也存在缺点,由于其灵敏度高,一旦开盖容易形成携带污染。

[0004] 因此,本领域仍然需要低成本、高灵敏度、无携带污染的检测特定核酸序列的方法。

发明内容

[0005] 本发明的第一方面涉及一种试剂盒,其包括:1)功能化的颗粒,其具有可用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的比色和/或沉淀和/或荧光检测的性质,2)用于通过能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系检测样品中特定核酸序列存在的扩增引物,3)用于能够产

生焦磷酸离子的核酸扩增体系的其他组分和装置。

[0006] 在一些实施方式中,颗粒是具有任何依赖于粒子间距离来控制比色性质类的材料,如金纳米颗粒或银纳米颗粒;或者

[0007] 颗粒是任何能通过和 Mg^{2+} 螯合来控制颗粒分散和沉淀的材料,如金颗粒、银颗粒、磁性颗粒、碳纳米管或氧化石墨烯;或者

[0008] 颗粒是具有任何依赖于粒子间距离来控制荧光性质类的材料,如量子点、荧光染料参杂的二氧化硅纳米颗粒。

[0009] 在一些实施方式中,用于功能化的颗粒的功能化分子同时具有可以固定到颗粒的官能团如巯基、氨基,和可以与 Mg^{2+} 形成螯合复合物且螯合的 Mg^{2+} 可被 $P_2O_7^{4-}$ 提取出的官能团如羧基、羟基、氨基、碳酸根、硫酸根、氟、磷酸根、硫代硫酸根。

[0010] 在另一些实施方式中,功能化的颗粒的功能化分子是简单的碳链,如11-巯基十一烷酸(MUA),或者是多聚物如聚乙二醇。

[0011] 在某些实施方式中,功能化的颗粒是功能化的纳米颗粒,如功能化的金纳米颗粒(AuNP),其中纳米颗粒粒径范围可以为,例如1-100纳米,如1-80纳米,如2-60纳米,如5-50纳米,如10-30纳米,如15-20纳米,如1-5纳米,如2-6纳米,如60-80纳米,只要所述纳米颗粒具有任何依赖于粒子间距离来控制比色和荧光的性质即可。

[0012] 在某些实施方式中,功能化的颗粒的功能化分子可以单一或者多种同时固定到AuNP表面。

[0013] 在某些实施方式中,功能化的纳米颗粒为量子点(QD),QD具有荧光标记性质,其具有至少一个化学基团以与 Mg^{2+} 形成螯合复合物,例如量子点表面经过MUA功能化后形成MUA-QD,可与MUA功能化的金纳米颗粒(MUA-AuNP)一起存在以控制荧光强度来实现特定核酸序列的检测,其中MUA-QD作为报告剂,而MUA-AuNP作为猝灭剂。除了QD以外,其它荧光材料也可以用于本发明的体系。

[0014] 在一些实施方式中,能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系是环介导等温扩增(LAMP)。其它会产生焦磷酸离子的扩增系统也可以用于功能化颗粒结合。

[0015] 在一些实施方式中,用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的其他组分和装置是本领域已知的用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的其他组分和装置,如用于LAMP的其他组分和装置。

[0016] 本发明的第二方面涉及如上所述的试剂盒在现场护理和现场核酸检测中的用途。

[0017] 在某些实施方式中,所述用途包括临床诊断、食品安全检测、环境监测和生物武器剂检测。

[0018] 本发明的第三方面涉及如上述第一方面中所限定的功能化的颗粒用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系以闭管式检测样品中特定核酸序列的用途,其中能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系如环介导等温扩增(LAMP)。

[0019] 本发明的第四方面涉及一种检测样品中特定核酸序列的方法,其包括步骤:

[0020] a) 获得待测的样品或其核酸;

[0021] b) 针对待检测样品中的特定核酸序列设计的用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系等温扩增(LAMP)的引物,或者使用已知的用于该特定核酸序列的用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的引物;

[0022] c) 将步骤a) 的样品或其核酸、步骤b) 的引物、功能化的颗粒、用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的其他组分以适当量混合并在其相应装置中反应, 功能化的颗粒具有可用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的比色和/或沉淀和/或荧光检测的性质, 其中步骤a) 的样品或其核酸、步骤b) 的引物、功能化的颗粒、用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的其他组分可以依次地、两种或多种预混合地或同时地加入总反应体系中;

[0023] d) 可选地, 观察反应结果, 判断样品中是否有特定核酸序列的存在。

[0024] 在某些实施方式中, 颗粒是具有任何依赖于粒子间距离来控制比色性质类的材料, 如金纳米颗粒或银纳米颗粒; 或者

[0025] 颗粒是任何能通过与 Mg^{2+} 螯合来控制颗粒分散和沉淀的材料, 如金颗粒、银颗粒、磁性颗粒、碳纳米管或氧化石墨烯; 或者

[0026] 颗粒是具有任何依赖于粒子间距离来控制荧光性质类的材料, 如量子点、荧光染料参杂的二氧化硅纳米颗粒。

[0027] 在某些实施方式中, 用于功能化的颗粒的功能化分子同时具有可以固定到颗粒的官能团如巯基、氨基, 和可以与 Mg^{2+} 形成螯合复合物且螯合的 Mg^{2+} 可被 $P_2O_7^{4-}$ 提取出的官能团如羧基、羟基、氨基、碳酸根、硫酸根、氟、磷酸根、硫代硫酸根。

[0028] 在一个实施方式中, 功能化的颗粒的功能化分子是简单的碳链如11-巯基十一烷酸(MUA), 或者是多聚物如聚乙二醇。

[0029] 在某些实施方式中, 功能化的颗粒是功能化的纳米颗粒, 如功能化的金纳米颗粒(AuNP), 其中纳米颗粒粒径范围为例如1-100纳米, 如1-80纳米, 如2-60纳米, 如5-50纳米, 如10-30纳米, 如15-20纳米, 如1-5纳米, 如2-6纳米, 如60-80纳米, 只要所述纳米颗粒具有任何依赖于粒子间距离来控制比色和荧光的性质即可。

[0030] 在某些实施方式中, 功能化的颗粒的功能化分子可以单一或者多种同时固定到AuNP表面。

[0031] 在某些实施方式中, 功能化的纳米颗粒为量子点(QD), QD具有荧光标记性质, 其具有至少一个化学基团以与 Mg^{2+} 形成螯合复合物, 例如量子点表面经过MUA功能化后形成MUA-QD, 可与MUA功能化的金纳米颗粒(MUA-AuNP) 一起存在以控制荧光强度来实现特定核酸序列的检测, 其中MUA-QD作为报告剂, 而MUA-AuNP作为猝灭剂。除了QD以外, 其它荧光材料也可以用于本发明的体系。

[0032] 在一个实施方式中, 能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系是环介导等温扩增(LAMP)。其它会产生焦磷酸离子的扩增系统也可以用于功能化颗粒结合。

[0033] 在某些实施方式中, 用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的其他组分和装置是本领域已知的用于能够产生焦磷酸离子的核酸扩增体系的其他组分和装置, 如用于LAMP的其他组分和装置。

[0034] 本发明的上述检测方法很容易应用于现场护理和现场核酸检测, 其具有所有的理想特征:

[0035] • 简单温度控制(一次性暖包即可满足实验条件)。

[0036] • 用肉眼即可对结果进行判断和解释。

[0037] • 易于试剂运输和储存(用于LAMP的冻干试剂) 和高鲁棒性(用于LAMP的部分处理或未经处理的样品)。

- [0038] • 无携带污染的隐忧。
- [0039] • 高灵敏度(在所有报道的基于AuNP的比色核酸检测平台中最灵敏)。
- [0040] • 低成本(MUA相对于巯基修饰的寡核苷酸便宜)。

附图说明

[0041] 图1、通过镁离子(Mg^{2+})模板螯合工艺的11-巯基十一烷酸修饰的金纳米颗粒(MUA-AuNP)的聚集以及通过焦磷酸离子($P_2O_7^{4-}$)的可逆解聚。a)示意图显示了分别通过 Mg^{2+} 和 $P_2O_7^{4-}$ 的可逆的MUA-AuNP的聚集与解聚。b)添加 Mg^{2+} (2mM),MUA-AuNP溶液(6nM的颗粒浓度)的颜色由红色变成紫色。接着,加入 $P_2O_7^{4-}$ (1.4mM)再于65℃孵育1小时,观察到暗红色沉淀(以及图4a)。温和超声~10s后,得到红色溶液。

[0042] 图2、MUA-AuNP用于闭管式比色环介导等温扩增(LAMP)法。a)检测原理示意图。MUA-AuNP聚集在含 Mg^{2+} 的LAMP反应混合物中。在缺失靶DNA序列时,溶液保持紫色,而在存在靶DNA序列时,LAMP产生了从聚集的MUA-AuNP中提取螯合的 Mg^{2+} 的 $P_2O_7^{4-}$,从而溶液变成红色。b)未含有(-ve)和含有(+ve)靶序列(10^5 拷贝的 λ DNA)的样品进行LAMP1h,再温和超声处理~10s的照片。c) LAMP反应产物的琼脂糖凝胶电泳。泳道M:100-bp DNA梯状条带;泳道1和2:无MUA-AuNP的对照;泳道3和4:含有MUA-AuNP的样品;泳道1和3:无靶的样品;和泳道2和4:存在靶的样品。

[0043] 图3、含有MUA-AuNP的比色LAMP法的特异性和灵敏度。a)用不同模板的4个样品的照片(λ DNA的特异性模板和pBR322DNA的非特异性模板):(从左至右)无模板对照样品; λ DNA的样品;pBR322DNA的样品;以及 λ DNA和pBR322DNA的样品。每个模板的量为每个反应 10^5 拷贝。b)含有不同量的靶序列(每个反应0、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 和 10^5 拷贝的 λ DNA)的样品的照片。c) b中的样品的紫外-可见光谱(其中箭头分别指向所述实线的位置)。

[0044] 图4、MUA-AuNP的聚集和解聚。a)在65℃下孵育1小时后,在2mM Mg^{2+} 中的样品(左)和在2mM Mg^{2+} 和1.4mM $P_2O_7^{4-}$ 中的样品(右)。温和超声处理~10s后,将沉淀的样品分散,从而分别产生紫色和红色溶液,如图1b所示。b)图显示了 $P_2O_7^{4-}$ (1.4mM)、乙二胺四乙酸(EDTA, 2.8mM)和脱氧核苷三磷酸(dNTPs,各0.35mM,即总量为1.4mM)对于因 Mg^{2+} (2mM)而聚集的MUA-AuNP的效果。在加入 $P_2O_7^{4-}$ 、EDTA或dNTPs之前,首先用 Mg^{2+} 孵育MUA-AuNP1min(溶液变为紫色),然后在65℃下孵育1h,然后温和超声处理~10s。

[0045] 图5.闭管式比色LAMP法。未含有(-ve)和含有(+ve)靶序列(10^5 拷贝的 λ DNA)的样品进行LAMP1h的图片。通过温和超声~10s使沉淀分散,分别得到紫色和红色溶液,如图2b所示。

[0046] 图6. Mg^{2+} 和dNTP的浓度对于含有MUA-AuNP的LAMP的影响。a)4对具有不同量的 Mg^{2+} 和dNTP的样品的图片。每对包括阴性(-ve,无靶序列, λ DNA)和阳性(+ve,含靶序列, 10^5 拷贝的 λ DNA)样本。在65℃进行LAMP反应1h,然后温和超声处理~10s。管下面所示的数字分别对应于b中的泳道编号。b) LAMP反应产物的琼脂糖凝胶电泳。泳道M:100-bp DNA梯状条带;泳道1-8:无MUA-AuNP的对照;泳道9-16:含有MUA-AuNP的样品;奇数泳道:不含靶的样本;偶数泳道:含有靶的样品;泳道1、2、9和10:8mM的 Mg^{2+} 和各1.4mM的dNTP;泳道3、4、11和12:4mM的 Mg^{2+} 和各0.4mM的dNTP;泳道5、6、13和14:2mM的 Mg^{2+} 和各0.2mM的dNTP;和泳道7、8、15和16:2mM的 Mg^{2+} 和各0.35mM的dNTP。

[0047] 图7. MUA-AuNP的 Mg^{2+} 浓度依赖的聚集。具有不同浓度的 Mg^{2+} (0、0.4、0.8和1.2mM)的MUA-AuNP样品的图片。将这些样品在室温下孵育10min,随后温和超声处理~10s。

[0048] 图8. LAMP后,加入了 $P_2O_7^{4-}$ 的含有8mM的 Mg^{2+} 和各1.4mM的dNTP的阳性样品的解聚。含有8mM的 Mg^{2+} 和各1.4mM的dNTP的阳性样品呈现紫红色(图6a,管号10)。当将 $P_2O_7^{4-}$ (5.6mM)加入到样品中时,再进一步在65℃下孵育1h,然后温和超声处理~10s,溶液颜色变成红色。

[0049] 图9. 含有MUA-AuNP的比色LAMP法的灵敏度。a) 含有不同量的靶序列(每个反应0、100、200、500和1000拷贝的 λ DNA)的样品的图片。b) a中样品的紫外-可见光谱(其中箭头分别指向所述实线的位置)。

[0050] 图10. 特异性试验的LAMP反应产物的琼脂糖凝胶电泳。泳道M: 100-bp的DNA梯状条带;泳道1-4: 无MUA-AuNP的对照;泳道5-8: 含有MUA-AuNP的样品;泳道1和5: 无模板;泳道2和6: 特定模板(10^5 拷贝的 λ DNA);泳道3和7: 非特定模板(10^5 拷贝的pBR322DNA);和泳道4和8: 特定和非特定模板一起(各 10^5 拷贝)。样品5-8的对应比色结果示于图3中。

[0051] 图11. 灵敏度试验的LAMP反应产物的琼脂糖凝胶电泳。泳道M: 100-bp的DNA梯状条带;泳道1-6: 无MUA-AuNP的对照;泳道7-12: 含有MUA-AuNP的样品;泳道1-6以及泳道7-12: 每个反应0、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 和 10^5 拷贝的靶序列(λ DNA)。样品7-12的相应比色结果示于图4a中。

[0052] 图12. 由一次性空气激活的暖包的放热化学反应进行温度控制的比色LAMP。a) 展示了装置的图片。b) 不含有(-ve)和含有(+ve)靶序列(10^5 拷贝的 λ DNA)的样品进行LAMP1h的图片。通过温和超声处理~10s,将沉淀分散。

具体实施方式

[0053] 在此,本发明报道了新的闭管式平台用于环介导等温扩增(LAMP)^[10]以及具备用于分散测试的所有理想特征的11-巯基十一烷酸修饰的AuNP (MUA-AuNP)。本领域技术人员知晓,具备用于分散测试的所有理想特征的除MUA外,还可以使用其他的功能化AuNP的功能化分子,只要此分子具有至少一个官能团以允许固定到AuNP上(如巯基和氨基)并且具有至少一个羧基基团以与 Mg^{2+} 形成螯合复合物。除羧基基团,也可以使用其它配体,只要其能与 Mg^{2+} 形成螯合络合物,并且螯合的 Mg^{2+} 可再被 $P_2O_7^{4-}$ 提取。多种纳米材料均适用于本发明的体系,金纳米颗粒和银纳米颗粒可用于比色检测;颗粒的材料种类可以包括金颗粒、银颗粒、磁性颗粒、碳纳米管和氧化石墨烯可用于颗粒的沉淀与分散检测;量子点和其它荧光材料可用于荧光检测。

[0054] LAMP的优势包括通用性(适用于DNA和RNA的单链和双链形式)、^[10e]鲁棒性(部分处理或未经处理的样品)、^[11]和易于试剂运输和储存(冻干试剂)。^[11]LAMP的另一个有用的特征是产生了作为反应副产物的焦磷酸根离子($P_2O_7^{4-}$),从而形成了闭管式比色^[10c]或荧光^[10d]检测的基础。Hupp以及同事率先基于离子模板螯合,使用MUA-AuNP用于感应二价重金属离子(如铅、镉和汞)。^[12]他们还表明,通过加入强金属离子螯合剂(乙二胺四乙酸,EDTA)可以使聚集的颗粒解聚。本发明人推测,镁离子(Mg^{2+})作为酶辅助因子在LAMP反应中起着不可或缺的作用,其可以触发MUA-AuNP的聚集, $P_2O_7^{4-}$ 再导致MUA-AuNP的解聚。

[0055] 在本发明中,第一个任务是研究 Mg^{2+} 和 $P_2O_7^{4-}$ 对MUA-AuNP溶液颜色的影响。通过柠檬酸盐还原法合成具有平均15nm直径的AuNP^[6b,13]并通过与MUA简单孵育用羧基基团将其

官能化。羧基基团和 Mg^{2+} 的螯合作用在图1a中示意性示出。所获得的聚集的MUA-AuNP可以通过加入提取螯合的 Mg^{2+} 的 $P_2O_7^{4-}$ 而解聚。模拟LAMP反应条件,在 $65^{\circ}C$ 下进行聚集与解聚实验。在添加 Mg^{2+} (2mM)到MUA-AuNP (6nM)时,溶液颜色立即由红色变为紫色。静置1h后,观察到暗紫色沉淀且上清液变澄清(以及图4a)。另一方面,当添加 Mg^{2+} ,再添加 $P_2O_7^{4-}$ (1.4mM)时,观察到暗红色沉淀(图4a)。温和超声处理后,沉淀解聚,分别得到紫色和红色溶液(图1b)。值得注意的是,由 $P_2O_7^{4-}$ 导致的解聚只是部分解聚,这一点已通过用EDTA(较强的 Mg^{2+} 螯合剂,图4b)会产生更强的红色而证明了。另一个用于比色LAMP的前提是所有其它的反应成分必须不能导致解聚过程,特别是脱氧核苷三磷酸(dNTPs, $P_2O_7^{4-}$ 的前体)。如图4b所示,dNTPs(各0.35mM,即总量为1.4mM)对于聚集的MUA-AuNP未观察到影响。

[0056] 第二个任务是验证闭管式比色LAMP法的概念证明实验。反应混合物中包括MUA-AuNP和标准的LAMP组分。如提出的检测方案(图2a)所示,当缺失靶序列时在整个LAMP反应中MUA-AuNP保持聚集,当存在靶时,因生成 $P_2O_7^{4-}$ 使最初聚集的颗粒逐渐解聚。实验结果与本发明人的预期相一致,即阴性样本(无靶,本研究中使用的模型分析物是 λ DNA)呈现紫色而阳性样品(10^5 拷贝的 λ DNA)呈现红色(图2b和图5)。此外,反应产物的琼脂糖凝胶电泳分析表明,MUA-AuNP对LAMP反应没有抑制效果(图2c)。这是由于具有紧密堆积的自组装单层的AuNP^[8d,9b](在此条件下的MUA),与寡核苷酸修饰的^[6b,8b]和未修饰的^[9]AuNP相比,更能与扩增反应相兼容。据本发明人所知,这是第一个闭管式的将基于AuNP的比色检测平台与等温扩增相耦合的示范。此外,MUA-AuNP的另一个优势是其与寡核苷酸修饰的AuNP相比成本低。

[0057] 阴性和阳性样品之间的色差通过 Mg^{2+} 和dNTP浓度的系统性优化而实现。有两种标准组合,一种是4mM Mg^{2+} 加各0.4mM的dNTP^[10a,b],而另一种是8mM Mg^{2+} 加各1.4mM的dNTP^[10d]但对于阳性样品,这两者都不容许由紫色到红色的颜色变化(图6a)。在前者的条件下,可以产生的 $P_2O_7^{4-}$ 的最大量为1.6mM,其可以与3.2mM Mg^{2+} 相结合。这使游离的 Mg^{2+} 浓度减小到使MUA-AuNP仍然聚集的水平(0.8mM)(图7)。在后者的条件下,虽然可以产生的 $P_2O_7^{4-}$ 的理论最大量(5.6mM)能结合所有的 Mg^{2+} ,但因dNTP过量,只有小部分实际生成了(~ 1.5 mM^[10c])。为了证实这一点,进行了后续实验,在LAMP反应后,将额外的 $P_2O_7^{4-}$ (5.6mM)加入阳性样品中。在 $65^{\circ}C$ 下继续孵育1h,再温和超声处理,观察到红色溶液(图8)。基于上述分析获知MUA-AuNP在0.4mM Mg^{2+} 时是单分散状态(图7),本发明人通过降低 Mg^{2+} 和dNTP的浓度(同时保持其在标准条件下的比例)解决了这些问题。在两种新组合之中(2mM Mg^{2+} 与各0.2或各0.35mM的dNTP),只有具有较多dNTP的一种产生了所期望的颜色变化,尽管其琼脂糖凝胶电泳结果类似(图6b)。本发明中, Mg^{2+} 浓度范围为1-10mM,相应的dNTP的浓度下限是:(Mg^{2+} 浓度-0.4mM)/8。在某些实施方式中, Mg^{2+} 浓度为2mM,dNTP各为0.35mM。

[0058] 第三个任务是评估比色LAMP法的特异性。pBR322DNA作为非特异性分析物。正如预期的那样,含有pBR322(10^5 拷贝)的样品呈现紫色而含有 λ DNA和pBR322(各 10^5 拷贝)的样品呈现红色(图3a)。

[0059] 第四个任务是确定检测极限。图3b和图9a表明,具有200或更多拷贝的靶DNA样品在视觉上可与阴性对照(无靶)相区分。对比阴性对照,具有200或更多拷贝的靶DNA的样品的SPR吸收带的蓝移进一步支持了这一点(图3c和图9b)。本发明人平台的检出极限与先前报道的开管(open-tube)式LAMP平台一致^[5f-h]并且比其它开管式等温平台低3-6个数量级。^[5a-e]

琼脂糖凝胶电泳结果显示MUA-AuNP不会危及LAMP的特异性和灵敏度(图10和11)。

[0060] 最后的任务是证明通过放热化学反应(在一次性空气激活的暖包中的铁氧化物)进行温度控制以实施比色LAMP法的可行性。将反应管置于含有暖包中的质量比为~1:5的新鲜的和使用过的内容物的混合物的纸杯中(图12a,温度保持在60-65°C,1h)。将硅油覆盖层加入反应混合物中以防止蒸发,蒸发会显著改变反应物(特别是 Mg^{2+})的浓度,从而影响颜色变化。重要的是,基于暖包的和基于设备的比色LAMP法都获得了相似的结果(图12b和图2b)。

[0061] 总之,本发明人已经开发了利用MUA-AuNP的新的闭管式比色LAMP法。用MUA-AuNP的比色结果比用 $Mg_2P_2O_7$ 或钙黄绿素的比色结果更容易解释。据本发明人所知,本发明是此类型中首个闭管式的基于AuNP的比色LAMP检测平台。

[0062] 本发明人的新平台享有所有优势:高特异性和灵敏度、简单温度控制、可视化比色读数、无忧携带污染控制、分析时间短、成本低。特别是,本发明人的方法,每20- μ L反应中200拷贝(17aM)的检出极限,是所有已报道的基于AuNP的比色DNA检测方法中最灵敏的(无论是闭管式或开管式;等温或热循环扩增),其典型的在皮摩尔(picomolar)或飞摩尔(femtomolar)水平。显而易见,LAMP在通用性、鲁棒性、易于试剂运输和储存方面的性能优于其它扩增技术。总之,这一技术在分散设置以及在资源有限的实验室中具有巨大潜力用于核酸检测。本发明人将探索利用小尺寸和电池供电的比色计进行实时吸光度测定的可能性,从而能精确量化靶的拷贝数。

[0063] 下面将通过下述非限制性实施例进一步说明本发明,本领域技术人员公知,在不背离本发明精神的情况下,可以对本发明做出许多修改,这样的修改也落入本发明的范围。

[0064] 实施例

[0065] 实施例1MUA-AuNP的合成

[0066] 15-nm AuNP的合成是基于本发明人之前报道的工艺。^[6b]用于AuNP合成的所有玻璃器皿和磁力搅拌棒用王水进行清洗(体积比为3:1的浓盐酸和硝酸的混合物;注意:王水有危害性且有强腐蚀性,并且必须小心在通风橱中操作),用水漂洗,并在烘箱中干燥。四氯金酸三水合物(hydrogen tetrachloroaurate(III))溶液(30mL,0.01wt%)在剧烈搅拌的回流下煮沸。再快速加入柠檬酸钠(3mL,1wt%)。几分钟内溶液颜色由浅黄色变到深红色。持续加热并搅拌10min,随后在搅拌状态下冷却至室温,然后将溶液通过0.8- μ m的硝酸纤维素膜(Millipore)进行过滤。利用Ultrospec2100pro UV/visible spectrophotometer(GE Healthcare)测量所合成的AuNP的紫外-可见光谱。AuNP的尺寸和浓度可以根据Haiss和同事所报道的方法从吸光度数据进行估算。^[13]根据在SPR峰的吸光度(ASPR)与在450nm处的吸光度(A450)的比率,确定AuNP的尺寸为~15nm。由公式S1确定AuNP溶液(cAuNPs,摩尔浓度)的浓度:

[0067] $C_{AuNPs} = A_{450} / \epsilon_{450}$ (S1)

[0068] 其中 ϵ_{450} 是15-nm AuNP在450nm的摩尔消光系数(即, $2.18 \times 10^8 M^{-1} cm^{-1}$)。所合成的AuNP溶液保存在4°C备用。

[0069] 在与MUA共轭连接之前,通过离心将AuNP溶液以5800rpm转速浓缩45分钟(Centrifuge5415D,Eppendorf),除去上清液,在超纯无DNase/RNase的蒸馏水中将红色油状沉淀再分散(原体积的1/10,Invitrogen)。在二甲亚砜中新鲜制备MUA的储备液(0.1M)。

AuNP (20nM) 和MUA (2mM) 以1400rpm的速度震荡孵育24h (Thermomixer compact, Eppendorf)。

[0070] 实施例2MUA-AuNP的聚集和解聚试验

[0071] 对MUA-AuNP的聚集和解聚试验:对于聚集试验,制备含有MUA-AuNP (6nM) 和1×等温扩增缓冲液 (20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 50mM KCl, 2mM MgSO₄, 0.1%吐温20, pH8.8; New England Biolabs) 的混合物。对于解聚试验,孵育1min后,补充K₄P₂O₇ (1.4mM) 或EDTA (2.8mM) 或dNTP (各0.35mM) 于上述混合物中。将这些溶液于65°C下孵育1h (GeneAmp PCR System9700, Applied Biosystems)。在温和超声10s之前和之后记录比色结果 (WiseClean WUC-A01H ultrasonic cleaner, Daihan Scientific)。对于Mg²⁺浓度依赖的聚集试验,将不同量的MgSO₄ (0、0.4、0.8和1.2mM) 加入到MUA-AuNP (6nM) 中。将这些溶液在室温下孵育10min。在温和超声10s后记录比色结果。

[0072] 比色LAMP法:6个引物用于扩增λDNA^[10b] (HPLC纯化的,整合DNA技术),包括:

[0073] FIP:5'-CAGCCAGCCGACGACGTTTCGCTCATAGGAGATATGGTAGAGCCGC-3' (SEQ ID NO: 1);

[0074] BIP:5'-GAGAGAATTTGTACCACCTCCCACCGGCACATAGCAGTCCTAGGGACAGT-3' (SEQ ID NO:2);

[0075] F3:5'-GGCTTGGCTCTGCTAACACGTT-3' (SEQ ID NO:3);

[0076] B3:5'-GGACGTTTGTAAATGTCCGCTCC-3' (SEQ ID NO:4);

[0077] 环F:5'-CTGCATACGACGTGTCT-3' (SEQ ID NO:5);和

[0078] 环B:5'-ACCATCTATGACTGTACGCC-3' (SEQ ID NO:6)。

[0079] 反应混合物 (20μL) 包括1×等温扩增缓冲液、FIP (0.8μM)、BIP (0.8μM)、F3 (0.2μM)、B3 (0.2μM)、环F (0.4μM)、环B (0.4μM)、dNTP、甜菜碱 (1M)、Bst2.0DNA聚合酶 (0.32单位μL⁻¹, New England Biolabs)、λDNA特定模板 (或无模板对照或pBR322DNA的非特定模板) 以及MUA-AuNP (6nM)。除非另有说明, MgSO₄浓度和dNTP分别为2mM和0.35mM (每种dNTP)。在65°C进行LAMP反应1h (GeneAmp PCR System9700)。在温和超声10s之前和之后记录比色结果。利用Ultrospec2100pro UV/visible spectrophotometer (GE Healthcare) 测量超声处理的反应产物 (70-μL规模) 的UV-可见光谱。对于琼脂糖凝胶电泳分析,将反应产物 (8μL产物加凝胶上样缓冲液) 上样于浸在TBE缓冲液 (45mM Tris, 45mM硼酸, 1mM EDTA, pH8.0) 中的2%凝胶上,于120V电泳1.5h。然后,将凝胶用溴化乙锭 (0.5μg mL⁻¹) 染色10分钟,并通过UV透照进行可视化。在由放热化学反应进行温度控制的试验中,将硅油 (10μL) 覆盖反应混合物。将反应管置于充满暖包内容物的纸杯中 (17.5g新鲜内容物与82.5g使用过的内容物相混合; Nukupon, Kokubo) 并孵育75min,使其花费15min以达到60-65°C的最佳LAMP反应温度。

[0080] 实施例3Mg²⁺和P₂O₇⁴⁻对MUA-AuNP溶液颜色的影响

[0081] 如上所述或通过柠檬酸盐还原法合成具有平均15nm直径的AuNP^[6b, 13]并通过与MUA简单孵育用羧基基团将其官能化。羧基基团和Mg²⁺的螯合作用在图1a中示意性示出。所获得的聚集的MUA-AuNP可以通过加入提取螯合的Mg²⁺的P₂O₇⁴⁻而解聚。模拟LAMP反应条件,在65°C下进行聚集与解聚实验。在添加Mg²⁺ (2mM) 到MUA-AuNP (6nM) 时,溶液颜色立即由红色变为紫色。静置1h后,观察到暗紫色沉淀且上清液变澄清 (图4a)。另一方面,当添加Mg²⁺,再添加P₂O₇⁴⁻ (1.4mM) 时,观察到暗红色沉淀 (图4a)。温和超声处理后,沉淀解聚,分别得到紫

色和红色溶液(图1b)。值得注意的是,由 $P_2O_7^{4-}$ 导致的解聚只是部分解聚,这一点已通过用EDTA(较强的 Mg^{2+} 螯合剂,图4b)会产生更强的红色而证明了。另一个用于比色LAMP的前提是所有其它的反应成分必须不能导致解聚过程,特别是脱氧核苷三磷酸(dNTPs, $P_2O_7^{4-}$ 的前体)。如图4b所示,dNTP(各0.35mM,即总量为1.4mM)对于聚集的MUA-AuNP未观察到影响。

[0082] 实施例4验证闭管式比色LAMP法的概念证明实验

[0083] 反应混合物中包括MUA-AuNP和标准的LAMP组分。如提出的检测方案(图2a)所示,当缺失靶序列时在整个LAMP反应中MUA-AuNP保持聚集,当存在靶时,因生成 $P_2O_7^{4-}$ 使最初聚集的颗粒逐渐解聚。实验结果与本发明人的预期相一致,即阴性样本(无靶,本研究中使用的模型分析物是 λ DNA)呈现紫色而阳性样品(10^5 拷贝的 λ DNA)呈现红色(图2b和图5)。此外,反应产物的琼脂糖凝胶电泳分析表明,MUA-AuNP对LAMP反应没有抑制效果(图2c)。这是由于具有紧密堆积的自组装单层的AuNP^[8d,9b](在此条件下的MUA),与寡核苷酸修饰的^[6b,8b]和未修饰的^[9]AuNP相比,更能与扩增反应相兼容。据本发明人所知,这是第一个闭管式的将基于AuNP的比色检测平台与等温扩增相耦合的示范。此外,MUA-AuNP的另一个优势是其与寡核苷酸修饰的AuNP相比成本低。

[0084] 阴性和阳性样品之间的色差通过 Mg^{2+} 和dNTP浓度的系统性优化而实现。有两种标准组合,一种是4mM Mg^{2+} 加各0.4mM的dNTP^[10a,b],而另一种是8mM Mg^{2+} 加各1.4mM的dNTP^[10d]但对于阳性样品,这两者都不容许由紫色到红色的颜色变化(图6a)。在前者的条件下,可以产生的 $P_2O_7^{4-}$ 的最大量为1.6mM,其可以与3.2mM Mg^{2+} 相结合。这使游离的 Mg^{2+} 浓度减小到使MUA-AuNP仍然聚集的水平(0.8mM)(图7)。在后者的条件下,虽然可以产生的 $P_2O_7^{4-}$ 的理论最大量(5.6mM)能结合所有的 Mg^{2+} ,但因dNTP过量,只有小部分实际生成了(~ 1.5 mM^[10c])。为了证实这一点,进行了后续实验,在LAMP反应后,将额外的 $P_2O_7^{4-}$ (5.6mM)加入阳性样品中。在65°C下继续孵育1h,再温和超声处理,观察到红色溶液(图8)。基于上述分析获知MUA-AuNP在0.4mM Mg^{2+} 时是单分散状态(图7),本发明人通过降低 Mg^{2+} 和dNTP的浓度(同时保持其在标准条件下的比例)解决了这些问题。在两种新组合之中(2mM Mg^{2+} 与各0.2或各0.35mM的dNTP),只有具有较多dNTP的一种产生了所期望的颜色变化,尽管其琼脂糖凝胶电泳结果类似(图6b)。

[0085] 实施例5评估比色LAMP法的特异性

[0086] pBR322DNA作为非特异性分析物,而 λ DNA作为特异性分析物。正如预期的那样,含有pBR322(10^5 拷贝)的样品呈现紫色而含有 λ DNA和pBR322(各 10^5 拷贝)的样品呈现红色(图3a)。

[0087] 实施例6确定比色LAMP法的检测极限。

[0088] 图3b和图9a表明,具有200或更多拷贝的靶DNA样品在视觉上可与阴性对照(无靶)相区分。对比阴性对照,具有200或更多拷贝的靶DNA的样品的SPR吸收带的蓝移进一步支持了这一点(图3c和图9b)。本发明人平台的检出极限与先前报道的开管(open-tube)式LAMP平台一致^[5f-h]并且比其它开管式等温平台低3-6个数量级。^[5a-e]琼脂糖凝胶电泳结果显示MUA-AuNP不会危及LAMP的特异性和灵敏度(图10和11)。

[0089] 实施例7证明通过放热化学反应(在一次性空气激活的暖包中的铁氧化物)进行温度控制以实施比色LAMP法的可行性

[0090] 将反应管置于含有暖包中的质量比为 $\sim 1:5$ 的新鲜的和使用过的内容物的混合物的纸杯中(图12a,温度保持在60-65°C,1h)。将硅油覆盖层加入反应混合物中以防止蒸发,

蒸发会显著改变反应物(特别是 Mg^{2+})的浓度,从而影响颜色变化。重要的是,基于暖包的和基于设备的比色LAMP法都获得了相似的结果(图12b和图2b)。

[0091] 参考文献:

[0092] [1] a) A.Niemz, T.M.Ferguson, D.S.Boyle, Trends Biotechnol. 2011, 29, 240; b) P.Craw, W.Balachandran, Lab Chip 2012, 12, 2469.

[0093] [2] a) N.L.Rosi, C.A.Mirkin, Chem. Rev. 2005, 105, 1547; b) R.Wilson, Chem. Soc. Rev. 2008, 37, 2028.

[0094] [3] a) C.A.Mirkin, R.L.Letsinger, R.C.Mucic, J.J.Storhoff, Nature 1996, 382, 607; b) R.Elghanian, J.J.Storhoff, R.C.Mucic, R.L.Letsinger, C.A.Mirkin, Science 1997, 277, 1078; c) J.J.Storhoff, R.Elghanian, R.C.Mucic, C.A.Mirkin, R.L.Letsinger, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 1959; d) K.Sato, K.Hosokawa, M.Maeda, J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 8102; e) H.Li, L.Rothberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 14036; f) F.Xia, X.Zuo, R.Yang, Y.Xiao, D.Kang, A.Vallee-Belisle, X.Gong, J.D.Yuen, B.B.Y.Hsu, A.J.Heeger, K.W.Plaxco, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010, 107, 10837.

[0095] [4] a) H.Deng, Y.Xu, Y.Liu, Z.Che, H.Guo, S.Shan, Y.Sun, X.Liu, K.Huang, X.Ma, Y.Wu, X.-J.Liang, Anal. Chem. 2012, 84, 1253; b) K.Sato, K.Hosokawa, M.Maeda, Nucleic Acids Res. 2005, 33, e4; c) H.Li, L.J.Rothberg, J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 10958; d) Y.L.Jung, C.Jung, H.Parab, T.Li, H.G.Park, Biosens. Bioelectron. 2010, 25, 1941.

[0096] [5] a) E.Tan, J.Wong, D.Nguyen, Y.Zhang, B.Erwin, L.K.Van Ness, S.M.Baker, D.J.Galas, A.Niemz, Anal. Chem. 2005, 77, 7984; b) W.Xu, X.Xue, T.Li, H.Zeng, X.Liu, Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 6849; c) W.Xu, X.Xie, D.Li, Z.Yang, T.Li, X.Liu, Small 2012, 8, 1846; d) J.Li, T.Deng, X.Chu, R.Yang, J.Jiang, G.Shen, R.Yu, Anal. Chem. 2010, 82, 2811; e) L.Cui, G.Ke, W.Y.Zhang, C.J.Yang, Biosens. Bioelectron. 2011, 26, 2796; f) Y.Seetang-Nun, W.Jaroenram, S.Sriurairatana, R.Suebsing, W.Kiatpathomchai, Mol. Cell. Probes 2013, 27, 71; g) R.Suebsing, P.Prombun, W.Kiatpathomchai, Lett. Appl. Microbiol. 2013, 56, 428; h) C.Zhou, Y.Mu, M.-C.Yang, Q.-Q.Wu, W.Xu, Y.Zhang, W.Jin, Q.Song, Z.-Y.Wu, Q.-H.Jin, Chem. Res. Chin. Univ. 2013, 29, 424.

[0097] [6] a) M.Cai, F.Li, Y.Zhang, Q.Wang, Nano Res. 2010, 3, 557; b) J.K.F.Wong, S.P.Yip, T.M.H.Lee, Small 2012, 8, 214; c) W.Shen, H.Deng, Z.Gao, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 14678.

[0098] [7] A.R.Herdt, S.M.Drawz, Y.Kang, T.A.Taton, Colloids Surf. B 2006, 51, 130.

[0099] [8] a) R.L.Letsinger, R.Elghanian, G.Viswanadham, C.A.Mirkin, Bioconjugate Chem. 2000, 11, 289; b) W.Zhao, Y.Gao, S.A.Kandadai, M.A.Brook, Y.Li, Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 2409; c) L.-J.Ou, P.-Y.Jin, X.Chu, J.-H.Jiang, R.-Q.Yu, Anal. Chem. 2010, 82, 6015; d) J.K.F.Wong, S.P.Yip, T.M.H.Lee, Nano Res. 2012, 5, 585.

[0100] [9] a) H.Li, J.Huang, J.Lv, H.An, X.Zhang, Z.Zhang, C.Fan, J.Hu, Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 5100; b) B.V.Vu, D.Litvinov, R.C.Willson, Anal. Chem. 2008, 80, 5462.

[0101] [10] a) T.Notomi, H.Okayama, H.Masubuchi, T.Yonekawa, K.Watanabe, N.Amino,

T.Hase, *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, e63; b) K.Nagamine, T.Hase, T.Notomi, *Mol. Cell. Probes* 2002, 16, 223; c) Y.Mori, K.Nagamine, N.Tomita, T.Notomi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 289, 150; d) N.Tomita, Y.Mori, H.Kanda, T.Notomi, *Nat. Protoc.* 2008, 3, 877; e) Y.Mori, T.Notomi, *J. Infect. Chemother.* 2009, 15, 62.

[0102] [11] Z.K.Njiru, *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 2012, 6, e1572.

[0103] [12] Y.Kim, R.C.Johnson, J.T.Hupp, *Nano Lett.* 2001, 1, 165.

[0104] [13] K.C.Grabar, R.G.Freeman, M.B.Hommer, M.J.Natan, *Anal. Chem.* 1995, 67, 735.

[0105] [13] W.Haiss, N.T.K.Thanh, J.Aveyard, D.G.Fernig, *Anal. Chem.* 2007, 79, 4215.

	<110> 香港理工大学	
	<120> 使用羧基修饰的金纳米颗粒的超灵敏闭管式比色环介导等温扩增法	
	<130> 140425HK01	
	<160> 6	
	<170> PatentIn version 3.3	
	<210> 1	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物FIP	
	<400> 1	
	cagccagccg cagcacgttc gctcatagga gatatggtag agccgc	46
	<210> 2	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0001]	<220>	
	<223> 引物BIP	
	<400> 2	
	gagagaattt gtaccacctc ccaccgggca catagcagtc ctagggacag t	51
	<210> 3	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物F3	
	<400> 3	
	ggcttggtc tgctaacacg tt	22
	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物B3	
	<400> 4	

	ggacgtttgt aatgtccgct cc	22
	<210> 5	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物环F	
	<400> 5	
[0002]	ctgcatacga cgtgtct	17
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物环B	
	<400> 6	
	accatctatg actgtacgcc	20

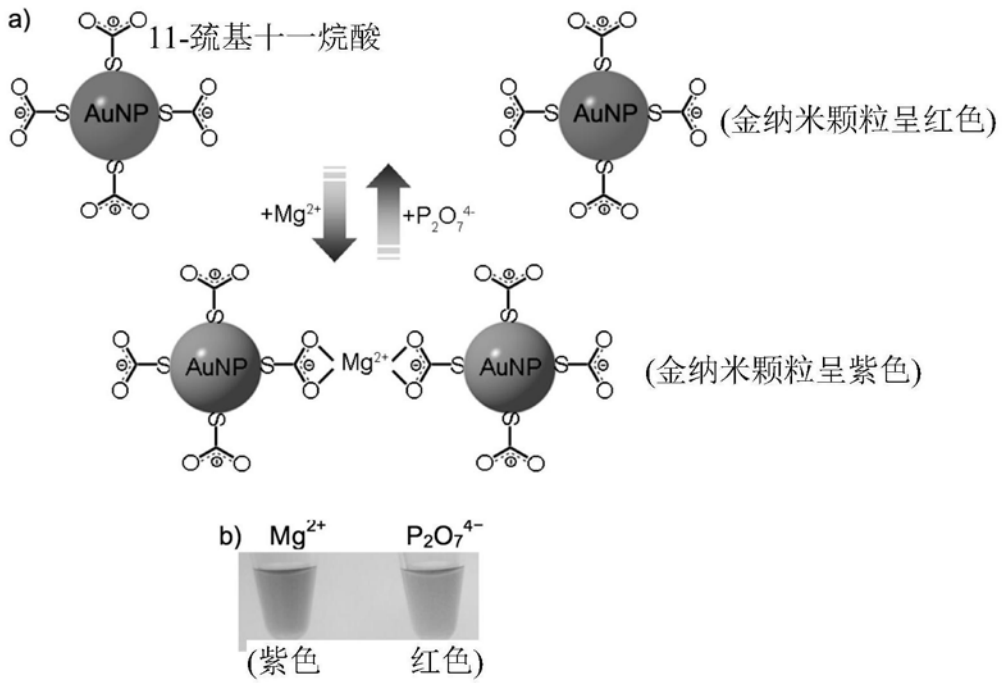


图1

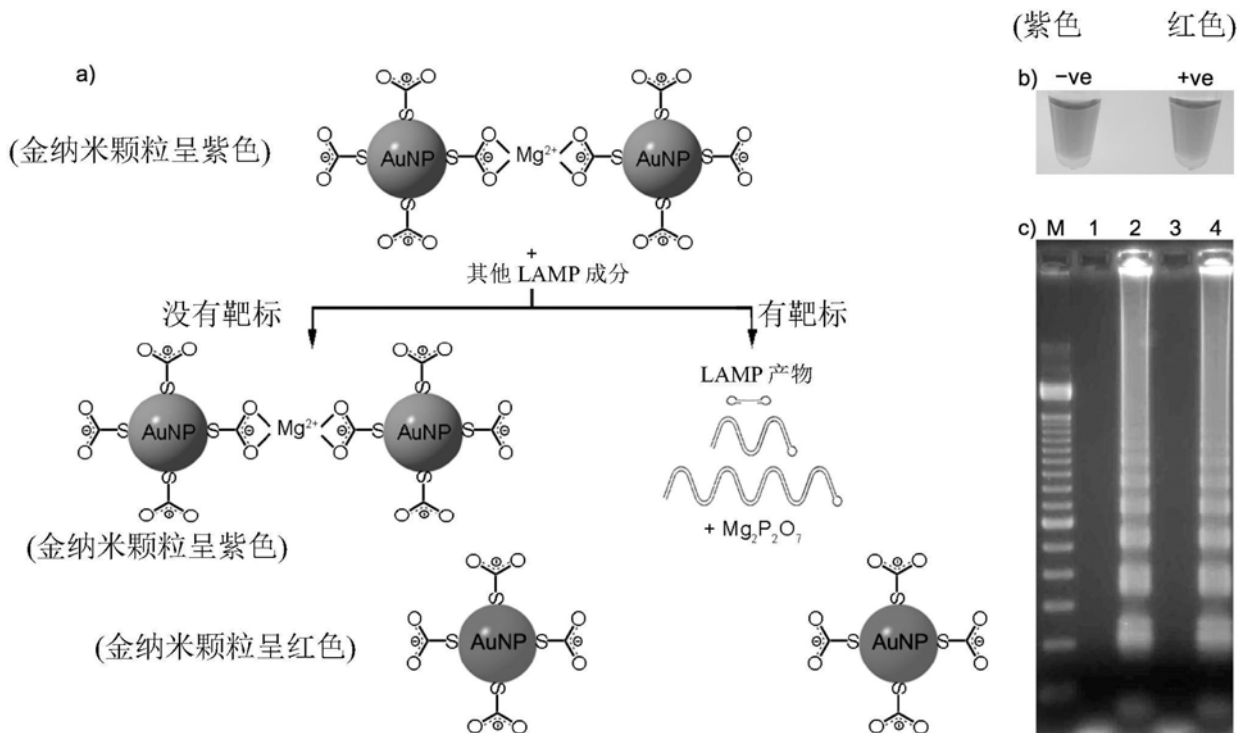


图2

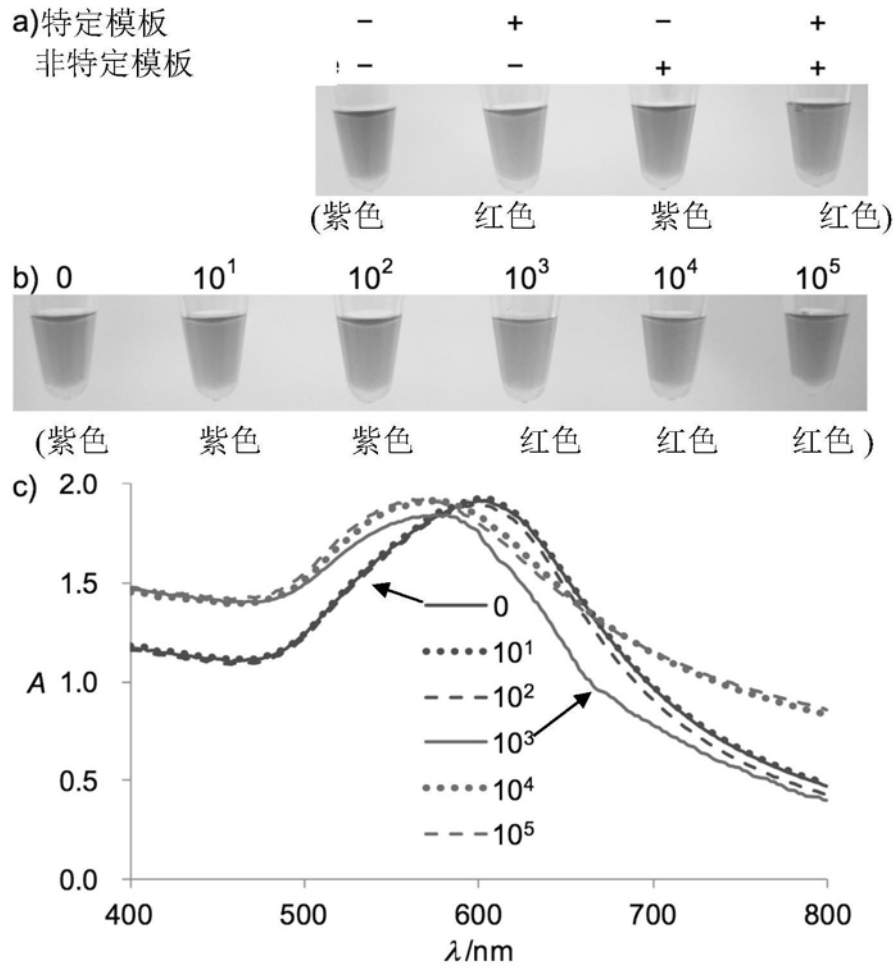


图3

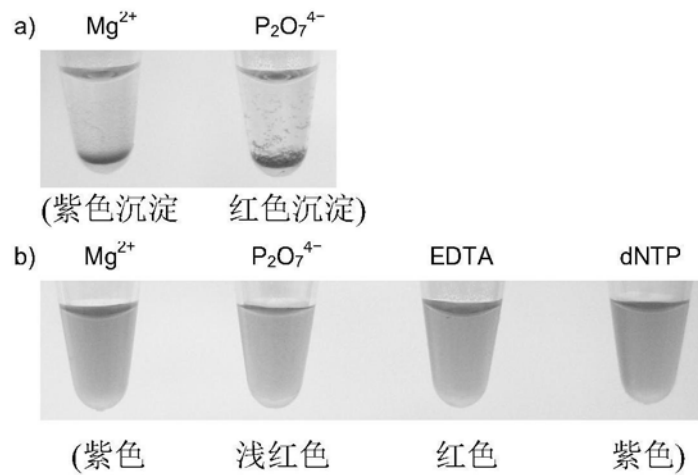


图4

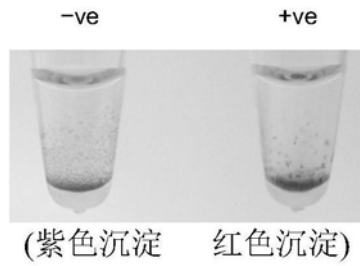


图5

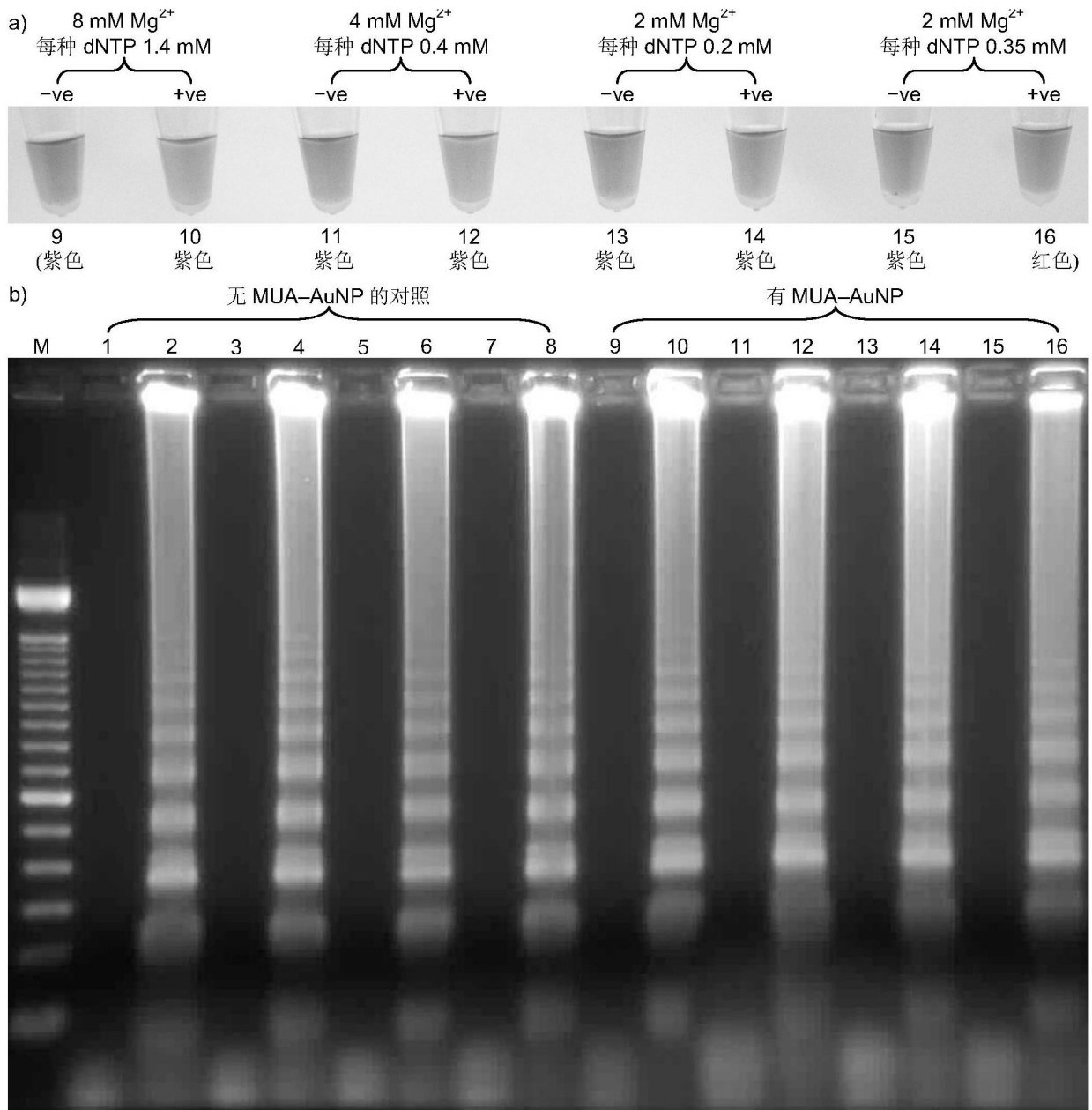


图6

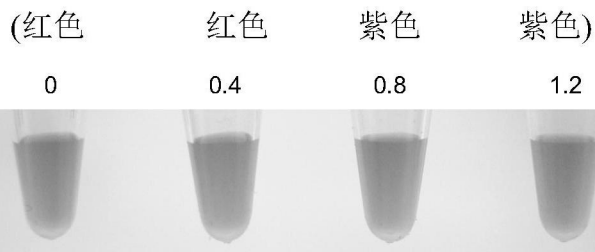


图7

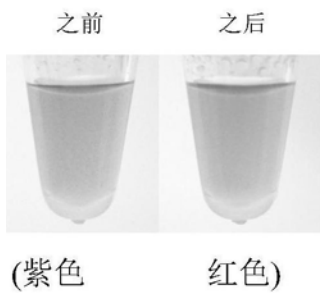


图8

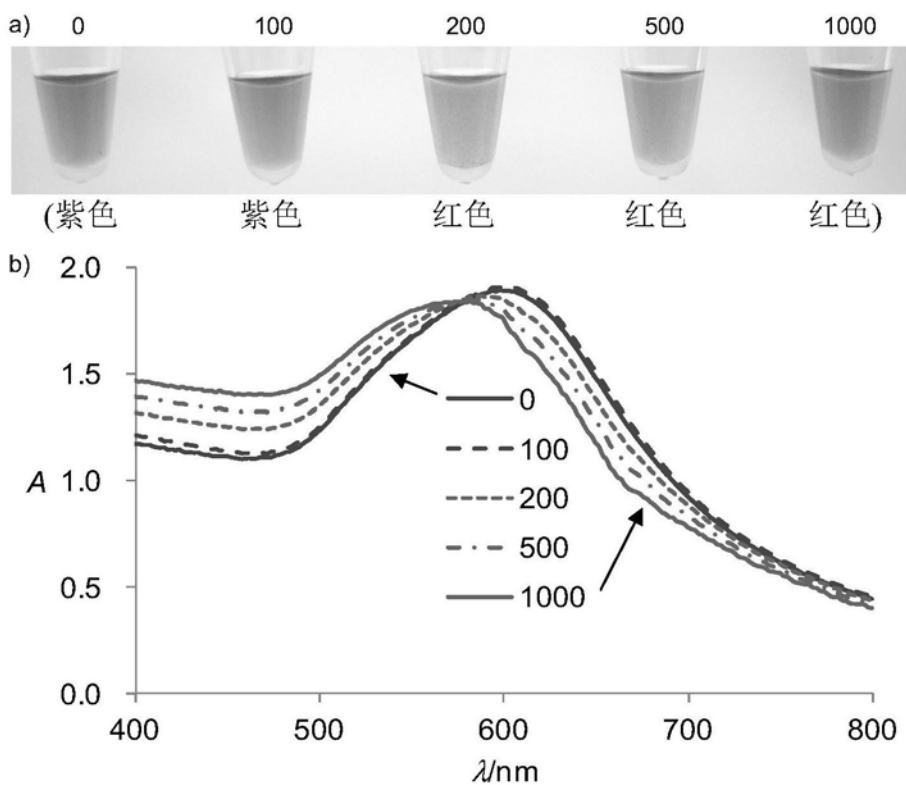


图9

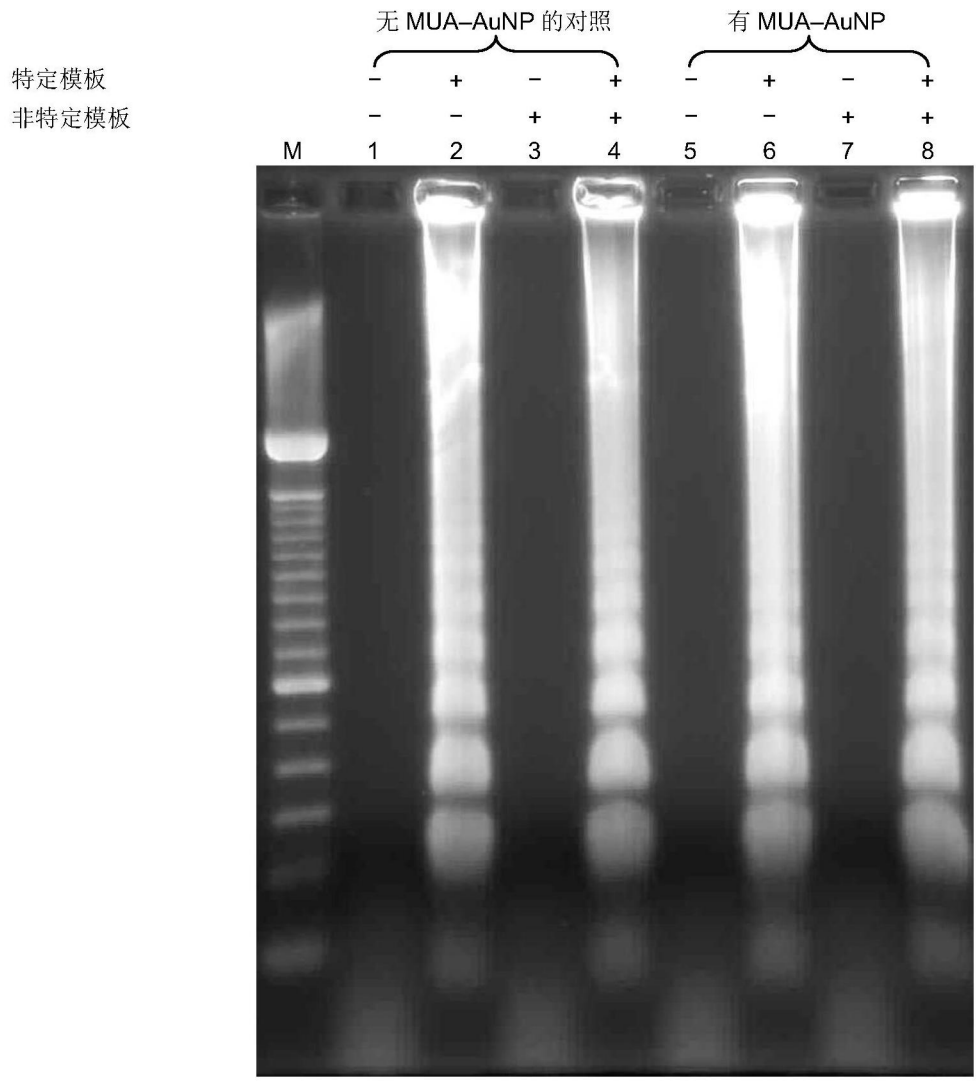


图10

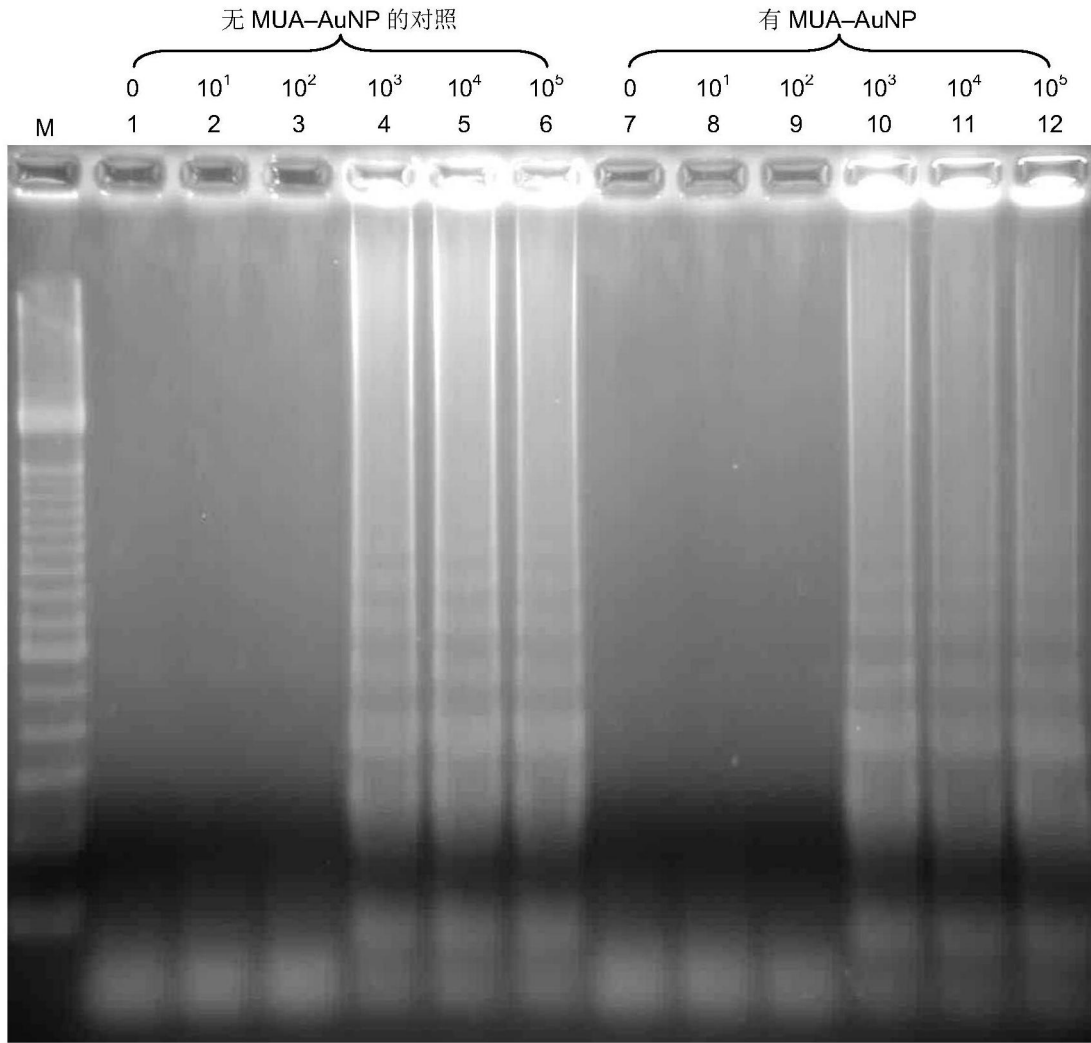


图11

a)



b)

-ve

+ve



(紫色

红色)

图12