

纳米探针芯片技术用于微量乙肝病毒 DNA 的检测

汪毅^{1,2} 毛红菊^{*2} 臧国庆¹ 张宏莲² 金庆辉² 赵建龙²

¹(上海交通大学附属第六人民医院, 上海 200062) ²(中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050)

摘要 利用两组探针修饰的微粒: (1)表面标记有可与待测乙肝病毒 (HBV) DNA 另一端结合的纳米金探针 1 (信号探针) 以及可与信号探针部分结合的纳米金探针 2 (检测探针); (2)表面标记有可与待测 HBV DNA 一端结合的磁珠探针 (捕捉探针 1)。检测靶 HBV DNA 时, 磁珠探针与信号探针在液相中可分别与 HBV DNA 靶序列一端结合最终形成三明治样结构。再以磁场将三明治样复合物从反应液中分离, 以 DTT 溶液将信号探针从纳米金颗粒上洗脱。洗脱后的信号探针数量反映靶基因的多寡, 信号探针一段与预先点样的基因芯片上的捕捉探针 2 结合, 检测探针与信号探针另一段相结合, 最后用银染液将检测探针显色从而得到靶目标 DNA 相对定量信息。结果表明, 本检测方法的检测灵敏度达到 10^{-15} mol/L 水平。检测时间少于 1.5 h, 检测结果与 HBV DNA 水平呈现较好的线性关系且无假阳性结果; 本方法有望用于乙肝病人血清中 HBV DNA 的快速筛测及其它微生物基因的检测。

关键词 乙肝病毒 DNA; 纳米金探针; 生物条形码扩增; 纳米探针芯片

1 引言

乙型肝炎是乙肝病毒 (HBV) 所引起的一种传播快、潜伏期长、危害广的传染病, 我国慢性无症状 HBV 感染者或慢性无症状 HBV 携带者已超过 1.2 亿, 是 HBV 感染者中存在数量最大的群体。采用有效的指标和方法实现早期诊断和病情监测对于控制传播、判断预后和指导用药都有重要意义^[1]。

PCR 一直是临床上检测 HBV DNA 的主要方法, 具有较高的特异性和灵敏度, 但却存在依赖酶促反应, 所用试剂较为昂贵且不易保存, 所需周期长和易污染, 反应完毕后对其扩增的靶基因较难定量的缺点^[2,3]。近年来, 荧光定量 PCR 试剂盒开始用于临床检测 HBV, 灵敏度高, 定量分析效果好。其中, SYBR Green 法不需要设计特异性探针, 成本较低, 但易产生假阳性结果^[4]。而 TaqMan 探针法有着的特异性较好, 但应用时需设计与目标序列互补的荧光探针^[5]。

基因芯片技术在医学各个领域中的应用日益广泛^[6,7]。但现阶段芯片检测的灵敏度不够高, 在检测核酸时低于 PCR 扩增的灵敏度; 其次基因芯片检测技术一般采用荧光标记探针技术, 需配套昂贵的仪器来阅读和分析杂交信号, 存在着系统成本过高, 灵敏度低等问题; 限制了基因芯片技术的应用^[8,9]。

近年来, 基于纳米材料的分子检测技术已被用于病原体 and 肿瘤相关 DNA 检测^[10,11]、蛋白检测^[12,13] 以及 microRNA 检测^[14]。纳米材料尤其是金纳米颗粒 (Gold nanoparticles, AuNPs), 具有很好的生物相容性和较大的比表面积, 金纳米粒子表面可以标记大量的生物活性分子 (寡核苷酸探针或是蛋白分子)。Zhang 等^[15,16] 将固定于金电极表面的探针 DNA 分子与靶分子结合, 再加入与靶分子结合的纳米金探针, 形成夹心结构, 通过伏安法测定修饰在纳米金上的六氨合钨的氧化还原电流, 可以识别和测定溶液中互补的靶 DNA, 制成了具有纳米金放大作用的 DNA 电化学生物传感器; 或直接以硫化铅 (PbS) 超微粒和靶分子杂交, 结合微分脉冲溶出伏安技术 (DPASV) 测定 Pb^{2+} , 从而间接判断靶分子的杂交情况^[17]。但是上述电化学方法检测灵敏度仍不够高; 且探针用量大, 杂交过程繁琐, 需专门仪器读取结果, 限制了该方法的应用。Mizuo 等^[18] 运用比色法检测靶 DNA 的存在, 结合了靶 DNA 的纳米金探针 (末端完全互补) 在一定的盐离子浓度下会聚集。但其检测灵敏度不高, 只能检测 50~500 μ mol/L 的目标 DNA 分子。本研究基于 Mirkin 等^[11] 开发的 BCA 技术, 将纳米金颗粒标记的探针结合基因芯片方法用于

2010-01-02 收稿; 2010-02-23 接受

本文系国家卫生部重大专项 (Nos 2009ZX10004-105, 2009ZX10004-301) 和上海市科委项目 (Nos 0952nm05700, 09ZR1437800) 资助

* E-mail: hjmao@mail.sjtu.ac.cn

HBV DNA 的检测,进一步优化了纳米金探针标记步骤和杂交条件,可在较短时间内完成对 HBV DNA 的检测,灵敏度已能接近 PCR 反应的检测灵敏度,有望用于乙肝病人血清中 HBV DNA 的快速筛测。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Prosys 5510A 型芯片点样仪; JASCO V-670 型紫外-可见光光谱仪。纳米金溶液 (平均粒径为 15 nm)、基因芯片 (本实验室自制);杂交缓冲液 (罗氏公司);羧基化的磁珠 (Invitrogen 公司); BSA (Sigma 公司); 0.1 mol/L PBS (pH 7.2, 0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 1.0 mol/L NaCl);胶体金重悬液 (0.1 mol/L PBS, 1.0 mol/L NaCl); 0.2 ×SSC 洗液 (含 0.1% SDS);银染液; NaNO_3 洗液。所需引物、探针序列均由大连宝生物有限 (TakaRa) 公司合成 (如表 1 所示)。其它试剂均为分析纯。

表 1 待测 HBV DNA 的 PCR 序列及核酸探针序列

序列名称 Name	序列结构 Structure
标记在磁珠上的氨基化捕捉探针-1 Oligonucleotide-modified magnetic microparticle probe (capture probe-1)	5'-NH ₂ -poly(T) 16-GTT CAT GTC CTA CTG TTC-3'
标记纳米金的信号探针 Oligonucleotide-modified gold nanoparticle (NP) probes 1 (bar-code DNA)	5'-GTGCCCTTGGGTGGCTTTG-PEG9mer-AGCTACGAA TAA-(CH ₂) ₃ -SH-3'
标记纳米金的检测探针 Oligonucleotide-modified gold NP probes 2 (detect probe)	5'-HS-(CH ₂) ₃ -Poly(A) 10-TTA TTC GTA GCT-3'
固定于芯片上的氨基化捕捉探针 Amino-modified capture DNA probe (capture probe)	5'-NH ₂ -poly(A) 16-CAAA GCCACCCAA GGCAC-3'
PCR 上游引物 Upstream primer for PCR	5'-ACGACCGACCTTGA GGCA TACTTC-3'
PCR 下游引物 Downstream primer for PCR	5'-CAGAGCAGAGGCGGTGTCG-3'

2.2 实验方法

2.2.1 HBV DNA 样品制备 裂解法抽提阳性血清样品中 HBV 基因组 DNA, PCR 扩增参考文献 [10] 进行。PCR 体系:缓冲液 1.5 μL, Taq 酶 1 U, 25 mmol/L MgCl_2 0.8 μL, 25 mmol/L dNTP 1.0 μL, 上下游引物各 0.5 μL, 引物终浓度为 0.5 pmol/L; 将阳性血清裂解离心后, 取 1.5 μL, 加二次蒸馏水至 15 μL。扩增条件: 94 °C 变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 54 °C 变性 30 s, 72 °C 变性 30 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 4 min。

2.2.2 纳米金探针制备 配制 1.0 mmol/L HAuCl_4 溶液及 38.8 mmol/L 柠檬酸三钠溶液。将 HAuCl_4 溶液加热至 130 °C, 保证加热过程中搅拌充分, 约 20 min 后迅速加入新配的柠檬酸三钠溶液 25 mL (此过程中注意保温), 持续搅拌至溶液冷却至室温, 即形成酒红色溶液。以 0.22 μm 硝酸纤维尼龙膜过滤溶液, 即可得到颗粒均匀的纳米金溶液。两种纳米金颗粒表面标记巯基修饰的 DNA 探针的修饰方法: 一种为可与靶 DNA 部分序列互补结合并带有巯基的寡核苷酸探针, 3 端修饰巯基的寡核苷酸探针和金纳米粒子以共价键结合, 使寡核苷酸牢固地结合在纳米金表面形成信号探针 (表 1); 另一种可与上信号探针部分序列结合, 该寡核苷酸探针 3 端亦以巯基修饰, 结合基因芯片对信号探针进行检测, 为检测探针。标记方法: 取 10 mmol/L 15 nm 纳米金溶液 1.0 mL, 以 9000 r/min 离心 50 min, 去上清液, 以 100 μL 无菌去离子水重悬; 加入 DNA 探针使其终浓度为 3 μmol/L, 室温放置 16 h; 分 3 次加入 0.1 mol/L PBS (pH 7.2) 至终浓度分别为 100 和 10 mmol/L, 混匀, 室温放置 48 h 以上; 用 0.01 mol/L PBS 溶液以 9000 r/min 离心清洗 50 min 两次, 去上清液, 以 100 μL 0.01 mol/L PBS 重悬, 4 °C 储存备用。用紫外-可见光光谱仪测其吸光光谱及 OD 值, 用透射电镜扫描 DNA 探针标记前后的纳米金。

2.2.3 磁珠探针标记 根据 HBV DNA 保守序列, 设计一段捕捉探针-1 (表 1), 标记于磁珠上, 用于捕捉样品中的 HBV DNA。取 PCR 管, 吸取未标记磁珠 50 μL (10 g/L), 将 50 μL 磁珠与 100 μL MES (25 mmol/L, pH 6) 混合, 充分混匀后磁分离。加入新配 10 g/L N-乙基-N'-²(3-二乙氨基丙基)碳二亚胺 (EDC) 和 10 g/L N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 各 50 μL, 室温孵育 40 min; 将上孵育后磁珠以 PBS (pH 7.4) 清洗, 磁分离后加入 90 μL MES 及 HBV 捕捉探针 9 μL (100 pmol/L), 室温孵育 1 h。反应完毕后, 将连接后磁珠以 PBS (pH 7.4) 清洗, 磁分离后加入 100 μL Tris-HCl (0.05 mol/L, pH 7.4), 孵育 15 min, 将磁珠未反应表面封闭; 灭活后以 PBS-BSA (0.1%, w/v) 清洗后磁分离, 重悬保存于 50 μL

PBS-BSA (0.1%, w/v)中。

2.2.4 DNA 芯片制备 根据信号探针序列设计,可与其部分互补结合的捕捉探针-2 (表 1);将氨基化修饰的捕捉探针通过芯片点样仪点到表面醛基化的在玻片上,点直径 100 μm,点间距 500 μm,点样量为 0.7 nL, DNA 探针浓度为 75 μmol/L, 37 °C 固定。未结合的探针以去离子水冲洗,浸泡于 40 mmol/L 巯基琥珀酸溶液中 30 min 以钝化其余结合位点,以去离子水多次冲洗后,4 °C 备用。

2.2.5 磁珠探针-目标 DNA 纳米金结合探针的连接及洗脱 在 HBV 目标 DNA 存在时,标记有 HBV DNA 捕捉探针的磁性颗粒和纳米金信号探针通过互补序列分别与靶分子杂交,形成类似“三明治”的结构。利用磁场可将这种结合物从溶液中分离出来。通过洗涤除去未结合的纳米金颗粒及其它反应物后,将沉淀重新悬浮。在重悬后溶液中加入二硫苏糖醇 (DTT) 可将纳米金颗粒表面的未与 HBV DNA 结合的探针 DNA 从其表面解离,释放到溶液中,这些探针 DNA 可作为放大信号的条形码 DNA (bio-barcode DNA) 用于检测。

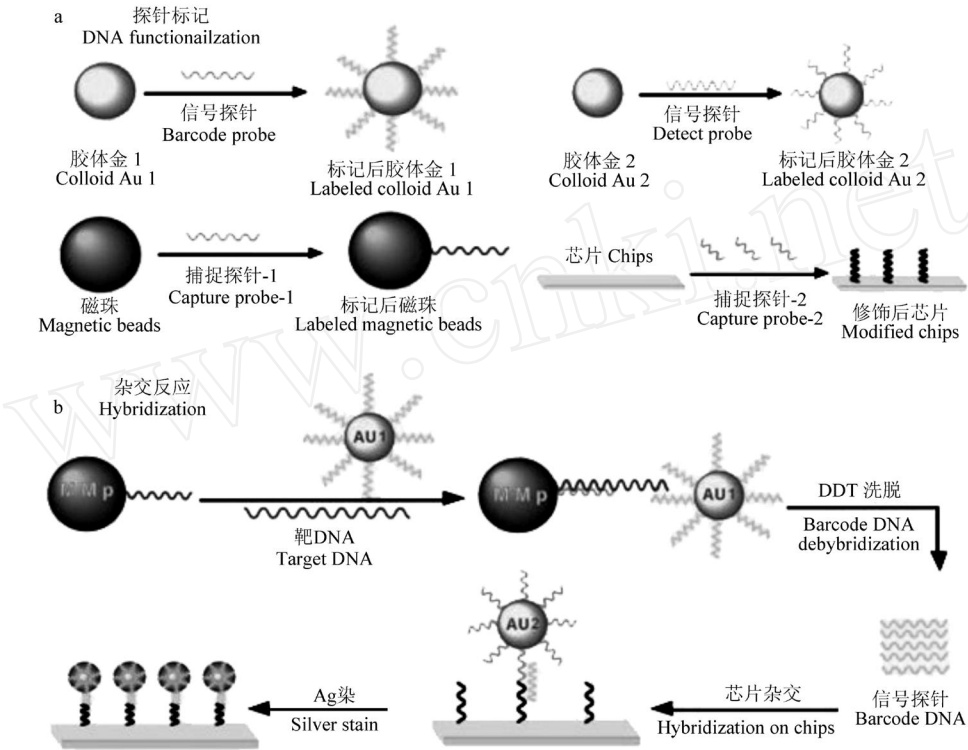


图 1 基于 BCA 技术的纳米探针标记及杂交检测过程示意图

Fig 1 Schematic of preparation of nano-probes and hybridization procedure based on bio-barcode amplification (BCA)

将 PCR 扩增产物 (约 10^{-7} mol/L) 按 100, 1000, 10000 和 100000 倍比梯度稀释。取 2 μL 标记后磁珠和 2 μL 靶 DNA (PCR 稀释样本需经 95 °C 变性 5 min, 分解为单链), 加入 17 μL 杂交液混匀, 总体积 21 μL, 48 °C 杂交 10 min。杂交完毕后加入 2 μL 纳米金信号探针, 总体积约为 23 μL, 混匀后 50 °C 杂交 40 min, 杂交结束后以 Assay 缓冲液清洗 (去除未结合的纳米结合探针和 HBV DNA), 磁分离后移去上清液。加入新配制的 0.5 mol/L DTT 溶液 (溶解于 Assay 缓冲液中) 20 μL, 室温下洗脱 10 min 后磁场分离, 吸取上清液, 供芯片杂交分析。

2.2.6 基因芯片检测 取 2 μL 洗脱液和 12 μL 杂交液, 混匀, 均匀滴入芯片点阵区, 40 °C 杂交 30 min。以 0.2 × SSC (含 0.1% SDS) 洗液清洗芯片 3~5 min, 氮气吹干待用。

取检测探针 1 μL, 加入杂交液 12 μL, 混匀后均匀滴入芯片点阵区, 40 °C 杂交 30 min; 杂交完毕后以 NaNO₃ 洗液清洗 3 min, 氮气吹干。每点阵均匀加入新制银染液 20 μL (避光操作), 室温反应 10 min 后置于去离子水以终止反应, 镜下观察。

3 结果与讨论

3.1 纳米金探针制备及表征结果分析

如 TEM 图 (图 2) 所示, 未标记 DNA 探针的纳米金颗粒周围界面清晰; 而标记后的纳米金颗粒围有一层灰黑色的疏水区域, 表明 DNA 探针标记到纳米金颗粒表面, 且可见 DNA 探针的标记并未使纳米金颗粒聚集, 其仍稳定存在, 分散性好。

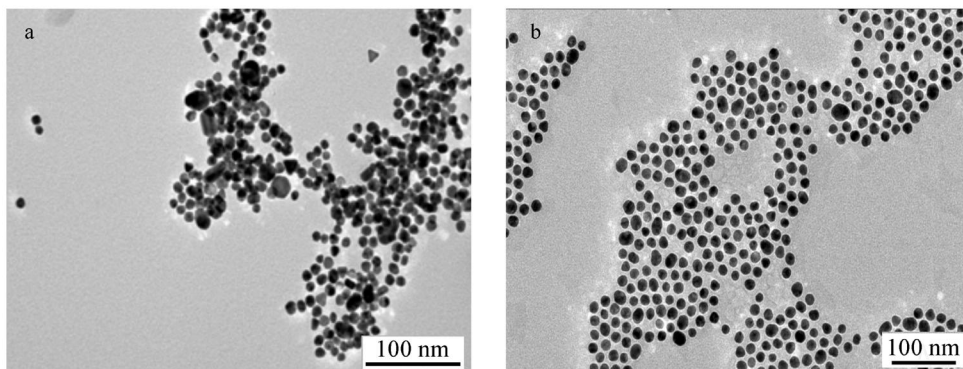


图 2 标记 DNA 探针前 (a) 和后 (b) 的纳米金透射电镜图

Fig 2 TEM images of bare Au nanoparticle (AuNP) (a) and AuNP modified with DNA probes (b)

随着粒径的增大, 纳米金溶液对应吸收峰的峰位呈现向长波段红移的趋势^[19, 20]。从光谱扫描图 (图 3) 可见, 标记了 DNA 探针的纳米金最大吸收峰的波长较未标记后移了约 5.0 nm, 由 520 nm 后移到近 525 nm 处。DNA 分子标记到纳米金颗粒的表面, 使纳米金粒子尺寸和形状较之前略增大, 吸光值也随之变大。

3.2 核酸检测结果与分析

3.2.1 纳米金探针浓度对检测的影响 杂交体系中纳米金探针含量低会导致基因芯片的信号减弱, 降低反应灵敏度。而过量的信号探针会使得基因芯片杂交信号强度高, 导致可能出现假阳性。不同浓度的纳米金信号探针杂交对最终基因芯片杂交信号的影响见图 4。芯片杂交信号随纳米金探针浓度升高而增强, 当纳米金探针为 8.7 nmol/L 时达到最高值, 继续提高信号探针浓度不能提高信号强度, 故本实验中纳米金信号探针最适浓度为 8.7 nmol/L。

3.2.2 磁珠探针浓度对检测的影响 磁珠探针量不足会导致芯片杂交信号降低, 降低检测靶 DNA 的灵敏度; 而磁珠浓度过高会造成浪费。由图 5 可知, 本实验中最适磁珠浓度为 1.5 g/L。

3.2.3 纳米金探针 磁珠探针杂交时间对检测的影响 考察了第二步杂交时间对分析结果的影响。此步杂交为纳米金信号探针与已结合磁珠探针的靶 DNA 之间的反应。结果表明, 杂交在 40 min 内即可基本完成。延长杂交时间不能明显增强反应信号。另外, 对第一步磁珠探针与靶 DNA 的杂交时间也经过测试, 二者杂交 10 min 内即可完成; 延长杂交时间不能增强最终信号。整个杂交实验过程可在 1 h 内完成。

3.2.4 纳米金探针检测不同浓度核酸

由图 6 所示, 本方法对目标核酸分子检出限为 10^{-15} mol/L, 接近 PCR 反应检测水平 (5~10 个拷贝 DNA 分子)。检测的信号好, 点阵清晰, 背景低, 且随目标 DNA 分子浓度降低, 信号结果呈现减弱趋势变化, 差异明显。对染色后芯片做灰度分析 (图 7), 银染后灰度值与 HBV DNA 浓度呈近似线性相关, 证实本反应体系的稳定性和实验结果的可靠性。

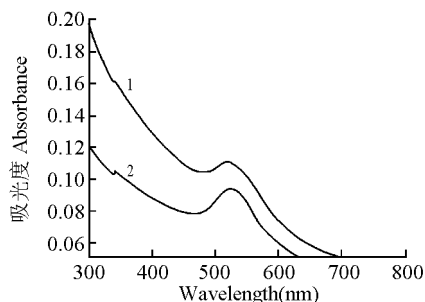


图 3 15 nm 纳米金标记寡核苷酸前后的紫外吸收光谱

Fig 3 UV-Vis spectra of AuNP probes

1. 520 nm 处未标记的纳米金 (Unmodified AuNPs at 520 nm); 2. 525 nm 标记后的纳米金 (DNA modified AuNPs at 525 nm)。

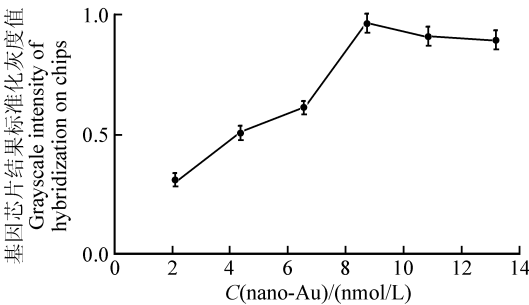


图 4 纳米金信号探针浓度对芯片检测结果的影响

Fig 4 Effect of concentration of bar-code DNA modified AuNPs on chip-based detection

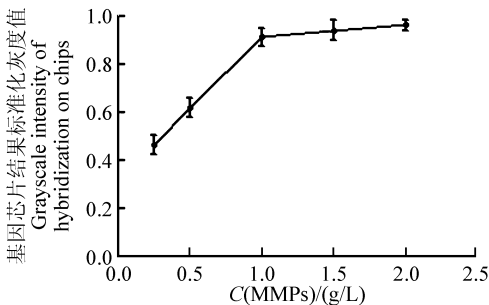


图 5 磁珠捕捉探针浓度的影响

Fig 5 Effect of concentration of capture probe-1 modified magntic microparticles(MMPs) on chip-based detection

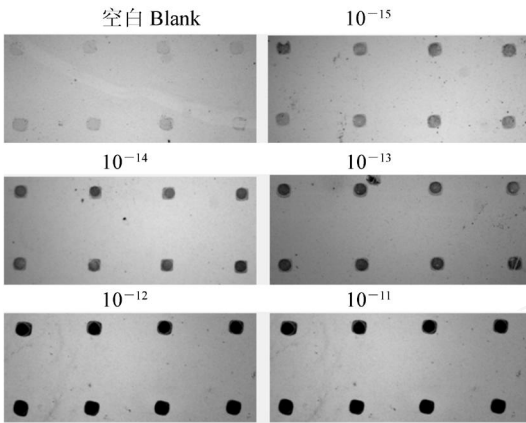


图 6 纳米金探针检测不同浓度 (mol/L) HBV 靶序列的芯片结果

Fig 6 Results of detection for HBV target DNA with different concentration(mol/L) by chip-based detection

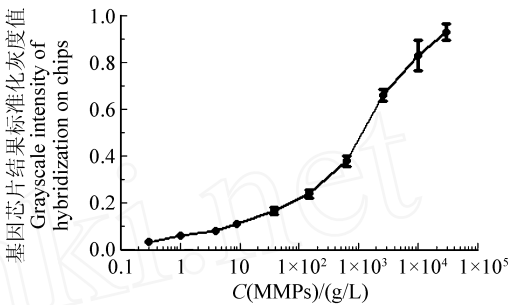


图 7 HBV DNA 浓度梯度实验结果灰度测定的标准化曲线每个浓度对应结果取 3 次独立实验均数

Fig 7 A normalized grayscale intensity calibration curve for HBV DNA concentration The result is from 3 independent experiments

近年来,利用纳米探针标记技术检测 HBV DNA 已有报道。习东等^[21]通过纳米金颗粒基因探针与 HBV DNA 样本杂交,敏感度可达 10^3 copies/mL,无需扩增直接用于对乙肝病人阳性血清中提取的 HBV DNA 的检测。但是液相中杂交现象不直观,结果需要通过昂贵的透射电镜观察。李玮等^[22]基于纳米金标记探针的目视化乙肝病毒基因芯片的研究,将目标 HBV DNA 分子先和芯片上捕捉探针结合,然后再与合成的纳米金检测探针结合从而放大信号。该方法检出限低至 10^{-9} mol/L 靶 DNA,其灵敏度和荧光标记法相同,检测 HBV DNA 尚达不到 PCR 方法的灵敏度。本方法对目标核酸分子的检出限为 1.0×10^{-15} mol/L,已接近 PCR 反应的检出限。结合基因芯片可以达到目视化检测,芯片杂交结果能较好地反映靶序列的浓度,实验结果与 HBV DNA 浓度呈现良好的线性关系。纳米金探针通过标记一定比例的结合探针和检测探针,不但放大了检测信号,还提高了基因芯片杂交反应的特异性。本芯片杂交结果只需普通的商用扫描仪或普通的倒置显微镜采集信号,具有成本低、重复性好等特点。本方法操作简单,且杂交结果背景低、稳定,易于保存,有望用于临床检验。

References

1 Yao G J. *Antimicrob Chemother*, **2007**, 60(3): 201~205

2 Suthent R, Gaudart N, Chokpaibulkit K, Tanliang N, Kanoksinsombath C, Chaisilwatana P. *J. Clin Microbiol*, **2003**, 41(3): 1016~1022

3 Fodor S P, Rava R P, Huang X C, Pease A C, Holmes C P, Adams C L. *Nature*, **1993**, 364(6437): 555~556

4 Emi A, Sun Y Y, Wang J, Zhou Q, Ning B T, Stacey L D, Guo L, Yang J P. *BMC Genomics*, **2008**, 9(2): 328

5 Francisco V, Jeffrey L M, Rayjalakshmi L. *Int J. Genomics Proteomics*, **2004**, 1(1): 1~12

- 6 Schena M, Shalon D, Davis R W, Brown P O. *Science*, **1995**, 270 (5235): 467~470
- 7 Schweitzer B, Kingsmore S. *Curr Opin Biotechnol*, **2001**, 12 (1): 21~27
- 8 Koizumi Shinji. *J. Occup Health*, **2004**, 46 (1): 20~25
- 9 Glenn H M, Fred C C. *Adv Biochem. Eng Biotechnol*, **2002**, 77: 21~42
- 10 Shiho T, Hiroshi S, Tsutomu N. *Anal Chim. Acta*, **2009**, 641 (1-2): 7~13
- 11 Mirkin C A, Nam J M, Stoeva S I. *J. Am. Chem. Soc*, **2004**, 126 (19): 5932~5933
- 12 Cuong C, Li X X, Jeewon L, Sang J S. *Biosens Bioelectron*, **2009**, 24 (5): 1292~1297
- 13 L U Ru-Ping (刘儒平), L U Jun-Tao (刘军涛), WANG M i-Xia (王蜜霞), LUO Jin-Ping (罗金平), L U Chun-Xiu (刘春秀), CA I Xin-Xia (蔡新霞). *Chinese J. Anal Chem. (分析化学)*, **2009**, 37 (12): 1749~1753
- 14 Yang W J, Li X B, Li Y Y, Zhao L F, He W L, Gao Y Q, Wan Y J, Xia W, Chen T, Zheng H. *Anal Biochem.*, **2008**, 376 (2): 183~188
- 15 Zhang J, Song S P, Zhang L Y, Wang L H, Wu H P. *JACS*, **2006**, 128 (26): 8575~8580
- 16 Zhang J, Song S P, Wang L H, Pan D, Fan C H. *Nat Protoc*, **2007**, 2 (11): 2888~2895
- 17 Sun W, Zhong J H, Qin P, Jiao K. *Anal Biochem.*, **2008**, 377 (2): 115~119
- 18 Sato K, Hosokawa K, Mizuo, Maeda. *Anal Sci*, **2007**, 23 (1): 17~20
- 19 Yan J I, M Camen Estévez, Smith J E, Wang K M, He X X, Wang L, Tan W H. *Nanotoday*, **2007**, 2 (3): 44~50
- 20 Zhao X J, Bagwe R P, Tan W H. *Adv Mater*, **2004**, 16 (2): 173~176
- 21 X I Dong (刁东), N N G Qin (宁琴), LU Qiang-Hua (卢强华), YAO Kai-Lun (姚凯伦), L U Zu-Li (刘祖黎), LUO Xiao-Ping (罗小平). *Chinese J. Clin Lab Sci (临床检验杂志)*, **2007**, 25 (13): 165~167
- 22 L I Wei (李玮), PANG Dai-Wen (庞代文). *Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报)*, **2003**, 24 (12): 2186~2188

Detection of Hepatitis B Virus Deoxyribonucleic Acid Based on Gold Nanoparticle Probe Chip

WANG Yi^{1,2}, MAO Hong-Ju^{*2}, ZANG Guo-Qing¹, ZHANG Hong-Lian², JIN Qing-Hui², ZHAO Jian-Long²

¹ (Department of Infection, the Sixth Peoples Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233)

² (Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050)

Abstract A nanoparticle-based bio-barcode amplification (BCA) approach was developed for the sensitive detection of hepatitis B virus (HBV) DNA. The BCA approach employed two sets of particles: (1) two-component oligonucleotide-modified gold nanoparticles (AuNPs): one oligonucleotide probe called signal probe (barcode DNA) is partial complementary with the target sequence of HBV DNA and another one called detection probe is partial complementary with the signal probe; (2) single component oligonucleotide modified magnetic microparticles (MMPs). In the presence of the target molecule, the gold nanoparticles and magnetic particles formed sandwich hybrids. Along with the isolation of sandwiched hybrids from the sample using a magnet, non-specific bound gold nanoparticles were removed, ensuring that only target-bound gold nanoparticles were collected. Subsequently, the bar-code DNAs were dehybridized from the gold nanoparticle by using the dithiothreitol (DTT). The detection probe with AuNP mixed with bar-code DNA solution was then added to a bar-code capture DNA modified chip, and the spots on chip were labeled with bar-code DNA strands and AuNP probes. Finally, the scanometric detection of silver stain was introduced to further amplify the signal. The results showed that it was possible in a format that offers low fmol/L (10^{-15} mol/L) sensitivity in the detection of HBV DNA sample and there is a good linear relationship between target concentration and spot intensity on chip. The detection of the assay could be fulfilled within 1.5 h. The method could provide a new generation of diagnostic assays for HBV or the other infectious disease.

Keywords Hepatitis B virus deoxyribonucleic acid; Gold nanoparticle probes; Bio-barcode amplification; nanoparticle probe chip-based detection

(Received 2 January 2010; accepted 23 February 2010)