(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2022 年 12 月 22 日 (22.12.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/262135 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 33/58 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01) *G01N 33/52* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/118498

(22) 国际申请日: 2021 年 9 月 15 日 (15.09.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110660432.5 2021年6月15日 (15.06.2021) CN

(71) 申请人: 江南大学(**JIANGNAN UNIVERSITY**) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

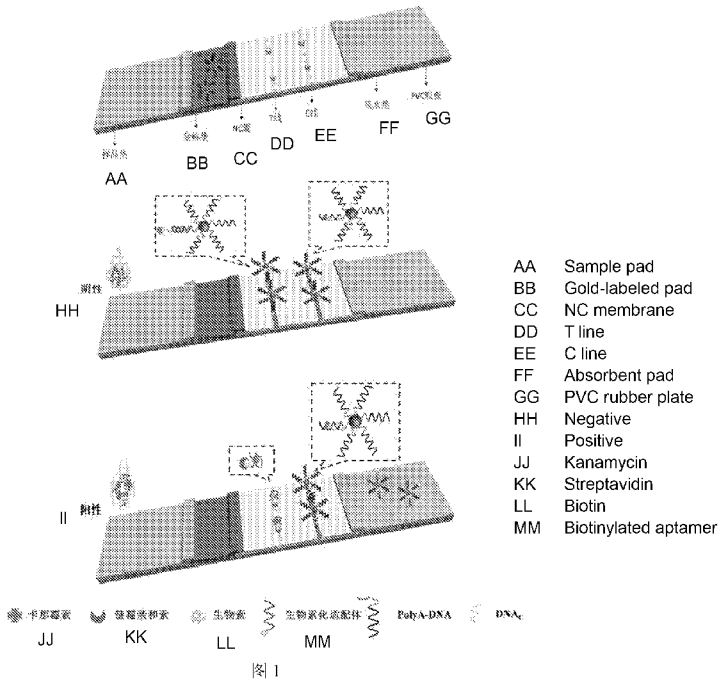
(72) 发明人: 彭池方(**PENG, Chifang**); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。常芮(**CHANG, Rui**); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。李秀萍(**LI, Xiuping**); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。钱志娟(**QIAN, Zhijuan**); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(**HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.**); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E区501 张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

(54) **Title:** UNIVERSAL APTAMER COLLOIDAL GOLD LATERAL CHROMATOGRAPHY TEST PAPER FOR DETECTING SMALL MOLECULAR SUBSTANCES

(54) 发明名称: 一种检测小分子物质的通用型适配体胶体金侧向层析试纸



AA Sample pad
BB Gold-labeled pad
CC NC membrane
DD T line
EE C line
FF Absorbent pad
GG PVC rubber plate
HH Negative
II Positive
JJ Kanamycin
KK Streptavidin
LL Biotin
MM Biotinylated aptamer

图 1

(57) **Abstract:** The present invention relates to the fields of analysis chemistry, medicine, environment, food safety detection, nano biosensing and the like. Disclosed is a universal aptamer colloidal gold lateral chromatography test paper for detecting small molecular substances. A probe AuNPs@poly-DNA is used for rapidly and sensitively capturing an aptamer, streptavidin and streptavidin-biotin-DNAc sprayed in a detection area and a control area do not need to be changed, and the other substance can be detected only by changing a nucleic acid chain part on the probe AuNPs@poly-DNA. A rapid, sensitive and low-cost universal colloidal gold lateral

WO 2022/262135 A1

[见续页]

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

chromatography test paper is developed. A test strip method is simple, convenient and rapid to detect small molecular substances, detection can be performed at any time, and an experiment result can be observed only by adding a test solution into a sample port and completely color-developing the test strip after 5 minutes, so that the detection efficiency can be greatly improved. Qualitative analysis is performed by naked eyes, and quantitative analysis is performed by using a colloidal gold test paper quantitative analyzer.

(57) 摘要：本发明公开了一种检测小分子物质的通用型适配体胶体金侧向层析试纸，属于分析化学、医药、环境、食品安全检测和纳米生物传感等领域。利用探针AuNPs@poly-DNA快速、灵敏地捕获适配体，且在检测区和控制区喷涂的链霉亲和素和链霉亲和素-生物素-DNAc无需改变，仅改变探针AuNPs@poly-DNA上的核酸链部分即可检测另一种物质。开发出用于快速、灵敏、低成本的通用型胶体金侧向层析试纸。试纸条法检测小分子物质简便快速，可随时检测，只需将样品口中加入测试溶液，5min后试纸条显色完全，即可观察实验结果，可以大幅度的提高检测效率。用肉眼进行定性分析，使用胶体金试纸定量分析仪进行定量分析。

一种检测小分子物质的通用型适配体胶体金侧向层析试纸

技术领域

本发明涉及一种检测小分子物质的通用型适配体胶体金侧向层析试纸，属于分析化学、医药、环境、食品安全检测和纳米生物传感等领域。

背景技术

侧流层析分析技术是一种基于纸张的检测平台，可以用于检测多种靶标物质，由于其在几分钟内提供结果的潜力引起研究者极大地兴趣。因为其具有低成本和易于开发生产的特点，侧流层析分析技术已被大量用于现场检测，并广泛应用于各种领域，包括生物医学、食品安全、质量控制以及环境卫生。侧流层析分析技术可以应用一系列生物样本，包括尿液、唾液、汗液、血清、血浆和血液。因此，侧流层析分析技术在多种领域中具有较高的应用价值。

侧流层析分析技术有两种模式，即竞争型和三明治型，对于低分子量的化合物（如真菌毒素等）的检测中通常采用的是竞争型。在采用竞争型胶体金试纸条的制备过程中，与靶标特异性结合的人工抗原和物种特异性抗免疫球蛋白抗体通常喷洒在消化纤维素膜（NC）上分别作为检测线（T 线）和质控线（C 线），或，可以将针对靶标的适配体互补链和人工设计的核酸链喷洒在消化纤维素膜（NC）上分别作为检测线（T 线）和质控线（C 线）。其中，T 线的信号强度与待检样本中的检测目标物的浓度成反比。无论待检样本中是否含有检测目标物，C 线都具有可见的独立信号。近年来，越来越多的研究人员重视通过侧流层析分析技术检测小分子物质。

核酸适配体是一种经过体外筛选技术-指数富集的配体系统进化技术（Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX），得到的一小段结构化的寡核苷酸序列（RNA 或 DNA），可以与相应的靶标分子（蛋白质，病毒，细菌，细胞，重金属离子等）进行高亲和力和强特异性的结合，为化学生物学界和生物医学界提供了一种新的高效快速识别的研究平台。

基于核酸适配体标记的胶体金侧向层析试纸，具有长期稳定、检测时间短、成本低、操作简单、快速等优点，是现场快速检测多种目标物的理想方法。现有核酸适配体胶体金侧向层析试纸条的设计，通常在 T 线上喷涂的是核酸链-链霉亲和素复合物，随着检测目标物的改变，需要重新制备特定的复合物及喷涂制备硝酸纤维素膜，导致现有的侧向层析试纸条的通用性差。

目前，基于适配体识别小分子化合物的胶体金侧向层析试纸研究较少。在文献（Biosensors & Bioelectronics,2015,71(15): 230-242.）中，采用了 DNA 功能化的金纳米球（AuNPs-DNA）

作为探针，采用磁性微球（MMS）快速分离卡那霉素适配体的互补链（cDNA），将 cDNA 作为检测目标，应用于试纸条上，根据 cDNA 的检测浓度转换为卡那霉素的检测浓度，以此来完成卡那霉素的定性以及定量检测，检测限达到 4.96 nmol/L（S/N=3）。该试纸条需要借助 MMS，且对卡那霉素的检测转化为对 cDNA 的检测，较为复杂，不利于产品的稳定生产和应用的重复性。在文献（Journal of Chromatography B, 2016, 1022: 102-108.）中，开发了一种基于核酸适配体的侧向层析试纸条，该试纸条采用竞争结合模式，用于现场快速检测黄芪中的 OTA。竞争反应发生在固定在试纸条上的 DNA 探针（测试区）和样品中的靶标（OTA）之间，两者竞争结合 AuNPs-apt 偶联物。该试纸条 T 线的颜色与样品中 OTA 的浓度成负相关。基于该方法，可在 15min 内完成 OTA 的检测，检测线为 1ng/mL。该试纸条将适配体偶联到 AuNPs 上，不利于样品中 OTA 对适配体的竞争，产品稳定性差，且设计较为复杂通用性差。

目前，已开发的核酸适配体胶体金侧向层析试纸，针对某个特定的目标物，试纸条上的探针需要反复优化设计，通用性差，检测灵敏度有待提高。

发明内容

[技术问题]

现有技术中，核酸适配体胶体金侧向层析试纸条的设计，通常是在金标垫上喷涂金标核酸适配体，通常在检测线（T 线）上喷涂的是链霉亲和素-核酸链复合物或带有荧光标记的核酸适配体或核酸适配体的互补链，针对某个特定的检测目标物，需要重新制备链霉亲和素-核酸链复合物，及重新喷涂制备硝酸纤维素膜，导致现有的侧向层析试纸条通用性不佳，试纸条的制备成本高。

[技术方案]

本发明采用 polyA-DNA 作为探针，该探针采用 polyA 作为锚定块，将 polyA-DNA 锚定在纳米金粒子上制备得到 AuNPs@polyA-DNA 偶联物。核酸试纸条的检测区域（T 线）喷涂链霉亲和素，控制区域（C 线）喷涂与 AuNPs@polyA-DNA 偶联物的 polyA-DNA 部分互补的寡核酸链（DNAc），构建了通用型的试纸条。该试纸条在 T 线喷涂的链霉亲和素，以及在 C 线喷涂的链霉亲和素-生物素-寡核酸链复合物无需改变，仅改变 polyA-DNA 上与适配体互补的部分，即可检测另一种物质，为以后的检测提供了方便。

本发明所使用的核酸适配体，是在已报道的适配体的碱基序列的基础上增加 5 个 T 碱基，这 5 个核酸碱基用于辅助杂交。探针上有 15 个碱基与核酸适配体互补。生物素化的核酸适配体与锚定有探针的 AuNPs@polyA-DNA 偶联物结合后，探针才能进一步与 T 线上的链霉亲和素结合。当存在小分子物质时，小分子物质与探针竞争结合核酸适配体，抑制了探针与核酸

适配的杂交，从而抑制了 T 线的显色，实现了快速检测。

本发明提供的核酸适配体胶体金侧向层析试纸条的通用性体现在硝酸纤维素膜的制备和探针的设计上，即在制备针对不同的小分子物质的胶体金试纸条时，硝酸纤维素膜上的 T 线和 C 线无需变动，仅需变更小分子物质相应的核酸适配体和金标垫上的 AuNPs@polyA-DNA 偶联物，即，针对不同的小分子物质，核酸适配体与探针 polyA-DNA 做相应的变动。

本发明提供一种基于核酸适配体和 AuNPs@polyA-DNA 偶联物的通用型胶体金侧向层析试纸条检测卡那霉素，该试纸条一般是由样品垫、结合垫（金标垫）、硝酸纤维素膜（NC 膜）、吸水垫和 PVC 胶板组成。

所述试纸条的检测原理为：采用竞争法检测小分子物质，当待测样品溶液中不含小分子物质时，5’端生物素化的核酸适配体与 AuNPs@polyA-DNA 偶联物结合，进而在 T 线上被链霉亲和素捕获形成 AuNPs@polyA-DNA-Apt 复合物，由于 AuNPs 的积累，在 T 线可以观察到一个清晰地深红色带，检测结果为阴性。当待测样品溶液中含有小分子物质时，小分子物质与 5’端生物素化的核酸适配体结合，核酸适配体不能与 AuNPs@polyA-DNA 探针结合，导致探针在 T 线区域的积累降低，T 线较浅或不显色，检测结果为阳性。T 线区域上的颜色强度与小分子物质的浓度呈负相关。无论样品溶液中有没有小分子物质，AuNPs@polyA-DNA 偶联物都可以在 C 线区域被 DNAc 捕获进而显色。

本发明的第一个目的是提供一种通用型胶体金侧向层析试纸条，所述试纸条含有核酸适配体、探针 polyA-DNA 和链霉亲和素-生物素-DNAc。

在一种实施方式中，所述探针 polyA-DNA 含有 polyA 片段、与 DNAc 互补的片段和与小分子物质的核酸适配体互补的片段。

在一种实施方式中，所述核酸适配体的 5’端经生物素标记；所述核酸适配体可与待测的小分子物质特异性结合。

在一种实施方式中，所述链霉亲和素-生物素-DNAc 是将链霉亲和素与 5’端经生物素标记的 DNAc 等体积混合，在 3~5℃孵育 0.8~1.2 h 制备得到的。

在一种实施方式中，所述 DNAc 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示。

在一种实施方式中，所述链霉亲和素浓度为 2.5 mg/mL，所述 DNAc 浓度为 250 μM。

在一种实施方式中，所述小分子物质包括但不限于卡那霉素、OTA、黄曲霉毒素、链霉素、氯霉素、雌二醇、双酚 A、啶虫脒。

在一种实施方式中，所述核酸适配体为针对待检测目标物设计的经过体外筛选技术-指数富集的配体系统进化技术得到的寡核苷酸序列。

在一种实施方式中，所述试纸条包括样品垫、结合垫（金标垫）、硝酸纤维素膜（NC膜）、吸水垫和PVC胶板；所述PVC底板上依次黏贴样品垫、金标垫、NC膜和吸水垫；所述NC膜上依次设有检测区和控制区，且检测区和控制区之间的距离为4~6 mm；所述检测区上有链霉亲和素，控制区上有链霉亲和素-生物素-DNAc；所述金标垫上含有AuNPs@polyA-DNA偶联物。

在一种实施方式中，所述样品垫与金标垫间重叠部位长度为1～2 mm，样品垫置于金标垫上方；金标垫与NC膜间重叠部位长度为1～2 mm，金标垫置于NC膜上方；NC膜与吸水垫间重叠部位长度为1～3 mm，吸水垫置于NC膜上方。

在一种实施方式中，所述AuNPs@polyA-DNA偶联物是将探针polyA-DNA锚定在纳米金粒子上得到的。

在一种实施方式中，所述纳米金粒子的粒径为13~17 nm；所述polyA-DNA的浓度为80~120 μM。

本发明的第二个目的是提供一种快速检测小分子物质的方法，所述方法是采用上述胶体金侧向层析试纸条进行测试，将待测溶液与小分子物质核酸适配体混合孵育后吸取50-100 μL滴加到样品垫上，孵育3~5 min，用肉眼进行定性分析或使用胶体金试纸定量分析仪根据标准曲线进行定量分析。

在一种实施方式中，所述标准曲线的制备方法为将小分子物质的标准溶液稀释至不同浓度后，将不同浓度的稀释液与5’端经生物素标记的核酸适配体混合，再滴加到样品垫上，孵育3~5 min，使用胶体金试纸定量分析仪进行定量分析，将数据进行拟合得到标准曲线。

在一种实施方式中，所述混合孵育的时间为15~25 min。

在一种实施方式中，所述核酸适配体与待测溶液的体积比为1:99。

在一种实施方式中，所述核酸适配体的初始浓度为0.1~1.0 μM。

本发明的第三个目的是提供上述通用型胶体金侧向层析试纸条的制备方法，所述方法具体步骤如下：

（1）将样品垫和金标垫切割后加入PBS浸泡并干燥。

（2）将探针AuNPs@polyA-DNA喷涂在金标垫上并干燥。

（3）在NC膜的检测区喷涂链霉亲和素，控制区喷涂链霉亲和素-生物素-DNAc，检测区和喷涂区之间距离固定在5 mm，35~39℃干燥2 h。

（4）将步骤（1）~（3）制备完成的样品垫、金标垫、NC膜和吸水垫依次粘贴在PVC板上即可得到检测卡那霉素的胶体金侧向层析试纸条。

在一种实施方式中，所述 AuNPs@polyA-DNA 偶联物是将探针 polyA-DNA 作为锚定块，将 polyA-DNA 锚定在纳米金粒子上得到的；所述探针 polyA-DNA 含有 polyA 片段、与 DNAc 互补的片段和与小分子物质的核酸适配体互补的片段；

在一种实施方式中，所述纳米金粒子的粒径为 13~17 nm。

在一种实施方式中，所述 polyA-DNA 的浓度为 80~120 μM。

在一种实施方式中，所述 DNAc 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示。

在一种实施方式中，所述样品垫与金标垫间重叠部位长度为 1～2 mm，样品垫置于金标垫上方；金标垫与 NC 膜间重叠部位长度为 1～2 mm，金标垫置于 NC 膜上方；NC 膜与吸水垫间重叠部位长度为 1～3 mm，吸水垫置于 NC 膜上方。

本发明还提供了所述通用型胶体金侧向层析试纸条或所述通用型胶体金侧向层析试纸条的制备方法在农药残留、兽药残留、环境监测、食品安全监测和生物医药领域中的应用。

本发明的有益效果：

（1）本文发明制备了高灵敏度、高特异性的一种基于适配体的通用型胶体金侧向层析试纸条。该试纸条对卡那霉素、OTA 检测反应灵敏（肉眼检测限分别为 15 ng/mL、10 ng/mL，读数仪检测限分别为 0.3 ng/mL、0.18 ng/mL）、快速（20 min）、检测结果重复性高。

（2）本发明所提出的检测方法实现了小分子物质（本发明为卡那霉素和 OTA）的高灵敏比色检测。在 5-250 ng/mL 的浓度范围内，T/C 线与卡那霉素的浓度呈现良好的线性关系，检出限为 0.3 ng/mL。在 1-250 ng/mL 的浓度范围内，T/C 线与卡那霉素的浓度呈现良好的线性关系，检出限为 0.18 ng/mL。

（3）本发明构建的试纸条，检测区和控制区喷涂的链霉亲和素和核酸链无需改变，制备试纸条时仅仅需要改变胶体金-核酸偶联物即可检测另一种物质，从而提高了喷涂制备硝酸纤维素膜的通用型，简化制备过程，降低试纸条成本。

（4）该试纸条可通过观察检测区的颜色变化，肉眼可以实现小分子物质的定性检测，使用胶体金定量分析仪可实现定量分析。

（5）该试纸条的核酸适配体的设计中，通过在 3’端增加多个 T 碱基以增加适配体与探针的结合效率，提高灵敏度，降低了核酸适配体的用量，减少成本。

附图说明

图 1 是试纸条的结构示意图和检测原理图。

图 2 是金纳米颗粒的表征：（a）AuNPs 的 TEM 图像；（b）AuNPs 的吸收光谱。

图 3 是用试纸条对不同浓度卡那霉素标准溶液的检测图；从左到右的浓度依次为 0、0.5、5、15、25、50、150、250 和 400 ng/mL。

图 4 是在标准检测液中，不同浓度卡那霉素时 T 线比 C 线的相对信号强度（T/C）标准曲线图；从左到右的浓度依次为 0、1、10、50、100、250 和 500 ng/mL。

图 5 是用试纸条对不同浓度 OTA 标准溶液的检测图。

图 6 是在标准检测液中，不同浓度 OTA 时 T 线比 C 线的相对信号强度（T/C）标准曲线图。

图 7 是用试纸条对不同浓度卡那霉素的蜂蜜样品的检测图。

图 8 是不同序列的核酸链对卡那霉素相应信号的影响；（a）探针上不同适配体互补链对 T 线显色的影响；（b）探针链 polyA-DNA(5+10)和 polyA-DNA(10+5)对卡那霉素响应信号的影响。

图 9 是 polyA-DNA 的结构。

具体实施方式

实施例一：基于核酸适配体的卡那霉素快速检测试纸条的制备

具体步骤为：

1.适配体序列和探针的设计

为了确保 5’端生物素化的核酸适配体能与 AuNPs@polyA-DNA 结合并且在 T 线区域能被链霉亲和素（SA）捕获，选择不同序列的核酸探针链（polyA-DNA$_{(20)}$，polyA-DNA$_{(15)}$，polyA-DNA$_{(5+10)}$，polyA-DNA$_{(5+5)}$，polyA-DNA$_{(10+5)}$）与 AuNPs 偶联（如表 1 所示），适配体的浓度为 0.5 μM。

结果如图 8（a）所示，，当核酸探针链为核酸序列如 SEQ ID NO:2 所示的 polyA-DNA$_{(10+5)}$和 SEQ ID NO:10 所示的 polyA-DNA$_{(5+10)}$时，与 3’端不增加 T 碱基的核酸探针链 polyA-DNA$_{(20)}$和 polyA-DNA$_{(15)}$相比，相对信号强度（T/C）显著增强。因此，将探针链为 polyA-DNA$_{(5+10)}$和 polyA-DNA$_{(10+5)}$应用于卡那霉素的检测，检验检测的灵敏性。选用适配体的浓度为 0.5 μM 时，应用探针链 polyA-DNA$_{(5+10)}$和 polyA-DNA$_{(10+5)}$对卡那霉素进行检测，如图 8（b）所示，加入相同浓度的卡那霉素（150 ng/mL）时，当应用核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 的核酸探针链 polyA-DNA$_{(10+5)}$时，对卡那霉素相应信号强度的变化（ΔT/C 值）最大。因此，下述实施例中应用的探针为核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示的 polyA-DNA$_{(10+5)}$。

表 1 卡那霉素适配体通用型 LFS 所用核酸序列

编号	DNA 名称	序列（5’-3’）	
1	Aptamer$_{(20+0)}$	T***GGGGGTTGAGGCTAAGCCGA***	SEQ ID NO:6
	poly A-DNA$_{(20+0)}$	AAAAAAAAAAAAAAATTATATTATTATTATAGAGTG ***TCGGCTTAGCCTCAACCCCC***	SEQ ID NO:7
2	Aptamer$_{(15+0)}$	TGGGGG***TTGAGGCTAAGCCGA***	SEQ ID NO:8

	poly A-DNA$_{(15+0)}$	AAAAAAAAAAAAAAATTATATTATTATTATAGAGTG ***TCGGCTTAGCCTCAA***	SEQ ID NO:9
3	Aptamer$_{(5+10)}$	TGGGGGTTGAGGCTAA***GCCGA*****TTTTTTTTTT**	SEQ ID NO:10
	poly A-DNA$_{(5+10)}$	AAAAAAAAAAAAAAATTATATTATTATTATAGAGTG ***AAAAAAAAAA****TCGGC*	SEQ ID NO:11
	Aptamer$_{(5+5)}$	TGGGGGTTGAGGCTAA***GCCGA*****TTTTT**	SEQ ID NO:12
4	poly A-DNA$_{(5+5)}$	AAAAAAAAAAAAAAATTATATTATTATTATAGAGTG ***AAAAA****TCGGC*	SEQ ID NO:13
	Aptamer$_{(10+5,)}$	TGGGGGTTGAG***GCTAAGCCGA*****TTTTT**	SEQ ID NO:1
5	poly A-DNA$_{(10+5)}$	AAAAAAAAAAAAAAATTATATTATTATTATAGAGTG ***AAAAA****TCGGCTTAGC*	SEQ ID NO:2
	DNA$_C$	AAAAACACTCTATAATAATAAT	SEQ ID NO:5

（带下划线或加粗的序列表示互补序列；加粗斜体序列表示适配体部分序列或其互补序列，加粗序列表示适配体延伸序列或其互补序列。）

polyA-DNA 的设计：polyA-DNA 有三个功能区。第一个功能区是 polyA，其作为锚定块，将 polyA-DNA 锚定在金纳米粒子上；第二个功能区是与 DNAc 互补的区域；第三个功能区是与核酸适配体互补的区域（图 9）。

寡核苷酸 DNAc 的设计：如表 1、表 2 中所示，DNAc 序列划线处与 polyA-DNA 互补，并在 3’端连有 5 个 A 碱基。

表 2 卡那霉素快速检测试纸条的 DNA 序列

核酸	序列(从 5’到 3’)	
卡那霉素适配体 Aptamer(10+5)	TGGGGGTTGAG**GCTAAGCCGA*****TTTTT**	SEQ ID NO:1
卡那霉素胶体金标记核酸探针 polyA-DNA(10+5)	AAAAAAAAAAAATTATATTATTATTATAGAGTG***AAAA A*****ATCGGCTTAGC**	SEQ ID NO:2
DNAc	AAAAACACTCTATAATAATAAT	SEQ ID NO:5

（带下划线或加粗的序列表示互补序列；加粗序列表示适配体部分序列或其互补序列，加粗斜体序列表示适配体延伸序列或其互补序列。）

表 3 OTA 快速检测试纸条的 DNA 序列

核酸	序列(从 5’到 3’)	
OTA 适配体 Aptamer（10+5）	GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGA**GCATCGGAC A*****TTTTT***	SEQ ID NO:3
OTA 胶体金标记核酸探针 polyA-DNA（10+5）	AAAAAAAAAAAAAAATTATATTATTATTATAGAGTG***A AAAA*****TGTCCGATGC**	SEQ ID NO:4
DNAc	AAAAACACTCTATAATAATAAT	SEQ ID NO:5

（带下划线或加粗的序列表示互补序列；加粗序列表示适配体部分序列或其互补序列；加粗斜体序列表示

适配体延伸序列或其互补序列。）

2.金纳米粒子（AuNPs）的制备及功能化

（1）AuNPs 的制备

实验用于合成和储备纳米材料的玻璃器皿均用王水（盐酸：硝酸=3:1）浸泡 12 h，用超纯水洗涤干净后使用。

AuNPs 的制备采用的是柠檬酸钠还原法。具体步骤如下：

1)将 100 mL 0.01%的 $HAuCl_4$ 加入 250 mL 锥形瓶中，加热搅拌至溶液暴沸，保持 1~2 min。

2）向锥形瓶中迅速加入 2 mL 1%的柠檬酸三钠溶液，继续加热搅拌。溶液的颜色由浅黄色逐渐变为深紫色最后变成酒红色，保持加热 10 min，制备得到粒径 15 nm 的 AuNPs，将其冷却至室温后，4℃冷藏备用。

（2）AuNPs 功能化

1）将 5-15 μL 100 μM 的 polyA-DNA 加入 1 mL 步骤（1）中制备得到的 AuNPs（10 nM）中混合均匀，然后加入 20 μL 500 mM 的柠檬酸缓冲液（pH 3.0）。混合均匀后，在室温下孵育 3 min。

2）孵育完成后，加入 60 μL pH 7.6 的 500 mM HEPES 缓冲液，调整 AuNPs 溶液的 pH 为中性，然后在室温下孵育 5-10 min。

3）孵育完成后，10000 r/min 离心 20 min，去上清，向沉淀物中加入重悬液复溶，10000 r/min、20 min 重复离心三次除去未反应的核酸，最终加入 400 μL 重悬液获得功能化的 AuNPs，即探针 AuNPs@polyA-DNA，4℃冷藏备用。

用透射电子显微镜分别对步骤（1）制备的 AuNPs 和步骤（2）制备的 AuNPs@polyA-DNA 进行表征，结果如图 2 所示，制备的粒径 15 nm 的 AuNPs 在 520 nm 处有单一的特征吸收峰，当与 polyA-DNA 结合时，最大吸收波长移至 530 nm，初步证明 polyA-DNA 成功修饰了 AuNPs。

重悬液的组成：20 mM Na_3PO_4，5% BSA，10%蔗糖，0.25% 吐温-20。

3.链霉亲和素-生物素-DNAc 的制备

（1）100 μL 2.5 mg/mL 的链霉亲和素与 100 μL 250 μM 5’端经生物素标记的 DNAc 混合并在 4℃下孵育 1 h，获得混合液。

（2）使用超滤管（MWCO 30 kDa）处理混合液，6000 r/min 20 min 离心三次，重悬于 300 μL 10 mM PBS 中，获得链霉亲和素-生物素-DNAc，4℃储存备用。

4.核酸适配体试纸条的组装

（1）将样品垫和结合垫（金标垫）切成适当尺寸，加入 10 mM PBS 浸泡 30 min，然后在 45℃下干燥。

（2）将步骤 1 中制备得到的探针 AuNPs@polyA-DNA 均匀的喷涂在结合垫上，37℃干燥 2 h。

（3）在 NC 膜上用三维喷点仪器以 0.9 μL/cm 的速度均匀喷涂链霉亲和素和步骤 2 制备的链霉亲和素-生物素-DNAc，分别作为检测区（T 线）和控制区（C 线），检测区和控制区之间的距离固定在 5 mm，37℃干燥 2 h。

（4）将步骤（1）~（3）制备完成的样品垫、结合垫、NC 膜、吸水垫按图 1 依次粘贴在 PVC 板上，将组装好的试纸条均匀切割为 4 mm 的宽度，放入分装袋中，密封保存。

实施例二：用试纸条对卡那霉素标准溶液的测定

（1）卡那霉素标准溶液的制备

卡那霉素标准溶液用 Running buffer（4×SSC，pH 7）分别稀释终浓度为 0.5、5、15、25、50、150、250 和 400 ng/mL。用超纯水将核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的卡那霉素适配体稀释至 0.5 μM。

（2）卡那霉素核酸试纸条检测标准曲线的建立：

将步骤（1）中 99 μL 不同浓度的卡那霉素标准溶液与 1 μL 卡那霉素适配体溶液混合孵育 20 min，混合反应后将混合液滴加入到样品垫进行检测，反应 3 min 后测定（T/C）相对信号强度，建立相对信号强度（T/C）与不同卡那霉素浓度之间对应关系的标准曲线。

结果如图 3 所示，当卡那霉素浓度为 15 ng/mL 时，试纸条上 T 线的颜色能与不含卡那霉素的溶液（0 ng/mL 卡那霉素）的试纸条上的 T 线的颜色有明显的差异；在卡那霉素浓度为 5~250 ng/mL 时 T 线颜色随卡那霉素浓度的增高而减弱，在卡那霉素浓度为 250 ng/mL 时 T 线颜色基本没有变化，因此肉眼检测下限为 15 ng/mL，上限为 250 ng/mL。

胶体金试纸定量分析仪读取不同浓度卡那霉素的相对信号强度（T/C），得到如图 4 所示相对信号强度（T/C）与卡那霉素浓度的变化关系曲线，最低检测线为 0.3 ng/mL。其中在 5~250 ng/mL 浓度范围内，相对信号强度（T/C）与浓度存在线性关系，线性回归方程为 $y=-0.1637x+0.4341$，$R^2=0.9819$，式中 y 为相对信号强度（T/C），x 为卡那霉素的浓度的 Log 函数（ng/mL）。

实施例三：用试纸条对 OTA 标准溶液的测定

（1）OTA 标准溶液的制备

OTA 标准溶液用 Running buffer（4×SSC，pH7）分别稀释终浓度为 1、10、50、100、

250 和 500 ng/mL。用超纯水将核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 OTA 适配体稀释至 0.5 μM。

（2）OTA 核酸试纸条检测标准曲线的建立：

将步骤(1)中 99 μL 不同浓度的 OTA 标准溶液与 1 μL OTA 适配体溶液混合孵育 20 min，混合反应后将混合液滴加入到样品垫进行检测，反应 3 min 后测定相对信号强度（T/C），建立相对信号强度（T/C）与不同 OTA 浓度之间对应关系的标准曲线。

结果如图 5 所示，当 OTA 浓度为 10 ng/mL 时，试纸条上 T 线的颜色能与不含 OTA 的溶液（0 ng/mL OTA）的试纸条上的 T 线的颜色有明显的差异；在 OTA 浓度为 1~250 ng/mL 时 T 线颜色随 OTA 浓度的增高而减弱，在 OTA 浓度为 250 ng/mL 时 T 线颜色基本没有变化，因此肉眼检测下限为 10 ng/mL，上限为 250 ng/mL。

胶体金试纸定量分析仪读取不同浓度 OTA 的相对信号强度（T/C），得到如图 6 所示相对信号强度（T/C）与 OTA 浓度的变化关系曲线，最低检测线为 0.18 ng/mL。其中在 1~250 ng/mL 浓度范围内，相对信号强度（T/C）与浓度存在线性关系，线性回归方程为 y =-0.151x+0.4371，R^2 =0 .9794，式中 y 为相对信号强度（T/C），x 为 OTA 的浓度的 Log 函数（ng/mL）。

实施例四：蜂蜜样品中卡那霉素残留的检测

利用蜂蜜模拟样品来测试回收率，步骤为：

（1）AuNPs@polyA-DNA 溶液预处理：将制备储藏的 AuNPs@polyA-DNA 添加 0.8~1.4 μL 体积至试纸条金标垫上，存储于 4℃。

（2）样品预处理：将蜂蜜样本稀释 10 倍，0.22 μm 微孔滤膜过滤。在蜂蜜中加入不同浓度的卡那霉素(50、150、250 ng/mL)；

（3）蜂蜜中卡那霉素的回收率测定：取实施例 1 中核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所述的卡那霉素适配体（0.5 μM）1 μL 与步骤（2）中含不同浓度卡那霉素的蜂蜜溶液 99 μL 混合孵育 20 min，混合反应后再采用试纸条进行检测。

应用实施例一制备得到的核酸适配体试纸条检测牛奶中卡那霉素的含量，结果如表 4 和图 7 所示。

表 4 蜂蜜样品中卡那霉素残留的检测

样品	添加浓度(ng/mL)	检测浓度(ng/mL)	加标回收率（%）	RSD（%）
蜂蜜	15	14.1	94.0	8.1
	50	51.9	103.8	3.7
	250	248.6	99.4	4.4

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以

权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1、一种通用型胶体金侧向层析试纸条，其特征在于，含有核酸适配体、探针 polyA-DNA 和链霉亲和素-生物素-DNAc；所述探针 polyA-DNA 含有 polyA 片段、与 DNAc 互补的片段和与核酸适配体互补的片段；所述核酸适配体的 5’端经生物素标记；所述核酸适配体可与待测的小分子物质特异性结合。

2、根据权利要求 1 所述的通用型胶体金侧向层析试纸条，其特征在于，所述链霉亲和素-生物素-DNAc 是将链霉亲和素与 5’端经生物素标记的 DNAc 等体积混合，在 3~5℃孵育 0.8~1.2 h 制备得到的；所述 DNAc 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示。

3、根据权利要求 2 所述的通用型胶体金侧向层析试纸条，所述链霉亲和素浓度为 2.5 mg/mL，所述 DNAc 浓度为 250 μM。

4、根据权利要求 1 所述的通用型胶体金侧向层析试纸条，其特征在于，所述小分子物质包括但不限于卡那霉素、OTA、黄曲霉毒素、链霉素、氯霉素、雌二醇、双酚 A、啶虫脒。

5、根据权利要求 1~4 任一所述的通用型胶体金侧向层析试纸条，其特征在于，所述试纸条包括样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 胶板；所述 PVC 底板上依次黏贴样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫；所述 NC 膜上依次设有检测区和控制区，且检测区和控制区之间的距离为 4~6 mm；所述检测区上有链霉亲和素，控制区上有链霉亲和素-生物素-DNAc；所述金标垫上含有 AuNPs@polyA-DNA 偶联物。

6、根据权利要求 5 所述的通用型胶体金侧向层析试纸条，其特征在于，所述样品垫与金标垫间重叠部位长度为 1～2 mm，样品垫置于金标垫上方；金标垫与 NC 膜间重叠部位长度为 1～2 mm，金标垫置于 NC 膜上方；NC 膜与吸水垫间重叠部位长度为 1～3 mm，吸水垫置于 NC 膜上方。

7、根据权利要求 5 所述的通用型胶体金侧向层析试纸条，其特征在于，所述 AuNPs@polyA-DNA 偶联物是将权利要求 1 中所述探针 polyA-DNA 锚定在纳米金粒子上得到的。

8、根据权利要求 7 所述的通用型胶体金侧向层析试纸条，其特征在于，所述纳米金粒子的粒径为 13~17nm；所述 polyA-DNA 的浓度为 80~120 μM。

9、一种快速检测卡那霉素的方法，其特征在于，所述方法是采用权利要求 1~8 任一所述的通用型胶体金侧向层析试纸条进行测试，将待测溶液与小分子物质的核酸适配体混合孵育后滴加到样品垫上，用肉眼进行定性分析或使用胶体金试纸定量分析仪根据标准曲线进行定量分析。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述标准曲线的制备方法为将小分子物质的标准溶液稀释至不同浓度后，将不同浓度的稀释液分别与 5’端经生物素标记的核酸适

配体混合，再滴加到样品垫上，使用胶体金试纸定量分析仪进行定量分析，将数据进行拟合得到标准曲线。

11、根据权利要求 9 或 10 所述的方法，其特征在于，所述待测溶液与核酸适配体混合孵育的时间为 15~25 min；所述待测溶液与核酸适配体混合的体积比为 99:1；所述核酸适配体的初始浓度为 0.1~1.0 μM。

12、权利要求 1~8 任一所述通用型胶体金侧向层析试纸条的制备方法，其特征在于，所述方法具体步骤如下：

（1）将样品垫和金标垫切割后加入 PBS 浸泡并干燥；

（2）将探针 AuNPs@polyA-DNA 喷涂在金标垫上并干燥；

（3）在 NC 膜的检测区喷涂链霉亲和素，控制区喷涂链霉亲和素-生物素-DNAc，检测区和喷涂区之间距离固定在 5 mm，35~39℃干燥 2 h；

（4）将步骤（1）~（3）制备完成的样品垫、金标垫、NC 膜和吸水垫依次粘贴在 PVC 板上即可得到检测卡那霉素的胶体金侧向层析试纸条。

13、根据权利要求 12 所述的制备方法，其特征在于，所述 AuNPs@polyA-DNA 偶联物是将探针 polyA-DNA 作为锚定块，将 polyA-DNA 锚定在纳米金粒子上得到的；所述探针 polyA-DNA 含有 polyA 片段、与 DNAc 互补的片段和与小分子物质的核酸适配体互补的片段。

14、根据权利要求 12 所述的制备方法，其特征在于，所述纳米金粒子的粒径为 13~17 nm，所述 polyA-DNA 的浓度为 80~120 μM。

15、权利要求 1~8 任一所述的通用型侧向层析试纸条或权利要求 12~14 任一所述的通用型胶体金侧向层析试纸条的制备方法在农药残留、兽药残留、环境监测、食品安全监测和生物医药领域中的应用。

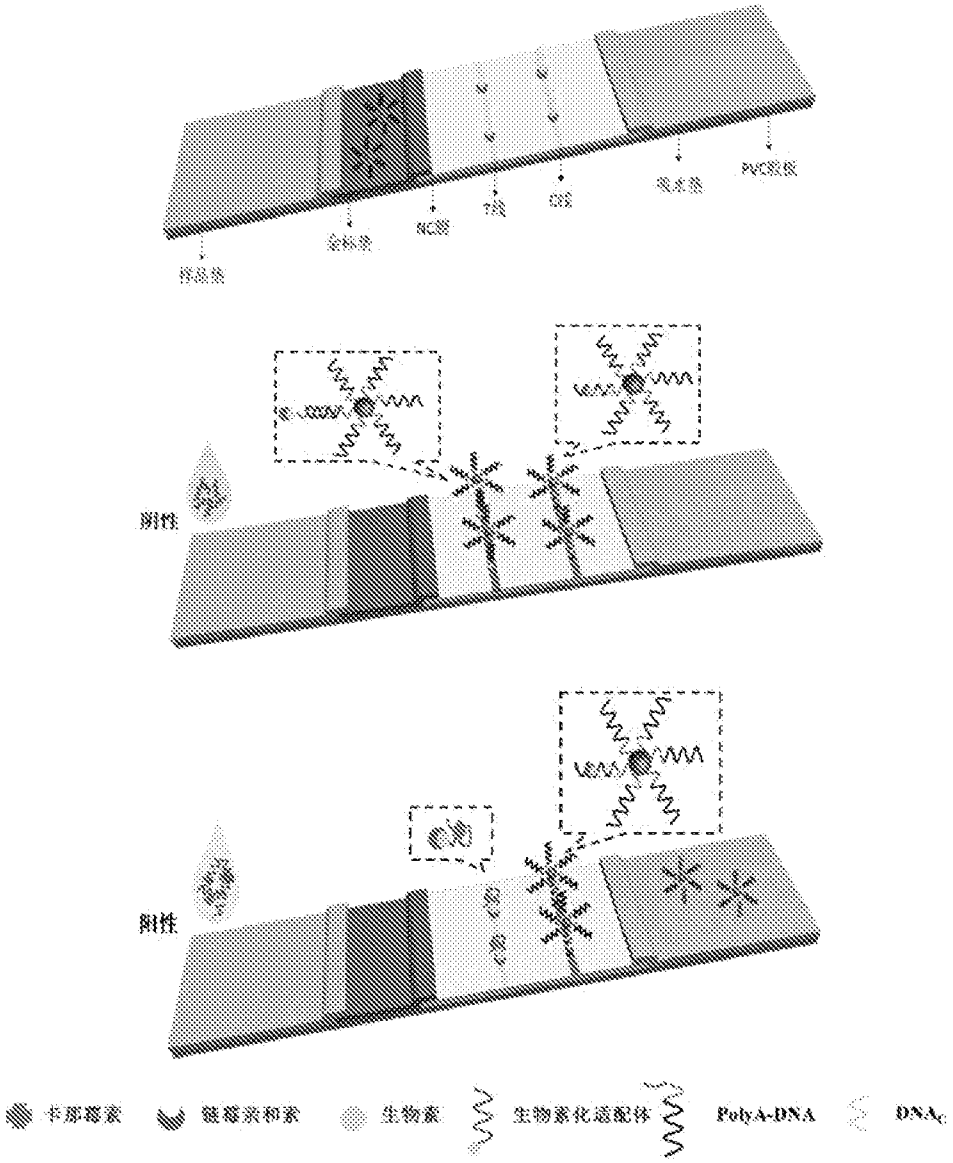


图 1

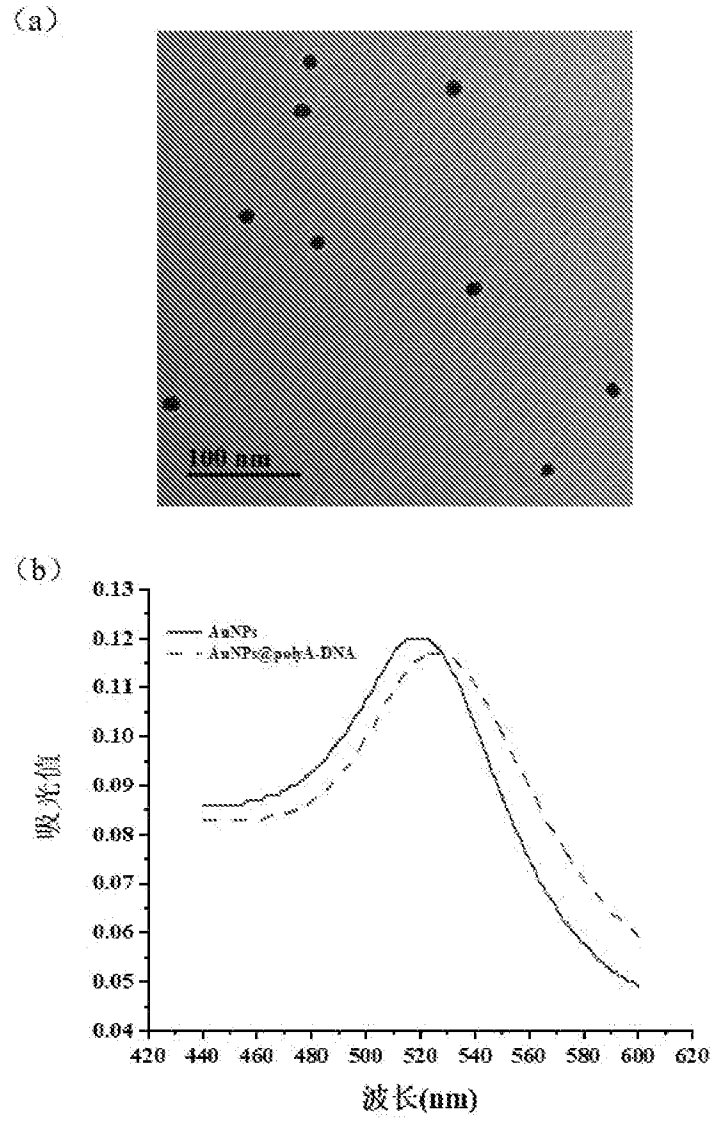

(a)
100 nm
(b)
AuNPs
AuNPs@polyA-DNA
吸光值
波长(nm)
0.13
0.12
0.11
0.10
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
420 440 460 480 500 520 540 560 580 600 620

图 2

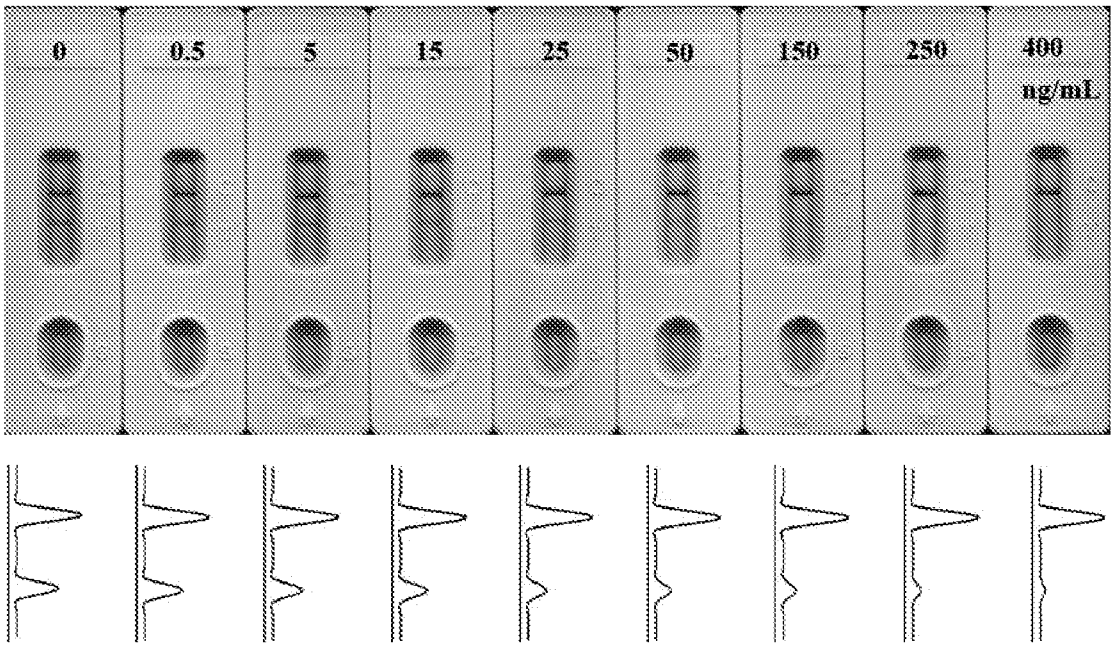

0
0.5
5
15
25
50
150
250
400
ng/mL

图 3

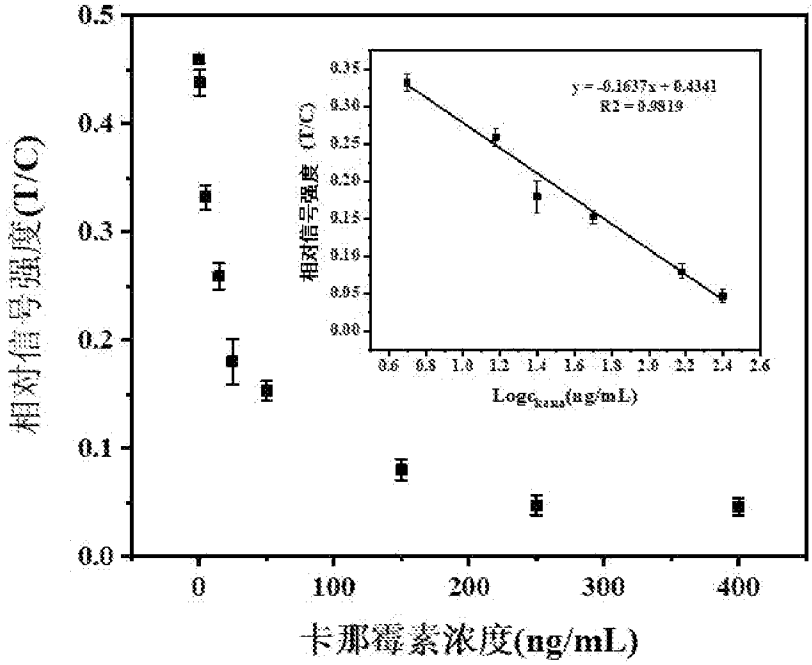

相对信号强度(T/C)
卡那霉素浓度(ng/mL)
y = -0.1637x + 0.4341
R2 = 0.9819
Logc卡那霉素(ng/mL)

图 4

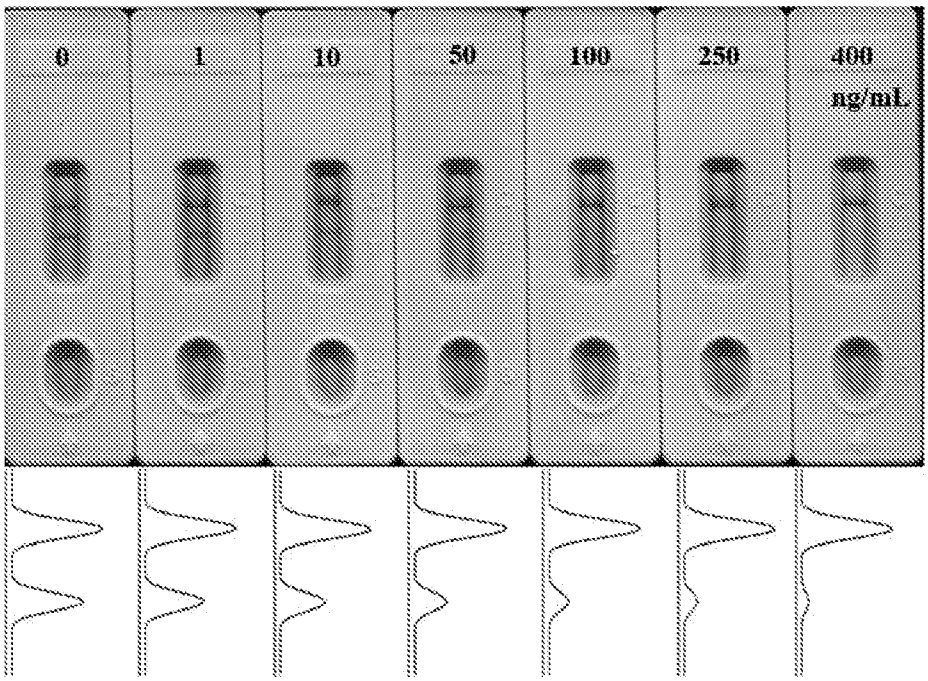

0
1
10
50
100
250
400
ng/mL

图 5

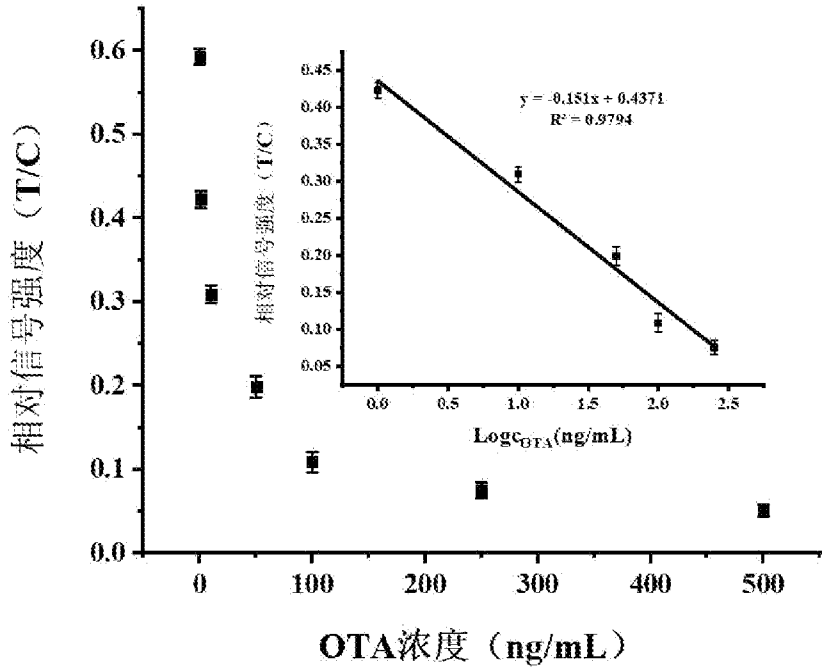

相对信号强度（T/C）
OTA浓度（ng/mL）
y = -0.151x + 0.4371
R² = 0.9794
相对信号强度（T/C）
Logc_OTA(ng/mL)

图 6

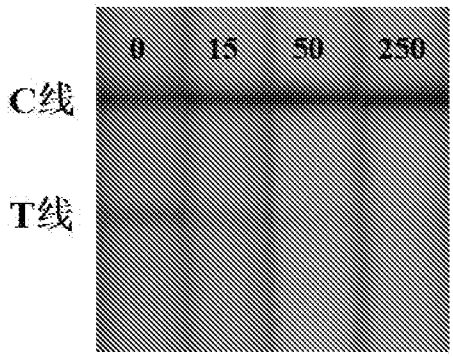
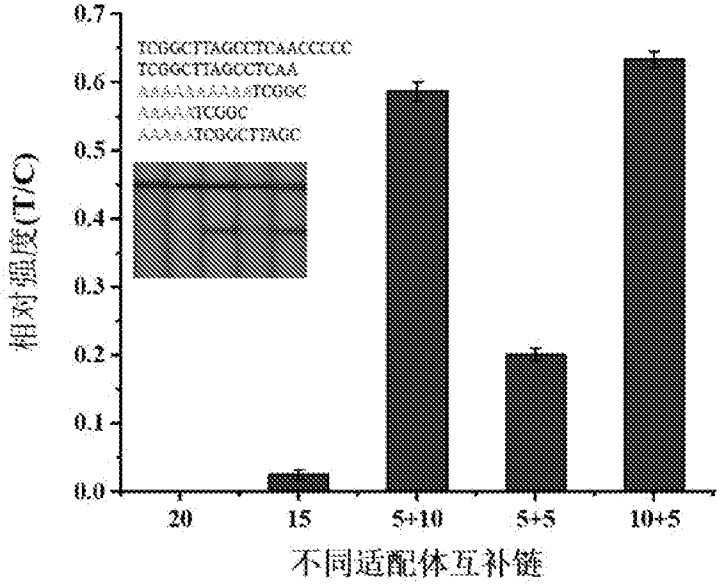

0
15
50
250
C线
T线

图 7

(a)


TCGGCTTAGCCTCAACCCCC
TCGGCTTAGCCTCAA
AAAAAAAAATCGGC
AAAAATCGGC
AAAAATCGGCTTAGC
相对强度(T/C)
20
15
5+10
5+5
10+5
不同适配体互补链

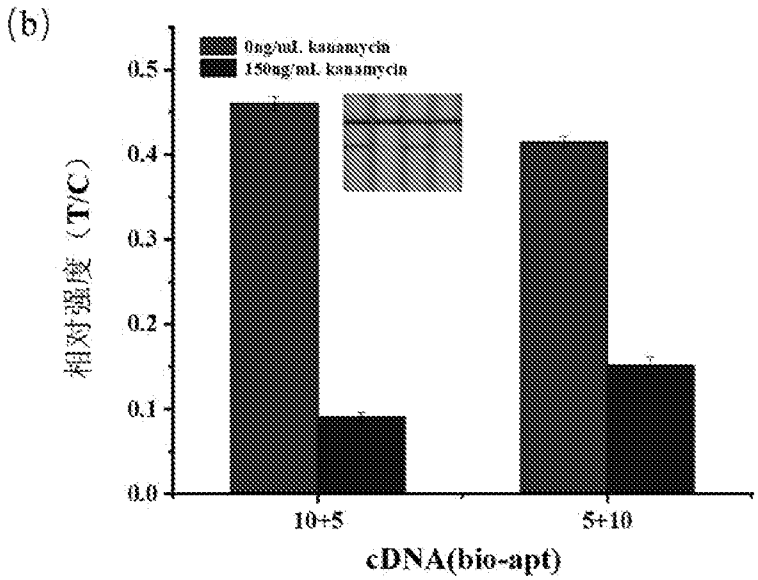

(b)
0ng/ml. kanamycin
150ng/ml. kanamycin
相对强度（T/C）
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
10+5
5+10
cDNA(bio-apt)

图 8

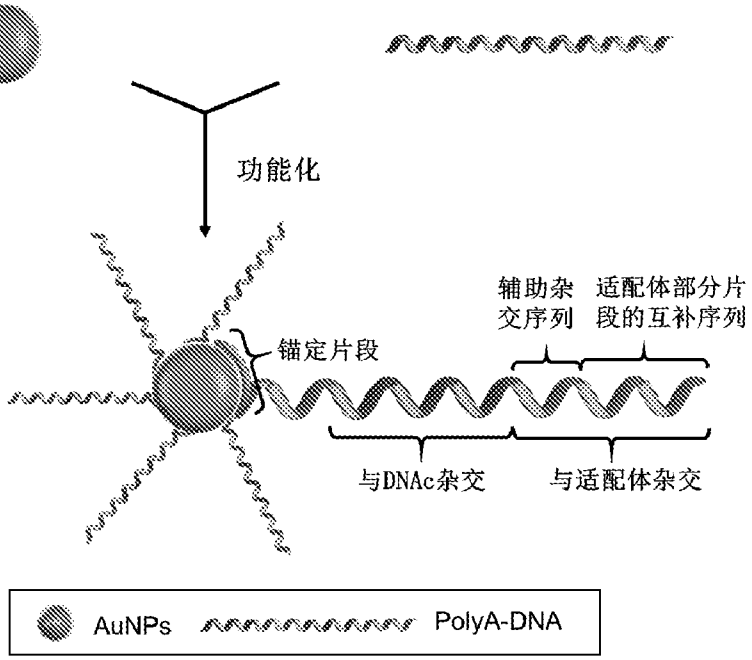

功能化
辅助杂交序列
适配体部分片段的互补序列
锚定片段
与DNAc杂交
与适配体杂交
AuNPs
PolyA-DNA

图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/118498

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/58(2006.01)i; G01N 33/558(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/52(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNTXT; CNKI; VEN; WOTXT; USTXT; EPTXT; ISI Web of Science: 江南大学, 探针, 链霉亲和素, 仅, 只, 测试区, 检测区, 测试线, 检测线, T线, 纳米, 金, 互补, DNA, probe, streptavidin, SA, only, test zone, test area, test line, T-line, T-zone, nano+, aunp+, +gold, match+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004042084 A1 (AUTOMATED ANALYSERS AND DIAGNO DIAGNOSTIC REAGENTS MEDICON MELLAS et al.) 21 May 2004 (2004-05-21) description, p. 1, lines 1-7, p. 3, line 25 to p. 4, line 18, p. 5, lines 15-31, and p. 7, line 27 to p. 9, line 8, and figures 1-4	1-15
A	CN 111621598 A (INSTITUTE OF MILITARY MEDICINE, ACADEMY OF MILITARY SCIENCES OF PLA) 04 September 2020 (2020-09-04) entire document	1-15
A	CN 108303415 A (BEIJING KWINBON BIOTECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 20 July 2018 (2018-07-20) entire document	1-15
A	CN 108008128 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 08 May 2018 (2018-05-08) entire document	1-15
A	CN 106990237 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 28 July 2017 (2017-07-28) entire document	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 January 2022	**15 February 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/118498

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/118498

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2004042084	A1	21 May 2004	AU	2003278398	A1	07 June 2004
				EP	1601787	A1	07 December 2005
CN	111621598	A	04 September 2020	CN	111621598	B	22 June 2021
CN	108303415	A	20 July 2018	CN	108303415	B	27 October 2020
CN	108008128	A	08 May 2018	CN	108008128	B	31 March 2020
CN	106990237	A	28 July 2017	CN	106990237	B	26 October 2018

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/118498

A. 主题的分类

G01N 33/58(2006.01)i; G01N 33/558(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/52(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N33

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS;CNTXT;CNKI;VEN;WOTXT;USTXT;EPTXT;ISI Web of Science:江南大学，探针，链霉亲和素，仅，只，测试区，检测区，测试线，检测线，T线，纳米，金，互补，DNA，probe，streptavidin，SA，only，test zone，test area，test line，T-line，T-zone，nano+，aunp+，+gold，match+

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2004042084 A1 (AUTOMATED ANALYSERS AND DIAGNO 等) 2004年5月21日 (2004-05-21) 说明书第1页第1-7行，第3页第25行至第4页第18行，第5页第15-31行，第7页第27行至第9页第8行，图1-4	1-15
A	CN 111621598 A (中国人民解放军军事科学院军事医学研究院) 2020年9月4日 (2020-09-04) 全文	1-15
A	CN 108303415 A (北京勤邦生物技术有限公司 等) 2018年7月20日 (2018-07-20) 全文	1-15
A	CN 108008128 A (江南大学) 2018年5月8日 (2018-05-08) 全文	1-15
A	CN 106990237 A (江南大学) 2017年7月28日 (2017-07-28) 全文	1-15

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年1月12日	2022年2月15日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 洪川 电话号码 (86-512)88997034

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/118498

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/118498

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2004042084	A1	2004年5月21日	AU	2003278398	A1	2004年6月7日
				EP	1601787	A1	2005年12月7日
CN	111621598	A	2020年9月4日	CN	111621598	B	2021年6月22日
CN	108303415	A	2018年7月20日	CN	108303415	B	2020年10月27日
CN	108008128	A	2018年5月8日	CN	108008128	B	2020年3月31日
CN	106990237	A	2017年7月28日	CN	106990237	B	2018年10月26日