(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116377124 A
(43)申请公布日 2023.07.04

(21)申请号 202211618784.5

(22)申请日 2022.12.15

(30)优先权数据
10-2021-0194434 2021.12.31 KR
10-2022-0094666 2022.07.29 KR

(71)申请人 高丽大学校算学协力团
地址 韩国首尔
申请人 汉阳大学校ERICA产学协力团

(72)发明人 金永根 李柱宪 朴范哲 朴贤秀 苏丁煜

(74)专利代理机构 北京金宏来专利代理事务所(特殊普通合伙) 11641
专利代理师 刘慧红

(51)Int.Cl.
C12Q 1/70(2006.01)
C12Q 1/686(2018.01)
C12N 15/11(2006.01)
C12R 1/93(2006.01)

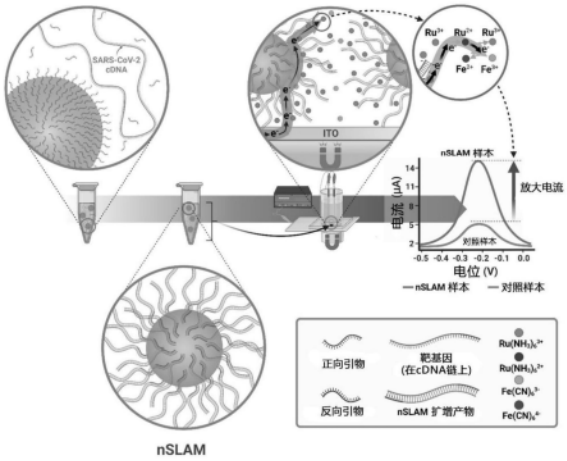
权利要求书3页 说明书23页
序列表（电子公布） 附图14页

(54)发明名称

用于检测冠状病毒的试剂盒和方法

(57)摘要

本发明提供了使用磁性纳米颗粒检测冠状病毒的试剂盒以及使用该试剂盒检测冠状病毒的方法。用于检测冠状病毒的试剂盒包括在一侧具有开口并设置有包含冠状病毒的样本的反应器、设置在反应器中的至少一个磁性纳米颗粒部件、被设置用于覆盖反应器的开口的导电基板、以及用于向反应器施加磁场的磁场施加部件，其中磁性纳米颗粒部件包括磁性纳米颗粒，磁性纳米颗粒包括由氧化铁制成的核部分和由金制成并围绕核部分设置的壳部分，以及附着到磁性纳米颗粒的壳部分上的引物。



CN 116377124 A

1.一种用于检测冠状病毒的试剂盒,包括:

磁性纳米颗粒和附着到所述磁性纳米颗粒的表面的引物,

其中,所述引物通过与所述冠状病毒的聚合酶链式反应形成扩增产物,并且由形成所述扩增产物所收集的所述磁性纳米颗粒通过重复施加电位来放大电化学信号以检测冠状病毒。

2.根据权利要求1所述的用于检测冠状病毒的试剂盒,其中,所述电化学信号通过施加DC或AC电源来测量电流值的变化。

3.根据权利要求1所述的用于检测冠状病毒的试剂盒,其中,所述引物包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:6中的任何一个或更多个。

4.根据权利要求1所述的用于检测冠状病毒的试剂盒,其中,所述冠状病毒为HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、MERS-CoV、和COVID-19(SARS-CoV-2)中的任何一个或更多个。

5.根据权利要求1所述的用于检测冠状病毒的试剂盒,其中,所述磁性纳米颗粒包括由氧化铁制成的核部分和围绕所述核部分设置的由金制成的壳部分组成的磁性纳米颗粒,以及

所述引物使用化合物进行改性在5'-末端具有硫醇基团和氨基团中的任何一个。

6.根据权利要求5所述的用于检测冠状病毒的试剂盒,其中,所述磁性纳米颗粒的平均直径被设置成具有第一长度并且所述壳部分的平均厚度被设置成具有第二长度,其中,所述第二长度比所述第一长度大0.09至0.15倍。

7.根据权利要求5所述的用于检测冠状病毒的试剂盒,其中,所述磁性纳米颗粒的平均直径被设置成具有第一长度并且所述壳部分的平均厚度被设置成具有第二长度,其中,所述第一长度为170nm至300nm并且所述第二长度为15nm至40nm。

8.根据权利要求5所述的用于检测冠状病毒的试剂盒,其中,所述磁性纳米颗粒通过如下方式制备:制备由氧化铁制成的核部分,

在所述核部分的表面上设置包含硅的缓冲部分,以及

通过氨基团(-NH_2)和硫醇基团(-SH)中的至少一个来官能化所述缓冲部分的外表面,然后形成包含金的壳部分。

9.根据权利要求1所述的用于检测冠状病毒的试剂盒,还包括:

反应器,在一侧具有开口;

导电基板,被设置成覆盖所述反应器的所述开口;

第一电极和第二电极,设置在所述反应器中;

磁场施加部件,用于向所述反应器施加磁场;以及

电化学信号测量部件,用于使用所述导电基板以及所述第一电极和所述第二电极作为三电极模块来测量电化学信号。

10.根据权利要求9所述的用于检测冠状病毒的试剂盒,其中,所述磁性纳米颗粒和在所述磁性纳米颗粒的表面上形成的扩增产物被设置在所述反应器中,以及

所述第一电极包括参考电极,所述导电基板包括工作电极,并且所述第二电极包括控制从所述参考电极和所述工作电极生成的电子平衡的对电极,它们作为三电极模块执行,

其中,所述第一电极或所述第二电极由金(Au)、钴(Co)、铂(Pt)、银(Ag)、碳纳米管、石

墨烯和碳中的任何一个或更多个组成,以及

所述导电基板包括氧化铟锡(ITO)、ZnO、SnO_2、In_2O_3、$CdSnO_4$、包括碳纳米管的碳基板材料、添加氟的掺氟氧化锡(FTO)和添加铝的掺铝IPA2210KR1341

氧化锌(AZO)中的任何一个或更多个。

11.根据权利要求9所述的用于检测冠状病毒的试剂盒,其中,所述电化学信号测量部件包括差分脉冲伏安计(DPV)、阳极溶出伏安法(ASV)、计时电流法(CA)、循环伏安法、方波伏安法(SWV)和阻抗计中的任何一个或更多个。

12.根据权利要求9所述的用于检测冠状病毒的试剂盒,其中,所述磁场施加部件将磁场可逆地施加到所述反应器中一次或更多次,所述磁场施加部件与所述反应器其间插入所述导电基板,以及

所述磁场施加部件将所述磁性纳米颗粒朝向所述反应器的所述开口移动并且控制移动所述磁性纳米颗粒的程度。

13.一种用于检测冠状病毒的方法,包括以下步骤:制备表面附着有引物的磁性纳米颗粒;

通过将具有附着到表面的所述引物的所述磁性纳米颗粒添加到包含冠状病毒的样本来执行聚合酶链式反应(PCR),以获得在表面上具有扩增产物的磁性纳米颗粒;

在设置有开口的反应器中添加表面上具有所述扩增产物的所述磁性纳米颗粒,使用导电基板覆盖所述开口,并且在第一条件下从所述导电基板的一侧将磁场施加到所述反应器中;

将包括钌(Ru)、铁(Fe)、银(Ag)、铜(Cu)、镍(Ni)、镉(Cd)和锌(Zn)中的任何一个或更多个的金属离子添加到所述反应器中,并且然后在第二条件下施加磁场;以及

在所述反应器中提供第一电极和第二电极,并且一起使用所述第一电极和所述第二电极以及所述导电基板来测量电化学信号。

14.根据权利要求13所述的用于检测冠状病毒的方法,其中,所述制备表面附着有引物的磁性纳米颗粒包括

制备由氧化铁制成的核部分,

IPA2210KR1341

在所述核部分的表面上提供包含硅的缓冲部分以制备纳米颗粒前体,

通过使用氨基团(-NH_2)和硫醇基团(-SH)中的至少一个官能化所述缓冲部分的外表面并且形成包含金的壳部分来制备磁性纳米颗粒,以及

将使用化合物改性的在5'末端具有硫醇基团和氨基团(-NH_2)中的任何一个的引物与所述磁性纳米颗粒混合并且执行盐陈化。

15.根据权利要求14所述的用于检测冠状病毒的方法,其中,所述盐陈化包括将所述磁性纳米颗粒和所述引物添加到搅拌器并且混合,并且然后在所述搅拌器中添加多次体积比为5:1至30:1的第一溶液和第二溶液并且对混合物进行超声处理,

其中,所述第一溶液通过混合氯化钠溶液、磷酸盐缓冲盐水和超纯水来提供,并且所述第二溶液通过混合磷酸盐缓冲盐水、十二烷基硫酸钠和超纯水来提供。

16.根据权利要求13所述的用于检测冠状病毒的方法,其中,所述引物包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:6中的任何一个或更多个。

17.根据权利要求13所述的用于检测冠状病毒的方法，其中，所述冠状病毒为HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、MERS-CoV、和COVID-19(SARS-CoV-2)中的任何一个或更多个。

18.根据权利要求13所述的用于检测冠状病毒的方法，其中，在所述电化学信号的测量中，

所述第一电极包括参考电极，所述导电基板包括工作电极，并且所述第二电极包括控制从所述参考电极和所述工作电极生成的电子平衡的对电极，它们作为三电极模块执行，

其中，所述第一电极或所述第二电极由金(Au)、钴(Co)、铂(Pt)、银(Ag)、碳纳米管、石墨烯和碳中的任何一个或更多个组成，以及

IPA2210KR1341

所述导电基板包括氧化铟锡(ITO)、ZnO、SnO_2、In_2O_3、$CdSnO_4$、包括碳纳米管的碳基板材料、添加氟的掺氟氧化锡(FTO)和添加铝的掺铝氧化锌(AZO)中的任何一个或更多个。

19.根据权利要求18所述的用于检测冠状病毒的方法，其中，所述电化学信号的测量包括差分脉冲伏安计(DPV)、阳极溶出伏安法(ASV)、计时电流法(CA)、循环伏安法、方波伏安法(SWV)和阻抗计中的任何一个或更多个。

20.根据权利要求19所述的用于检测冠状病毒的方法，其中，所述第一电极是包含Ag/AgCl的参考电极，所述第二电极是包含Pt的对电极，并且所述导电基板是包含ITO的工作电极，它们作为三电极模块执行，以及

所述电化学信号的测量包括差分脉冲伏安法(DPV)。

用于检测冠状病毒的试剂盒和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年12月31日和2022年7月29日提交至韩国知识产权局的韩国专利申请第10-2021-0194434号和第10-2022-0094666号的优先权和权益,其整体内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及用于检测冠状病毒的试剂盒和用于检测冠状病毒的方法,更具体地,涉及能够在短时间内以高灵敏度有效检测低浓度的冠状病毒的用于检测冠状病毒的试剂盒和用于检测冠状病毒的方法。

背景技术

[0004] 分子诊断是对疾病的基础,诸如DNA或RNA进行诊断,并且已被应用于各个领域,诸如传染病、癌症诊断、遗传病和定制诊断。作为具有代表性的分子诊断技术,存在一种在短时间内扩增DNA的聚合酶链式反应(PCR)技术。

[0005] 基于PCR的分子诊断技术对特定癌症和特定病毒传染病具有高的诊断准确度的优势,并且因此已被用作黄金标准。其中,主要使用昂贵但准确度最高的实时PCR,并且已使用大量较便宜的常规PCR。

[0006] 冠状病毒是指属于单链RNA为基因组的冠状病毒科的病毒,并且不仅存在于鸟类中,还存在于包括人类在内的各种哺乳动物中。冠状病毒有多种种类,并且已知引起呼吸道和消化道传染病,具体取决于病毒的性质和宿主。

[0007] 在人类中,作为严重急性呼吸系统综合症(SARS)的致病病毒,冠状病毒已成为问题,其在2003年是世界性问题,并且在2015年是中东呼吸系统综合症冠状病毒(MERS)。最近,冠状病毒作为SARS-CoV-2,冠状病毒疾病-19(COVID-19)的病原体引起了关注,其正在世界各地蔓延。

[0008] 冠状病毒感染呈现高流行性,并且即使在发病初期无症状状态下也具有高度传染性,使得极有可能引起大规模感染。目前,世界各地都在开发治疗药物和疫苗,但尚未确定治愈方法,并且因此,最好的措施是及早检测感染者并且防止大规模感染。

[0009] 因此,PCR技术已被用作能够快速准确地诊断多个测试对象是否感染冠状病毒的技术之一。另一方面,该PCR技术具有引发足够的聚合酶链式反应并且需要昂贵的设备、成本和大量时间以便保持高准确度的缺点。此外,检测寿命短和浓度低(1fM或更少)的碱基序列也存在很多困难。

发明内容

[0010] 本公开致力于提供用于检测冠状病毒的试剂盒和用于检测冠状病毒的方法,能够在短时间内以高灵敏度有效检测低浓度的冠状病毒。

[0011] 本公开还致力于提供用于检测冠状病毒的试剂盒和用于检测冠状病毒的方法,能

够通过使用新型磁性纳米颗粒来减少PCR的循环数以显著缩短诊断所需的时间并提高效率。

[0012] 根据本公开的一个方面，本公开的实施方式提供了用于检测冠状病毒的试剂盒和用于检测冠状病毒的方法。

[0013] 本公开的实施方式提供了一种用于检测冠状病毒的试剂盒，包括：磁性纳米颗粒和附着到磁性纳米颗粒的表面的引物，其中引物可以通过与冠状病毒的聚合酶链式反应形成扩增产物，并且形成扩增产物所收集的磁性纳米颗粒可以通过重复施加电位来放大电化学信号以检测冠状病毒。

[0014] 在实施方式中，电化学信号可以通过施加DC或AC电源来测量电流值的变化。

[0015] 在实施方式中，引物可以包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:6中的任何一个或更多个。

[0016] 在实施方式中，冠状病毒可以是HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、MERS-CoV、和COVID-19(SARS-CoV-2)中的任何一个或更多个。

[0017] 在实施方式中，磁性纳米颗粒可以包括由氧化铁制成的核部分和围绕核部分设置的由金制成的壳部分组成的磁性纳米颗粒，并且引物可以使用化合物进行改性在5’-末端具有硫醇基团和氨基团中的任何一个。

[0018] 在实施方式中，磁性纳米颗粒的平均直径可以被设置成具有第一长度并且壳部分的平均厚度可以被设置成具有第二长度，其中第二长度可以比第一长度大0.09至0.15倍。

[0019] 在实施方式中，磁性纳米颗粒的平均直径可以被设置成具有第一长度并且壳部分的平均厚度可以被设置成具有第二长度，其中第一长度可以是170nm至300nm并且第二长度可以是15nm至40nm。

[0020] 在实施方式中，磁性纳米颗粒可以通过如下方式制备：制备由氧化铁制成的核部分，在核部分的表面上设置包含硅的缓冲部分，通过氨基团(-NH2)和硫醇基团(-SH)中的至少一个来官能化缓冲部分的外表面，然后形成包含金的壳部分。

[0021] 在实施方式中，用于检测冠状病毒的试剂盒还可以包括：反应器，在一侧具有开口；导电基板，被设置成覆盖反应器的开口；第一电极和第二电极，设置在反应器中；磁场施加部件，用于向反应器施加磁场；以及电化学信号测量部件，用于使用导电基板以及第一和第二电极作为三电极模块来测量电化学信号。

[0022] 在实施方式中，磁性纳米颗粒和在磁性纳米颗粒的表面上形成的扩增产物可以被设置在反应器中，并且第一电极可以包括参考电极，导电基板可以包括工作电极，并且第二电极可以包括控制从参考电极和工作电极生成的电子平衡的对电极，它们可以作为三电极模块执行，其中第一或第二电极可以由金(Au)、钴(Co)、铂(Pt)、银(Ag)、碳纳米管、石墨烯和碳中的任何一个或更多个组成，并且导电基板可以包括氧化铟锡(ITO)、ZnO、SnO_2、In_2O_3、$CdSnO_4$、包括碳纳米管的碳基板材料、添加氟的掺氟氧化锡(FTO)和添加铝的掺铝氧化锌(AZO)中的任何一个或更多个。

[0023] 在实施方式中，电化学信号测量部件包括差分脉冲伏安计(DPV)、阳极溶出伏安法(ASV)、计时电流法(CA)、循环伏安法、方波伏安法(SWV)和阻抗计中的任何一个或更多个。

[0024] 在实施方式中，磁场施加部件将磁场可以可逆地施加到反应器中一次或更多次，磁场施加部件与反应器其间插入导电基板，并且磁场施加部件可以将磁性纳米颗粒朝向反

应器的开口移动并且控制移动磁性纳米颗粒的程度。

[0025] 根据本公开的另一方面，提供了一种用于检测冠状病毒的方法，包括以下步骤：制备表面附着有引物的磁性纳米颗粒；通过将具有附着到表面的引物的磁性纳米颗粒添加到包含冠状病毒的样本来执行聚合酶链式反应(PCR)，以获得在表面上具有扩增产物的磁性纳米颗粒；在设置有开口的反应器中添加表面上具有扩增产物的磁性纳米颗粒，使用导电基板覆盖开口，并且在第一条件下从导电基板的一侧将磁场施加到反应器中；将包括钌(Ru)、铁(Fe)、银(Ag)、铜(Cu)、镍(Ni)、镉(Cd)和锌(Zn)中的任何一个或更多个的金属离子添加到反应器中，然后在第二条件下施加磁场；以及在反应器中提供第一和第二电极，并且一起使用第一和第二电极以及导电基板来测量电化学信号。

[0026] 在实施方式中，制备表面附着有引物的磁性纳米颗粒可以包括：制备由氧化铁制成的核部分，在核部分的表面上提供包含硅的缓冲部分以制备纳米颗粒前体，通过使用氨基团(-NH2)和硫醇基团(-SH)中的至少一个官能化缓冲部分的外表面并且形成包含金的壳部分来制备磁性纳米颗粒，以及将使用化合物改性的在5’末端具有硫醇基团和氨基团(-NH2)中的任何一个的引物与磁性纳米颗粒混合并且执行盐陈化。

[0027] 在实施方式中，盐陈化可以包括将磁性纳米颗粒和引物添加到搅拌器并且混合，然后在搅拌器中添加多次体积比为5:1至30:1的第一溶液和第二溶液并且对混合物进行超声处理，其中第一溶液可以通过混合氯化钠溶液、磷酸盐缓冲盐水和超纯水来提供，并且第二溶液可以通过混合磷酸盐缓冲盐水、十二烷基硫酸钠和超纯水来提供。

[0028] 在实施方式中，引物可以包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:6中的任何一个或更多个。

[0029] 在实施方式中，冠状病毒可以是HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、MERS-CoV、和COVID-19(SARS-CoV-2)中的任何一个或更多个。

[0030] 在实施方式中，在电化学信号的测量中，第一电极可以包括参考电极，导电基板可以包括工作电极，并且第二电极可以包括控制从参考电极和工作电极生成的电子平衡的对电极，它们可以作为三电极模块执行，其中第一或第二电极可以由金(Au)、钴(Co)、铂(Pt)、银(Ag)、碳纳米管、石墨烯和碳中的任何一个或更多个组成，并且导电基板可以包括氧化铟锡(ITO)、ZnO、SnO_2、In_2O_3、$CdSnO_4$、包括碳纳米管的碳基板材料、添加氟的掺氟氧化锡(FTO)和添加铝的掺铝氧化锌(AZO)中的任何一个或更多个。

[0031] 在实施方式中，电化学信号的测量可以包括差分脉冲伏安计(DPV)、阳极溶出伏安法(ASV)、计时电流法(CA)、循环伏安法、方波伏安法(SWV)和阻抗计中的任何一个或更多个。

[0032] 在实施方式中，第一电极可以是包含Ag/AgCl的参考电极，第二电极可以是包含Pt的对电极，并且导电基板可以是包含ITO的工作电极，它们可以作为三电极模块执行，并且电化学信号的测量可以包括差分脉冲伏安法(DPV)。

[0033] 根据本公开，可以提供用于检测冠状病毒的试剂盒和方法，其能够通过对磁性纳米颗粒的形状等进行各种控制而以高灵敏度检测冠状病毒。

[0034] 此外，可以提供用于检测冠状病毒的试剂盒和方法，其能够减少PCR循环的数量并且以高准确度快速检测冠状病毒。

[0035] 此外，可以提供用于检测冠状病毒的试剂盒和方法，其能够通过改性和使用引物，

即使在低浓度下也能够高效检测冠状病毒。

附图说明

[0036] 图1是示意性示出使用根据本公开的实施方式的用于检测冠状病毒的试剂盒来检测冠状病毒的整体过程的示图。

[0037] 图2是示意性示出本公开的用于检测冠状病毒的试剂盒的示图。

[0038] 图3是示出本公开的磁性纳米颗粒的示图。

[0039] 图4是示意性示出根据本公开的实施方式的具有附着在表面上的引物的磁性纳米颗粒的制造方法的示图。

[0040] 图5是制备示例3的磁性纳米颗粒的示意图和TEM图像。

[0041] 图6是制备示例3的磁性纳米颗粒的SEM图像。

[0042] 图7是示出制备示例3的磁性纳米颗粒和根据制备示例1的氧化铁纳米颗粒(核)的尺寸的图表。

[0043] 图8是确认制备示例3的磁性纳米颗粒的磁场特性的结果。

[0044] 图9是示出关于本公开中使用的COVID-19病毒的N、E和RdRP序列的信息的示图。

[0045] 图10和图11示出了FDA紧急批准的基于RT-PCR的COVID-19诊断试剂盒的数据。

[0046] 图12是示出根据本公开的实施方式的执行nSLAM的过程的示意图。

[0047] 图13是使用本公开的实施方式确认冠状病毒的最小可检测浓度的实验结果。

[0048] 图14示出了在PCR过程期间寻找和最佳退火温度的实验结果。

[0049] 图15和图16示出了使用本公开的实施方式确认冠状病毒的最小可检测PCR循环的实验结果。

[0050] 图17示出了用于确认根据本公开的实施方式的使用反向引物的效率的实验结果。

[0051] 图18和图19示出了用于确认本公开的实施方式对SARS-CoV-2病毒具有选择性的实验结果。

具体实施方式

[0052] 其他示例性实施方式的细节将包括在详细描述和附图中。

[0053] 本公开的优点和特征,以及用于实现其的方法将从下面参照附图详细描述的示例性实施方式中得到更清楚的理解。然而,本公开不限于以下将公开的实施方式,而是可以以各种不同的形式实施。除非在下面的描述中另有说明,否则本公开中表示组分、反应条件和组分含量的所有数字、值和/或表达式均为近似,除了与这些值本质上不同的之外,其反映了为获得这些值而生成的测量结果中的各种不确定性,并且因此,在所有情况下,都应理解为由术语“约”限定。此外,当在本说明书中公开数值范围时,除非另有说明,否则这些范围是连续的并且包括从该范围的最小值到最大值的所有值。此外,当这些范围指整数时,除非另有说明,否则包括从最小值到最大值的所有整数。

[0054] 此外,在本公开中,当公开变量的范围时,变量将被理解为包括所公开的范围内的所有值,包括该范围的公开端点。例如,将理解,“5至10”的范围包括任何较低的范围,诸如6至10、7至10、6至9和7至9,以及值5、6、7、8、9和10,并且包括落入所公开的范围内的整数之间的任何值,诸如5.5、6.5、7.5、5.5至8.5和6.5至9等。例如,将理解,“10％至30％”的范围

包括任何较低的范围，诸如10％至15％、12％至18％和20％至30％，以及包括10％、11％、12％、13％等直到30％的所有整数，并且包括落入所公开的范围内的整数之间的任何值，诸如10.5％、15.5％、25.5％等。

[0055] 图1是示意性示出使用根据本公开的实施方式的用于检测冠状病毒的试剂盒来检测冠状病毒的整体过程的示图。

[0056] 图2是示意性示出本公开的用于检测冠状病毒的试剂盒的示图。图3是示出本公开的磁性纳米颗粒的示图。图4是示意性示出根据本公开的实施方式的具有附着在表面上的引物的磁性纳米颗粒的制造方法的示图。

[0057] 参照图2至图4，本公开的实施方式是一种用于检测冠状病毒的试剂盒。用于检测冠状病毒的试剂盒包括磁性纳米颗粒和附着在磁性纳米颗粒的表面上的引物。引物通过与冠状病毒的聚合酶链式反应(PCR)形成扩增产物，并且其中形成扩增产物的磁性纳米颗粒具有通过重复施加电位放大的电化学信号以检测冠状病毒。电化学信号可以通过施加DC或AC电源来测量电流值的变化。磁性纳米颗粒100可以包括由氧化铁制成的核部分和由金制成以围绕核部分的壳部分。

[0058] 例如，根据本实施方式的用于检测冠状病毒的试剂盒可以通过电化学信号检测冠状病毒，其中在电化学信号中，首先测量的初始信号和重复施加电位获得的测量信号逐渐增加。也就是说，即使在初始信号过低而不易测量时，也可以通过重复增加测量信号以高灵敏度测量冠状病毒。

[0059] 在本公开中，术语“靶核酸”、“单靶碱基序列”和“特定单碱基序列”是指通过根据本公开的方法扩增的核酸分子。核酸的类型可以是脱氧核糖核苷酸(DNA)、核糖核苷酸(RNA)以及它们的混合物或组合。构成核酸的碱基是天然存在的核苷酸，例如鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)，但可以包含其他天然和人工改性的碱基。术语“改性碱基”是指其中鸟嘌呤、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶这五个核苷酸已被化学改性的碱基。在本公开中，靶核酸、单靶碱基序列和特定单碱基序列需要是单链以用于扩增，但是形成双链或更高级结构的核酸也可以通过热变性、碱变性处理等转化成单链并被使用。本公开的靶核酸、单靶单碱基序列和特定单碱基序列还包括加入这种变性处理的方面。此外，还包括使用RNA为模板通过逆转录反应制备的cDNA。

[0060] 如本文使用的，术语“样本”是指被认为包括待检测的靶核酸、单靶碱基序列和特定单碱基序列的混合物。样本可以来源于包括人(例如，血液、唾液、体液、身体组织等)的活体、环境(例如，土壤、海水、环境水(温泉水、洗澡水、冷却塔水等))或者人工或天然产品(例如，加工食品，诸如面包，发酵食品，诸如酸奶，或者栽培植物，诸如稻米和小麦，微生物，病毒)，并且通常可以使用经受核酸提取操作的样本。如果需要，可以增加核酸纯化过程。

[0061] 根据该实施方式的用于检测冠状病毒的试剂盒包括：反应器，在一侧具有开口；导电基板，被设置成覆盖反应器的开口；第一电极和第二电极，设置在反应器中；磁场施加部件，用于向反应器施加磁场；以及电化学信号测量部件，用于通过使用导电基板以及第一和第二电极作为三电极模块来测量电化学信号。

[0062] 磁性纳米颗粒是指包括由氧化铁制成的核部分和由金制成的壳部分的颗粒形状，并且磁性纳米颗粒部件是指其中引物附着到磁性纳米颗粒的表面上的形状。另外，扩增产物是指在执行聚合酶链式反应之后获得的结果，并且扩增产物可以在磁性纳米颗粒部件的

引物中执行并且在磁性纳米颗粒的表面上被收集。

[0063] 在执行PCR扩增反应之后,可以在反应器中提供磁性纳米颗粒部件。开口,例如一个或更多个孔,可以设置在反应器的下侧,并且开口被导电基板阻挡,使得设置在反应器中的磁性纳米颗粒部件不会被排放到外部。磁场施加部件设置在导电基板外部,并且磁场施加部件可以使磁性纳米颗粒部件朝向反应器的开口移动并且控制移动的程度以提高核酸检测效率。

[0064] 通常,在使用PCR技术检测核酸、冠状病毒等的过程中,存在诱导足够的聚合酶链式反应并且需要昂贵的设备、成本和大量时间以便保持高准确度的缺点。此外,其中扩增产物的寿命短并且样本中包含的浓度低(约1fM或更小)的碱基序列的检测有很多困难。因此,存在如下问题:包括被研究用于诱导具有直接影响的电极与靶碱基序列之间的相互作用的微电极的纳米结构效率低。

[0065] 此外,在基于功能性金属纳米颗粒的荧光或电信号检测技术与常规PCR技术一起使用的情况下,存在如下问题:在聚合酶链式反应之后,牵涉颗粒的后处理过程,并且在为颗粒与靶碱基序列特异性反应创造环境的过程中,检测效率降低,并且引起检测错误的概率高。

[0066] 在本公开的实施方式中,在磁性纳米颗粒合成之后,使用分散在水溶液中的硫醇基团,将用于启动与特定疾病相关的单靶核苷酸序列的扩增反应的核苷酸序列(正向或反向引物)附着到磁性纳米颗粒的表面,从而提高处理效率。此外,通过将钌离子吸附到碱基序列来测量在0.25V逐渐增加的电流峰值,以提供超灵敏的疾病检测系统,即使在靶碱基序列的浓度为aM和低于该浓度的浓度范围区域时,仍可以对其进行检测量。

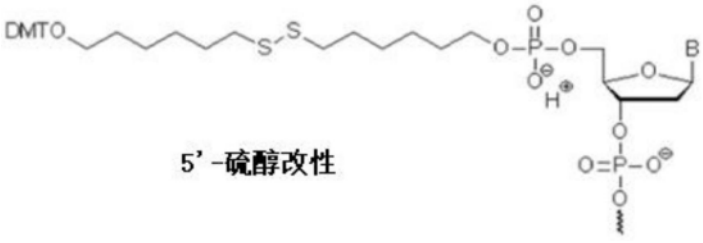
[0067] 此外,根据本实施方式的用于检测冠状病毒的试剂盒尽管显著减少了PCR重复循环,仍提高了准确度,并且可以将PCR过程缩短至10分钟以内,从而显著缩短检测步骤所耗用的时间。

[0068] 冠状病毒可以是HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、MERS-CoV和COVID-19(SARS-CoV-2)中的任何一个或更多个。

[0069] 引物可以包括SEQ ID NO:7至SEQ ID NO:12中的任何一个或更多个。可以通过使用下面的化学式1将引物改性成在反向引物的5'-末端处具有硫醇基团的以下化学式1来使用引物。除硫醇基团外,反向引物的5'末端也可以使用氨基团改性。

[0070] [化学式1]

[0071]



5'-硫醇改性

[0072] 具体而言,可以通过使用作为具有硫醇官能团的化合物的硫醇改性剂C6 S-S(O-二甲氧基三苯甲基-己基-二硫己基-磷酸酯)对引物进行改性来使用引物,并且更具体地,可以通过进一步将由5至30个腺嘌呤碱基序列A组成的间隔区添加并附着到硫醇改性剂C6 S-S来使用引物。间隔区可以在附着到磁性纳米颗粒的表面的引物执行聚合酶链式反应时,防止相邻引物之间的空间干扰,并且提高引物的迁移率以提高聚合酶链式反应的效率。另

一方面，腺嘌呤序列可能为5至30个，并且当腺嘌呤序列少于5个时，作为间隔区的功能不充分，并且当腺嘌呤序列超过30个时，较之磁性纳米颗粒的尺寸，间隔区设置过长以致产生问题。

[0073] 参照图3，磁性纳米颗粒100的平均直径被设置成具有第一长度a，壳部分的平均厚度被设置成具有第二长度b，并且第二长度b可被设置成比第一长度a大0.09倍至0.15倍。具体地，第二长度b可被设置成比第一长度a大约0.1倍至0.15倍、或约0.5倍至0.15倍、约0.7倍至0.15倍、约0.09倍至0.15倍、约0.09倍至0.12倍。如果第二长度b小于第一长度a的0.09倍，则难以形成壳部分的均匀厚度并且难以高效控制附着到壳部分的引物和PCR扩增产物，并且如果第二长度b大于第一长度a的0.15倍，则在施加磁场时难以控制颗粒的移动，并且难以有效检测电化学信号。

[0074] 此外，当第一长度a为170nm至300nm时，第二长度b可为15nm至40nm。当第一长度a小于170nm时，存在磁性纳米颗粒在样本中团聚或聚集的问题，并且当第一长度a大于300nm时，难以通过施加磁场控制磁性纳米颗粒的移动。此外，当第二长度b小于15nm时，难以形成具有均匀厚度的壳部分，并且当第二长度b大于40nm时，存在磁性纳米颗粒的移动灵敏度因磁场或电流劣化的问题。具体地，第一长度可以是约200nm至300nm、约210nm至300nm、约220nm至300nm、约200nm至280nm或者约200nm至260nm。此外，第二长度b可以是约20nm至40nm、约20nm至35nm或约20nm至30nm。

[0075] 磁性纳米颗粒部件可以通过如下方式制备：制备由氧化铁制成的核部分、在核部分的表面上设置包含硅的缓冲部分、使用氨基团(-NH_2)或硫醇基团(-SH)来官能化缓冲部分的外表面，然后形成包含金的壳部分以制造磁性纳米颗粒，并且将磁性纳米颗粒和改性的引物混合。

[0076] 核部分可以使用氯化铁溶液作为铁前体，并且由氧化铁制成的核部分可以通过使用二醇等作为还原剂和溶剂的多元醇反应来制备。壳部分可以通过如下方式制备：首先使用氯金酸($HAuCl_4$)溶液作为金前体制备金纳米颗粒，将金纳米颗粒附着到核部分的表面，然后使金生长。在这种情况下，为了稳定地附着金纳米颗粒，可以使用二氧化硅前体在核部分的表面上形成包含二氧化硅的缓冲部分，然后通过缓冲部分附着到核部分。随后，改性的引物可以结合到壳部分，并且改性的引物可以包括反向引物或正向引物中的至少一个。

[0077] 这样，在其中改性的引物结合到磁性纳米颗粒的表面的磁性纳米颗粒部件中，当执行PCR反应时，通过靶核酸的长度扩增的碱基序列在磁性纳米颗粒的表面上形成双链。随后，在通过PCR反应将具有扩增产物的磁性纳米颗粒部件设置在反应器中之后，可以通过磁场施加部件将磁场一次或更多次可逆地施加到反应器中，磁场施加部件与反应器其间具有导电基板。通过施加磁场，磁性纳米颗粒部件可以朝向反应器的开口移动，并且可以通过开口与导电基板相邻设置。

[0078] 试剂盒还可以包括电化学信号测量部件，用于使用设置在反应器中的第一电极、第二电极和包括第一电极、第二电极和导电基板的三电极模块来测量电化学信号。

[0079] 第一电极包括参考电极，导电基板包括工作电极，并且第二电极可以包括控制从参考电极和工作电极生成的电子平衡的对电极，它们作为三电极模块被执行。

[0080] 第一或第二电极可以由金(Au)、钴(Co)、铂(Pt)、银(Ag)、碳纳米管、石墨烯和碳中的任何一个或更多个组成，并且导电基板可以包括氧化铟锡(ITO)、ZnO、SnO_2、In_2O_3、

$CdSnO_4$、包括碳纳米管的碳基板材料、添加氟的掺氟氧化锡(FTO)和添加铝的掺铝氧化锌(AZO)中的任何一个或更多个。

[0081] 此外,电化学信号测量部件可以通过使用第一电极和第二电极以及导电基板来测量电化学信号。例如,电化学信号测量部件可以包括差分脉冲伏安法(DPV)、阳极溶出伏安法(ASV)、计时电流法(CA)、循环伏安法、方波伏安法(SWV)和阻抗计中的任何一个或更多个。

[0082] 在本公开的实施方式中,样本可以包括血液、血清、血浆、唾液、腹水、羊水、精液、泪液、脑脊液、骨髓、胸水、滑液、淋巴液、尿液、组织活检和细胞系中的一个或更多个。

[0083] 根据本公开的另一方面,本公开包括使用上述用于检测冠状病毒的试剂盒来检测冠状病毒的方法。

[0084] 用于检测冠状病毒的方法包括:制备表面上附着引物的磁性纳米颗粒;通过将表面上附着有引物的磁性纳米颗粒添加到包含冠状病毒的样本来执行聚合酶链式反应(PCR)以获得在表面上具有扩增产物的磁性纳米颗粒;将表面上具有扩增产物的磁性纳米颗粒放入具有开口的反应器中,用导电基板覆盖开口,并且在第一条件下从导电基板的一侧将磁场施加到反应器中;在将包含钌(Ru)、铁(Fe)、银(Ag)、铜(Cu)、镍(Ni)、镉(Cd)和锌(Zn)中的至少一个的金属离子添加到反应器中之后,在第二条件下施加磁场;以及在反应器中提供第一和第二电极,并且通过一起使用第一和第二电极以及导电基板来测量电化学信号。

[0085] 表面附着有引物的磁性纳米颗粒的制备可以包括:制备由氧化铁制成的核部分,在核部分的表面上设置包含硅的缓冲部分以制备纳米颗粒前体,使用氨基团(-NH_2)和硫醇基团(-SH)中的至少一个将缓冲部分的外表面官能化,然后形成包含金的壳部分以制备磁性纳米颗粒,将磁性纳米颗粒和引物混合,以及执行盐陈化。

[0086] 磁性纳米颗粒部件可以通过制备磁性纳米颗粒并且然后将引物附着到磁性纳米颗粒的表面来形成。

[0087] 磁性纳米颗粒的制备是通过使用氯化铁溶液作为铁前体和使用二醇等作为还原剂和溶剂的多元醇反应制备由氧化铁制成的核部分。随后,壳部分可以通过如下方式制备:使用二氧化硅前体在核部分的表面上形成包含二氧化硅的缓冲部分,附着作为种子的金纳米颗粒,然后生长金。金纳米颗粒可以附着到从核部分到缓冲部分形成的纳米颗粒前体的表面,并且在这种情况下,可以使用胺基团和硫醇基团中的任何一个将金纳米颗粒官能化,然后将其附着。

[0088] 具体地,将纳米颗粒前体浸渍在包含胺基团或硫醇基团的溶液中,在60℃至90℃的温度下超声处理2小时至10小时,并且在超声处理完成之后用水洗涤,然后将洗涤后的纳米颗粒前体分散在水中以制备纳米颗粒前体分散体。可以通过混合金纳米颗粒并且然后添加氯金酸($HAuCl_4$)溶液以形成壳部分来将纳米颗粒前体分散体制备为磁性纳米颗粒。在这种情况下,可以预先制备平均直径为0.5nm至5nm的颗粒形式的金纳米颗粒并且将其用作种子。

[0089] 在60℃至90℃的温度下执行超声处理2小时至10小时,使得胺基团和硫醇基团中的任何一个可以均匀地附着到纳米颗粒前体的表面上,并且过程效率可以在随后的附着金纳米颗粒的过程中得到提高。此外,用作种子的金纳米颗粒的平均直径可以为0.5nm至5nm,并且当平均直径小于0.5nm时,金纳米颗粒在纳米颗粒前体的一部分表面上团聚或聚集,并

且当平均直径大于0.5nm时，难以控制壳部分的厚度。具体地，金纳米颗粒的平均直径可以为约1nm至5nm、约0.5nm至4nm或约0.5nm至3nm。

[0090] 引物可以包括使用单硫醇基团和单氨基团中的任何一个改性的引物。在该引物中，由于双硫醇(-SH)基团和氨基团中的任何一个在能够与特定单碱基序列的3'末端反应的5'末端中双键结合，因此氨基团或硫醇基团的双键可以加工成单键。

[0091] 改性的引物可以与磁性纳米颗粒混合并结合到磁性纳米颗粒的表面。在这种情况下，可以执行盐陈化以便防止发生改性的引物的碱基序列的非特定性附着和聚集。

[0092] 盐陈化可以包括将磁性纳米颗粒和改性的引物加入搅拌器中并混合，然后在搅拌器中多次加入体积比为5:1至30:1的第一溶液和第二溶液并且对混合物进行超声处理。可以通过混合氯化钠溶液、磷酸盐缓冲盐水和超纯水来提供第一溶液，并且可以通过混合磷酸盐缓冲盐水、十二烷基硫酸钠和超纯水来提供第二溶液。

[0093] 具体地，盐陈化可以依次包括一次陈化和二次陈化。一次陈化可以执行2至6小时，并且可以通过每1小时添加第一和第二溶液来执行超声处理。二次陈化可以执行4至12小时，并且超声处理可通过使用体积比是一次陈化中使用的1.5至3倍的第一和第二溶液并且每隔2小时加入第一和第二溶液来执行。盐陈化通过改变条件由一次陈化和二次陈化执行以提高处理效率。

[0094] 此外，可以改性引物为除了硫醇基团之外还具有附着到其上的氨基团。在这种情况下，在5'末端用氨基团改性的反向引物可以通过控制pH以获得质子并且然后将质子静电结合到带负电荷的金表面来结合到磁性纳米颗粒的表面。

[0095] 通过在第一和第二条件下施加磁场，磁性纳米颗粒部件的至少一部分可以转移到反应器的开口侧以与导电基板接触。第一条件可以包括1分钟至10分钟的0.1T至1T的条件，并且第二条件可以包括12分钟至30分钟的0.1T至1T的条件。

[0096] 第一条件主要用于将磁性纳米颗粒部件附着到导电基板，并且第二条件用于添加包括钌(Ru)、铁(Fe)、银(Ag)、铜(Cu)、镍(Ni)、镉(Cd)和锌(Zn)中的至少一个的金属离子，然后将吸附有金属离子的磁性纳米颗粒部件移动到导电基板上。替选地，可以添加亚甲基蓝或包含硝基团的化合物来代替金属离子。

[0097] 在电化学信号的测量中，第一电极包括参考电极，导电基板包括工作电极，并且第二电极可以包括控制从参考电极和工作电极生成的电子平衡的对电极，它们作为三电极模块被执行。

[0098] 第一或第二电极可以由金(Au)、钴(Co)、铂(Pt)、银(Ag)、碳纳米管、石墨烯和碳中的任何一个或更多个组成，并且导电基板可以包括氧化铟锡(ITO)、ZnO、SnO_2、In_2O_3、$CdSnO_4$、包括碳纳米管的碳基板材料、添加氟的掺氟氧化锡(FTO)和添加铝的掺铝氧化锌(AZO)中任何一个或更多个。

[0099] 电化学信号的测量可以包括差分脉冲伏安法(DPV)、阳极溶出伏安法(ASV)、计时电流法(CA)、循环伏安法、方波伏安法(SWV)和阻抗计中的任何一个或更多个。

[0100] 具体地，第一电极为包含Ag/AgCl的参考电极，第二电极为包含Pt的对电极，并且导电基板为包含ITO的工作电极，它们作为三电极模块被执行，并且电化学信号的测量可以包括差分脉冲伏安法(DPV)。

[0101] 通过测量电化学信号可以测量初始电流信号和最终电流信号，并且初始电流信号

是指初级电流信号，而最终电流信号高于初始电流信号，电流信号变化不大。

[0102] 磁性纳米颗粒部件的表面上的扩增密度越高，并且扩增的磁性纳米颗粒部件的数量越多，则与金属离子的吸附量越大。例如，当具有长碱基对的磁性纳米颗粒部件的浓度与附着有短碱基序列的磁性纳米颗粒部件相比低时，初始电流量与最大电流之间的差增大。具体地，通过在导电性基板的表面上施加附着有短碱基序列的磁性纳米颗粒部件和具有长碱基对的磁性纳米颗粒部件随机排列的形式的电流来测量初始电流信号，具有长碱基对的磁性纳米颗粒部件的浓度低，使得吸附的金属离子的电信号程度弱。另一方面，随着重复施加电流，具有长碱基对的磁性纳米颗粒部件与导电基板的表面相邻对准，并且附着有相对短的碱基序列的磁性纳米颗粒部件被移交给具有长碱基对的磁性纳米颗粒部件，并且因此可能发生远离导电基板的重新排列。由于重复执行这样的电流施加，电流信号达到保持在一定的恒定状态的最终电流信号，并且可以通过初始电流信号和最终电流信号之间的差异来有效地检测靶核酸。

[0103] 在根据本公开的实施方式的使用磁性纳米颗粒检测靶核酸的试剂盒和方法中，即使当样本中的靶核酸的浓度为aM或更小时，也可以检测到靶核酸。

[0104] 此外，这种超灵敏的疾病检测系统可以在未来将出现的各种疾病的快速和准确的诊断测试技术的开发中发挥关键作用。在本公开中，可以通过将本公开的实施方式的检测方法应用于COVID-19传染病作为用于验证的疾病模型来确认可行性。迄今为止，已开发出诸如基于分子的化验、基于血清学的免疫化验、基于抗原的化验等多种COVID-19诊断技术，并且在这些技术中，分子诊断技术被认为是用于诊断COVID-19传染病的黄金标准，其具有高的准确度、灵敏度和特异性，并且能够在感染的早期阶段进行检测。本公开的检测方法可以移植到这样的分子诊断技术，其可以进一步增强传统的分子诊断技术的优势，同时提供一种高超高灵敏度的诊断方法。基于此，可以构建能够以高准确度快速诊断疾病同时显著减少PCR中的重复循环数量的快速诊断系统。根据本公开，通过使用引物附到在磁性纳米颗粒的表面的磁性纳米颗粒部件，可以在约10分钟内减少PCR过程。因此，通过显著缩短检测时间，有望将其用作紧急COVID-19传染病的实时现场诊断系统。此外，由于使用磁性纳米颗粒的磁性质进行采集并且使用DPV检测电化学信号，超出常规分子诊断的fM至pM的检测限，可以检测aM及以下的浓度范围。此外，基于对COVID-19模型的影响，本公开的检测方法有望扩展到未来疾病(例如，各种癌症、病毒引起的疾病)的诊断测试技术的开发。

[0105] 在下文中，将描述本公开的制备示例和示例。然而，以下示例仅是本公开的优选示例，并且本公开的范围不受以下示例的限制。

[0106] 制备示例1(氧化铁纳米颗粒的制备)

[0107] 通过多元醇方法合成氧化铁纳米颗粒。使用氯化铁六水合物($FeCl_3.6H_2O$)作为铁离子前体，分别使用乙二醇作为还原剂和溶剂、乙酸钠(NaOAc)辅助水解和H_2O。在装有50mL乙二醇的三颈烧瓶中，加入2mmol的$FeCl_3.6H_2O$、6mmol的NaOAc和150mmol的H_2O，并且在机械搅拌下快速加热至200℃ 15分钟。反应时间在200℃下保持3小时30分钟，然后将混合物冷却至室温并用乙醇洗涤数次并且分散在H_2O中以制备氧化铁纳米颗粒。

[0108] 制备示例2(金纳米颗粒的制备)

[0109] 对于金纳米颗粒，使用三水合氯化金($HAuCl_4.3H_2O$)作为金离子前体，并且分别使用硼氢化钠($NaBH_4$)作为还原剂，柠檬酸三钠作为稳定剂并且H_2O作为溶剂用于反应。首先，

在50mL的H_2O中使用0.25mM的$HAuCl_4.3H_2O$和0.25mM的柠檬酸三钠调节浓度，然后加入1.5mL的冷H_2O($NaBH_4$，0.1M)。在这种情况下，在将温度保持在室温的同时，使用磁棒执行磁力搅拌反应。

[0110] 制备示例3(磁性纳米颗粒的制备)

[0111] 通过使用制备示例1中制备的氧化铁纳米颗粒，使用在氨催化剂下使用TEOS水解反应的Stφber方法在氧化铁纳米颗粒的表面上形成二氧化硅。分别使用乙醇和H_2O作为溶剂、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)作为稳定剂、氢氧化铵溶液(NH_4OH)作为催化剂、以及原硅酸四乙酯(TEOS)作为二氧化硅前体。在反应器中，加入50mL的乙醇、7.5mL的H_2O、2.5mL的NH_4OH和400mg的PVP并且混合。然后，添加25mg的在制备示例1中制备的氧化铁纳米颗粒。在将0.050mL的TEOS加入到与氧化铁纳米颗粒混合的均匀混合溶液中之后，在室温下振荡1小时30分钟。在反应完成之后，在使用乙醇洗涤数次之后将制备的磁性纳米颗粒前体(具有在表面上形成的二氧化硅的磁性纳米颗粒)分散在10mL的乙醇中。

[0112] 为了将制备示例2中制备的金纳米颗粒附着到磁性纳米颗粒前体，使用3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)作为胺基团(-NH_2)的前体，并且使用2-丙醇作为溶剂。将分散有磁性纳米颗粒前体的4mL的乙醇替换为10mL的2-丙醇溶剂，并且加入0.050mL的APTES进行振荡。然后，在80℃下通过4小时的超声处理执行反应。在反应完成之后，使用H_2O洗涤所制备的表面使用胺基团官能化的磁性纳米颗粒前体并且使其分散在5mL的H_2O中。将表面使用胺基团官能化的磁性颗粒前体分散在其中的5mL的H_2O和30mL的金纳米颗粒混合在一起，然后振荡16小时。随后，将溶解在1wt％的PVP中的H_2O与稳定剂一起均匀振荡以制备表面附着有金纳米颗粒的磁性纳米颗粒前体，使用H_2O洗涤，并且分散在20mL的H_2O中。这里，金纳米颗粒通过胺基团与磁性纳米颗粒前体结合。

[0113] 对于金纳米颗粒生长溶液，将45mg的$HAuCl_4.3H_2O$和50mg的碳酸钾(K_2CO_3)溶解在500mL的水中，陈化16小时，然后用作金纳米颗粒生长溶液。将1mg的表面使用胺基团官能化的磁性颗粒前体分散在2mL的1wt％的聚壬基吡咯烷酮(PVP，55,000kDa)中，然后与80mL的金纳米颗粒生长溶液和1mg/mL的3mL的双(对磺基苯基)苯基膦二水合二钾盐(BSPP)混合。随后，注入2mL的37wt％的甲醛并且振荡2小时以制备具有由氧化铁颗粒制成的核部分和由金制成的壳部分的磁性纳米颗粒。所制备的磁性纳米颗粒用H_2O洗涤并且分散在20mL的H_2O中。图5是制备示例3的磁性纳米颗粒的示意图和TEM图像。图6是制备示例3的磁性纳米颗粒的SEM图像。图7是示出制备示例3的磁性纳米颗粒和根据制备示例1的氧化铁纳米颗粒(核)的尺寸的图表。图8是确认制备示例3的磁性纳米颗粒的磁场特性的结果。

[0114] 参照图5至图7，确认了氧化铁纳米颗粒的直径约为191.8nm，并且表面上具有金的磁性纳米颗粒的直径约为237nm，并且颗粒尺寸也是均匀形成的。参照图8，场为0时的隆起(eminence)指示0，并且矫顽力被测量为小至0，使得因为需要扩增而不会发生凝聚。此外，确认了最大磁场呈现出约16的高值。

[0115] 制备示例4(与改性的引物结合的磁性纳米颗粒的制备)

[0116] 通过将用于扩增冠状病毒的引物附着到上面制备的磁性纳米颗粒来使磁性纳米颗粒官能化。

[0117] 首先，使用单硫醇基团处理在5’末端具有双硫醇基团的反向引物和正向引物。

[0118] 将0.907g(0.0756M)的磷酸二氢钠和3.285g(0.2314M)磷酸氢二钠加到100mL的超

纯水(UPW)中以制备0.307M的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。将0.143g(0.927×10^{-3}摩尔)的1,4-二硫醇苏糖醇(DTT)与150μL的2M的NaOH一起放入5mL的0.307M的PBS中,以制备5.150mL的0.18M的DTT溶液。为了处理单硫醇状态的碱基序列,将120μL(12nmole)的100μM硫醇化引物溶液和150μL的上述制备的DTT溶液注入用铝箔包裹的微管中,然后机械搅拌1小时。

[0119] 制备NAP-5柱,并且将10mL的UPW按3mL、3mL、3mL、1mL依次注入NAP-5柱中以执行平衡反应。将机械搅拌1小时的溶液注入NAP-5柱中,并且额外注入UPW,使得柱中的溶液体积变为500μL。在溶液被完全渗透之后,将微管置于柱的底部。此外,注入500μL的UPW,并且在微管中接收500μL的产物,直到完全流出微管。在另一个微管中将3μL的接收到的溶液与297μL的UPW混合之后,将混合溶液转移到300μL的石英池(石英比色皿)中,并且通过UV-Vis光度法测量吸光度(OD,光密度)值。通过在200至400nm的波长范围内测量总计3次的吸光度,测量波长260nm的吸光度(A260)的平均值,并且计算摩尔浓度(M)。摩尔浓度通过下式1计算。

[0120] [式1]

[0121] M=[A260/(消光系数×光程(1cm))]×稀释因子

[0122] 在从计算的摩尔浓度计算出提取4nmole引物所需的量之后,将相应量的混合溶液分配到若干微管中的每一个中。此后,每个管均被填充UPW,使得溶液的体积为500μL。

[0123] 将制备示例3中制备的10μg的磁性纳米颗粒转移到微管中之后,将钕磁体(约3000至5000高斯)置于管底部并且收集磁性纳米颗粒15分钟。此后,去除上清液并且将收集的磁性纳米颗粒分散在250μL的UPW中。

[0124] 在锥形管中,将100mg的十二烷基硫酸钠(SDS)加入到10mL的UPW中并且涡旋以制备1%(w/v)的SDS溶液。将500μL的4nmol的上述制备的具有单硫醇基团的引物、250μL的洗涤后的磁性纳米颗粒和7.57μL的1%SDS溶液混合并且固定在振荡器上振荡1小时,并且每10分钟超声处理30分钟。振荡执行1小时,然后额外振荡15小时而不进行超声处理。

[0125] 此后,执行盐陈化以去除引物碱基序列的非特异性附着和凝聚。通过将6.644mL的5M的NaCl溶液与3.356mL的UPW混合来制备盐陈化溶液(3.322M NaCl)。加入500μL的PBS(0.1M,pH 7.4)并且与10mg的SDS一起混合到9.5mL的UPW中以制备PBS·SDS溶液(5mM PB,0.1%SDS,pH 7.2)。将84.18μL的PBS·SDS溶液放入管中并且振荡30分钟,然后加入1.69μL的PBS·SDS溶液和15.21μL的盐陈化溶液,涡旋30秒并且超声处理30秒,然后振荡2小时。向其中加入1.69μL的PBS·SDS溶液和15.21μL的盐陈化溶液,并且重复4次涡旋、超声和振荡过程。再次向其中加入3.38μL的PBS·SDS溶液和30.42μL的盐陈化溶液,涡旋30秒,超声30秒,然后振荡1小时。向其中加入3.38μL的PBS·SDS溶液和30.42μL的盐陈化溶液,并且重复3次涡旋、超声和振荡过程。整个过程总共执行8小时,并且加入16.9μL的PBS·SDS溶液和152.1μL的盐陈化溶液。此后,将混合物进一步振荡8小时以使盐陈化充分进行。最终溶液由pH7.2、0.5M NaCl、0.5mM PBS和0.0175%SDS组成。

[0126] 在盐陈化完成之后,执行洗涤过程以仅提取附着有引物的磁性纳米颗粒。在超声处理1分钟之后,将磁体置于试管底部并且将磁性纳米颗粒下沉18分钟。此后,去除上清液,加入1mL的UPW,然后分别涡旋和超声处理30秒,然后再次使用磁体收集磁性纳米颗粒18分钟。在重复总共3次洗涤过程之后,将10μL的UPW加入溶液并且转移到0.2mL的PCR管。使用DynaMag PCR磁分离器收集18分钟附着有引物的磁性纳米颗粒,然后去除上清液,加入5μL

的UPW，并且超声处理30秒。

[0127] [示例1]

[0128] 1.具有冠状病毒特异性碱基序列的磁性纳米颗粒

[0129] 将5μL的附着有反向引物或正向引物的磁性纳米颗粒、10μL的100μM正向引物或反向引物单序列、2μL的靶单序列(COVID-19cDNA，互补DNA)、10μL的10X高保真PCR缓冲液(High Fidelty PCR Buffer)、1μL的10mM dNTP混合物、2μL的50mM $MgSO_4$、0.2μL的铂Taq DNA聚合酶高保真(5U/μL)和24.8μL的UPW加入PCR管并且移液1分钟以均匀混合所有溶液。此后，在重复聚合酶链式反应(PCR)35次之后，将最终附着有扩增产物的磁性纳米颗粒洗涤3次并且分散在5μL的UPW中。

[0130] 这里，根据每个DNA序列的尺寸设置不同的PCR设置。DNA序列使用COVID-19病毒的特异性标记，N(核衣壳蛋白)、E(包膜蛋白)和RdRP(RNA依赖性RNA聚合酶)的序列，并且其尺寸分别为67mer、113mer和100mer。每个DNA序列的单碱基序列是5'-TTACAAACATTGGCCGCAAATTGCACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAGC GTTCTTCGGAATGTCGCGC-3'(N)、5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTTGCTTTCGTGG TATTCTTGCTAGTTACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCGATTGTGTGC GTACTGCTGCAATAT-3'(E)和5'-GTGAAATGGTCATGTGTGGCGGTTCACTATATGTTAAACCAGGTGGAA CCTCATCAGGAGATGCCACAACTGCTTATGCTAATAGTGTTTTTAACAT TTGT-3'(RdRP)。

[0131] 在使用附着有正向引物的磁性纳米颗粒的情况下，使用反向引物和与其互补的靶，并且以相同方式适用剩余条件。

[0132] 此外，关于该DNA序列的信息在以下表1和图9中示出。

[0133] [表1]

[0134]

基因	引物名称	机构	基因位置**	引物类型	序列(5'→3')
N2	2019-nCoV_N2-R	CDC*（美国）	29230-29213	正向引物	GCG CGA CAT TCC GAA GAA
				改性正向引物***	5'硫醇C6 S-S-A15-GCG CGA CAT TCC GAA GAA
	2019-		29164-	反向引物	TTA CAA ACA

[0135]

	nCoV_N2-F		29183		TTG GCC GCA AA
				改性反向引物***	5’硫醇C6 S-S-A15-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA
E	E_Sarbeco_R2	Charite（德国）	26381-26360	正向引物	ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A
				改性正向引物***	5’硫醇C6 S-S-A15-ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A
	E_Sarbeco_F1		26269-26294	反向引物	ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT
				改性反向引物***	5’硫醇C6 S-S-A15-ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT
RdRP	RdRP_SARSr-R1		15530-15505	正向引物	CAR ATG TTA AAS ACA CTA TTA GCA TA
				改性正向引物***	5’硫醇C6 S-S-A15-CAR ATG TTA AAS ACA CTA TTA GCA TA
	RdRP_SARSr-F2		15431-15452	反向引物	GTG ARA TGG TCA TGT GTG GCG G
				改性反向引物***	5’硫醇C6 S-S-A15-GTG ARA TGG TCA TGT GTG GCG G

[0136] 在上表1中，*CDC为疾病预防控制中心，并且**为从Wuhan-Hu-1、严重急性呼吸系统综合症冠状病毒2的全基因中分离出来的特定核苷酸序列。***为改性的反向引物或正向引物，其通过对反向引物或正向引物的5’末端进行改性并且将AAAAAAAAAAAAAAA(A15间隔区，A是腺嘌呤)附着到改性的5’末端使用通过硫醇改性的C6 S-S组进行改性。此外，在表中，通过SARS-CoV-2RNA逆转录生成的互补DNA(cDNA)用作PCR扩增的模板。因此，根据逆转录的RNA，与模板cDNA杂交的引物是反向引物或正向引物，其中与cDNA链互补的DNA链杂交的引物是正向引物或反向引物。

[0137] 选定的靶碱基序列(N、E、RdRP)基于FDA紧急批准的基于逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)的COVID-19诊断试剂盒的数据(图10和图11)。图10和图11，a)表示检测限(LoD)，且b)表示循环阈值(Ct)。在图10和图11中，ORF代表开放阅读框；RdRP表示依赖于RNA的RNA聚合酶；S表示尖峰；E表示包膜；N表示核衣壳的缩写。

[0138] 表2示出了将改性引物附着到磁性纳米颗粒之前和之后的尺寸比较。在每个样本实验5次之后，通过动态光散射(DLS)测量直径。

[0139] [表2]

[0140]

磁性纳米颗粒的类型	流体动力学直径（d.nm）	多分散性指数（PDI）
官能化磁性纳米颗粒 1	290.3	0.096
官能化磁性纳米颗粒 2	277.4	0.264
官能化磁性纳米颗粒 3	289.4	0.253
官能化磁性纳米颗粒 4	300	0.152
官能化磁性纳米颗粒 5	294.1	0.279
平均值	**290.2 ± 8.3**	**0.209 ± 0.080**
磁性纳米颗粒 1	233	0.141
磁性纳米颗粒 2	245.5	0.002
磁性纳米颗粒 3	215.6	0.260
磁性纳米颗粒 4	272	0.291
磁性纳米颗粒	255.6	0.046
平均值	**244.3 ± 21.5**	**0.148 ± 0.127**

[0141] 这里,改性引物在5’末端附着硫醇基团用于将反向引物或正向引物与金结合,并且将序列A附加到15mer(A15间隔区),使得通过确保距磁性纳米颗粒表面的距离来良好结合靶单序列。这里,5’末端的硫醇基团通过与磁性纳米颗粒的表面上的金的还原反应与游离硫醇基团形成强键,并且将改性的引物结合到磁性纳米颗粒的表面。改性的引物与COVID-19cDNA的特定序列互补结合,并且通过nSLAM反应从5’末端聚合到3’末端。

[0142] 图9示出了用于检测COVID-19的nSLAM引物组、COVID-19生物标志物的基因位置以及COVID-19cDNA和附着到磁性纳米颗粒表面的引物的结合模式。要使用的引物组的来源分别是2019-nCoV_N2(CDC,美国)、E_Sarbeco(Charite,德国)和RdRP_SARSr(Charite,德国)。

[0143] 2.使用附着有改性的反向引物的磁性纳米颗粒(官能化磁性纳米颗粒)的nSLAM机制

[0144] 在官能化磁性纳米颗粒的纳米颗粒表面局部扩增(nSLAM)的第一个循环中,靶DNA互补地结合到磁性纳米颗粒的表面上的反向引物。此后,靶DNA用作模板链,以通过DNA聚合酶和dNTP聚合到模板链的3’末端。

[0145] 在nSLAM的第二个循环中,模板链与磁性纳米颗粒的表面分离,并且与模板链互补的单DNA链保留在磁性纳米颗粒的表面上。这里,特定序列的正向引物互补结合,并且磁性纳米颗粒的表面上的DNA单链被用作模板,以通过DNA聚合酶和dNTP再次聚合。

[0146] 在nSLAM的第三个循环中,从正向引物聚合的新的单DNA链与磁性纳米颗粒的表面分离并且通过与相邻的游离反向引物结合而再次聚合。保留在磁性纳米颗粒中的聚合单DNA链也通过与相邻的游离正向引物结合而重新聚合。

[0147] 随着该过程的重复和nSLAM循环的重复,同时聚合的DNA链的数量增加,并且在磁性纳米颗粒的表面上捕获的双链DNA增加。此外,双链和单链靶DNA同时存在,以复合DNA的形式存在。

[0148] 图12逐步示出了基于使用SARS-CoV-2(以下称为COVID-19)的官能化磁性纳米颗

粒的nSLAM反应机制。图12的步骤1和2是nSLAM的第一个循环，并且SARS-CoV-2的cDNA与磁性纳米颗粒的改性反向引物互补结合，然后DNA聚合。图12的步骤3至5是nSLAM的第二个循环，以及其中在模板链分离之后，正向引物与附着到磁性纳米颗粒的单个DNA结合以再次聚合的状态。图12的步骤6至7是nSLAM的第三个循环，以及其中从正向引物聚合的单链分离并且与相邻的反向引物结合，并且保留在磁性纳米颗粒中的单链与新的相邻正向引物结合以再次聚合的状态。

[0149] 在这种情况下，步骤7的橙色(o)和红色(r)DNA链是与靶DNA序列相同的链，并且使用DNA链作为模板扩增的双链与靶DNA序列的双链相同。另一方面，使用由蓝色(b)、浅蓝色(lb)和灰色(g)组成的长单链作为模板聚合的DNA具有部分双链复合DNA。因此，在步骤8中，大部分扩增产物为靶DNA序列的双链形式，但是少数产物具有仅在长单链上的特定位点以双链存在的形式。

[0150] [示例2]

[0151] 1.包含nSLAM扩增产物的磁性纳米颗粒的电化学检测

[0152] 与靶DNA序列一样长的双螺旋附着到磁性纳米颗粒的表面，在nSLAM之后执行针对靶DNA序列的特异性扩增的改性反向引物。因此，这些双螺旋所附着的磁性纳米颗粒的尺寸变得与靶DNA序列的长度一样大，并且当靶DNA序列为N2、E和RdRP时，分别形成约为82mer、128mer和115mer的尺寸。

[0153] 分别制备5μL的每个nSLAM扩增产物，其包含大部分在上方形成的磁性纳米颗粒。

[0154] 将10Ω/sq和0.7T的ITO基板(20mm×30mm)用丙酮、乙醇和水洗涤3次，并且与电化学检测容器(池)的底部紧密接触固定。将5μL的nSLAM扩增产物注入电化学检测容器底部的圆孔中，并且与ITO基板接触。在圆孔底部施加磁场2分钟以收集基板上的nSLAM扩增产物中的所有磁性纳米颗粒之后，将1mL的包含50μM $Ru(NH_3)_6Cl$和4mM $K_3Fe(CN)_6$作为电催化报告成对溶液注入检测容器中并且立即移除所施加的磁场。该状态保持18分钟，直到磁性纳米颗粒的表面上的DNA沉入ITO基板底部，与溶液中的离子发生反应。

[0155] 18分钟后，使用恒电位仪(EM-stat3/Palmsense)将参考电极(管形Ag/AgCl参考电极)、对电极(线形Pt对电极)和工作电极(ITO基板)彼此连接以设置3个电极。在EM-stat3器件切换到差分脉冲伏安法(DPV)模式之后，设置脉冲高度为50mV，脉冲宽度为0.05s，步高为5mV，步宽为0.1s，并且施加0至-0.5V的电压，并且测量每个溶液中生成的电流值的峰值。

[0156] 当通过连接三电极系统向DPV施加电压时，电子依次通过电极、ITO基板、磁性纳米颗粒的表面和扩增的DNA双链转移到溶液中的钌离子，并且离子被还原。被还原的钌离子通过向周围的铁离子转移电子而被再次氧化，并且在重复这种电子转移过程的同时，生成氧化还原电流。电流信号具有玻尔兹曼曲线的形状，其中存在峰值。DNA双链的数量和长度越大，带负电荷越多的DNA越可能吸引更多的钌阳离子，并且与仅附着有改性的反向引物的磁性纳米颗粒相比，具有附着到表面的扩增DNA产物的磁性纳米颗粒的电子移动更活跃，使得测量到相当高的电流值(测量的电流信号的峰值相当高)。通过使用电流信号高度的这种差异，可以检查是否存在SARS-CoV-2遗传物质，这可以立即诊断是否感染COVID-19。

[0157] [示例3]

[0158] 使用本公开的诊断试剂盒执行实验以确定诊断是否感染COVID-19所需的靶DNA的最小浓度。

[0159] 首先，测量COVID-19cDNA的检测限(LoD)。检测限是被确定为可被传感器检测到的特定目标的目标的最小浓度。为此，将COVID-19cDNA的浓度分别设置为10^{-25}M、10^{-22}M、10^{-19}M、10^{-16}M、10^{-13}M和10^{-10}M，并且在每个浓度下执行nSLAM。将nSLAM扩增产物置于检测容器中，并且通过DPV电化学检测确认超过信号阈值的最小浓度。

[0160] 首先，制备用于nSLAM的cDNA。通过RNA的逆转录制备cDNA，并且基于要制备和注入的cDNA量转换RNA量。对包含相同量RNA的若干样本进行逆转录产生的cDNA量进行统计，然后汇总在表3中。结果，确认7个cDNA样本的平均转换值约为5.08倍。

[0161] [表3]

[0162]

RNA样本	RNA浓度**（ng/μL）	使用体积（μL）	cDNA样本	cDNA浓度***（ng/μL）	cDNA溶液的总体积（μL）	cDNA总量（μg）	转换因子†（从RNA到cDNA）	平均转换因子
RNA 1	53.3	46.9 (2.5 μg RNA)	cDNA_1	242.2	59.4	14.39	5.76	5.08 (±0.41)
RNA 2	58.2	42.9 (2.5 μg RNA)	cDNA_2	218.8	55.4	12.12	4.85	
RNA 3	57.3	43.6 (2.5 μg RNA)	cDNA_3-1	231.5	56.1	12.99	5.20	
			cDNA_3-2	226.1	56.1	12.68	5.07	
			cDNA_3-3	228.4	56.1	12.81	5.12	
RNA 4	57.7	43.3 (2.5 μg RNA)	cDNA_4-1	196.9	55.8	10.99	4.40	
			cDNA_4-2	231.5	55.8	12.92	5.17	

[0163]

[0164] 表3的指标如下。*表示从国家病原体培养物保藏中心(National Culture Collection for Pathogens)获得的亚临床RNA样本(NCCP#43327)，SARS-CoV-2病毒是从感染患者获得的，并且RNA在获得前经过NCCP提取和纯化。**表示通过式2和UV-Vis吸光度测量计算的RNA浓度。

[0165] [式2]

[0166] 浓度(ng/μL)＝λ_{max}吸光度/光程(1cm)×转换因子(40ng/μL)×稀释因子(100×)(n＝3/样本)

[0167] ***表示通过式3和UV-Vis吸光度测量计算的cDNA浓度。

[0168] [式3]

[0169] 浓度(ng/μL)＝λ_{max}吸光度/光程(1cm)×转换因子(33ng/μL)×稀释因子(100×)(n＝3/样本)

[0170] †表示根据转换因子从1μg的SARS-CoV-2RNA生成的cDNA量(μg)。

[0171] 从韩国疾病控制和预防机构(KDCA)的国家病原体培养物保藏中心(NCCP)接收到SARS-CoV-2野生型RNA样本(COVID-19遗传物质),并且获得从实际患者提取的半临床样本以使用用于RT-PCR的Superscript III第一链合成系统(First-Strand Synthesis System)(Invitrogen)逆转录试剂盒合成具有与该RNA互补的序列的单链cDNA。将2.5μg的SARS-CoV-2RNA、0.5μL的随机六聚体(50ng/μL)和1μL的10nM dNTP混合物加入PCR管,然后填充10μL的UPW。此后,将混合物在65℃下培养5分钟并且在冰上冷却1分钟。进一步将2μL的10XRT缓冲液、4μL的25mM $MgCl_2$、2μL的0.1M DTT、1μL的40U/μL的RNaseOUT和1μL的200U/μL的SuperScript III逆转录酶加入管,然后依次在25℃下培养10分钟和在50℃下培养50分钟。最后,将混合物在85℃下培养5分钟并且在冰上冷却5分钟。向其加入1μL的2U/μL的E.coli RNaseH,并且在37℃下培养20分钟,并且在4℃下储存制备的cDNA。

[0172] 将上述制备示例中制备的5μL的官能化磁性纳米颗粒加入21个PCR管。在这些管中的18个管中,分别加入24.8μL的UPW、5μL的10X高保真PCR缓冲液、1μL的10mM dNTP混合物、2μL的50mM $MgSO_4$、0.2μL的铂Taq DNA聚合酶高保真(5U/μL)和10μL的正向引物,然后按三个管分束(共6束),并且向每个束加入2μL的上文所述的不同浓度的每个cDNA。在管充分混合之后,对18个管执行nSLAM扩增。执行一次30秒的初始变性(95℃),并且通过设置15秒的变性(94℃),30秒的退火(53℃)和1分钟的延伸(68℃),然后在4℃终止来执行35次nSLAM循环。为了在nSLAM过程期间保持颗粒的均匀分散,当第18个nSLAM循环的延伸经过55秒时取出管并且对其进行30秒超声处理,然后再次执行nSLAM。

[0173] 在nSLAM完成之后,执行洗涤过程以提取nSLAM扩增产物。将21个管放入DynaMag PCR磁分离器中,并且收集颗粒18分钟。在除去上清液之后,加入20μL的UPW,超声处理30秒,然后放入磁分离器以收集颗粒18分钟。该洗涤过程重复3次,并且将收集到的颗粒最终分散在5μL的UPW中。

[0174] 通过比较上述经受nSLAM处理的18个管与未经受nSLAM的3个管之间的电化学信号来确认扩增。电化学信号检测方法以与示例2相同的方式执行,并且每个溶液测量12次电化学信号。使用下式4计算阈值。

[0175] [式4]

[0176] 阈值＝(控制样本平均信号)+(3×控制样本信号的标准偏差)

[0177] 使用COVID-19碱基序列的RNA依赖性RNA聚合酶(RdRP)部分的测量结果导出和分析S型曲线(Sigmoid拟合)。结果,经确认,当cDNA的浓度为0.455×10^{-18}M(0.274份/μL)或更高时,信号超过阈值,并且通过考虑每个COVID-19RNA 1份的5.08份的cDNA对应于RNA 0.054份/μL来转换浓度。这显著低于现有的分子诊断试剂盒的1至2份/μL RNA(1aM水平)的检测限,并且与现有的诊断试剂盒相比,可以使用非常少的量诊断冠状病毒。

[0178] 图13是示出在对COVID-19遗传物质的RdRP碱基序列执行nSLAM时的DPV电化学信号根据COVID-19RNA的浓度的变化的结果。

[0179] 这是在每个RNA浓度下测量经过35次nSLAM的扩增产物的DPV的结果。检测限为RNA 0.054份/μL。

[0180] 此外，nSLAM中的退火步骤的温度设置是在各种温度下进行实验后设置的，以找到最佳温度。该实验通过对每个温度执行PCR之后的基因的电泳来确认，并且电泳结果如图14所示。

[0181] 在实际的nSLAM过程中，样本首先在95℃下预热30秒，然后进入全尺度循环，并且一个循环包括95℃的15秒的变性步骤、53℃的30秒的退火步骤以及68℃的1分钟的延伸步骤。这里，为了找到在引物与模板链结合的退火步骤中可以产生最多扩增产物的最佳温度，PCR过程在三个温度区间中进行。考虑到引物的熔点Tm，将退火温度Ta设置为比Tm低的温度区间，并且确认所有引物的熔点都在50℃后段至60℃中段。因此，设置的Ta温度区间被设置为比其低的53℃、56℃、59℃。

[0182] 与实际的nSLAM不同，使用经过简单5’末端处理的改性的反向引物，而不是附着到磁性纳米颗粒的反向引物。每个引物组用于N2、E和RdRP靶，并且每个引物组的Ta被不同地设置成53℃、56℃和59℃，并且执行简单PCR(每个引物组35个循环)。

[0183] 此后，将扩增产物装载在1.8％琼脂糖凝胶上，然后在180V电源下执行电泳80分钟。在图14中，与左侧50bp DNA梯相比，针对每个靶制作的条带位置对应于扩增产物的预期尺寸，并且当彼此比较Ta时，对于所有靶在53℃形成最亮和最强的条带，这意味着合成了最多的扩增产物。

[0184] 基于此，通过将退火温度设置成53℃来执行实际的nSLAM过程。

[0185] [示例4]

[0186] 使用本公开的诊断试剂盒执行实验以确定诊断是否感染COVID-19所需的最小nSLAM循环数量。

[0187] 首先，将制备示例中制备的5μL官能化磁性纳米颗粒分别加入27个PCR管中。除3个管之外，在剩余的24个管中，分别加入24.8μL的UPW、5μL的10X高保真PCR缓冲液、1μL的10mM dNTP混合物、2μL的50mM $MgSO_4$、0.2μL的铂Taq DNA聚合酶高保真(5U/μL)、10μL的100μM正向引物和2μL的浓度为1fM的SARS-CoV-2cDNA。以与上述示例3相同的方式执行cDNA的制备方法。通过按三个管将24个管分束(共8束)，对每个束执行不同数量的nSLAM循环。nSLAM循环数量被分别设置成3、5、10、15、20、25、30和35次。对于在充分混合溶液之后的24个管，执行一次30秒的初始变性(95℃)，并且通过设置15秒的变性(94℃)、30秒的退火(53℃)和1分钟的延伸(68℃)来执行预定数量的PCR，然后在4℃终止。为了在nSLAM过程期间保持颗粒的均匀分散，在具有总共5个nSLAM循环的样本的第三个循环、具有10个nSLAM循环的样本的第五个循环、具有15个nSLAM循环的样本的第8个循环、具有20个nSLAM循环的样本的第10个循环、具有25个nSLAM循环的样本的第13个循环、具有30个nSLAM循环的样本的第15个循环和具有35个nSLAM循环的样本的第18个循环中，在延伸步骤的55秒时，取出管并且对其进行30秒超声处理，然后再次执行nSLAM。

[0188] 在nSLAM过程之后，以与其他示例相同的方式执行洗涤。

[0189] 这里，在COVID-19cDNA上扩增的靶序列是RNA依赖性RNA聚合酶(RdRP)序列，并且如表1所述使用nSLAM中使用的反向和正向引物。

[0190] 27个管(包括3个对照样本)的电化学检测处理也以与其他示例相同的方式执行。

[0191] 作为使用RdRP序列的测量结果，确认从第三个nSLAM循环开始超过阈值。

[0192] 甚至对N2(核衣壳蛋白)和E(包膜蛋白)的碱基序列也执行了相同的实验。当仅设

置一个靶基因时，由于容易受到碱基序列多样性的影响并且误诊率高，世界卫生组织(WHO)推荐设置两种或三种类型的靶基因用于COVID-19的分子诊断。其中一种是筛选化验，而另一种是确证化验，并且需要配置至少一个COVID-19特异性序列。当设置三个靶时，仅当所有三个基因都被检测到时，才能诊断出COVID-19阳性，从而增加了可靠性。在本实验中，E基因被设置为COVID-19所属的beta-冠状病毒族中保存的基因，并且RdRP和N2基因为仅针对COVID-19特异性存在的序列，其用作验证性分析。

[0193] 这里，当COVID-19cDNA的靶序列为N2时，使用2019-nCoV_N2引物组(CDC，美国)，并且靶单序列为5’GCGCGACATTCCGAAGAACGCTGAAGCGCTGGGGGCAAATTGTGCAATTTGCGGCCAATGTTTGTAA-3’，其由67mer组成。附着到磁性纳米颗粒的反向引物使用5’末端经过处理的改性的反向引物，并且具有5’-AAAAAAAAAAAAAAAAATTACAAACATTGGCCGCAAA-3’碱基序列。在nSLAM中，与水溶液中的靶单序列的互补单序列反应的正向引物由5’-GCGCGACATTCCGAAGAA-3’组成。

[0194] 当cDNA的靶序列为E时，使用RdRP_SARSr引物组(Charitι，德国)，并且靶单序列为5’ATATTGCAGCAGTACGCACACAATCGAAGCGCAGTAAGGATGGCTA GTGTAACTAGCAAGAATACCACGAAAGCAAGAAAAGAGAAGTACGCT ATTAACTATTAACGTACCTGT-3’，其由113mer组成。附着到磁性纳米颗粒的反向引物使用5’末端经过处理的改性的反向引物，并且具有5-AAAAAAAAAAAAAAAAACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3’碱基序列。在nSLAM中，与水溶液中的靶单序列的互补单序列反应的正向引物由5’-ATATGCAGCAGTACGCACACA-3’组成。

[0195] 对于N2和E靶，nSLAM循环数量简化为3、5、10、15、25和35次，并将5μL的官能化磁性纳米颗粒分别加入42个PCR管(附着有N2基因的改性的反向引物的21个磁性纳米颗粒和附着有E基因的改性的反向引物的21个磁性纳米颗粒)。除了3个N2检测管和3个E检测管，以与对RdRP靶执行的nSLAM相同的方式将试剂分别加入剩余的36个管。将18个N2检测管和18个E检测管按每3个管分组(6组N2检测管组，6组E检测管组)，每组的nSLAM循环数量不同。6组N2检测管组和E检测管组中的每一个的nSLAM循环被设置成3次、5次、10次、15次、25次、35次。在管中的溶液充分混合之后，执行nSLAM扩增。执行一次30秒的初始变性(95℃)，并且通过设置15秒的变性(94℃)、30秒的退火(53℃)和1分钟的延伸(68℃)来执行3至35次的nSLAM循环，然后在4℃终止。为了在nSLAM过程期间保持颗粒的均匀分散，在具有总共5个nSLAM循环的样本的第3个循环、具有10个nSLAM循环的样本的第5个循环、具有15个nSLAM循环的样本的第8个循环、具有25个nSLAM循环的样本的第13个循环和具有35个nSLAM循环的样本的第18个循环中，在延伸步骤的55秒时，取出管并且对其进行30秒超声处理，然后再次执行nSLAM。

[0196] 在nSLAM过程之后，溶液的洗涤过程和电化学检测过程以与其他示例相同的方式执行。

[0197] 作为测量的结果，N2靶的3.9个nSLAM循环和E靶的3.4个nSLAM循环超过了阈值。

[0198] 通过这一点，确认所有检测靶(N2、E、RdRP序列)的最小可检测nSLAM循环数量为4次。在常规的分子诊断的情况下，PCR循环平均设置成35至40个循环，并且所需时间约为3小时，使得诊断的大部分时间消耗在PCR步骤中。相比之下，本公开能够将nSLAM循环缩短为4次，并且将所需时间大幅缩短至约7.5分钟，使得可望实现病毒源性传染病发生的实际现场所需的快速现场诊断。

[0199] 图15和图16是示出在对实验示例中的COVID-19遗传物质的N2、E和RdRP碱基序列执行PCR时，在均匀保持靶序列的COVID-19cDNA的浓度时，DPV电化学信号根据nSLAM循环数量而变化的示图。

[0200] 图15中的a示出了对于RdRP碱基序列在1fM cDNA浓度下在每个nSLAM循环之后的电化学信号的平均峰值电流值，并且已经确认可检测的nSLAM循环的最小数量是3次(需要约75分钟)。

[0201] 图15中的b示出了对于E碱基序列在1fM cDNA浓度下在每个nSLAM循环之后的电化学信号的平均峰值电流值，并且已经确认可检测的nSLAM循环的最小数量是3.4次(需要约6.3分钟)。

[0202] 图15中的c示出了对于N2碱基序列在1fM cDNA浓度下在每个nSLAM循环之后的电化学信号的平均峰值电流值，并且已经确认可检测的nSLAM循环的最小数量是3.9次(需要约7.3分钟)。

[0203] 图16是示出对N2、E和RdRP碱基序列在1fM cDNA浓度下在每个nSLAM循环之后在通过非线性回归处理电化学测量值之后比较阈值附近的数据的示图。每个靶的阈值被单独指示，并且所有靶的可检测nSLAM循环的最小数量为4(需要约7.5分钟)。

[0204] [比较例1]

[0205] 执行实验以确认将反向引物的序列附着到磁性纳米颗粒的表面的效率。通过将正向引物的序列而非反向引物的序列附着到磁性纳米颗粒的表面来执行nSLAM，并且比较电流信号的差异。检测靶被设置为RdRP基因序列。

[0206] 首先，以与上述示例相同的方式制备用于分子诊断nSLAM的cDNA。作为磁性纳米颗粒，制备附着有制备示例中制备的改性的反向引物的磁性纳米颗粒和附着有改性的正向引物的磁性纳米颗粒。

[0207] 对于正向引物，通过处理5'末端来制备改性的正向引物以附着到磁性纳米颗粒的表面。在正向引物的处理中，以与制备示例相同的方式将A15间隔区和硫醇基团附着到RdRP_SARSr正向引物的5'末端，并且制备5'-AAAAAAAAAAAAAAACARATGTTAAASACACTATTAGCATA-3'序列的单链。以与制备示例相同的方式将该单序列附着到磁性纳米颗粒的表面。此外，还制备未改性的正向和反向引物，用于nSLAM反应一起进行，并且反向引物的碱基序列为'-GTGARATGGTCATGTGTGGCGG-3'(RdRP_SARSr反向引物)。

[0208] 为了比较附着有改性的正向引物的磁性纳米颗粒和附着有改性的反向引物附着的磁性纳米颗粒的电化学信号，通过稀释10^{-25}M、10^{-19}M、10^{-16}M和10^{-10}M浓度制备cDNA。

[0209] 将5μL的附着有改性的反向引物的磁性纳米颗粒加入15个PCR管。在除三个PCR管之外的12个管中，分别加入24.8μL的UPW、5μL的10X高保真PCR缓冲液、1μL的10mM dNTP混合物、2μL的50mM $MgSO_4$、0.2μL的铂Taq DNA聚合酶高保真(5U/μL)和10μL的100μM正向引物(5'-CARATGTTAAASACACTATTAGCATA-3')，然后按三个管将12个管分束(共4组)，并且每组加入2μL的不同浓度的每个cDNA。在溶液充分混合之后，对12个管执行nSLAM扩增。执行一次30秒的初始变性(95℃)，并且通过设置15秒的变性(94℃)、30秒的退火(53℃)和1分钟的延伸(68℃)来执行nSLAM循环，然后在4℃终止。为了在nSLAM过程期间保持颗粒的均匀分散，在nSLAM循环期间当第18个nSLAM循环的延伸经过55秒时取出管并且对其进行30秒超声处理，然后再次执行nSLAM。

[0210] 在nSLAM完成之后，以与上述示例相同的方式执行用于提取nSLAM扩增产物的洗涤过程和电化学信号检测过程。

[0211] 将5μL的附着有改性的正向引物的磁性纳米颗粒加入15个PCR管。在除三个PCR管之外的12个管中，分别加入24.8μL的UPW、5μL的10X高保真PCR缓冲液、1μL的10mM dNTP混合物、2μL的50mM $MgSO_4$、0.2μL的铂Taq DNA聚合酶高保真(5U/μL)和10μL的100μM正向引物(5'-GTGARATGGTCATGTGTGGCGG-3')，然后按三个管将12个管分束(共4组)，并且每组加入2μL的不同浓度(10^{-25}M、10^{-19}M、10^{-16}M和10^{-10}M)的每个cDNA。在溶液充分混合之后，对12个管执行nSLAM扩增，并且以与反向引物相同的方式执行nSLAM设置、nSLAM之后的洗涤过程、电化学信号测量和数据布置。

[0212] 作为两个实验的结果，确认附着有改性的反向引物的磁性纳米颗粒的平均电流值整体较高，并且信号差异随着cDNA浓度的增加而变大。此外，附着有改性反向引物的磁性纳米颗粒的平均电流信号值超过10^{-19}M cDNA或更高的浓度区间的阈值，但是在附着有改性的正向引物的磁性纳米颗粒的情况下，阈值高于反向引物，并且平均电流值整体较低，使得在10^{-19}McDNA或更低的浓度下不超过阈值。也就是说，在相同的靶遗传物质浓度下使用附着有改性的反向引物的磁性纳米颗粒时，电化学信号电流值较高，并且超过阈值的cDNA浓度区间较宽。因此，这意味着即使在比使用附着有改性的正向引物的磁性纳米颗粒时的浓度更低的浓度下也能够进行检测。通过这一点，当使用附着有改性的反向引物的磁性纳米颗粒执行nSLAM时，可以进一步提高检测系统的灵敏度。

[0213] 图17示出了在执行上述实验之后通过电化学测量获得的平均峰值电流值。误差条表示每个样本的电流值的标准偏差。蓝色虚线L1和橙色虚线L2分别表示基于附着有改性的反向引物的磁性纳米颗粒的对照样本和附着有改性的正向引物的磁性纳米颗粒的对照样本的平均峰值电流值计算的阈值。总体而言，反向引物的nSLAM样本的电流值较高，最佳拟合线的斜率较大，并且测量的cDNA浓度区间中的所有电流值均超过阈值。

[0214] [比较例2]

[0215] 在使用本公开的示例诊断冠状病毒的情况下测试了COVID-19的特异性以确定其他遗传物质是否可能具有影响。

[0216] 作为阴性对照靶，选择与COVID-19属于同一beta病毒族的MERS-CoV和HCoV-OC43。这两个靶接收自国家病原体培养物保藏中心(NCCP)。所有靶是取自实际感染者的半临床样本，并且对于每个靶，使用N2、E和RdRP基因的附着有改性的反向引物的磁性纳米颗粒执行nSLAM过程。以与示例相同的方式制备每种RNA遗传物质的cDNA的合成。将制备示例中制备的N2、E和RdRP基因的5μL的附着有改性的反向引物的磁性纳米颗粒分别加入36个PCR管(每12个管)。除用于N2检测的3个管、用于E检测的3个管和用于RdRP检测的3个管之外，以与示例相同的方式将PCR试剂加入剩余的27个管。然而，在9个N2、E和RdRP样本中，分别地，3个样本注有SARS-CoV-2(COVID-19)cDNA，3个样本注有MERS-CoV cDNA，并且剩余3个样本注有HCoV-OC43cDNA。

[0217] 以与示例相同的方式对加入PCR试剂的27个样本执行nSLAM。执行一次30秒的初始变性(95℃)，并且通过设置15秒的变性(94℃)、30秒的退火(53℃)和1分钟的延伸(68℃)来执行nSLAM循环，然后在4℃终止。为了在nSLAM过程期间保持颗粒的均匀分散，在nSLAM循环期间当第18个nSLAM循环的延伸经过55秒时取出管并且对其进行30秒超声处理，然后再次

执行nSLAM。

[0218] 在nSLAM完成之后,以与示例相同的方式执行用于提取nSLAM扩增产物的洗涤过程和电化学信号规范。

[0219] 作为测量的结果,所有序列靶中仅COVID-19野生型RNA(以下称为SARS-CoV-2RNA)靶特异性地超过了阈值,并且对于MERS-CoV和HCOV-OC43,所有扩增碱基序列的信号未超过阈值。结果,可以确认使用本公开的COVID-19分子诊断系统仅对COVID-19遗传物质特异性地引起基因扩增。

[0220] 图18示出了上述实验的结果,示出了COVID-19模型的特异性。虚线表示在没有使用每个基因序列(N2、E、RdRP碱基序列)的附着有改性的反向引物的磁性纳米颗粒执行nSLAM的情况下,使用样本(对照样本)的电化学信号计算的阈值。对于所有类型的基因序列,仅在注有SARS-CoV-2靶的样本中测量到超过阈值的电流值。

[0221] 图19是在执行PCR以确认与SARS-CoV-2以外的基因存在交叉反应之后通过电泳获得的图像。对于SARS-CoV-2以外的基因材料,可以确认几乎没有形成条带,并且与电化学信号测量结果一样,不会与其他基因材料发生交叉反应。

[0222] 本领域技术人员将能够理解,在不改变本公开的技术精神或本质特征的情况下,本公开可以容易地以其他详细形式实施。因此,应认识到,上述实施方式在所有方面都是示例性的,而不是限制性的。本公开的范围由下面将要描述的权利要求而不是由详细描述来表示,并且将被解释为权利要求的含义和范围以及从其等同物得到的所有变化或修改形式都包含在本公开的范围内。

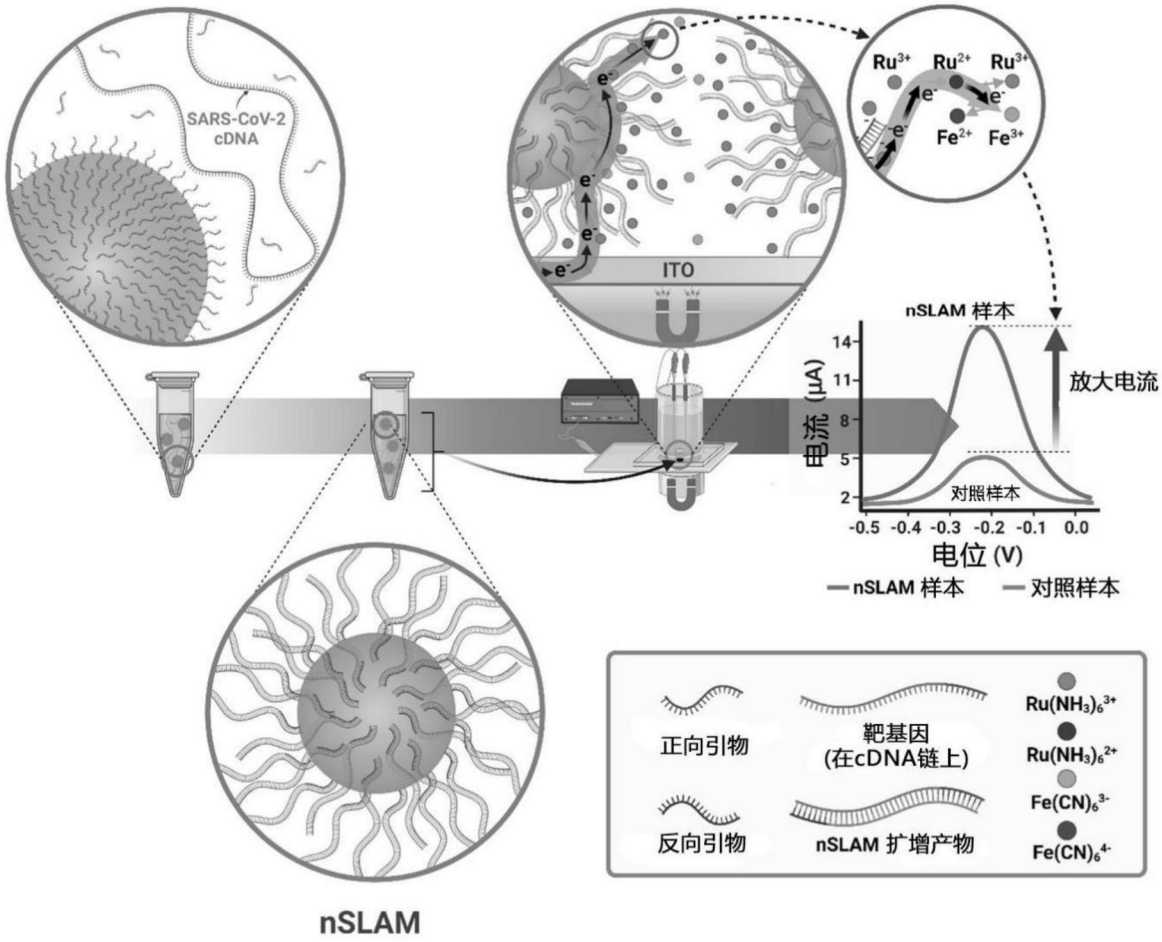

SARS-CoV-2
cDNA
ITO
nSLAM
nSLAM 样本
放大电流
电流 (μA)
对照样本
电位 (V)
nSLAM 样本
对照样本
正向引物
靶基因
(在cDNA链上)
反向引物
nSLAM 扩增产物

图1

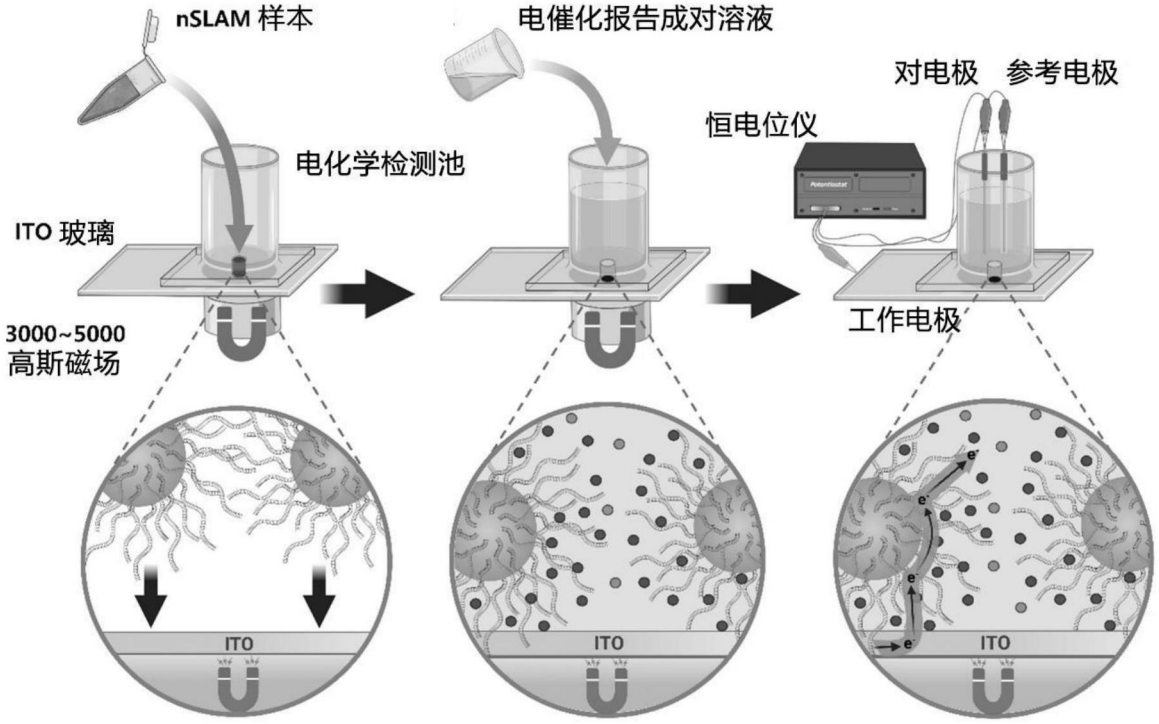

nSLAM 样本
电催化报告成对溶液
对电极
参考电极
恒电位仪
电化学检测池
ITO 玻璃
3000~5000
高斯磁场
工作电极
ITO
ITO
ITO

图2

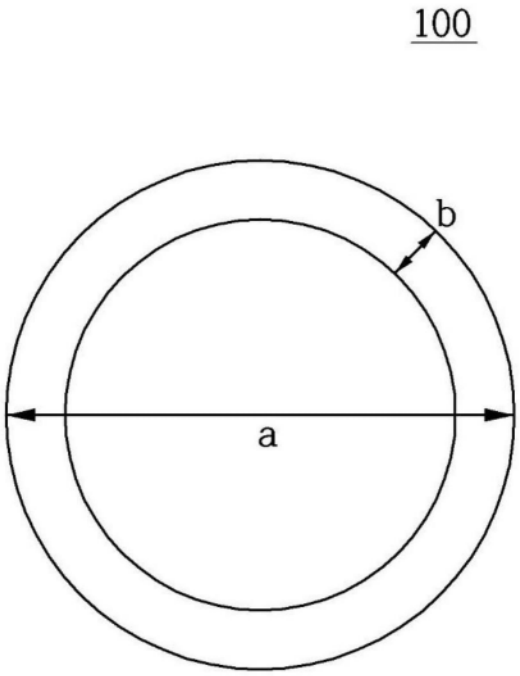

100
b
a

图3

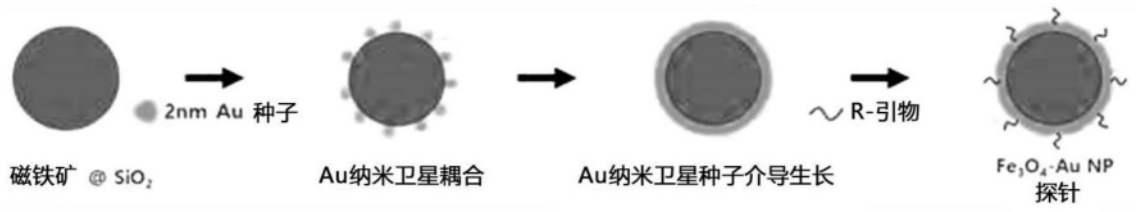

2nm Au 种子
R-引物
磁铁矿 @ SiO_2
Au纳米卫星耦合
Au纳米卫星种子介导生长
Fe_3O_4-Au NP
探针

图4

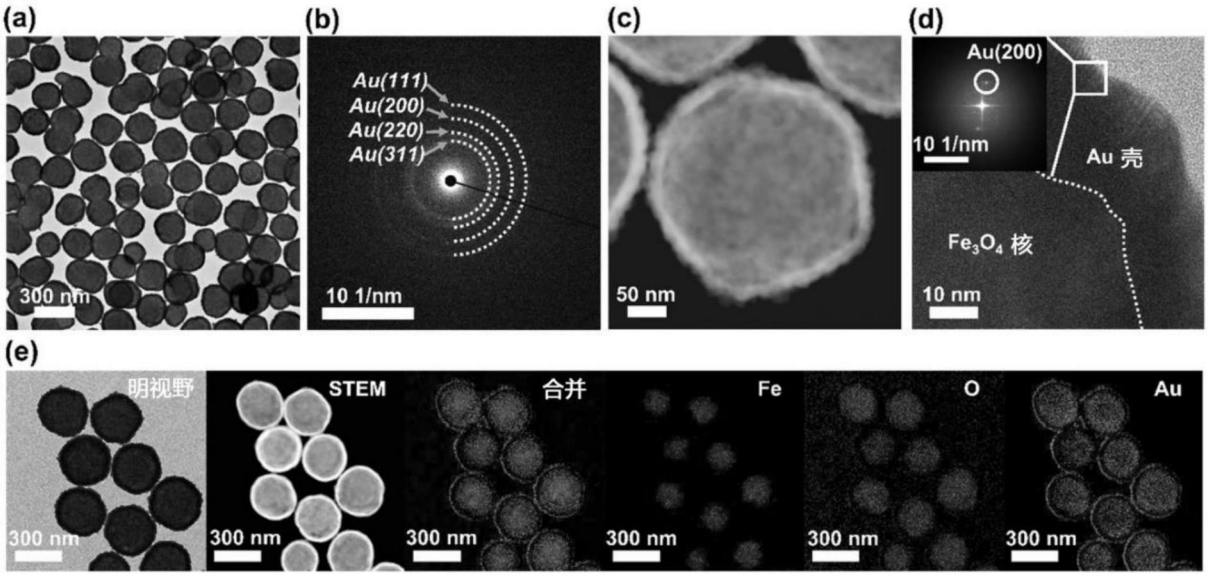

(a)
300 nm
(b)
Au(111)
Au(200)
Au(220)
Au(311)
10 1/nm
(c)
50 nm
(d)
Au(200)
10 1/nm
Au 壳
Fe_3O_4 核
10 nm
(e)
明视野
STEM
合并
Fe
O
Au
300 nm

图5

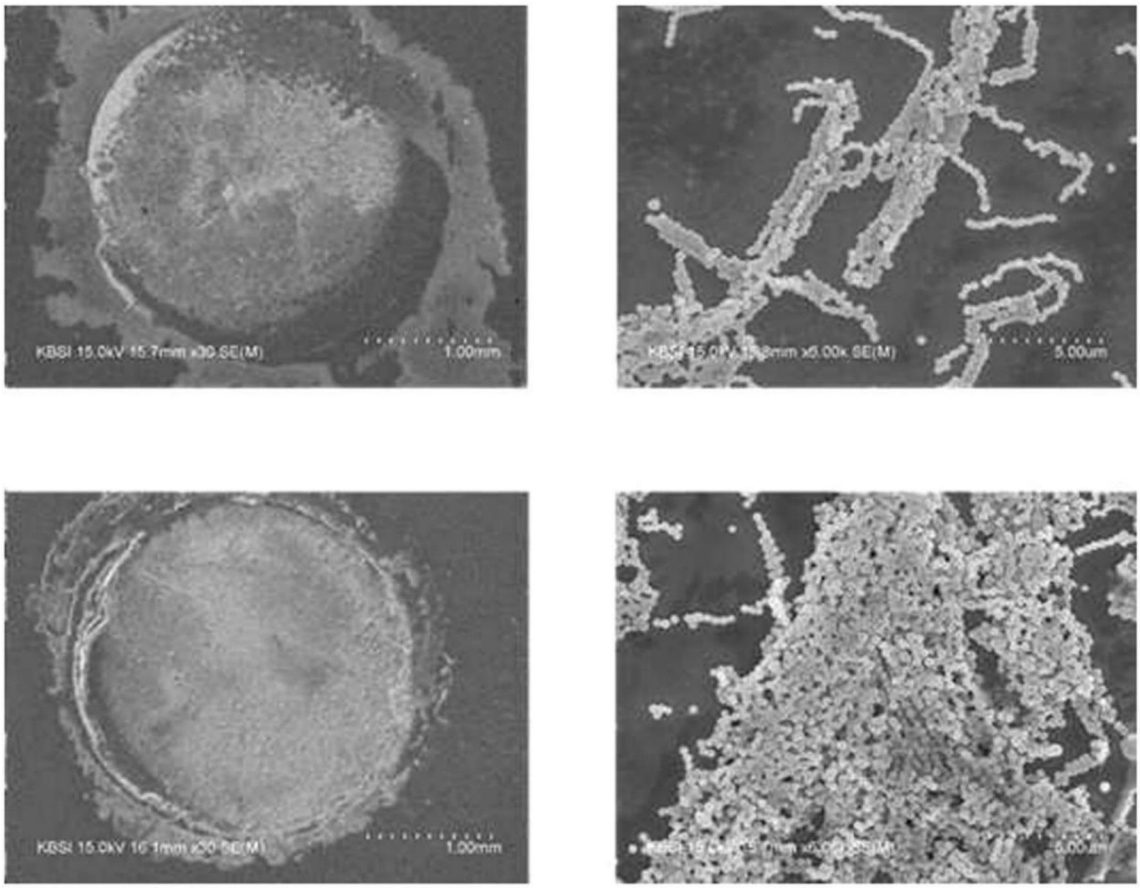


图6

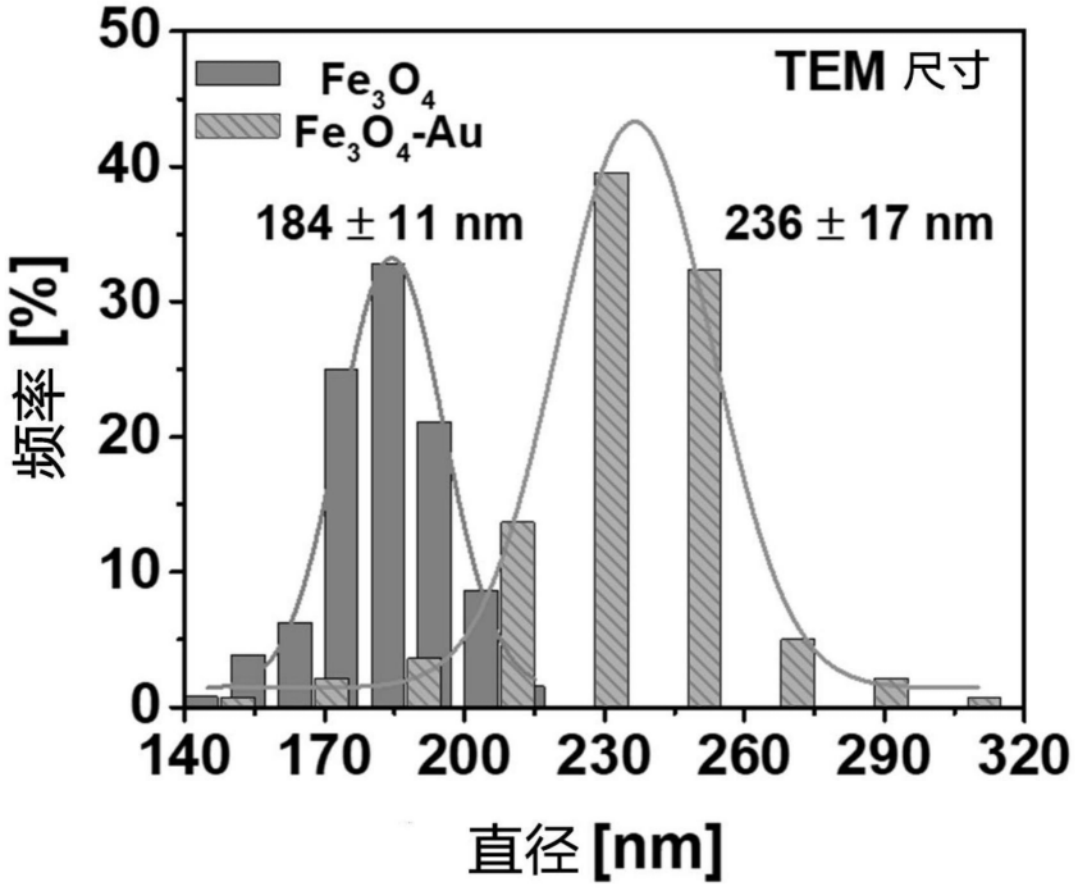

50
40
30
20
10
0
频率 [%]
140
170
200
230
260
290
320
直径 [nm]
Fe3O4
Fe3O4-Au
TEM 尺寸
184 ± 11 nm
236 ± 17 nm

图7

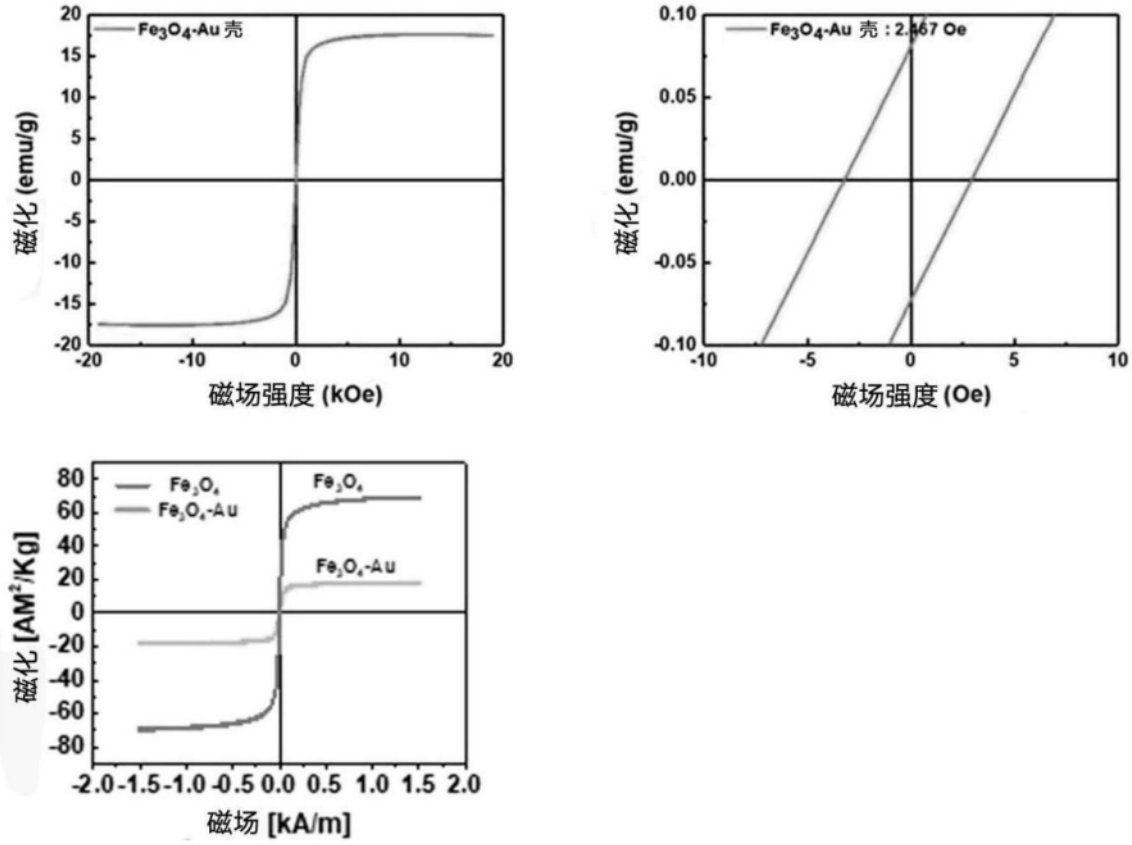

Fe3O4-Au 壳
磁化 (emu/g)
磁场强度 (kOe)
Fe3O4-Au 壳 : 2.467 Oe
磁化 (emu/g)
磁场强度 (Oe)
Fe3O4
Fe3O4-Au
磁化 [AM²/Kg]
磁场 [kA/m]

图8

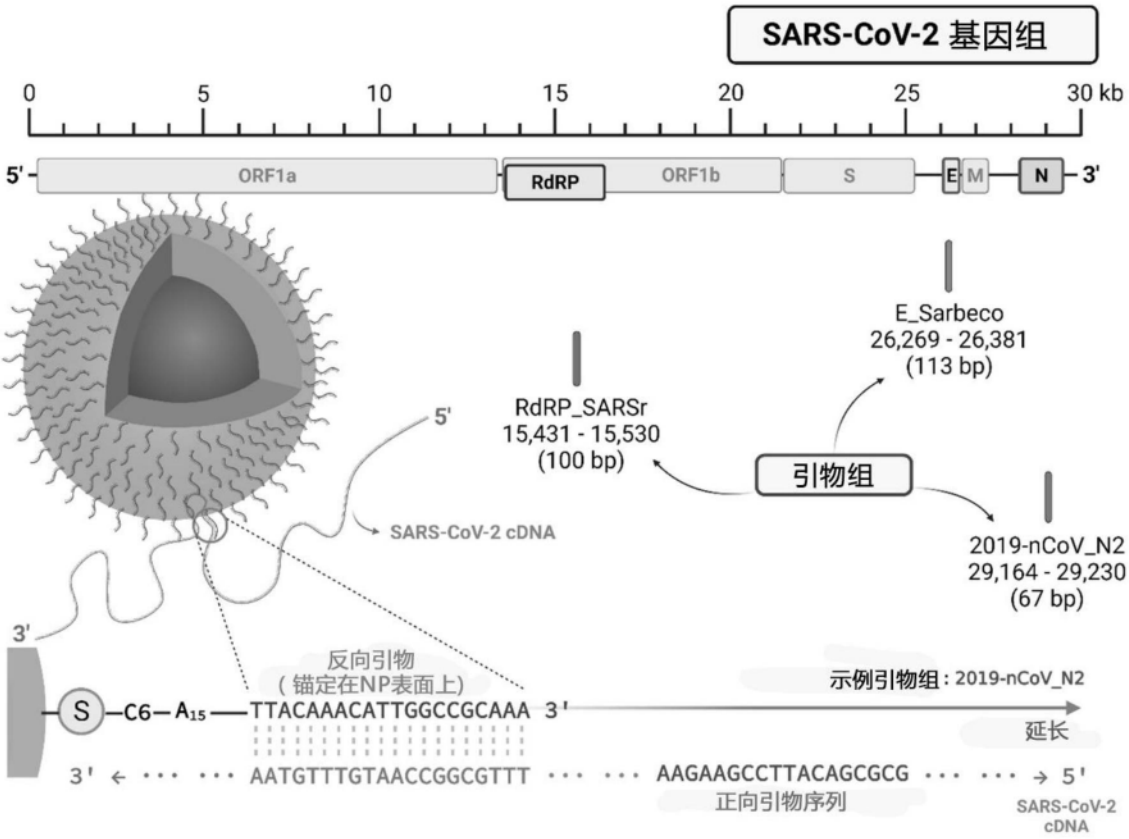

SARS-CoV-2 基因组
0
5
10
15
20
25
30 kb
5'
ORF1a
RdRP
ORF1b
S
E
M
N
3'
E_Sarbeco
26,269 - 26,381
(113 bp)
RdRP_SARSr
15,431 - 15,530
(100 bp)
引物组
2019-nCoV_N2
29,164 - 29,230
(67 bp)
5'
SARS-CoV-2 cDNA
3'
反向引物
(锚定在NP表面上)
S
C6
A15
TTACAAACATTGGCCGCAAA
3'
示例引物组: 2019-nCoV_N2
延长
3'
AATGTTTGTAACCGGCGTTT
AAGAAGCCTTACAGCGCG
5'
正向引物序列
SARS-CoV-2
cDNA

图9

生产商	产品	扩增方法	LoD[a] (份/μL)	Ct[b] 值	运行时间 (分钟)
LetsGetChecked, Inc.	LetsGetChecked 冠状病毒 (COVID-19) 测试	(多重) 实时转录介导扩增	~0.007	-	-
PerkinElmer, Inc.	PerkinElmer 新型冠状病毒核酸检测试剂盒	实时 RT-PCR/混检	ORF[c]1ab: 0.009 N[c]: 0.03	≤42	120
Roche Molecular Systems, Inc.	用在cobas Liat 系统上的cobas SARS-CoV核酸测试	(多重) 实时 RT-PCR	0.012	-	20
得克萨斯州卫生服务部，实验室服务科	DSHS SARS-CoV-2 化验	实时 RT-PCR	0.02	≤35	-
Quest Diagnostics Infectious Disease, Inc.	Quest Diagnostics RC SARS-CoV-2 化验	实时 RT-PCR/混检 (仅H)	ORF[c]1a: 0.025 E[d]: 0.032	-	-
Abbott Molecular, Inc.	SARS-CoV-2化验中的 Alinity	(多重) 实时 RT-PCR	0.03	-	<117
RTA实验室生物制品制药和机械工业	Diagnovital SARS-CoV-2 实时 PCR 试剂盒	(多重) 实时 RT-PCR	0.038	≤35	-
Becton, Dickinson & Company (BD)	用于BD Max系统的 BioGX SARS-CoV-2 试剂	(多重) 实时 RT-PCR	0.04	-	180
Thermo Fisher Scientific Inc.	TaqPath COVID-19 混检试剂盒	(多重) 实时 RT-PCR	0.05	-	-
Verily Life Sciences	Verily COVID-19 RT-PCR 试剂盒	(多重) 实时 RT-PCR	0.06	≤37	-
Poplar Healthcare	Poplar SARS-CoV-2 TMA 混检化验	(多重) 实时 RT-PCR/混检	~0.07	-	210
RCA Laboratory Services	GENETWORx Covid-19 Nasal Swab 测试	转录介导扩增/双动力学化验	~0.072	-	180
Viracor Eurofins Clinical Diagnostics	Viracor SARS-CoV-2 化验 DTC	实时 RT-PCR	0.073	≤38	1440
Life Technologies Corporation	TaqPath COVID-19 MS2 组合试剂盒2.0	(多重) 实时 RT-PCR	0.075	-	-
Laboratory Corporation of America (LabCorp)	Pixel by LabCorp COVID-19 测试家用采集试剂盒	(单/多重) 实时 RT-PCR/混检	0.08	-	-
DiaCarta, Inc.	QuantiVirus SARS-CoV-2 测试试剂盒	(多重) 单步实时 RT-PCR	0.1	<40	120
Pro-Lab Diagnostics	Pro-Amp RT SARS-CoV-2 测试	RT-等温核酸扩增	0.125	-	60
Color Health, Inc.	Color SARS-CoV-2 RT-LAMP 诊断化验 (DTC)	等温核酸扩增 (LAMP)	0.75	-	-
Lucira Health, Inc.	Lucira CHECK-IT COVID-19 测试试剂盒	RT-LAMP	0.9	-	30
SEASUN BIOMATERIALS, Inc.	AQ-TOP COVID-19 快速检测试剂盒 PLUS	(单定位点) RT-LAMP	1	≤30	45

图10

生产商	产品	扩增方法	LoD[a] (份/μL)	Ct[b] 值	运行时间 (分钟)
Visby Medical, Inc.	Visby Medical COVID-19	实时 RT-PCR	1.112	-	30
Helix OpCo LLC (dba Helix)	Helix COVID-19 NGS 测试	基于扩增产物的下一代测序	1.125	-	>80
Exact Sciences Laboratories	SARS-CoV-2 （N基因检测）测试	（双重）实时 RT-PCR	1.2	8≤Ct≤40	-
Omnipathology Solutions Medical Corporation	通过RT-PCR的Omni COVID-19 化验	（多重） 实时 RT-PCR	1.23	<40	-
Applied DNA Sciences, Inc.	Linea COVID-19 化验试剂盒	实时 RT-PCR	1.25	<40	60
Cue Health Inc.	Cue COVID-19 测试	等温核酸扩增	1.3	-	25
ResearchDx, Inc., DBA Pacific Diagnostics	PacificDx Covid-19	实时 RT-PCR	1.6	<40	-
Biomeme, Inc.	Biomeme SARS-CoV-2 实时 RT-PCR 测试	（多重） 实时 RT-PCR	1.8	≤40	80
GK Pharmaceuticals Contract Manufacturing Operations	GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR 试剂盒	实时 RT-PCR	2	<40	-
Vela Operations Singapore Pte Ltd.	VitoKey SARS-CoV-2 RT-PCR 测试	（多重） 实时 RT-PCR	2.25	10<Ct<40	240
Gravity Diagnostics, LLC	Gravity Diagnostics COVID-19 化验	（双重）实时 RT-PCR	2.4	<35	-
GeneMatrix, Inc.	NeoPlex COVID-19 检测试剂盒	（多重） 实时 RT-PCR	2.5	≤40	180
TNS Co., Ltd (Bio TNS)	COVID-19 RT-PCR 肽核酸（PNA）试剂盒	实时 RT-PCR	2.524	≤40	-
ScienCell Research Laboratories	ScienCell SARS-CoV-2 冠状病毒实时 RT-PCR (RT-qPCR) 检测试剂盒	实时 RT-PCR	3.16	<40	75
BillionToOne, Inc.	qSanger-COVID-19 化验	基于一代测序的测试	3.2	-	-
KogeneBiotech Co., Ltd.	PowerChek 2019-nCoV 实时 PCR 试剂盒	（多重） 实时 RT-PCR	4	≤37	360
Seegene, Inc.	Allplex 2019-nCoV 化验	（多重） 实时 RT-PCR	4.167	≤40	240
Co-Diagnostics, Inc.	Logix Smart 冠状病毒疾病 2019 (COVID-19)试剂盒	（多重） 单步实时 RT-PCR	4.29	≤45	63–90
Luminex Molecular Diagnostics, Inc.	NxTAG CoV Extended Panel 化验	（多重） 实时 RT-PCR	5	-	-
Gencurix, Inc.	GenePro SARS-CoV-2 测试	（多重） 实时 RT-PCR	5.55	<31	110
INNO Diagnostics Reference Laboratory, Ponce Medical School	PMSF-INNO SARS-CoV-2 RT-PCR 测试 (授权 HHS/OASH)	实时 RT-PCR	6	≤40	-

图11

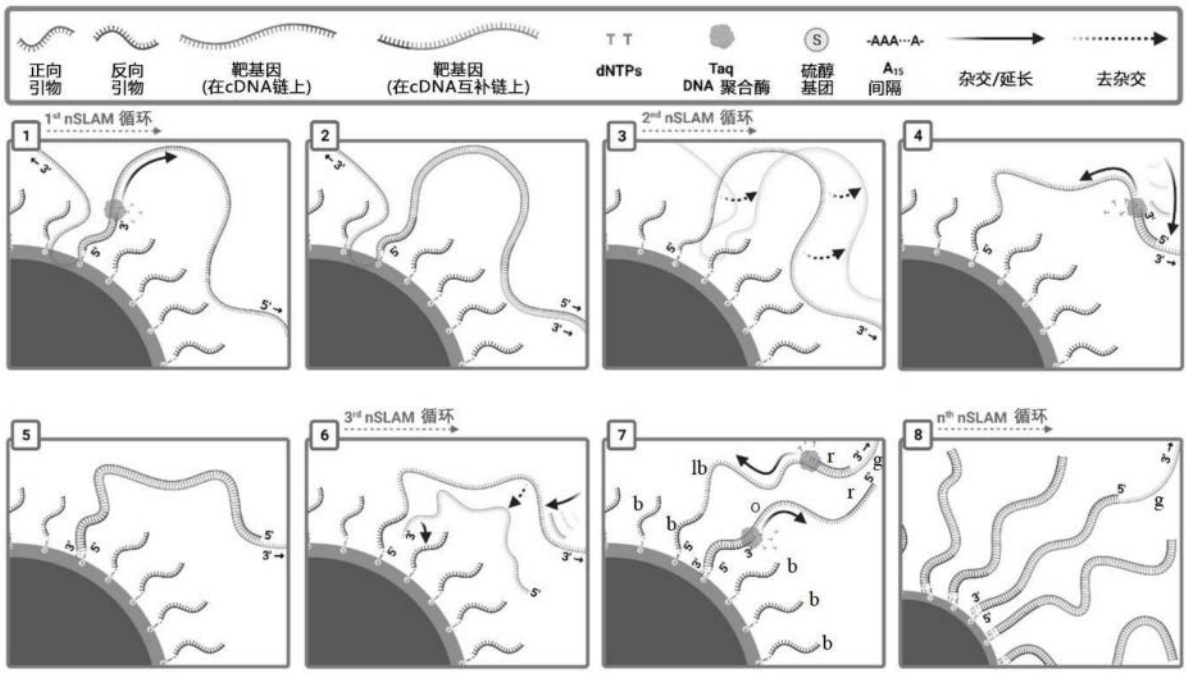

正向引物
反向引物
靶基因 (在cDNA链上)
靶基因 (在cDNA互补链上)
dNTPs
Taq DNA 聚合酶
硫醇基团
A15 间隔
杂交/延长
去杂交
1st nSLAM 循环
2nd nSLAM 循环
3rd nSLAM 循环
nth nSLAM 循环

图12

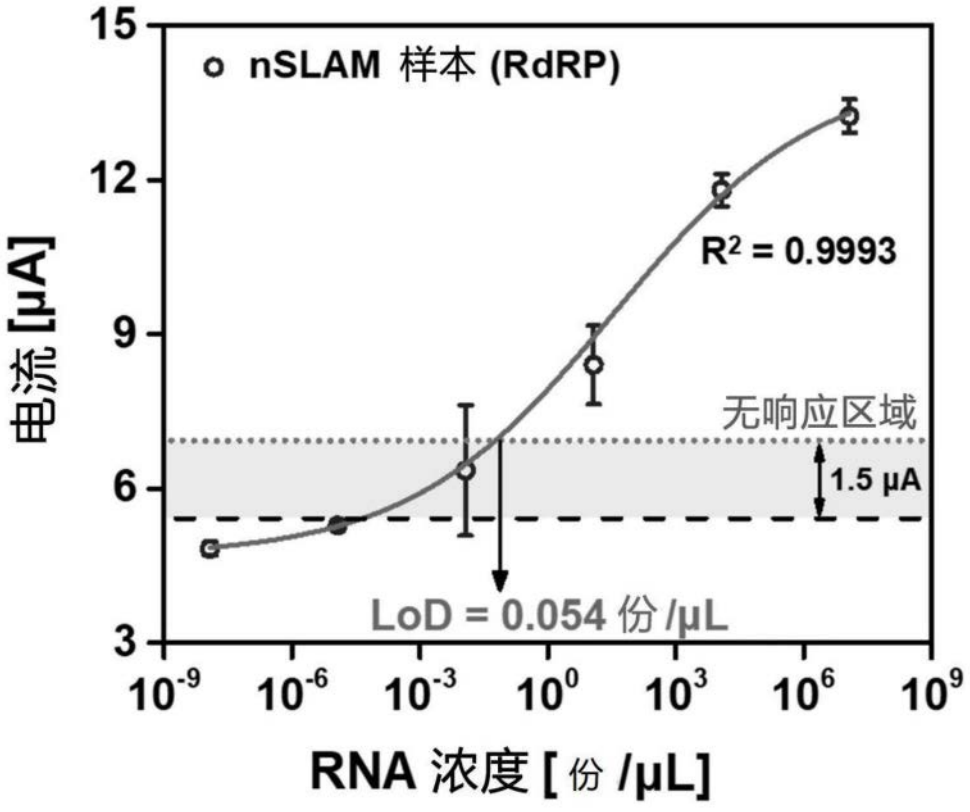

nSLAM 样本 (RdRP)
R² = 0.9993
无响应区域
1.5 μA
LoD = 0.054 份 /μL
电流 [μA]
RNA 浓度 [份 /μL]
15
12
9
6
3
10-9
10-6
10-3
100
103
106
109

图13

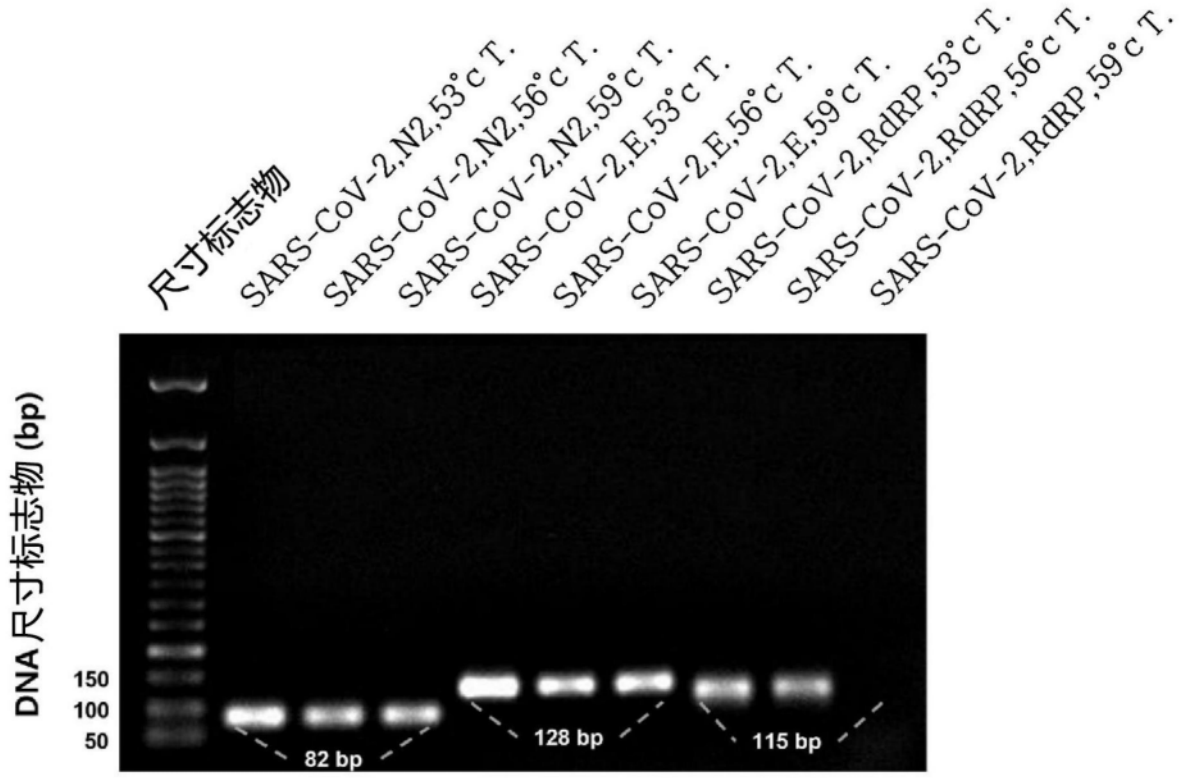

尺寸标志物
SARS-CoV-2,N2,53°c T.
SARS-CoV-2,N2,56°c T.
SARS-CoV-2,N2,59°c T.
SARS-CoV-2,E,53°c T.
SARS-CoV-2,E,56°c T.
SARS-CoV-2,E,59°c T.
SARS-CoV-2,RdRP,53°c T.
SARS-CoV-2,RdRP,56°c T.
SARS-CoV-2,RdRP,59°c T.
DNA尺寸标志物 (bp)
150
100
50
82 bp
128 bp
115 bp

图14

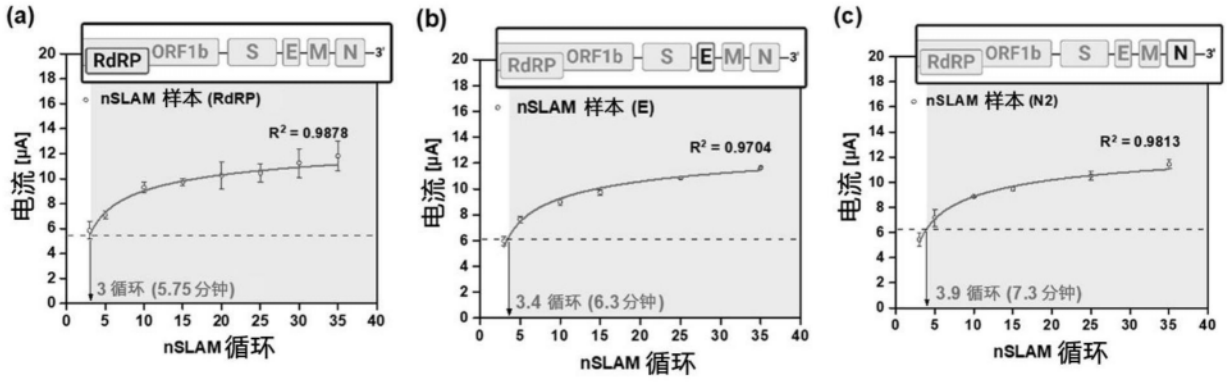

(a)
RdRP ORF1b S E M N 3'
nSLAM 样本 (RdRP)
R² = 0.9878
3 循环 (5.75 分钟)
电流 [μA]
nSLAM 循环
(b)
RdRP ORF1b S E M N 3'
nSLAM 样本 (E)
R² = 0.9704
3.4 循环 (6.3 分钟)
电流 [μA]
nSLAM 循环
(c)
RdRP ORF1b S E M N 3'
nSLAM 样本 (N2)
R² = 0.9813
3.9 循环 (7.3 分钟)
电流 [μA]
nSLAM 循环

图15

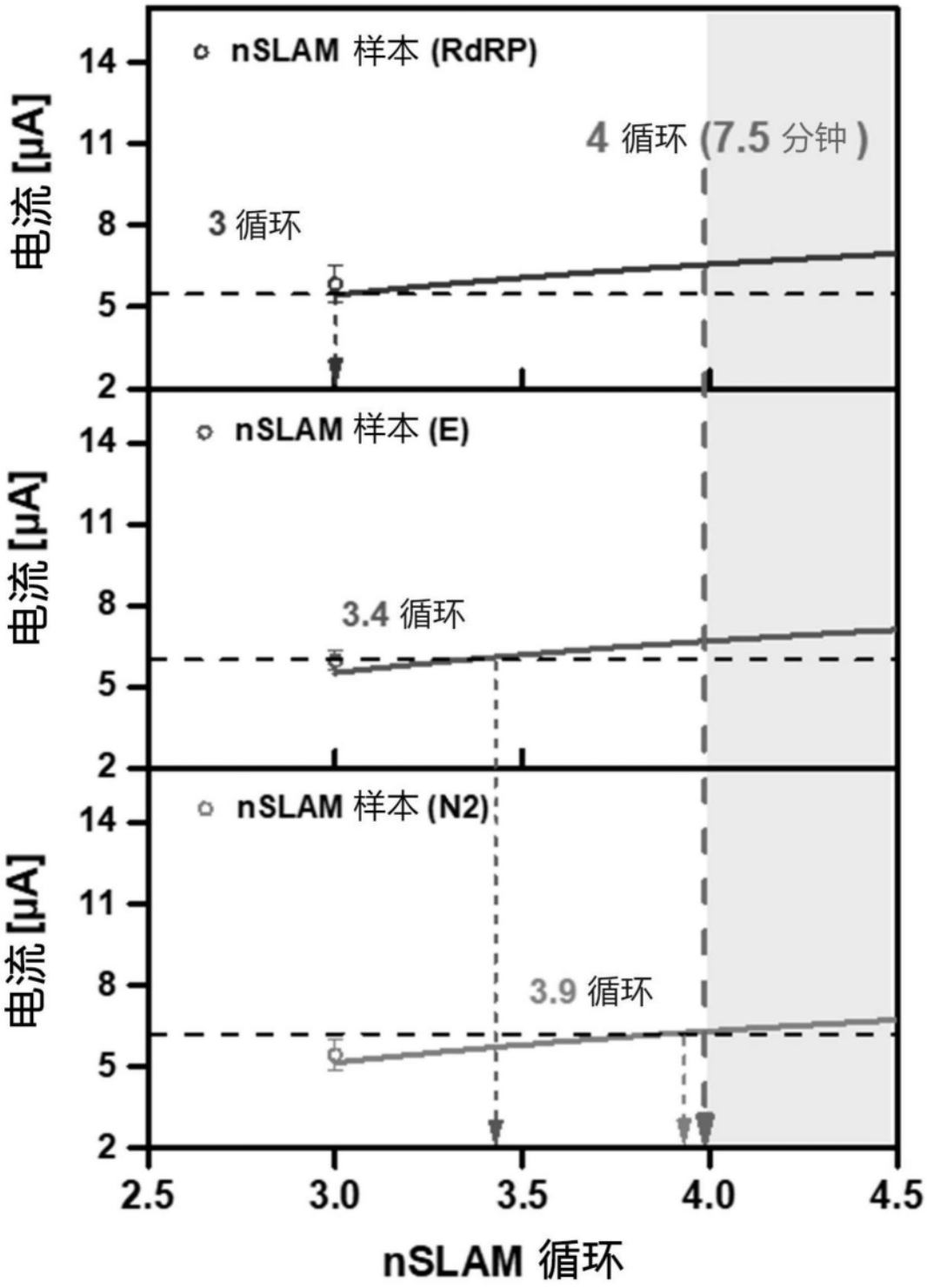

nSLAM 样本 (RdRP)
4 循环 (7.5 分钟)
3 循环
nSLAM 样本 (E)
3.4 循环
nSLAM 样本 (N2)
3.9 循环
电流 [μA]
14
11
8
5
2
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
nSLAM 循环

图16

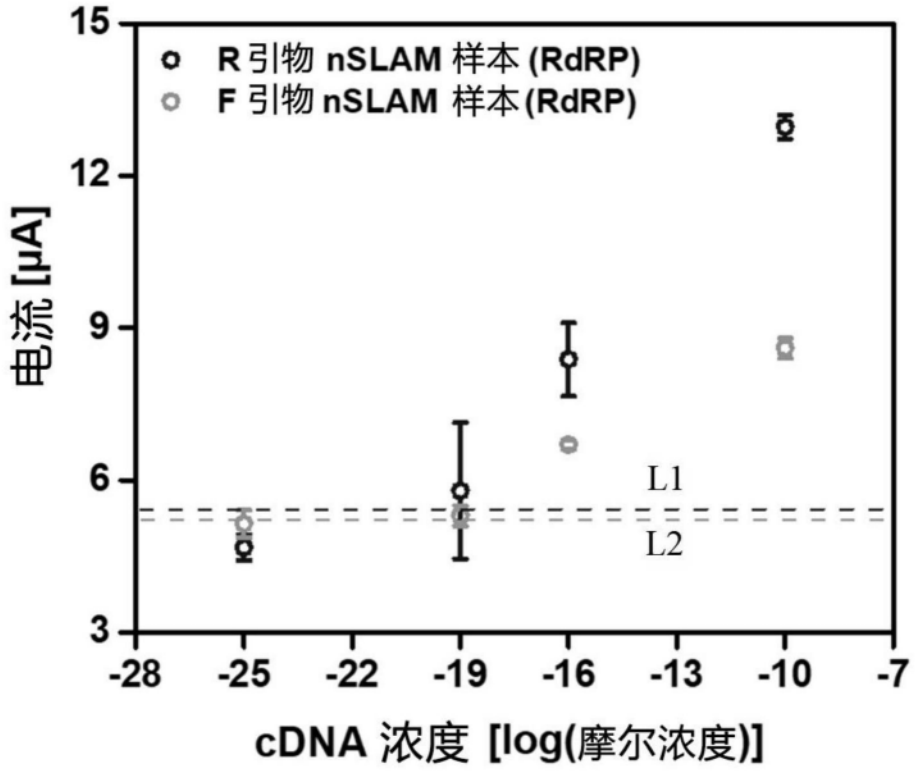

R 引物 nSLAM 样本 (RdRP)
F 引物 nSLAM 样本 (RdRP)
电流 [μA]
15
12
9
6
3
L1
L2
-28
-25
-22
-19
-16
-13
-10
-7
cDNA 浓度 [log(摩尔浓度)]

图17

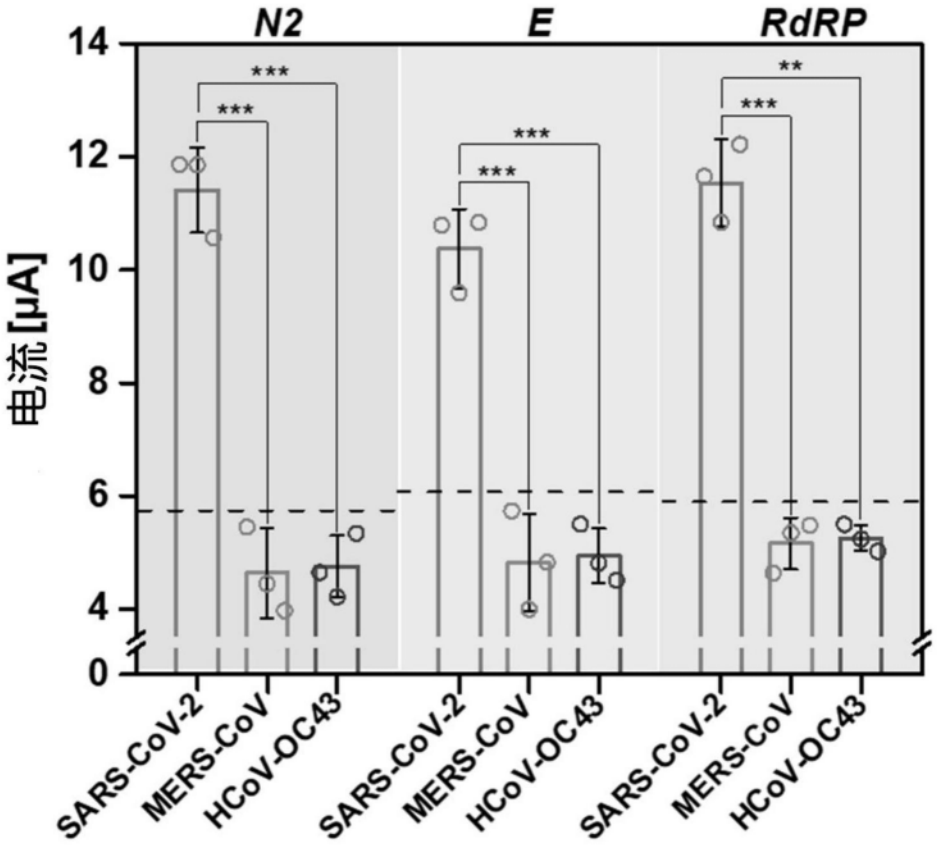

N2
E
RdRP
电流 [μA]
14
12
10
8
6
4
0
***
***
***
***
**
***
SARS-CoV-2
MERS-CoV
HCoV-OC43
SARS-CoV-2
MERS-CoV
HCoV-OC43
SARS-CoV-2
MERS-CoV
HCoV-OC43

图18

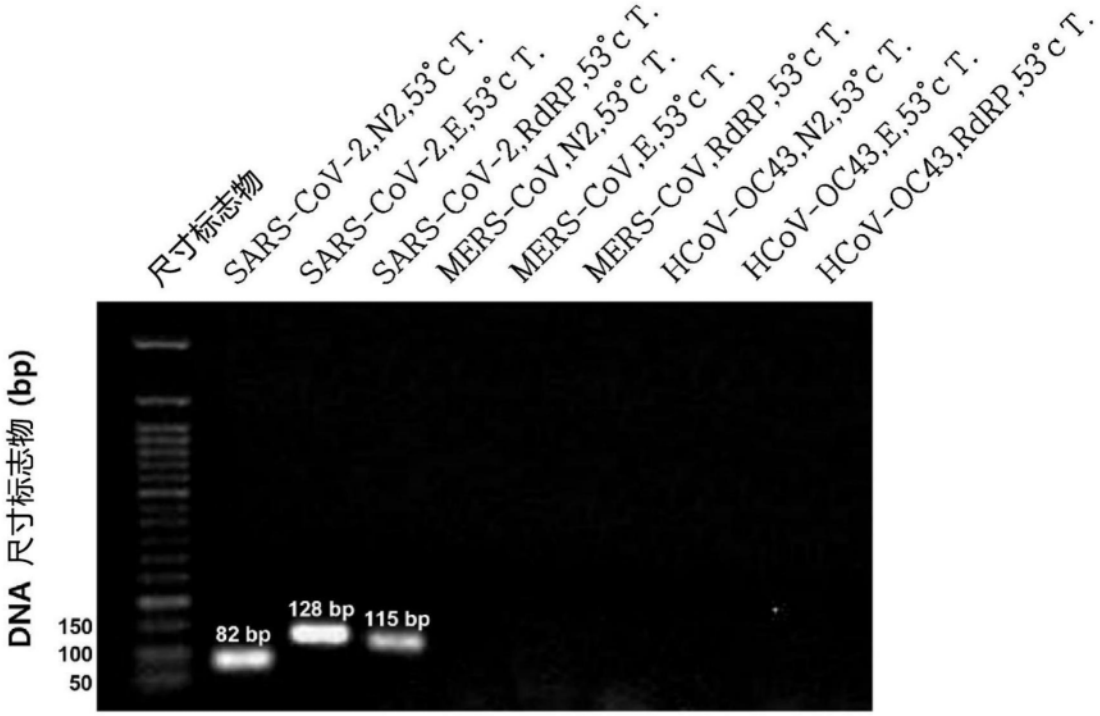

尺寸标志物
SARS-CoV-2,N2,53°c T.
SARS-CoV-2,E,53°c T.
SARS-CoV-2,RdRP,53°c T.
MERS-CoV,N2,53°c T.
MERS-CoV,E,53°c T.
MERS-CoV,RdRP,53°c T.
HCoV-OC43,N2,53°c T.
HCoV-OC43,E,53°c T.
HCoV-OC43,RdRP,53°c T.
DNA 尺寸标志物 (bp)
150
100
50
82 bp
128 bp
115 bp

图19