

(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
2020 年 8 月 6 日 (06.08.2020)



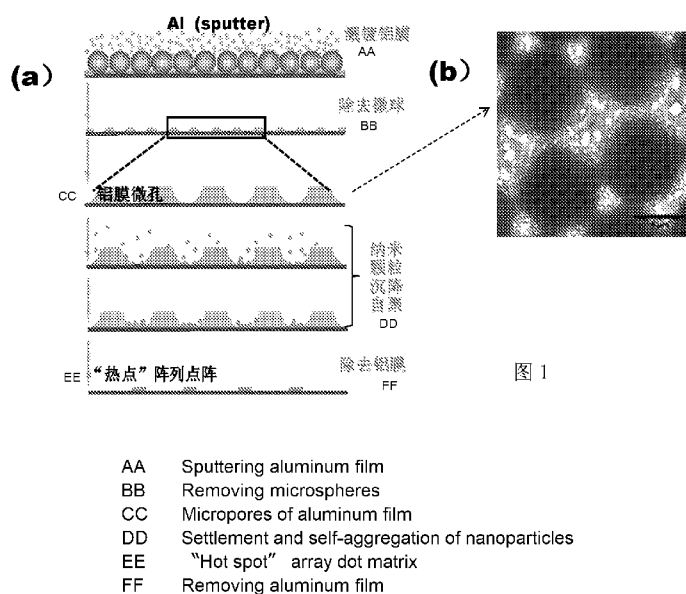
(10) 国际公布号
WO 2020/155709 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 21/65 (2006.01) *B82Y 15/00* (2011.01)
G01N 21/64 (2006.01) *B82Y 30/00* (2011.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/114545
- (22) 国际申请日: 2019 年 10 月 31 日 (31.10.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910098748.2 2019 年 1 月 31 日 (31.01.2019) 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 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。

(72) 发明人: 皮付伟(PI, Fuwei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。张圆媛(ZHANG, Yuanyuan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。刘玲(LIU, Ling); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。尹子叶(YIN, Ziyue); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。成玉梁(CHENG, Yuliang); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。林琳(LIN, Lin); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。孙秀兰(SUN, Xiulan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。

(54) Title: DOT MATRIX ARRAY ENHANCEMENT CHIP FOR HIGH-THROUGHPUT AND ULTRA-SENSITIVE DETECTION

(54) 发明名称: 一种高通量、超灵敏检测的点阵阵列增强芯片



(57) Abstract: A dot matrix array enhancement chip for high-throughput and ultra-sensitive detection belongs to the field of food safety detection. In said chip, a single layer of gold nanoparticles is chemically bonded on a hydrophilic substrate, so that the nano gold material naturally settles into pores of said chip by means of electrostatic adsorption and forms a regularly arranged dot matrix. Gold particles arranged in the pores form plasma regional enhancement hotspots by the interval of a granular surfactant (CTAB), and the arranged gold nanoparticles aggregate with each other to form a long-term effect, thereby improving the detection efficiency and sensitivity of the chip.

(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, 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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))。

(57) 摘要: 一种高通量、超灵敏检测的点阵阵列增强芯片, 属于食品安全检测领域。该芯片通过在亲水基底上化学键合单层纳米金颗粒, 将纳米金材料通过静电吸附作用自然沉降于芯片孔洞中, 并形成规则排列的点阵。孔洞排布的金颗粒在颗粒表面活性剂(CTAB)的间隔下形成等离子体区域增强热点, 所排布的纳米金颗粒相互之间聚集形成长程效应, 从而提高了芯片的检测效率和灵敏度。

一种高通量、超灵敏检测的点阵阵列增强芯片

技术领域

本发明涉及一种高通量、超灵敏检测的点阵阵列增强芯片，属于食品安全检测领域。

背景技术

近年来，生物毒素、重金属等物质的污染、检测及控制问题是长期困扰我国食品安全的重要问题，也是国家层面人民健康长期关注的热点问题。传统毒素检测方法如高效液相色谱法、薄层色谱等在检测时间、检测精度、设备成本、可操作性等方面存在一定的不足，而且针对食品加工过程中生物毒素降解产物的毒力有效识别和高通量快速检测涉及较少，尤其缺乏与生物毒素消减、降解等潜在危害物毒力高通量快速检测相匹配的技术和检测器件。现有的检测技术虽有优点，但多存在检测灵敏度较低、检测限较高以及检测目标单一等问题。

表面等离子体增强是指吸附在特定纳米级粗糙界面的分析物结构信号被极大增强的一种现象，其增强机理已被证实为相邻纳米颗粒之间区域电磁场耦合形成表面电子云叠加“热点”，即“热点”效应。（“热点”：相邻的金属纳米颗粒由于局域电磁场耦合而形成的分析物信号极大增强的区域）。等离子体增强“热点”效应的发现和“热点”基底制备方法的迅速发展，使得区域等离子体技术在化学、分析、生物等研究领域已得到了广泛应用。近年来，研究表明，相对于由二聚体及三聚体纳米颗粒形成的一维（1D）“热点”，二维（2D）和三维（3D）结构的区域等离子体“热点”增强阵列因其长程效应和数量的增多而使得总体等离子体信号大大增强，并且信号增强效应更加稳定、持久。虽然三维“热点”阵列具有独立的光散射和众多空间增强局域场，但由颗粒自组装形成的区域有序二维“热点”阵列因具有偏振光效应和界面有序性而更易于实际操控和应用。

发明内容

本发明提供了一种高通量、多靶向信号增强检测阵列芯片的制备技术，通过在亲水基底上化学键合单层纳米金颗粒（金球、金棒、金十字等不同形态的金基纳米材料），所用的纳米金材料通过静电吸附作用自然沉降至芯片孔洞中，并形成规则排列的点阵。孔洞排布的金颗粒在颗粒表面活性剂（CTAB）的间隔下形成等离子体区域增强热点所排布的纳米金颗粒相互之间聚集形成长程效应，从而提高检测效率和灵敏度。

本发明的第一个目的是提供一种高通量、超灵敏、多靶向检测的区域等离子体信号增强点阵阵列芯片的制备方法；所述方法包括如下步骤：

- （1）将微球溶液分散在芯片基底上，形成单层微球点阵，自然风干；

- (2) 将固定有微球点阵的亲水基底蒸镀铝膜；
- (3) 超声清洗，除去微球颗粒，制得表面具有微纳孔洞铝膜的芯片基底；
- (4) 对步骤(3)处理后的芯片基底表面硅烷化处理，使处理后的界面带正电荷或负电荷；
- (5) 将金纳米材料滴在步骤(4)处理后的基底表面，获得点阵阵列芯片。

在本发明的一种实施方式中，所述芯片基底为亲水基底。

在本发明的一种实施方式中，所述芯片基底的材料包括但不限于玻璃片、硅片、半导体。

在本发明的一种实施方式中，所述纳米金颗粒的形态包括但不限于：金球、金棒、金十字。

在本发明的一种实施方式中，所述纳米金颗粒表面具有颗粒表面活性剂(CTAB)。

在本发明的一种实施方式中，所述步骤(1)是将微球溶液平铺在玻璃片上，自然风干，形成单层微球点阵。为保证所排布的纳米金颗粒之间具有稳定的连续信号增强的效应和进行进一步功能化，芯片基底的制备中微球排布于玻片并尽可能形成单层的步骤至为重要。

在本发明的一种实施方式中，所述步骤(2)在磁控溅射仪中蒸镀铝膜，铝膜的厚度为50nm~100nm。

在本发明的一种实施方式中，所述步骤(4)是将超声清洗后的玻璃片于0.08~0.12MPa真空干燥，再于70℃的条件下蒸镀APTES或APTMS 0.8~1.2小时。

在本发明的一种实施方式中，所述微球为SiO₂微球。

在本发明的一种实施方式中，所述芯片基底经过清洗，所述清洗具体是：

- (1) 分别用无水乙醇和超纯水超声清洗20~30分钟；
 - (2) 将步骤(1)清洗后的芯片基底烘干后，在等离子体清洗机中进行清洗10~15分钟；
- 在本发明的一种实施方式中，所述微球清洗步骤：用移液枪吸取150μl的SiO₂微球，采用降速梯度离心法用超纯水清洗5次，将清洗后的微球稀释至浓度为0.5~1.0mol/L。

在本发明的一种实施方式中，所述方法还将金棒或金十字与标记物DNA偶联，沉降于芯片基底表面的微纳孔洞中。

在本发明的一种实施方式中，所述方法的具体步骤为：

- (a) 将100 μM ssDNA和1 mM TCEP静置避光3h，加入0.1 M的金纳米棒或金十字；
- (b) 向步骤(a)的体系中加入SDS-HCl溶液，室温震荡12 h，离心并收集沉淀；
- (c) 向沉淀中加入0.005 M CTAB，再沉降于芯片孔洞中。

在本发明的一种实施方式中，所述标记物DNA为DNA1、DNA2；其中，

DNA1: 5'-HS-C6-AAAAAATCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3'

DNA2: 5'-HS-C6-AAAAAAAAAAAAAAAAAATAGCTTATCAGACT-cy5-3'。

本发明的第二个目的是提供应用所述方法制备的芯片。

本发明还要求保护所述芯片在化学、分析、生物领域检测方面的应用。

有益效果：本发明提供了一种高通量、超灵敏、多靶向检测的点阵阵列增强芯片，该芯片能够将检测信号的灵敏度提高 10^2 倍，并将检测限降低至 aM 级。

附图说明

图 1 基于微球刻蚀点阵技术的“热点”增强阵列芯片基底制备流程图(a)；右侧为除去微球后芯片孔洞扫描电镜 (SEM) 图(b)。

图 2 玻璃基质等离子体“热点”增强阵列芯片示意图 (a)；纳米颗粒区域等离子体增强模拟图 (b)；

图 3 FITC-BSA 标记的芯片孔洞倒置荧光显微镜图 (10x100)。

图 4 纳米金“热点”点阵阵列扫描电镜图。

图 5 金棒和金球“热点”点阵阵列芯片拉曼信号扫描图。

图6 用本芯片来检测添加各种浓度的miRNA-21的荧光反应，图中由下至上的曲线分别代表添加的miRNA-21浓度0,0.00001,0.00008,0.0002,0.0003,0.0006,0.0008,0.0013,0.001,0.0016, 0.005,0.1,1,10,50,100,150,200,400 fM。

图 7 荧光强度对 miRNA-21 浓度的对数的依赖性，线性范围为 0.0006 至 0.0016 和 0.1 至 100fM。每个数据是三次重复的平均值 (N = 3)，误差条表示测量的标准偏差。

图 8 金棒和金球溶液的拉曼信号扫描图。

具体实施方式

实施例 1 芯片的制备

如图 1 和图 2 所示，本发明的芯片制备流程如下：

(1) 玻片和微球的清洗：分别用无水乙醇和超纯水超声清洗玻片，清洗时间为 30 分钟；将清洗后的玻片烘干后在等离子体清洗机中进行清洗，时间为 15 分钟；将清洗后的玻片保存于超纯水中。

(2) 微球在玻璃界面上定点排布,即用移液枪吸取 50 微升浓度为 1mol/L 微球溶液滴在玻片上，当微球溶液扩散到玻片底部时，将玻片底部旋转 180° 至顶部，使部分微球溶液回流，以形成面积更大的单层微球点阵；

(3) 将玻片在磁控溅射仪中镀铝以固定微球的位置,通过调节蒸镀时间和蒸镀速率调控

铝膜的厚度为 50nm;

(4) 将蒸镀铝膜的玻片在超纯水中进行超声清洗, 除去界面上的微球得到芯片孔洞, 将此玻片拍摄扫描电镜 (SEM)。

(5) 将超声处理的玻片在 APTES 蒸汽中密闭, 进行 1h 孔洞界面硅烷化处理。

实施例 2 芯片上金棒 (AuNR) 和金球 (AuNP) 的拉曼信号检测

将表面具有 CTAB 的合成的金棒 (AuNR) 和金球 (AuNP) 沉降于纳米孔洞中, 金棒即在孔洞中自聚形成信号增强“热点”点阵阵列, 再加入 200 微升拉曼探针分子血红蛋白超声摇匀并检测拉曼信号, 计算点阵增强效果。检测结果如图 5 所示, 结果显示, 相比于纯的血红蛋白分子, AuNR 和 AuNP 点阵在波数 600cm^{-1} 和 1121cm^{-1} 均有增强的信号, 且 AuNP 在波数 1600cm^{-1} 处也有增强的信号。经过计算, 本芯片的增强效果可达 10^2 倍。由此可见, 本芯片具有良好的信号增强性能。

实施例 3 病原微生物 microRNA 检测

金棒或金十字偶联 DNA 步骤, 其中, 金十字偶联 DNA1; 金棒偶联 DNA2:

1. 在 PCR 管中加入等体积数的 100 μM ssDNA 和 1 mM TCEP, 反应条件: 静置避光 3h, 活化 DNA;
2. 吸取 0.1M 的金纳米棒或金十字 1 mL;
3. 吸取与步骤 1 体积和等体积数的 SDS-HCL ($\text{pH}=3$) 加入步骤 2 中;
4. 室温震荡 12 h, 转速为 1000 rpm;
5. 1000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液, 向沉淀中加入 0.005 M CTAB 备用。

将连接 DNA1 的金纳米十字和偶联有 DNA2 的金棒按照相同的摩尔量沉降于按实施例 1 的方法制备的芯片孔洞中, 此 DNA1 链末端修饰有 cy5 荧光染料。另有金棒上连接 DNA2, 此 DNA1 链与 DNA2 部分碱基互补配对, 此时 cy5 荧光染料不发光, 处于猝灭状态; 当加入病原微生物 miRNA-21 时, 由于此 RNA 与 DNA1 部分碱基互补配对, 此时金棒上偶联的 DNA1 与 RNA 杂交, 释放出金十字上偶联的 DNA2 的 cy5 荧光, 根据 cy5 的荧光强度可对病原微生物的 miRNA-21 进行检测。检测结果如图 6, 图 7 所示, 由荧光强度对 miRNA-21 浓度的对数的曲线给出了由等式表示的两个线性响应 ($F = 1830.32 \log C + 6349.27$, $R^2 = 0.9901$; 以及 $F = 244.41 \log C + 1916.10$, $R^2 = 0.9984$); 检测限可低至 0.5aM 和 0.03fM, 而其他荧光方法的检测限为 nM, 表明该芯片具有高通量、超灵敏特性。

所用的 DNA1、DNA2 和 microRNA 序列均购自上海生物工程有限公司。

DNA1: 5'-HS-C6-AAAAAATCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3'

DNA2: 5'-HS-C6-AAAAAAAAAAAAAAAAATAGCTTATCAGACT-cy5-3'

miRNA-21: 5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'

对比例 1:

具体实施方式同实施例 2，区别在于，纳米金材料没有沉降至纳米孔洞中，直接将 200 微升拉曼探针分子血红蛋白加入等量金棒（AuNR）和金球（AuNP）溶液中，超声摇匀并检测拉曼信号，结果如图 8 所示，与点阵芯片（图 5）相比，溶液中的拉曼信号减弱了数 10 倍。

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、一种高通量、超灵敏、多靶向检测的区域等离子体信号增强点阵阵列芯片的制备方法，其特征在于包括如下步骤：

- (1) 将 0.5~1mol/L 微球溶液分散在芯片基底上，形成单层微球点阵，自然风干；
- (2) 将固定有微球点阵的亲水基底蒸镀铝膜，使铝膜厚度为 50nm~100nm；
- (3) 超声清洗，除去微球颗粒，制得表面具有微纳孔洞铝膜的芯片基底；
- (4) 对步骤(3)处理后的芯片基底表面硅烷化处理，使处理后的界面带正电荷或负电荷；

- (5) 将纳米金材料滴在步骤(4)处理后的基底表面，获得点阵阵列芯片。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤(1)是将微球溶液平铺在玻璃片上，自然干燥，形成单层微球点阵。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤(2)在磁控溅射仪中蒸镀铝膜，铝膜的厚度为 50nm~100nm。

4、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述芯片基底为亲水基底。

5、根据权利要求 1 或 4 所述的方法，其特征在于，所述芯片基底的材料包括但不限于玻璃片、硅片、半导体。

6、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述纳米金材料的形态包括：金球、金棒或金十字。

7、根据权利要求 1 或 6 所述的方法，其特征在于，所述纳米金材料表面具有颗粒表面活性剂。

8、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述微球的浓度为 0.5~1.0 mol/L。

9、根据权利要求 1~8 任一所述的方法，其特征在于，将金棒或金十字与标记物 DNA 偶联，沉降于芯片基底表面的微纳孔洞中。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于，具体步骤为：

- (a) 将 100 uM ssDNA 和 1 mM TCEP 静置避光 3h，加入 0.1 M 的金纳米棒或金十字；
- (b) 向步骤(a)的体系中加入 SDS-HCl 溶液，室温震荡 12 h，离心并收集沉淀；
- (c) 向沉淀中加入 0.005 M CTAB，再沉降于芯片孔洞中。

11、根据权利要求 9 或 10 所述的方法，其特征在于，所述标记物 DNA 为 DNA1 或 DNA2；其中，DNA1 偶联金十字，DNA2 偶联金棒；

DNA1: 5'-HS-C6-AAAAAATCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3'

DNA2: 5'-HS-C6-AAAAAAAAAAAAAAAAAATAGCTTATCAGACT-cy5-3'。

12、应用权利要求 1~11 任一所述方法制备获得的高通量、超灵敏、多靶向检测的区域等离子体信号增强点阵阵列芯片。

13、权利要求 12 所述的高通量、超灵敏、多靶向检测的区域等离子体信号增强点阵阵列芯片在化学、分析、生物领域检测方面的应用。

14、一种检测方法，其特征在于，将待测样品置于权利要求 1~11 任一所述方法制备的点阵阵列芯片中，检测荧光强度。

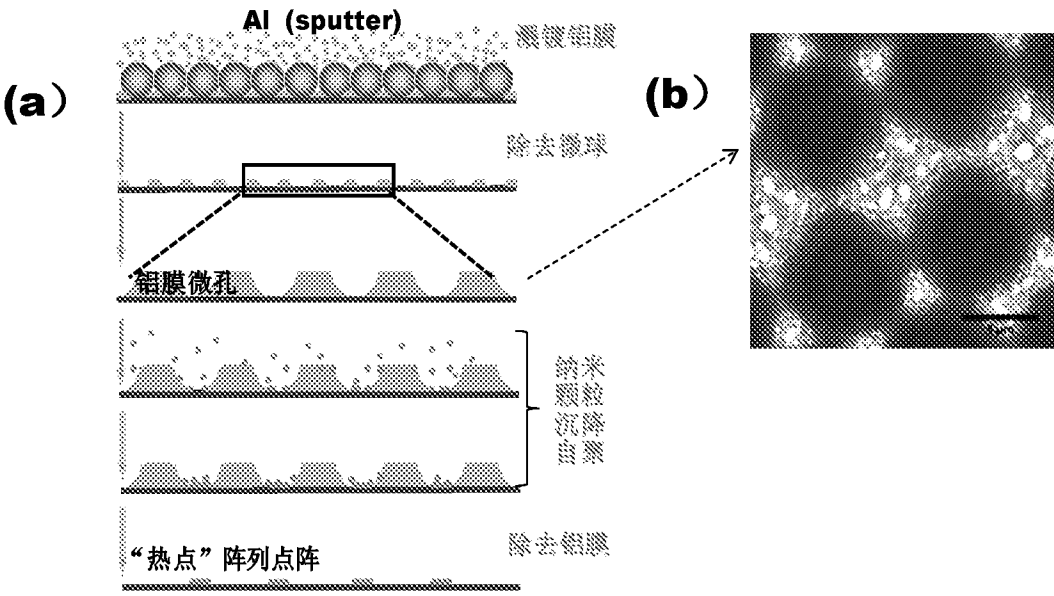


图 1

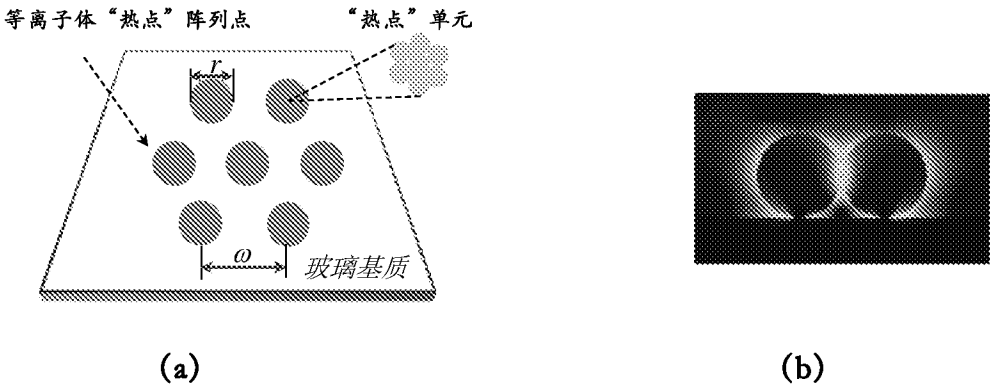


图 2

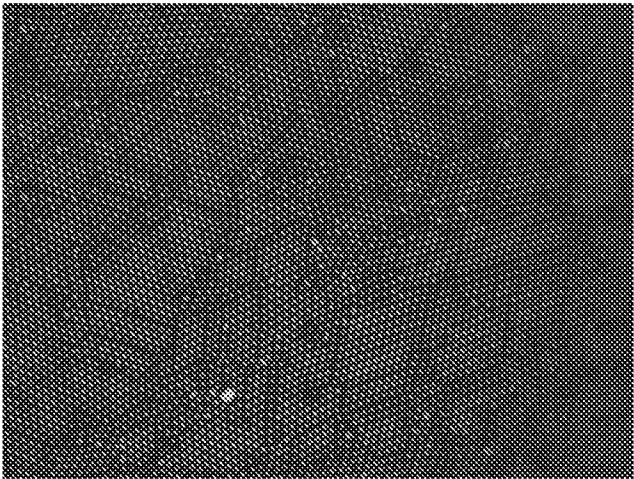


图 3

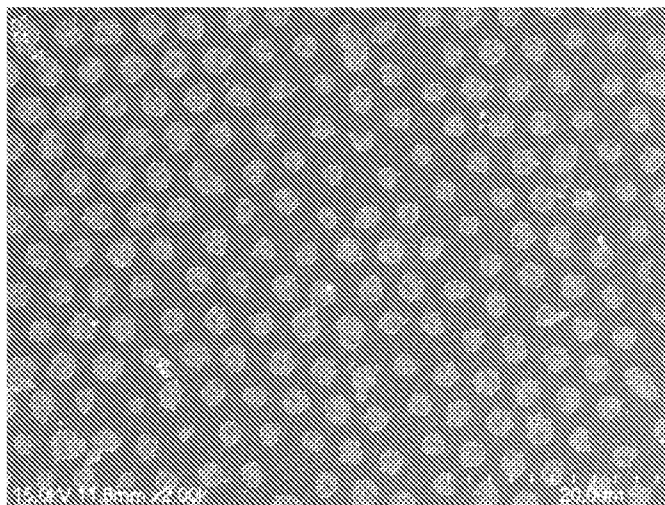


图 4

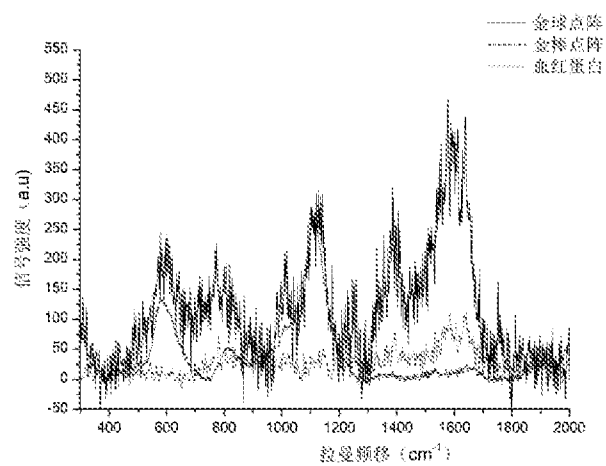


图 5

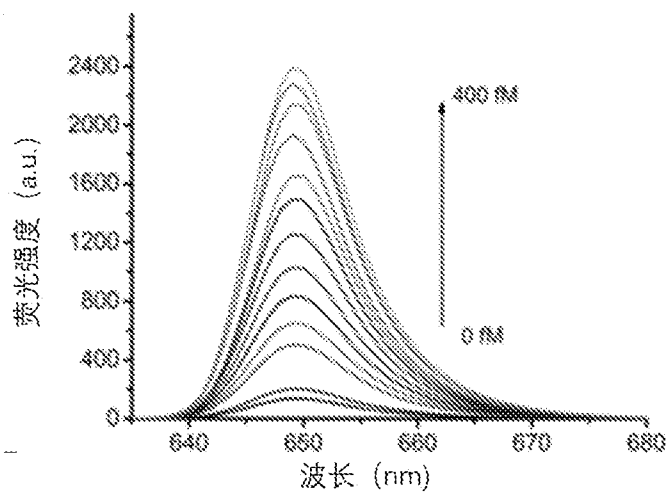


图 6

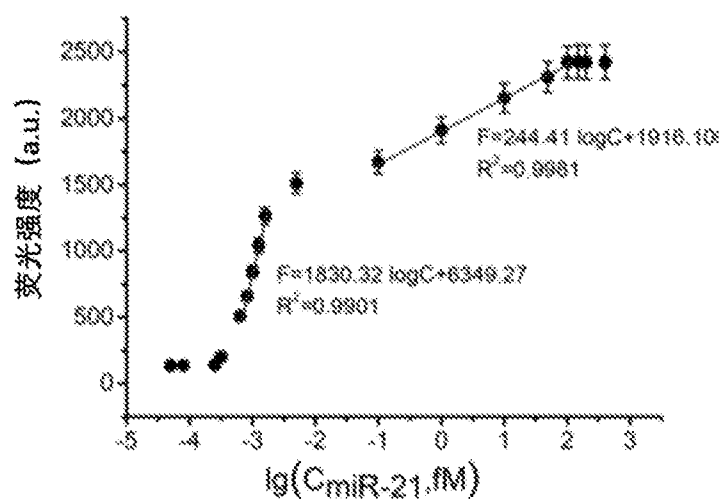


图 7

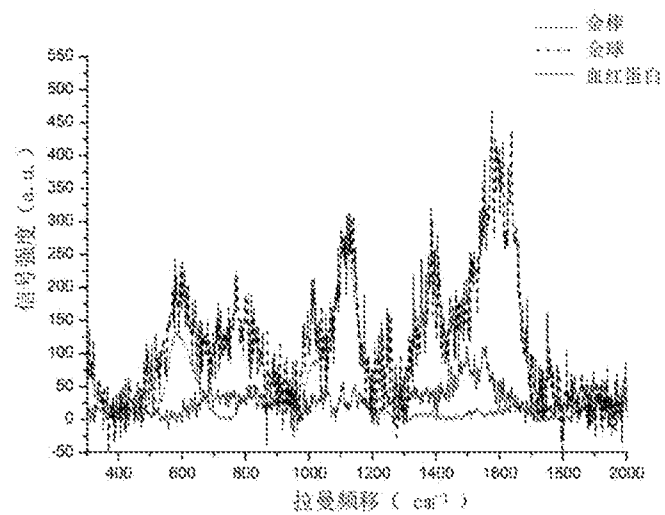


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/114545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 21/65(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i; B82Y 15/00(2011.01)i; B82Y 30/00(2011.01)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)

G01N21/-

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)

CNPAT, CNKI, EPODOC, WPI: 增强, 芯片, 纳米金, 纳米颗粒, 金球, 金棒, 金十字, 微球, 阵列, 孔洞, 活性剂, 拉曼, 荧光, 微小RNA, 检测, enhanced, chip, array, nanopartic+, gold, microsphere, hole?, Raman, fluorescence, microRNA, miRNA, CTAB, DNA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109781705 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 21 May 2019 (2019-05-21) claims 1-10, description, paragraphs [0034]-[0055], and figures 1-8	1-14
X	顾卓敏 (GU, Zhuomin). "二维有序金属球腔阵列的构筑及拉曼光谱研究 (Fabrication and Raman Spectra of Two-dimensional Ordered Gold Cavities)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑 (Chinese Master's Theses Full-Text Database, Engineering Science and Technology I), No. S2, 15 December 2013 (2013-12-15), ISSN: 1674-0246, sections 1.4-1.5, 2.1-2.2 and 4.1-4.3	1, 3, 5-8, 12, 13
Y	顾卓敏 (GU, Zhuomin). "二维有序金属球腔阵列的构筑及拉曼光谱研究 (Fabrication and Raman Spectra of Two-dimensional Ordered Gold Cavities)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑 (Chinese Master's Theses Full-Text Database, Engineering Science and Technology I), No. S2, 15 December 2013 (2013-12-15), ISSN: 1674-0246, sections 1.4, 1.5, 2.1, 2.2 and 4.1-4.3	2, 4, 9-11, 14
Y	CN 103938158 A (TIANJIN UNIVERSITY) 23 July 2014 (2014-07-23) claim 5, description, paragraph [0030], and figure 1	2, 4



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

19 January 2020

Date of mailing of the international search report

06 February 2020

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/CN2019/114545

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUN, Jiadi et al. "Ultrasensitive "FRET-SEF" Probe for Sensing and Imaging MicroRNAs in Living Cells Based on Gold Nanoconjugates" <i>Analytical Chemistry</i> , Vol. 90, No. 5, 08 January 2018 (2018-01-08), experimental methods, results and discussion, and support information sheet S1	9-11, 14
A	CN 108037100 A (JIANGNAN UNIVERSITY et al.) 15 May 2018 (2018-05-15) entire document	1-14
A	CN 107478636 A (JIANGXI NORMAL UNIVERSITY) 15 December 2017 (2017-12-15) entire document	1-14
A	US 2007285657 A1 (ACADEMIA SINICA) 13 December 2007 (2007-12-13) entire document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/114545

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109781705	A	21 May 2019	None			
CN	103938158	A	23 July 2014	None			
CN	108037100	A	15 May 2018	CN	108037100	B	03 September 2019
				WO	2019096069	A1	23 May 2019
CN	107478636	A	15 December 2017	None			
US	2007285657	A1	13 December 2007	TW	I325956	B	11 June 2010
				US	7453565	B2	18 November 2008
				TW	200801486	A	01 January 2008

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/114545

A. 主题的分类

G01N 21/65 (2006.01) i; G01N 21/64 (2006.01) i; B82Y 15/00 (2011.01) i; B82Y 30/00 (2011.01) 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)

G01N21/-

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))

CNPAT, CNKI, EPDOC, WPI: 增强, 芯片, 纳米金, 纳米颗粒, 金球, 金棒, 金十字, 微球, 阵列, 孔洞, 活性剂, 拉曼, 荧光, 微小RNA, 检测, enhanced, chip, array, nanopartic+, gold, microsphere, hole?, Raman, fluorescence, microRNA, miRNA, CTAB, DNA

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
PX	CN 109781705 A (江南大学) 2019年 5月 21日 (2019 - 05 - 21) 权利要求1-10、说明书第[0034]-[0055]段、附图1-8	1-14
X	顾卓敏. “二维有序金属球腔阵列的构筑及拉曼光谱研究” 中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技 I 辑, 第S2期, 2013年 12月 15日 (2013 - 12 - 15), ISSN: 1674-0246, 第1.4-1.5, 2.1-2.2, 4.1-4.3节	1, 3, 5-8, 12-13
Y	顾卓敏. “二维有序金属球腔阵列的构筑及拉曼光谱研究” 中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技 I 辑, 第S2期, 2013年 12月 15日 (2013 - 12 - 15), ISSN: 1674-0246, 第1.4-1.5, 2.1-2.2, 4.1-4.3节	2, 4, 9-11, 14
Y	CN 103938158 A (天津大学) 2014年 7月 23日 (2014 - 07 - 23) 权利要求5、说明书第[0030]段、附图1	2, 4

☒ 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

2020年 1月 19日

国际检索报告邮寄日期

2020年 2月 6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

授权官员

吴艳苹

电话号码 86-(10)-53962453

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
Y	SUN, Jiadi 等. "Ultrasensitive "FRET-SEF" Probe for Sensing and Imaging MicroRNAs in Living Cells Based on Gold Nanoconjugates" Analytical Chemistry, 第90卷, 第5期, 2018年 1月 8日 (2018 - 01 - 08), 实验方法, 结果与讨论, 支持信息表S1	9-11, 14
A	CN 108037100 A (江南大学 等) 2018年 5月 15日 (2018 - 05 - 15) 全文	1-14
A	CN 107478636 A (江西师范大学) 2017年 12月 15日 (2017 - 12 - 15) 全文	1-14
A	US 2007285657 A1 (ACADEMIA SINICA) 2007年 12月 13日 (2007 - 12 - 13) 全文	1-14

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/114545

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)
CN	109781705	A	2019年 5月 21日	无			
CN	103938158	A	2014年 7月 23日	无			
CN	108037100	A	2018年 5月 15日	CN	108037100	B	2019年 9月 3日
				WO	2019096069	A1	2019年 5月 23日
CN	107478636	A	2017年 12月 15日	无			
US	2007285657	A1	2007年 12月 13日	TW	I325956	B	2010年 6月 11日
				US	7453565	B2	2008年 11月 18日
				TW	200801486	A	2008年 1月 1日