

(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
2013 年 12 月 27 日 (27.12.2013)



(10) 国际公布号
WO 2013/189265 A1

(51) 国际专利分类号:

G01N 21/29 (2006.01) G01N 21/78 (2006.01)
G01N 21/33 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2013/077335

(22) 国际申请日: 2013 年 6 月 17 日 (17.06.2013)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201210206227.2 2012 年 6 月 18 日 (18.06.2012) CN
201210207722.5 2012 年 6 月 18 日 (18.06.2012) CN
201210205843.6 2012 年 6 月 18 日 (18.06.2012) CN
201210205861.4 2012 年 6 月 18 日 (18.06.2012) CN

(71) 申请人: 中国科学院化学研究所 (INSTITUTE OF CHEMISTRY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村北一街 2 号, Beijing 100190 (CN)。

(72) 发明人: 唐亚林 (TANG, Yalin); 中国北京市海淀区中关村北一街 2 号, Beijing 100190 (CN)。孙红霞 (SUN, Hongxia); 中国北京市海淀区中关村北一街 2 号, Beijing 100190 (CN)。杨千帆 (YANG, Qianfan); 中国北京市海淀区中关村北一街 2 号, Beijing 100190 (CN)。向俊锋 (XIANG, Junfeng); 中国北京市海淀区中关村北一街 2 号, Beijing 100190 (CN)。

(74) 代理人: 北京弘权知识产权代理事务所 (普通合伙) (CHINABLE IP); 中国北京市朝阳区安定路 35 号六层 35-10-2 内 620 室, Beijing 100029 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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,

[见续页]

(54) Title: METHOD, SYSTEM, AND KIT FOR DETECTING POTASSIUM ION CONCENTRATION

(54) 发明名称: 钾离子浓度检测方法、系统和试剂盒

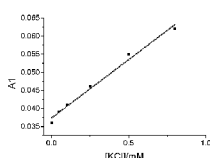


图 1/Fig. 1

(57) Abstract: Provided is a method for detecting a potassium ion concentration in a liquid sample, comprising the steps of: (1) formulating a plurality of solution samples with different potassium ion concentrations with a buffering solution at a pH of 6.2-8.2, wherein each of the solution samples contains DNA molecules capable of forming G-quadruplexes at the same concentration and a cyanine dye at the same concentration; (2) placing the plurality of solution samples under an ultraviolet/visible light absorption spectrometer or a spectrophotometer, and detecting the absorbance value at a first wavelength and the absorbance value at a second wavelength, or placing the plurality of solution samples under a fluorescence spectrophotometer, and detecting the fluorescence intensity value at a third wavelength with an excitation wavelength of 560 nm,

wherein the first wavelength is in a range of 560 nm to 590 nm, the second wavelength is in a range of 500 nm to 540 nm, and the third wavelength is in a range of 580 nm to 640 nm; (3) plotting with the potassium ion concentration of each of the solution samples as an abscissa or an ordinate and the absorbance value at the first wavelength or the absorbance value at the second wavelength or the ratio of the absorbance value at the first wavelength to the absorbance value at the second wavelength, or the fluorescence intensity value at the third wavelength measured in step (2) as an ordinate or an abscissa, so as to obtain a standard curve of the potassium ion concentration; (4) adding DNA molecules capable of forming G-quadruplexes, a compound of formula I and a buffering solution into a liquid sample to be tested, so as to allow the DNA molecules capable of forming G-quadruplexes, the compound of formula I and the pH value in the liquid sample to be tested to be consistent with those of the solution samples in step (1), so as to obtain a test solution; (5) placing the test solution obtained in step (4) under the ultraviolet/visible light absorption spectrometer or the spectrophotometer and detecting the absorbance values of the test solution at the first wavelength and the second wavelength, or placing the test solution under the fluorescence spectrophotometer, and detecting the fluorescence intensity value at a third wavelength with an excitation wavelength of 560 nm; (6) determining the corresponding potassium ion concentration value of the test solution in the standard curve of the potassium ion concentration obtained in step (3) by using the absorbance value at the first wavelength or the absorbance value at the second wavelength, or the ratio of the absorbance value at the first wavelength to the absorbance value at the second wavelength or the fluorescence intensity value at the third wavelength measured in step (5), and then calculating the potassium ion concentration of the sample to be tested by the dilution ratio of the sample to be tested.

(57) 摘要:

[见续页]

WO 2013/189265 A1



IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, 本国际公布:

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)。

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

提供了一种检测液体样品中钾离子浓度的方法，包括以下步骤：（1）用 pH6.2-8.2 的缓冲溶液配制钾离子浓度不同的多个溶液样本，其中每个所述溶液样本中含有相同浓度的能够形成 G-四链体的 DNA 分子以及相同浓度的菁染料；（2）将所述多个溶液样本置于紫外可见光吸收光谱仪或分光光度计下，检测第一波长处的吸光度值及第二波长处的吸光度值，或者将所述多个溶液样本置于荧光光谱仪下，采用 560nm 的激发波长，检测波长在第三波长处的荧光强度值，其中所述第一波长在 560nm 至 590nm 范围，所述第二波长在 500nm 至 540nm 范围，所述第三波长在 580nm 至 640nm 范围；（3）以各个所述溶液样本的钾离子浓度作为横坐标或纵坐标，以步骤（2）中测得的第一波长处的吸光度值或第二波长处的吸光度值或者第一波长处的吸光度置于第二波长处的吸光度值的比值或者第三波长处的荧光强度值作为纵坐标或横坐标作图，从而获的钾离子浓度的标准曲线；（4）在待测液体样品中加入能够形成 G-四链体的 DNA 分子、式 I 的化合物以及缓冲液，以使待测液体样品中的能够形成 G-四链体的 DNA 分子、式 I 的化合物以及 pH 值与步骤（1）中的溶液样本一致，从而得到测试溶液；（5）将步骤（4）中获得的测试溶液置于紫外可见光吸收光谱仪或分光光度计下，检测测试溶液在第一波长及第二波长处吸光度值，或者将所述测试溶液置于荧光光谱仪下，采用 560nm 的激发波长，检测第三波长处的荧光强度值；（6）利用步骤（5）中测得的第一波长处的吸光度值或第二波长处的吸光度值或者第一波长处的吸光度值与第二波长处的吸光度值的比值或者第三波长处的荧光强度值在步骤（3）中获得的钾离子浓度标准曲线中找到对应的测试溶液的钾离子浓度值，然后通过待测样品的被稀释倍数计算出待测样品的钾离子浓度。

钾离子浓度检测方法、系统和试剂盒

5 相关申请的交叉引用

本申请要求 2012 年 6 月 18 日提交的中国专利申请 201210206227.2、201210207722.5、201210205843.6 和 201210205861.4 的优先权。本申请通过引用包括上述申请的全部内容。

技术领域

10 本发明属于生物医药领域，具体而言涉及一种钾离子浓度检测方法。

背景技术

人体内的钾是维持细胞生理活动的主要阳离子，是保持机体的正常渗透压及酸碱平衡，参与糖及蛋白质代谢，保证神经肌肉的正常功能所必需，其含量是人体生理活动的重要指标。尿液、血清中钾离子的含量水平在临床上可用来诊断一些肾脏、心脏
15 等方面的疾病。

正常情况下，人体的钾离子浓度有一个合理的参考范围，如血清中：3.5~5.5 mmol/L；尿液中 25~125 mmol/24h。当钾离子高于参考值，表现出高钾症，其原因主要有：急性肾功能衰竭、严重溶血或组织损伤、急性酸中毒或组织缺氧、肾上腺皮质功能减退、醛固酮缺乏、长期应用利尿剂、家族性高血钾等。血清钾高还可引起严重的肌肉、心肌和呼吸功能的抑制性应激紊乱，以及特异的心电图改变。血清钾高于
20 7mmol/L 时，就有这些现象出现，超过 10mmol/L 时，即可发生心室纤颤，心脏停搏而导致死亡。反之当钾的摄入量不足、钾丢失严重、肾脏疾病转入多尿期等情况时则会出现低钾症。

现有技术中测定钾离子浓度的方法主要有：中子活化法、同位素稀释质谱法、化学测定法、火焰光度法、离子选择电极法、酶动力学法、原子分光光度法等。目前，临床上经常使用的方法是火焰光度法和离子选择电极法。

(1) 火焰光度法：火焰光度法是一种发射光谱分析法，利用火焰中激发态原子回降至基态时发射的光谱强度进行含量分析，可检测血清、尿液、脑脊液及胸腹水的

Na⁺和 K⁺，该方法属于经典的标准参考法，优点是结果准确可靠，广为临床采用。

通常采用的定量方法有外标准法和内标准法。外标准法一般操作误差较大，不常采用。内标法是标本及标准液采用加进相同浓度的内部标准元素进行测定，一般是加入锂内标，测定的是锂 / 钾电流的比值，而不是单独钾的电流，这样，可减小燃气和火焰温度波动等因素引起的误差，因而有较好的准确性。

(2) 离子选择电极法 (ISE 法)：在专用仪器上进行血清和尿液的钾、钠离子测定。因其具有标本用量少，快速准确，操作简便等优点，是目前所有方法中最为简便准确的方法，几乎有取代其他方法的趋势。其原理是：离子选择电极是一种电化学传感器，其结构中有一个对特定离子具有选择性响应的敏感膜电极，将离子活度转换成电位信号，在一定范围内，其电位与溶液中特定离子活度的对数呈线性关系，通过与已知离子浓度的溶液比较可求得未知溶液的离子活度，按其测定过程又分为直接测定法和间接测定法，目前大部分采用间接测定法，由于间接测定法将待测样本稀释后测定，所测离子活度更接近离子浓度。

目前主要的电极种类有：玻璃膜电极，感应材料为玻璃膜；固相电极，由难溶金属物质加压成型；液态膜电极，将环氧树脂或内装聚氯乙烯作为感应膜；缬氨霉素膜制成的 K⁺电极。这些电极都具有一定寿命，使用一段时间后，电极会老化，且价格昂贵。

(3) 化学测定法：目前 K⁺的化学测定主要利用复环王冠化合物如穴冠醚或球冠醚，亦称为冠醚，均为离子载体进行测定，由于大环结构内有空穴，分子内部氧原子有未共用电子对可与金属离子结合，根据空穴大小，可选择性结合不同直径的金属离子，从而达到测出离子浓度的目的。

(4) 酶法：酶法测定钾的原理是利用对丙酮酸激酶的激活作用，后者催化磷酸烯醇式丙酮酸变为乳酸同时伴有还原型辅酶 I 的消耗，在波长 340nm 处测 NADH 的吸光度下降。

(5) 原子分光光度法也可用于检测血清中钾、钠离子，但操作复杂，误差较大，不及火焰光度法简便。

发明内容

本发明的目的：提供一种利用菁染料超分子与鸟嘌呤四链体 (G-四链体) 作用体系检测钾离子浓度的新方法，以及应用该方法配制而成的钾离子浓度检测试剂盒。利用该试剂盒中的试剂，可利用紫外吸收光谱或荧光光谱仪器定量分析血清或尿液中钾

离子的浓度，测定过程不受钠离子或其他微量元素的影响，精确度高。同时，由于该试剂灵敏度很高，对不同钾离子浓度表现出颜色上的变化，肉眼可见，可实现可视化检测。

本发明的总体技术路线为：通过加入钾离子来调控 G-四链体结构的形成或构象转变，随之菁染料识别 G-四链体结构的变化，从而反映出钾离子的浓度水平。具体为：在没有钠离子及其他金属阳离子存在的环境下，钾离子促使单链的 DNA 序列转变为 G-四链体结构，随着 G-四链体结构的生成，菁染料的聚集形态发生变化，从而在颜色上发生改变，达到肉眼观测，同时在紫外吸收光谱及荧光光谱上也发生明显的变化，吸光度及荧光强度的变化程度与钾离子浓度成正比，从而实现定量反映钾离子水平；或者在钠离子存在的环境下，DNA 序列形成反平行结构 G-四链体，加入钾离子反平行 G-四链体则发生构象转变，随着 G-四链体构象转变，菁染料的聚集形态发生变化，从而在颜色上及紫外吸收光谱及荧光光谱上也发生明显的变化，吸光度及荧光强度的变化程度与钾离子浓度成正比，可定量反映钾离子水平。

本发明的第一方面提供一种检测液体样品中钾离子浓度的方法，所述方法包括以下步骤：

(1) 用 pH6.2~8.2 的缓冲溶液配制钾离子浓度不同的多个溶液样本，其中每个所述溶液样本中含有相同浓度的能够形成 G-四链体的 DNA 分子以及相同浓度的菁染料；

(2) 将所述多个溶液样本置于紫外可见光吸收光谱仪或分光光度计下，检测第一波长处的吸光度值及第二波长处的吸光度值，或者将所述多个溶液样本置于荧光光谱仪下，采用 560nm 的激发波长，检测波长在第三波长处的荧光强度值，其中所述第一波长在 560nm 至 590nm 范围，所述第二波长在 500nm 至 540nm 范围，所述第三波长在 580nm 至 640nm 范围；

(3) 以各个所述溶液样本的钾离子浓度作为横坐标或纵坐标，以步骤 (2) 中测得的第一波长处的吸光度值或第二波长处的吸光度值或者第一波长处的吸光度值与第二波长处的吸光度值的比值或者第三波长处的荧光强度值为纵坐标或横坐标作图，从而获得钾离子浓度的标准曲线；

(4) 在待测液体样品中加入能够形成 G-四链体的 DNA 分子、式 I 的化合物以及缓冲液，以使待测液体样品中的能够形成 G-四链体的 DNA 分子的浓度、式 I 的化合物的浓度以及 pH 值与步骤 (1) 中的溶液样本一致，从而得到测试溶液；

(5) 将步骤 (4) 中获得的测试溶液置于紫外可见光吸收光谱仪或分光光度计下，

检测测试溶液在第一波长及第二波长处吸光度值，或者将所述测试溶液置于荧光光谱仪下，采用 560nm 的激发波长，检测第三波长处的荧光强度值；

5 (6) 利用步骤(5)中测得的第一波长处的吸光度值或第二波长处的吸光度值或者第一波长处的吸光度值与第二波长处的吸光度值的比值或者第三波长处的荧光强度值在步骤(3)中获得的钾离子浓度标准曲线中找到对应的测试溶液的钾离子浓度值，然后通过待测样品被的稀释倍数计算出待测样品的钾离子浓度。

本发明的方法可以方便地用于检测各种溶液样品中的钾离子浓度，例如，可以检测人或动物血液、尿液或其他体液中的钾离子浓度。

10 由于在人体或动物体中，除了钾离子之外还存在许多其他金属离子，特别是钠离子的存在对本发明的方法的精确性会产生一定的影响。

因此，本发明的第二方面提供一种在钠离子背景下检测液体样品中钾离子浓度的方法，所述方法包括以下步骤：

15 (1) 用 pH6.2~8.2 的缓冲溶液配制钾离子浓度不同的多个溶液样本，其中每个所述溶液样本中含有相同浓度的能够形成 G-四链体的 DNA 分子、相同浓度的钠离子以及相同浓度的菁染料；

20 (2) 将所述多个溶液样本置于紫外可见光吸收光谱仪或分光光度计下，检测所述溶液样本在第一波长及第四波长处的吸光度值，或者将所述多个溶液样本置于荧光光谱仪下，采用 560nm 的激发波长，检测波长在第三波长处的荧光强度值，其中所述第一波长在 560nm 至 590nm 范围，所述第四波长在 610nm 至 670nm 范围，所述第三波长在 580nm 至 640nm 范围；

(3) 以各个所述溶液样本的钾离子浓度作为横坐标或纵坐标，以步骤(2)中测得的各溶液样本在第一波长处的吸光度值或第四波长处的吸光度值或者第一波长处的吸光度值与第四波长处的吸光度值的比值或者第三波长处的荧光强度值为纵坐标或横坐标作图，从而获得钾离子浓度的标准曲线；

25 (4) 在待测液体样品中加入能够形成 G-四链体的 DNA 分子、式 I 的化合物以及缓冲液，以使待测液体样品中的能够形成 G-四链体的 DNA 分子的浓度、式 I 的化合物的浓度以及 pH 值与步骤(1)中的溶液样本一致，从而得到测试溶液；

30 (5) 将步骤(4)中获得的测试溶液置于紫外可见光吸收光谱仪或分光光度计下，检测所述测试溶液在所述第一波长及所述第四波长处的吸光度值，或者将所述测试溶液置于荧光光谱仪下，采用 560nm 的激发波长，检测波长在所述第三波长处的荧光强度值；

(6) 利用步骤(5)中测得的第一波长处的吸光度值或第四波长处的吸光度值或者第一波长处的吸光度值与第四波长处的吸光度值的比值或者第三波长处的荧光强度值在步骤(3)中获得的钾离子浓度标准曲线中找到对应的测试溶液的钾离子浓度值, 然后通过待测样品被的稀释倍数计算出待测样品的钾离子浓度。

5 本发明的第三方面提供一种检测液体样品中钾离子浓度范围的方法, 所述方法包括以下步骤:

(1) 用 pH6.2~8.2 的缓冲溶液以一定的钾离子浓度梯度配制多个溶液样本, 其中每个所述溶液样本中含有相同浓度的能够形成 G-四链体的 DNA 分子、相同浓度的钠离子以及相同浓度的菁染料; 将配制好的溶液样本作为标准比色样品备用;

10 (2) 在待测液体样品中加入能够形成 G-四链体的 DNA 分子、菁染料以及缓冲液, 以使待测液体样品中的能够形成 G-四链体的 DNA 分子的浓度、菁染料的浓度以及 pH 值与步骤(1)中的溶液样本一致, 从而得到测试溶液, 并记录待测液体样品被稀释的比例;

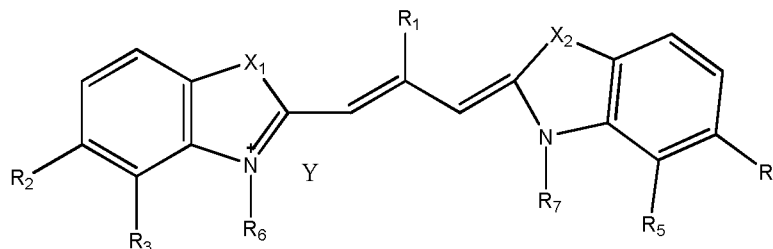
(3) 将测试溶液与步骤(1)中获得的标准比色样品的颜色进行对比, 颜色与测试溶液相同的标准比色样品的钾离子浓度与测试溶液的钾离子浓度一致, 并通过待测样品的稀释比例计算待测样品的钾离子浓度。

根据本发明第一方面的方法, 其中所述缓冲液选自三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、硼酸-硼砂缓冲液、三乙醇胺缓冲液、咪唑-盐酸缓冲液、双甘氨酸缓冲液或 2-氨基-2-甲基-1-丙醇缓冲液。

20 根据本发明第二方面和第三方面的方法, 其中所述缓冲液选自三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl) 缓冲液、硼酸-硼砂缓冲液、三乙醇胺缓冲液、咪唑-盐酸缓冲液、双甘氨酸缓冲液、2-氨基-2-甲基-1-丙醇缓冲液、磷酸钠-磷酸氢钠缓冲液、巴比妥钠-盐酸缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液、硼砂-氢氧化钠缓冲液或磷酸钠缓冲液。

25 在本发明的实施方案中, 对缓冲液中缓冲剂的浓度并不做特别的限定, 但是优选的浓度范围为 10~50 mmol/L。

根据本发明第一方面、第二方面和第三方面的方法, 其中所述菁染料为下式 I 的化合物



式 I

其中： R_1 为 C_1 - C_6 的烷基、苯基、烷基取代的苯基； R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自 H 或 C_1 - C_6 的烷基，或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的碳原子一起形成 5 元至 7 元的环结构，或者 R_4 和 R_5 与它们所连接的碳原子一起形成 5 元至 7 元的环结构； R_6 和 R_7 为 C_1 - C_6 烷基或者磺酸基取代的 C_1 - C_6 烷基；Y 为反离子，根据 R_6 和 R_7 所带电荷的不同而不同，若 R_6 和 R_7 为烷基，则 Y 为卤素阴离子；若 R_6 和 R_7 只有一个带有磺酸根，则无需 Y 作为反离子；若 R_6 和 R_7 均带有磺酸根，则 Y 为三乙胺阳离子； X_1 ， X_2 独立地选自碳 (C)、氧 (O)、硫 (S)、硒 (Se) 或碲 (Te)。

根据本发明第一方面、第二方面和第三方面的方法，其中 C_1 - C_6 的烷基为碳原子数为 1-6 的直链或支链的烷基，包括但不限于，甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、正己基或异己基等。

根据本发明第一方面、第二方面和第三方面的方法，其中 R_1 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、正己基、异己基、苯基、甲基苯基或二甲基苯基。

根据本发明第一方面、第二方面和第三方面的方法，其中 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、正己基或异己基。

根据本发明第一方面、第二方面和第三方面的方法，其中 R_2 和 R_3 与它们所连接的碳原子可以形成 5 元至 7 元的饱和环结构或不饱和环结构，所述环结构可以含或不含有氮 (N) 或硫 (S) 原子。

根据本发明第一方面、第二方面和第三方面的方法，其中 R_4 和 R_5 与它们所连接的碳原子可以形成 5 元至 7 元的饱和或不饱和环结构，所述环结构可以含或不含有 N 或 S 原子。

根据本发明第一方面、第二方面和第三方面的方法，其中 Y 优选为氟、氯、溴、碘阴离子或三乙胺阳离子。

根据本发明第一方面、第二方面和第三方面的方法，其中可以通过使用可溶性钾盐如氯化钾、硫酸钾、硝酸钾等来配制所述多个溶液样本，各溶液样本中钾离子浓度

的范围优选在 0 至 300 mmol/L 的范围, 进一步优选在 0 至 200mmol/L 的范围, 更进一步优选在 0 至 150mmol/L 的范围, 最优选在 20 至 100 mmol/L 的范围, 其中所述可溶性钾盐的非限定性实例包括, 氯化钾、溴化钾、碘化钾、硫酸钾或硝酸钾等。

5 根据本发明第二方面或第三方面所述的方法, 其中所述多个溶液样本中钠离子浓度优选控制在人体或动物体中生理浓度范围内, 例如 0 至 300 mmol/L 的范围, 优选 10 至 200mmol/L, 更优选在 40 至 160 mmol/L 的范围, 钠离子的浓度可以通过添加可溶性钠盐或者使用含有钠离子的缓冲液来调节, 所述可溶性钠盐的非限定性实例包括, 氯化钠、溴化钠、碘化钠、硫酸钠或硝酸钠等。

10 根据本发明第一方面、第二方面和第三方面的方法, 其中所述菁染料在溶液样本中的浓度在 3 至 20 μ mol/L 的范围, 优选在 5 至 10 μ mol/L, 所述能够形成 G-四链体的 DNA 分子在溶液样本中的浓度在 3 至 30 μ mol/L 的范围, 优选在 5 至 20 μ mol/L, 进一步优选在 10 至 20 μ mol/L。

根据本发明第一方面、第二方面和第三方面的方法, 其中所述能够形成 G-四链体的 DNA 分子为分子序列中富含鸟嘌呤的 DNA 分子, 并且优选分子序列中具有
15 “GG”结构的 DNA 分子。此类 DNA 分子中, 四个鸟嘌呤通过氢键连接可以形成平面四集体, 两个以上的平面四集体可以相互堆叠形成立体四链结构, 即鸟嘌呤四链体(G-四链体)。这类 DNA 分子的非限定性实例包括, 如可购自英骏生物技术有限公司的
TTAGGGTTAGGG 、 TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 、
AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 、 TGAGGGTGAGGGAGGGTGAGGGAA 、
20 AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG 、 GGGCGCGGGAGGAATTGGGCGGG 、
GGTTGGTGTGGTTGG、TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG、TTGGGGTTGGGG、
GGGGTTGGGG 、 GGGCGCGGGAGGAAGGGGGCGGG 或
GGGCGCGGGAGGAATTGGGCGGG 等 DNA 分子, 但可形成 G-四链体的 DNA 序列
范围不受这些列举所限制。另外, 对于本发明中所使用的能够形成 G-四链体的 DNA
25 分子的长度并没有特殊限制, 但是优选 6~300 个碱基的长度, 更优选 10~100 个碱基的长度, 最优选 10~30 个碱基的长度。

本发明的第四方面提供一种实施本发明方法的试剂盒, 所述试剂盒包括:
pH6.2~8.2 的缓冲液、可溶性钾盐、能够形成 G-四链体的 DNA 分子和菁染料。

根据本发明第四方面的试剂盒, 还包括可溶性钠盐。

30 根据本发明第四方面的试剂盒, 还包括标准比色卡, 其中所述标准比色卡中不同的颜色对应不同的钾离子浓度。所述标准比色卡上的颜色可以通过以下方式来确定:

(i) 用 pH6.2~8.2 的缓冲溶液配制钾离子浓度不同的多个溶液样本, 使每个所述溶液样本中含有相同浓度的能够形成 G 四链体的 DNA 分子、相同浓度的钠离子以及相同浓度的菁染料; (ii) 按照溶液样本钾离子浓度由低到高的顺序排列, 并通过例如数码相机等图像采集手段采集溶液样本的颜色并制作成标准比色卡, 比色卡上不同的颜色对应不同的钾离子浓度。在这种情况下, 使用试剂盒检测待测样品中钾离子浓度时, 在待测液体样品中加入能够形成 G-四链体的 DNA 分子、菁染料、可溶性钠盐以及缓冲液, 以使待测液体样品中的能够形成 G-四链体的 DNA 分子的浓度、菁染料的浓度、钠离子浓度以及 pH 值与在确定标准比色卡的颜色时所配制的溶液样本一致, 从而得到测试溶液, 通过将测试溶液的颜色与标准比色卡上的颜色进行比较来确定测试溶液的钾离子浓度范围, 并通过待测样品的稀释倍数获得待测样品的浓度范围。

根据本发明第四方面的试剂盒, 其中所述缓冲液、可溶性钾盐、可溶性钠盐、能够形成 G 四链体的 DNA 分子和菁染料如前文所定义。

根据本发明的方法、试剂盒和系统, 其中对于式 I 的化合物而言, 其制备方法可以参考 Leslie G. S., Brooker and Frank L. W., JACS, 1935, 547-551 中记载的合成路线, 也可以使用本领域熟知的其他方法来制备。

本发明的第五方面提供实施本发明第一方面和第二方面方法的系统, 所述系统包括本发明第四方面的试剂盒和紫外可见光吸收光谱仪或分光光度计或荧光光谱仪。

本发明的方法和试剂盒的主要优点在于:

1) 本发明利用菁染料超分子聚集体特异识别钾离子调控的 G-四链体结构, 可在生理钠离子浓度下操作而不受影响, 对钾离子特异性高;

2) 本发明使用菁染料超分子探针, 对钾离子调控的 G-四链体结构变化十分敏感, 伴有聚集形态的改变, 同时在紫外吸收光谱中展现出吸收带高达近百纳米的位移, 因而产生颜色上的变化, 可实现可视检测;

3) 本发明所使用的菁染料超分子, 在紫外吸收光谱及荧光光谱都能产生显著变化, 利用普通的紫外吸收光谱仪或分光光度计或荧光光谱仪都可实现定量检测, 不需要特殊或额外仪器, 测试成本低廉, 便于行业内推广应用;

4) 本发明所用试剂成分只有 3~4 种, 只需按比例混合, 就可用仪器检测, 操作简单、快捷且成本低廉, 该体系在缓冲液环境中操作, 不会污染环境。

5) 本发明所用试剂成分简单、种类少, 相互之间不会产生影响, 且稳定性好, 可长时间储存, 能很好保证应用测试效果;

6) 应用本发明提供的检测方法可以制成液态试剂、干粉试剂、干试剂等多种形

式的试剂，可用来测定人体和其它动物体内钾离子的含量，也可用来检测水质或土壤等其他样本中的钾离子水平。

7) 应用本发明提供的检测方法，根据菁染料聚集体颜色变化的特性，可以开发成试纸的形式，使检测更为简单、便利。

5 8) 使用本发明的方法，通过不同的稀释倍数，可以实现对各种浓度范围的样品中的钾离子浓度进行分析。

附图说明

图 1 是根据本发明实施例 1 的钾离子浓度标准曲线；

图 2 是根据本发明实施例 2 的钾离子浓度标准曲线；

10 图 3 是根据本发明实施例 3 的钾离子浓度标准曲线；

图 4 是根据本发明实施例 4 的钾离子浓度标准曲线；

图 5 是根据本发明实施例 9 的钾离子浓度标准曲线；

图 6 是根据本发明实施例 10 的钾离子浓度标准曲线；

图 7 是根据本发明实施例 11 的钾离子浓度标准曲线；

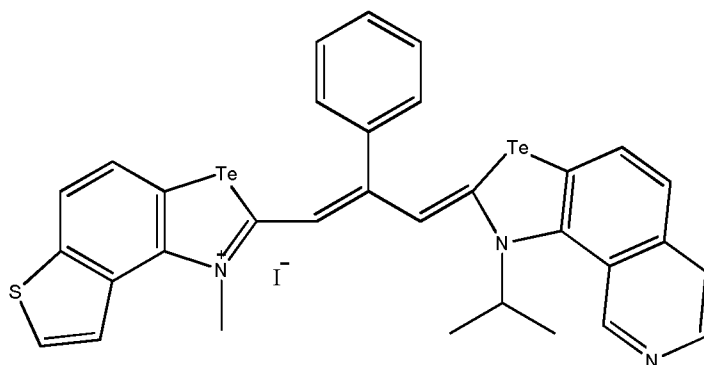
15 图 8 是根据本发明实施例 12 的钾离子浓度标准曲线。

具体实施方式

下面将参照附图以具体实施例的方式来更详细地描述本发明，但是应当理解，本发明可以以不同的方式实施，提供这些实施例仅是为了使本说明书充分和完整，以使本领域技术人员能够实施本发明，本发明的范围不应当限定为本文所列的具体实施
20 例。在本发明的实施例中所使用的仪器有：紫外可见光吸收光谱仪，型号为 Agilent 8453 UV-visible spectrophotometer；荧光光谱仪，型号 Hitachi F4500 spectrofluorometer (Japan)。

实施例 1

在本实施例中使用的能够形成 G 四链体的 DNA 为
25 AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG，所使用的菁染料为下式的化合物



1) 制备标准溶液样本和测试溶液

将一定量的 DNA 溶解于 pH 值 6.2 的 Tris-HCl 缓冲液中, 制备浓度为 200 μ mol/L DNA 母液, 备用。

5 取浓度为 200 μ mol/L 菁染料的甲醇溶液 300 μ L, 加入 19.2ml Tris-HCl 缓冲液, 然后再加入 DNA 溶液 300 μ L 混匀。把上述样本平均分成 10 份, 每份样本溶液为 1.98mL。

取其中的 6 个样本, 分别加入一定量的浓度为 200mmol/L 的 KCl 溶液, 然后用 Tris-HCl 缓冲液定容至 2mL, 得到钾离子的浓度分别为 0、0.05、0.1、0.25、0.5、0.8 mmol/L 的标准溶液样本。

10 另外 4 个样本中加入待测尿液样本 20 μ L, 得到 4 个测试溶液, 尿液样本占测试溶液的 1%。

以上样品于阴暗处放置、备用。

2) 检测分析

15 将上述样品分别利用紫外吸收光谱仪进行分析。一切操作都在室温环境下进行, 不需额外条件。紫外吸收光谱收集的波长在 400~800nm 处的数据。

3) 结果分析

20 以标准样本在 580nm 处的吸光度 (A_1) 为横坐标, 以标准样本的钾离子浓度为纵坐标做图, 得到钾离子浓度的标准曲线, 如图 1 所示。用测试溶液的 580nm 处的吸光度可以在标准曲线上找到对应的测试溶液的钾离子浓度值, 将其除以 1% 得到待测尿样的钾离子浓度值, 结果见下表 1。

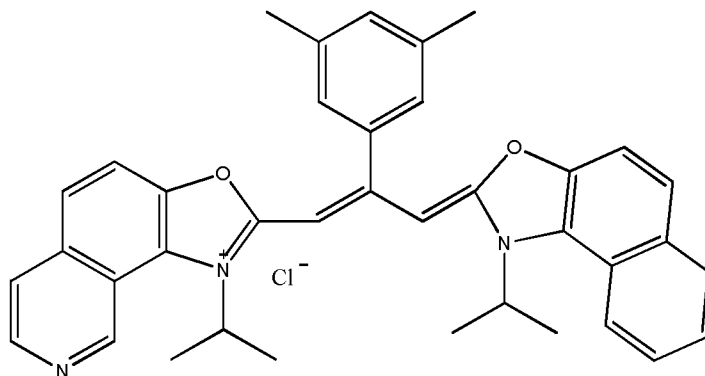
表 1

待测样品	由 A_1 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
尿样 1	33.28	32.76
尿样 2	51.29	53.93
尿样 3	70.56	72.53

尿样 4	16.13	15.20
------	-------	-------

实施例 2

在本实施例中使用的能够形成 G 四链体的 DNA 为 TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA DNA，所使用的菁染料为下式的化合物



5 1) 制备标准溶液样本和测试溶液

将一定量的 DNA 溶解于 pH 值 8.2 的硼酸-硼砂缓冲液中,制备浓度为 200 μ mol/L DNA 母液, 备用。

取浓度为 600 μ mol/L 菁染料的甲醇溶液 300 μ L, 加入 19.2ml 硼酸-硼砂缓冲液, 然后再加入 DNA 溶液 300 μ L 混匀。把上述样本平均分成 10 份, 每份样本溶液为 1.98mL。

取其中的 6 个样本, 分别加入一定量的浓度为 200mmol/L 的 KCl 溶液, 然后用硼酸-硼砂缓冲液定容至 2mL, 得到钾离子的浓度分别为 0、0.05、0.1、0.25、0.5、0.8 mmol/L 的标准溶液样本。

15 另外 4 个样本中加入待测尿液样本 20 μ L, 得到 4 个测试溶液, 尿液样本占测试溶液的 1%。

2) 检测分析

将上述样品分别利用紫外吸收光谱仪进行分析。一切操作都在室温环境下进行, 不需额外条件。紫外吸收光谱收集的波长在 400~800nm 处的数据。

3) 结果分析

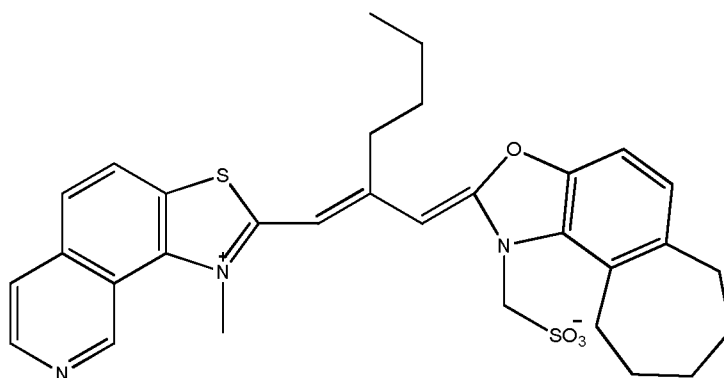
20 以标准样本在 580nm 处的吸光度与 530nm 处吸光度的比值 (A_1/A_2) 为纵坐标, 以标准样本的钾离子浓度为横坐标做图, 得到钾离子浓度的标准曲线, 如图 2 所示。用测试溶液的 580nm 处的吸光度与 530nm 处吸光度的比值可以在标准曲线上找到对应的测试溶液的钾离子浓度值, 将其除以 1%得到待测尿样的钾离子浓度值, 结果见下表 2。

表 2

待测样品	由 A_1/A_2 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
尿样 1	28.93	31.17
尿样 2	40.22	39.71
尿样 3	20.05	21.76
尿样 4	39.50	43.02

实施例 3

在本实施例中使用的能够形成 G 四链体的 DNA 为 GGGCCAGGGAGCGGGGCGGAGGGGG，所使用的菁染料为下式的化合物



1) 制备标准溶液样本和测试溶液

将一定量的 DNA 溶解于 pH 值 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液中，制备浓度为 600 μ mol/L DNA 母液，备用。

取浓度为 1.2 mmol/L 菁染料的甲醇溶液 300 μ L，加入 19.2ml Tris-HCl 缓冲液，然后再加入 DNA 溶液 300 μ L 混匀。把上述样本平均分成 10 份，每份样本溶液为 1.98mL。

取其中的 6 个样本，分别加入一定量的浓度为 200mmol/L 的 KCl 溶液，然后用 Tris-HCl 缓冲液定容至 2mL，得到钾离子的浓度分别为 0、0.05、0.1、0.25、0.5、0.8 mmol/L 的标准溶液样本。

另外 4 个样本中加入待测尿液样本 20 μ L，得到 4 个测试溶液，尿液样本占测试溶液的 1%。

以上样品于阴暗处放置、备用。

2) 检测分析

将上述样品分别利用紫外吸收光谱仪进行分析。一切操作都在室温环境下进行，不需额外条件。紫外吸收光谱收集的波长在 400~800nm 处的数据。

3) 结果分析

以标准样本在 530nm 处的吸光度 (A_2) 为纵坐标, 以标准样本的钾离子浓度为横坐标做图, 得到钾离子浓度的标准曲线, 如图 3 所示。用测试溶液的 530nm 处的吸光度在标准曲线上找到对应的测试溶液的钾离子浓度值, 将其除以 1% 得到待测尿样的钾离子浓度值, 结果见下表 3。

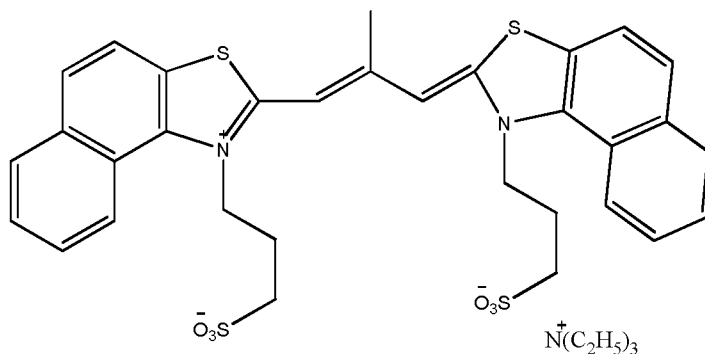
5

表 3

待测样品	由 A_2 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
尿样 1	15.41	14.88
尿样 2	38.42	35.24
尿样 3	14.12	16.34
尿样 4	4.06	4.87

实施例 4

在本实施例中使用的能够形成 G 四链体的 DNA 为 AGGGTT, 所使用的菁染料为下式的化合物



10

1) 制备标准溶液样本和测试溶液

将一定量的 DNA 溶解于 pH 值 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液中, 制备浓度为 1.2 mmol/L DNA 母液, 备用。

取浓度为 200 μ mol/L 菁染料的甲醇溶液 300 μ L, 加入 19.2ml Tris-HCl 缓冲液, 然后再加入 DNA 溶液 300 μ L 混匀。把上述样本平均分成 10 份, 每份样本溶液为 1.98mL。

15

取其中的 6 个样本, 分别加入一定量的浓度为 200mmol/L 的 KCl 溶液, 然后用 Tris-HCl 缓冲液定容至 2mL, 得到钾离子的浓度分别为 0、0.05、0.1、0.25、0.5、0.8 mmol/L 的标准溶液样本。

另外 4 个样本中加入待测尿液样本 20 μ L, 得到 4 个测试溶液, 尿液样本占测试溶液的 1%。

20

以上样品于阴暗处放置、备用。

2) 检测分析

将上述样品荧光光谱仪进行分析。一切操作都在室温环境下进行,不需额外条件。
荧光光谱激发波长为 560nm, 波长收集范围为 570~720nm。

3) 结果分析

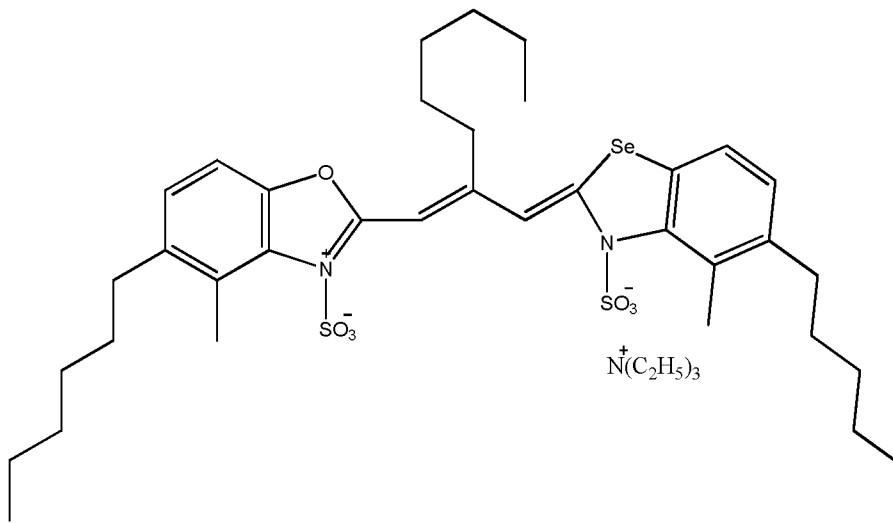
以标准样本的在波长 580nm 处的荧光强度 (FI) 为横坐标, 以标准样本的钾离子浓度为纵坐标做图, 得到钾离子浓度的标准曲线, 如图 4 所示。用测试溶液的荧光强度在标准曲线上找到对应的测试溶液的钾离子浓度值, 将其除以 1% 得到待测尿样的钾离子浓度值, 结果见下表 4。

表 4

待测样品	由 FI 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
尿样 1	18.18	19.36
尿样 2	46.53	69.27
尿样 3	5.03	5.68
尿样 4	9.57	10.35

实施例 5

采用与实施例 1 相同的步骤对四个血清样品进行检测, 区别在于使用的 DNA 为 TTAGGG TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG, 使用的菁染料为下式的化合物:



检测溶液样本和测试溶液在波长 590nm 处的吸光度, 记为 A_1 。

结果如下表 5:

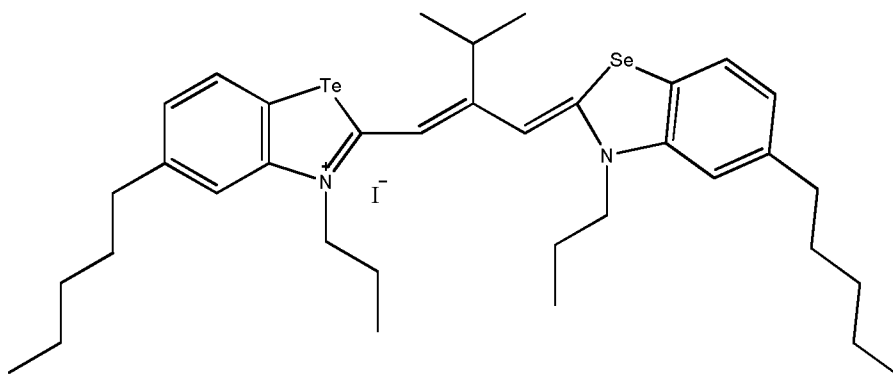
表 5

待测样品	由 A_1 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
血清样 1	32.67	28.29
血清样 2	50.13	45.23

血清样 3	34.12	37.19
血清样 4	21.17	25.87

实施例 6

采用与实施例 2 相同的步骤对四个血清样品进行检测，区别在于使用的 DNA 为 AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG，使用的菁染料为下式的化合物：



- 5 检测溶液样本和测试溶液在波长 590nm 处和 540nm 处的吸光度，分别记为 A_1 和 A_2 。

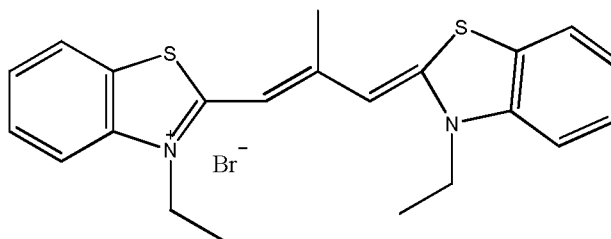
结果如下表 6：

表 6

待测样品	由 A_1/A_2 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
血清样 1	30.13	28.29
血清样 2	43.24	45.23
血清样 3	35.44	37.19
血清样 4	23.19	25.87

实施例 7

- 10 采用与实施例 3 相同的步骤对四个血清样品进行检测，区别在于使用下式的化合物：



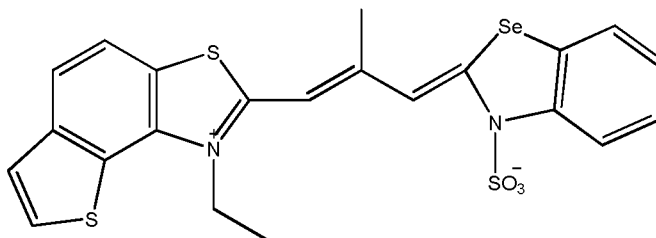
检测溶液样本和测试溶液在波长 500nm 处的吸光度，记为 A_2 。

结果如下表 7：

待测样品	由 A ₂ 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
血清样 1	33.12	28.29
血清样 2	50.18	45.23
血清样 3	35.45	37.19
血清样 4	24.05	25.87

实施例 8

采用与实施例 4 相同的步骤对四个血清样品进行检测，区别在于使用下式的化合物：



- 5 检测溶液样本和测试溶液在波长 640nm 处的荧光强度，记为 FI。
结果如下表 8：

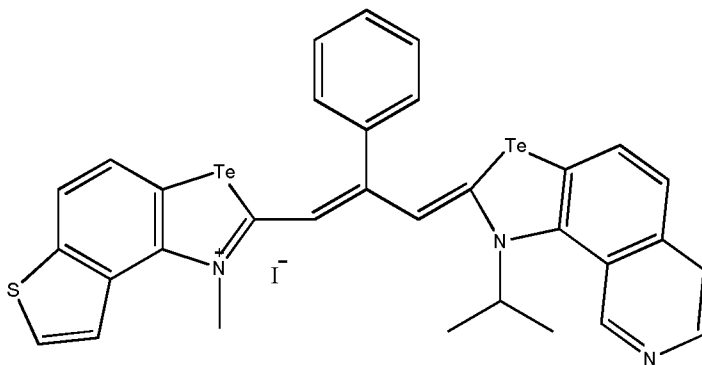
表 8

待测样品	由 FI 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
血清样 1	26.43	28.29
血清样 2	42.14	45.23
血清样 3	36.67	37.19
血清样 4	23.48	25.87

实施例 9-16 在钠离子背景下进行

实施例 9

- 10 在本实施例中使用的能够形成 G-四链体的 DNA 为 AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG，所使用的菁染料为下式的化合物



1) 配制标准溶液样本和测试溶液

将一定量的 DNA 样品溶解于含有 20mmol/L NaCl 的 Tris-HCl (Tris-Na) 缓冲液 (pH6.2) 中, 制备浓度为 500μmol/L 的 DNA 母液, 备用。

5 取浓度为 200μmol/L 菁染料的甲醇溶液 300μL, 加入 19.38ml Tris-Na 缓冲液, 然后再加入 DNA 溶液 120μL 混匀。把上述样本平均分成 10 份, 每份样本溶液为 1.98mL。

取其中的 7 个样本, 分别加入一定量的浓度为 200mmol/L KCl 的 Tris-Na 溶液, 然后用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL, 得到钾离子的浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1、1.5 mmol/L 的标准样本溶液。

另外 3 个样本中加入待测尿液样本 20μL, 尿液样本占总溶液样本的 1%。

10 以上样品于阴暗处放置、备用。

2) 检测分析

将上述样品利用紫外吸收光谱仪进行分析。一切操作都在室温环境下进行, 不需额外条件。紫外吸收光谱收集的波长在 400~800nm 处的数据。

3) 结果分析

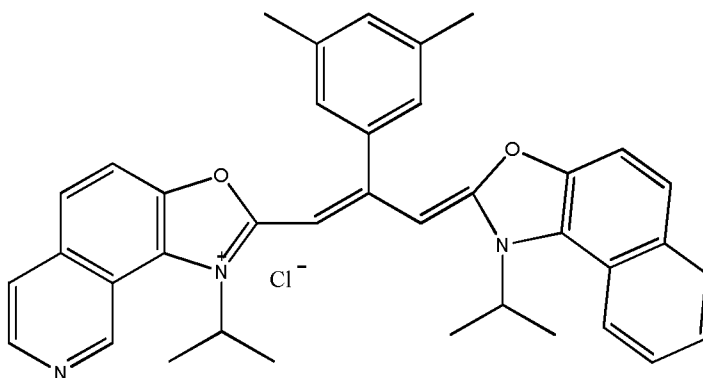
15 以标准溶液样本在 560nm 处的吸光度 (记为 A_1) 为横坐标, 以标准溶液样本的钾离子浓度为纵坐标作图, 得到钾离子浓度的标准曲线, 如图 5 所示。用测试溶液的 580nm 处的吸光度可以在标准曲线上找到对应的测试溶液的钾离子浓度值, 将其除以 1% 得到待测尿样的钾离子浓度值, 结果见下表 9。

表 9

待测样品	由 A_1 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
尿样 1	29.43	31.17
尿样 2	36.88	39.71
尿样 3	20.12	21.76

20 实施例 10

在本实施例中使用的能够形成 G- 四链体的 DNA 为 AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG, 所使用的菁染料为下式的化合物



1) 配制标准溶液样本和测试溶液

将一定量的 DNA 溶解于含有 200mmol/L NaCl 的 Tris-HCl (Tris-Na) 缓冲液 (pH8.2) 中, 制备浓度为 1.5 mmol/L 的 DNA 母液, 备用。

5 取浓度为 600 μ mol/L 菁染料的甲醇溶液 300 μ L, 加入 19.38ml Tris-Na 缓冲液, 然后再加入 DNA 溶液 120 μ L 混匀。把上述样本平均分成 10 份, 每份样本溶液为 1.98mL。

取其中的 7 个样本, 分别加入一定量的浓度为 200mmol/L KCl 的 Tris-Na 溶液, 然后用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL, 得到钾离子的浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1、1.5 mmol/L 的标准样本溶液。

10 另外 3 个样本中加入待测尿液样本 20 μ L, 尿液样本占总溶液样本的 1%。

以上样品于阴暗处放置、备用。

2) 检测分析

将上述样品分别利用紫外吸收光谱仪进行分析。一切操作都在室温环境下进行, 不需额外条件。紫外吸收光谱收集的波长在 400~800nm 处的数据。

15 3) 结果分析

以标准样本在 650nm 处的吸光度 (记为 A_3) 为横坐标, 以标准溶液样本的钾离子浓度为纵坐标作图, 得到钾离子浓度的标准曲线, 如图 6 所示。用测试溶液的 650nm 处的吸光度可以在标准曲线上找到对应的测试溶液的钾离子浓度值, 将其除以 1% 得到待测尿样的钾离子浓度值, 结果见下表 10。

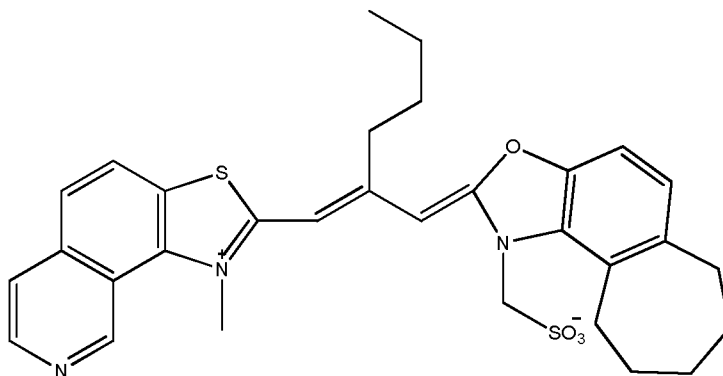
20

表 10

待测样品	由 A_3 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
尿样 1	30.28	31.17
尿样 2	38.23	39.71
尿样 3	20.95	21.76

实施例 11

在本实施例中使用的能够形成 G 四链体的 DNA 为 GGGCCAGGGAGCGGGGCGGAGGGGG，所使用的菁染料为下式的化合物



1) 配制标准溶液样本和测试溶液

- 5 将一定量的 DNA 溶解于含有 160mmol/L NaCl 的 Tris-HCl (Tris-Na) 缓冲液 (pH7.0) 中, 制备浓度为 500 μ mol/L 的 DNA 母液, 备用。

取浓度为 200 μ mol/L 菁染料的甲醇溶液 300 μ L, 加入 19.38ml Tris-Na 缓冲液, 然后再加入 DNA 溶液 120 μ L 混匀。把上述样本平均分成 10 份, 每份样本溶液为 1.98mL。

- 10 取其中的 7 个样本, 分别加入一定量的浓度为 200mmol/L KCl 的 Tris-Na 溶液, 然后用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL, 得到钾离子的浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1、1.5 mmol/L 的标准样本溶液。

另外 3 个样本中加入待测尿液样本 20 μ L, 尿液样本占总溶液样本的 1%。

以上样品于阴暗处放置、备用。

2) 检测分析

- 15 将上述样品利用紫外吸收光谱仪进行分析。一切操作都在室温环境下进行, 不需额外条件。紫外吸收光谱收集的波长在 400~800nm 处的数据。

3) 结果分析

- 20 以标准样本在 560nm 处的吸光度 (A_1) 与 670nm 处的吸光度 (A_3) 的比值 (A_1/A_3) 为横坐标, 以标准溶液样本的钾离子浓度为纵坐标作图, 得到钾离子浓度的标准曲线, 如图 7 所示。用测试溶液的 560nm 处的吸光度与 670nm 处的吸光度的比值 (A_1/A_3) 可以在标准曲线上找到对应的测试溶液的钾离子浓度值, 将其除以 1% 得到待测尿样的钾离子浓度值, 结果见下表 11。

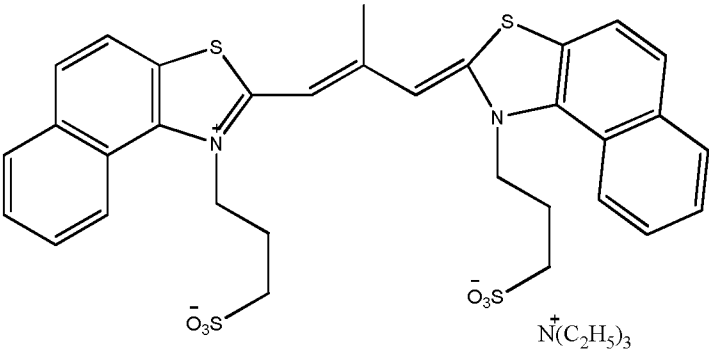
表 11

待测样品	由 A_1/A_3 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
尿样 1	28.37	31.17

尿样 2	36. 76	39. 71
尿样 3	20. 43	21. 76

实施例 12

在本实施例中使用的能够形成 G- 四链体的 DNA 为 GGGCGCGGGAGGAATTGGGCGGG，所使用的菁染料为下式的化合物



5 1) 配制标准溶液样本和测试溶液

将一定量的 DNA 溶解于含有 40mmol/L NaCl 的 Tris-HCl (Tris-Na) 缓冲液中，制备浓度为 3mmol/L 的 DNA 母液，备用。

取浓度为 1.2 mmol/L 菁染料的甲醇溶液 300μL，加入 19.38ml Tris-Na 缓冲液,然后再加入 DNA 溶液 120μL 混匀。把上述样本平均分成 10 份，每份样本溶液为 1.98mL。

10 取其中的 7 个样本，分别加入一定量的浓度为 200mmol/L KCl 的 Tris-Na 溶液，然后用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL，得到钾离子的浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1、1.5 mmol/L 的标准样本溶液。

另外 3 个样本中加入待测尿液样本 20μL，尿液样本占总溶液样本的 1%。

以上样品于阴暗处放置、备用。

15 2) 检测分析

将上述样品用荧光光谱仪进行分析。一切操作都在室温环境下进行，不需额外条件。荧光光谱激发波长为 560nm，波长收集范围为 570~720nm。

3) 结果分析

20 以标准样本在 640nm 处的荧光强度（记为 FI）为横坐标，以标准溶液样本的钾离子浓度为纵坐标作图，得到钾离子浓度的标准曲线，如图 8 所示。用测试溶液的 640nm 处的荧光强度可以在标准曲线上找到对应的测试溶液的钾离子浓度值，将其除以 1%得到待测尿样的钾离子浓度值，结果见下表 12。

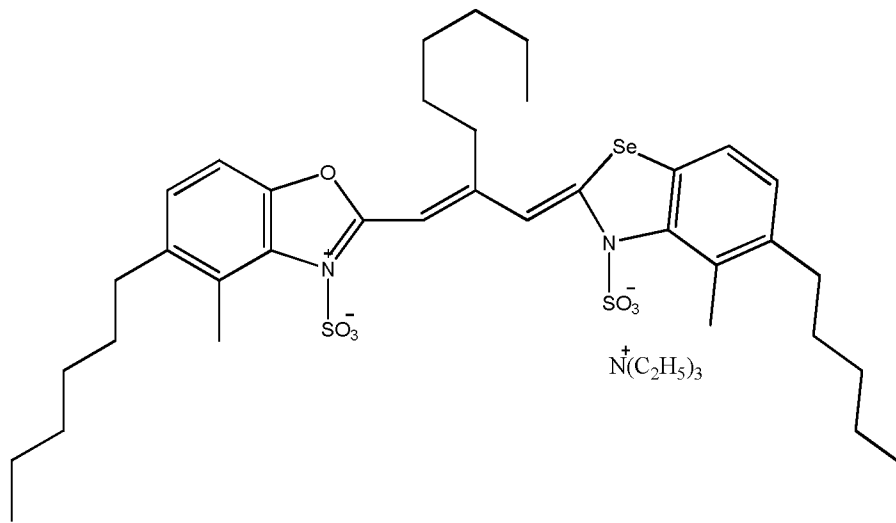
表 12

待测样品	由 FI 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
------	-------------------	-------------

尿样 1	32.14	31.17
尿样 2	38.72	39.71
尿样 3	19.85	21.76

实施例 13

采用与实施例 9 相同的步骤对三个血清样品进行检测，区别在于使用的 DNA 为 GGGCGCGGGAGGAATTGGGCGGG，使用的菁染料为下式的化合物：



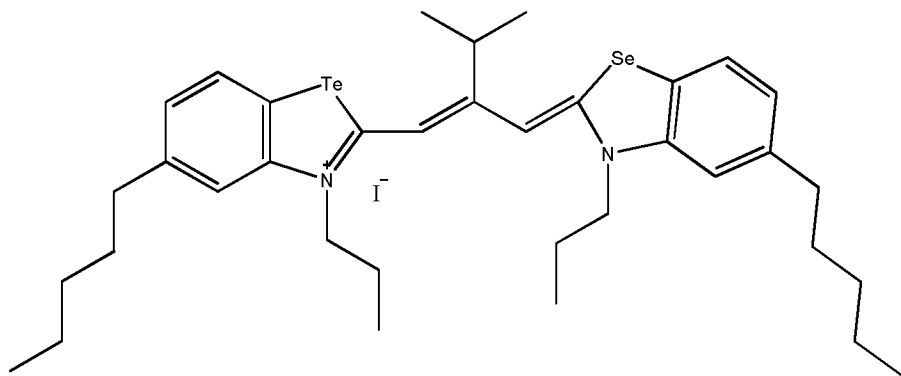
- 5 检测溶液样本和测试溶液在波长 590nm 处的吸光度，记为 A_1 。
结果如下表 13：

表 13

待测样品	由 A_1 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
血清样 1	42.16	45.56
血清样 2	34.54	32.17
血清样 3	27.81	25.45

实施例 14

- 10 采用与实施例 10 相同的步骤对三个血清样品进行检测，区别在于使用的 DNA 为 GGGCGCGGGAGGAAGGGGGCGGG，使用的菁染料为下式的化合物：



检测溶液样本和测试溶液在波长 670nm 处的吸光度，记为 A_3 。

结果如下表 14:

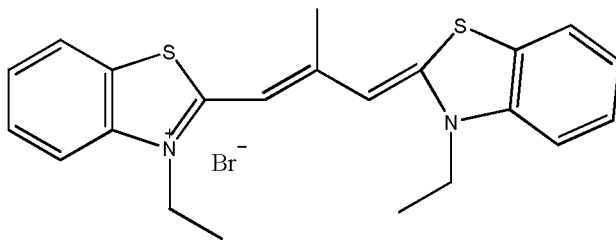
表 14

待测样品	由 A_3 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
血清样 1	48.25	45.56
血清样 2	35.13	32.17
血清样 3	28.54	25.45

5

实施例 15

采用与实施例 11 相同的步骤对三个血清样品进行检测，区别在于使用的 DNA 为 GGGGTTGGGG，使用的菁染料为下式的化合物：



检测溶液样本和测试溶液在波长 580nm 和 610nm 处的吸光度，分别记为 A_1 和

10

A_3 。

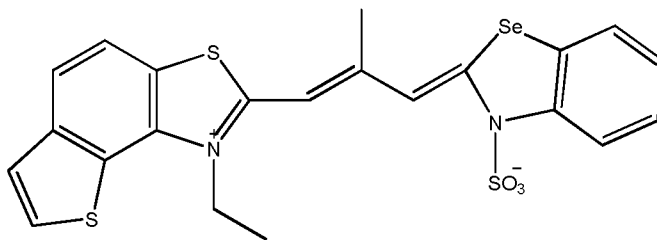
结果如下表 15:

表 15

待测样品	由 A_1/A_3 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
血清样 1	46.98	45.56
血清样 2	33.81	32.17
血清样 3	27.43	25.45

实施例 16

采用与实施例 12 相同的步骤对三个血清样品进行检测，区别在于使用的 DNA 为 TTGGGGTTGGGG，使用的菁染料为下式的化合物：



检测溶液样本和测试溶液在波长 600nm 处的荧光强度，记为 FI。

5

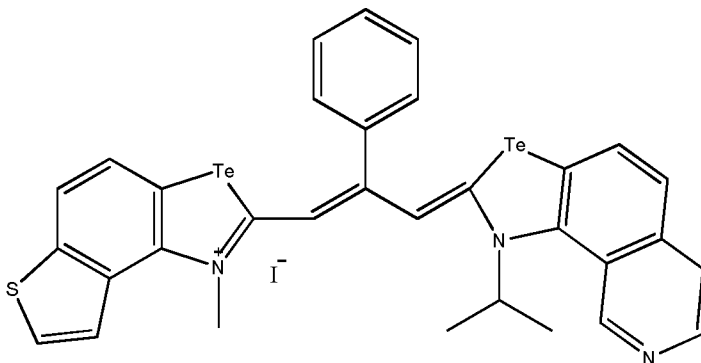
结果如下表 16：

表 16

待测样品	由 FI 得到的浓度 mmol/L	实际浓度 mmol/L
血清样 1	47.55	45.56
血清样 2	35.64	32.17
血清样 3	28.13	25.45

实施例 17

本实施例对三个尿液样本的钾离子浓度进行验证，各尿液样本的实际钾离子浓度如下：尿样 1 为 5.84mmol/L、尿样 2 为 22.25mmol/L、尿样 3 为 38.17mmol/L。在本
10 实施例中使用的能够形成 G-四链体的 DNA 为 TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG，所使用的菁染料为下式的化合物



1) 配制标准溶液样本

15 将一定量的 DNA 样品溶解于含有 20mmol/L NaCl 的 Tris-HCl (Tris-Na) 缓冲液 (pH8.0) 中，制备浓度为 100μmol/L 的 DNA 母液，备用。

取浓度为 200μmol/L 菁染料的甲醇溶液 300μL，加入 9.1ml Tris-Na 缓冲液，然后再加入 DNA 溶液 600μL 混匀。把上述样本平均分成 10 份，每份样本溶液为 1mL。

取其中的 7 个样本, 分别加入一定量的浓度为 200mmol/L KCl 的 Tris-Na 溶液, 然后用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL, 得到钾离子的浓度分别为 0、2、4、8、10、15、20 mmol/L 的标准样本溶液。标准溶液样本的颜色如下: 0~10mmol/L 的标准溶液样本的颜色从蓝色逐渐转变为紫红色, 10~20mmol/L 的标准溶液样本的颜色从紫红色逐渐转变为红色。

2) 配制测试溶液

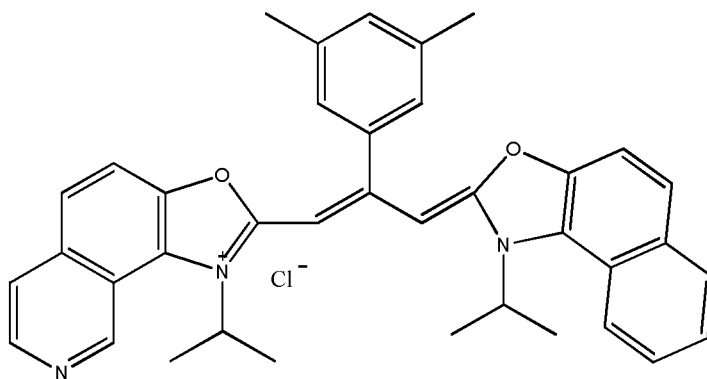
另外 3 个样本中加入待测尿液样本 1mL 并用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL, 得到 3 个测试溶液, 每个测试溶液中尿液样本占测试溶液体积的 50%。

3) 对比分析

将测试溶液的颜色与标准溶液样本的颜色进行比较, 结果发现测试溶液 1 的颜色为蓝色, 测试溶液 2 为紫红色, 测试溶液 3 的颜色为粉红色。因此测试溶液 1 的钾离子浓度在 0~10 的范围, 测试溶液 2 和测试溶液 3 的钾离子浓度在 10~20 的范围, 通过稀释比例换算可以得出尿样 1 的钾离子浓度在 0~20 的范围, 尿样 2 和尿样 3 的钾离子浓度在 20~40 的范围。该结果与尿样的实际浓度吻合。

实施例 18

本实施例对三个尿液样本的钾离子浓度进行验证, 各尿液样本的实际钾离子浓度如下: 尿样 1 为 9.18mmol/L、尿样 2 为 32.43mmol/L、尿样 3 为 49.57mmol/L。在本实施例中使用的能够形成 G-四链体的 DNA 为 AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG, 所使用的菁染料为下式的化合物



1) 配制标准溶液样本

将一定量的 DNA 样品溶解于含有 40mmol/L NaCl 的 Tris-HCl (Tris-Na) 缓冲液 (pH6.2) 中, 制备浓度为 500μmol/L 的 DNA 母液, 备用。

[01] 取浓度为 200μmol/L 菁染料的甲醇溶液 300μL, 加入 9.14ml Tris-Na 缓冲液, 然后再加入 DNA 溶液 360μL 混匀。把上述样本平均分成 10 份, 每份样本溶液为 0.98mL。

取其中的 7 个样本, 分别加入一定量的浓度为 200mmol/L KCl 的 Tris-Na 溶液, 然后用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL, 得到钾离子的浓度分别为 0、5、10、15、20、30、40mmol/L 的标准样本溶液。标准溶液样本的颜色如下: 0~15mmol/L 的标准溶液样本的颜色从蓝色逐渐转变为紫红色, 15~40mmol/L 的标准溶液样本的颜色从紫红色逐渐转变为粉红色。

2) 配制测试溶液

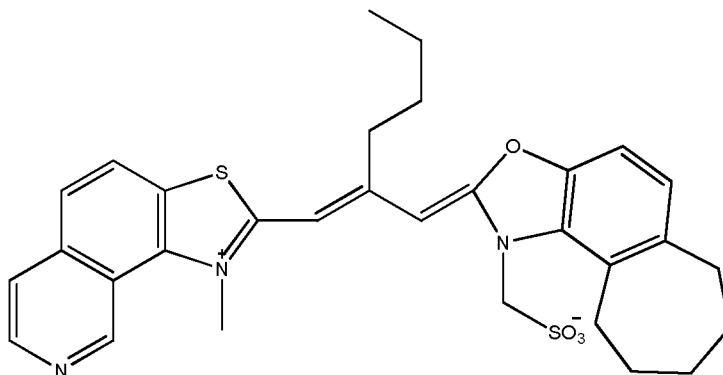
另外 3 个样本中加入待测尿液样本 1mL 并用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL, 得到 3 个测试溶液, 每个测试溶液中尿液样本占测试溶液体积的 50%。

3) 对比分析

将测试溶液的颜色与标准溶液样本的颜色进行比较, 结果发现测试溶液 1 的颜色为蓝色, 测试溶液 2 为紫红色、测试溶液 3 为粉红色。因此测试溶液 1 的钾离子浓度在 0~15 的范围, 测试溶液 2 和测试溶液 3 的钾离子浓度在 15~40 的范围, 通过稀释比例换算可以得出尿样 1 的钾离子浓度在 0~30 的范围, 尿样 2 和尿样 3 的钾离子浓度在 30~80 的范围。该结果与尿样的实际浓度吻合。

实施例 19

本实施例对三个尿液样本的钾离子浓度进行验证, 各尿液样本的实际钾离子浓度如下: 尿样 1 为 9.82mmol/L、尿样 2 为 20.35mmol/L、尿样 3 为 78.26mmol/L。在本实施例中使用的能够形成 G- 四链体的 DNA 为 TTAGGG TTAGGGTTAGGGTTAGGG, 所使用的菁染料为下式的化合物



1) 配制标准溶液样本

将一定量的 DNA 样品溶解于含有 100mmol/L NaCl 的 Tris-HCl (Tris-Na) 缓冲液 (pH7.5) 中, 制备浓度为 500 μ mol/L 的 DNA 母液, 备用。

取浓度为 200 μ mol/L 菁染料的甲醇溶液 0.4mL, 加入 4.2ml Tris-Na 缓冲液, 然后再加入 DNA 溶液 0.4mL 混匀。把上述样本平均分成 10 份, 每份样本溶液为 0.5mL。

取其中的 7 个样本，分别加入一定量的浓度为 200mmol/L KCl 的 Tris-Na 溶液，然后用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL，得到钾离子的浓度分别为 0、10、20、40、60、80、100 mmol/L 的标准样本溶液。标准溶液样本的颜色如下：0~60mmol/L 的标准溶液样本的颜色从蓝色逐渐转变为紫红色，60~100mmol/L 的标准溶液样本的颜色从紫红色逐渐转变为红色。

2) 配制测试溶液

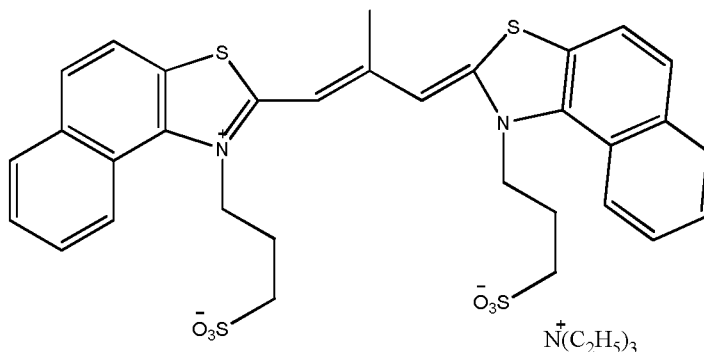
另外 3 个样本中加入待测尿液样本 1.5mL，得到 3 个测试溶液，每个测试溶液中尿液样本占测试溶液体积的 75%。

3) 对比分析

将测试溶液的颜色与标准溶液样本的颜色进行比较，结果发现测试溶液 1 和 2 的颜色为蓝色，测试溶液 3 的颜色为紫红色。因此测试溶液 1、2、3 的钾离子浓度在 0~60 的范围，通过稀释比例换算可以得出尿样 1、2、3 的钾离子浓度在 0~80 的范围。该结果与尿样的实际浓度吻合。

实施例 20

本实施例对三个尿液样本的钾离子浓度进行验证，各尿液样本的实际钾离子浓度如下：尿样 1 为 42.58mmol/L、尿样 2 为 70.65mmol/L、尿样 3 为 98.34mmol/L。在本实施例中使用的能够形成 G-四链体的 DNA 为 AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG，所使用的菁染料为下式的化合物



1) 配制标准溶液样本

将一定量的 DNA 样品溶解于含有 160mmol/L NaCl 的 Tris-HCl (Tris-Na) 缓冲液 (pH8.2) 中，制备浓度为 500μmol/L 的 DNA 母液，备用。

取浓度为 200μmol/L 菁染料的甲醇溶液 0.5mL，加入 3.5ml Tris-Na 缓冲液，然后再加入 DNA 溶液 1mL 混匀。把上述样本平均分成 10 份，每份样本溶液为 0.5mL。

取其中的 7 个样本，分别加入一定量的浓度为 200mmol/L KCl 的 Tris-Na 溶液，然后用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL，得到钾离子的浓度分别为 0、20、50、75、100、

125、160 mmol/L 的标准样本溶液。标准溶液样本的颜色如下：0~100mmol/L 的标准溶液样本的颜色从蓝色逐渐转变为紫红色，100~125mmol/L 的标准溶液样本的颜色从紫红色逐渐转变为粉红色。

2) 配制测试溶液

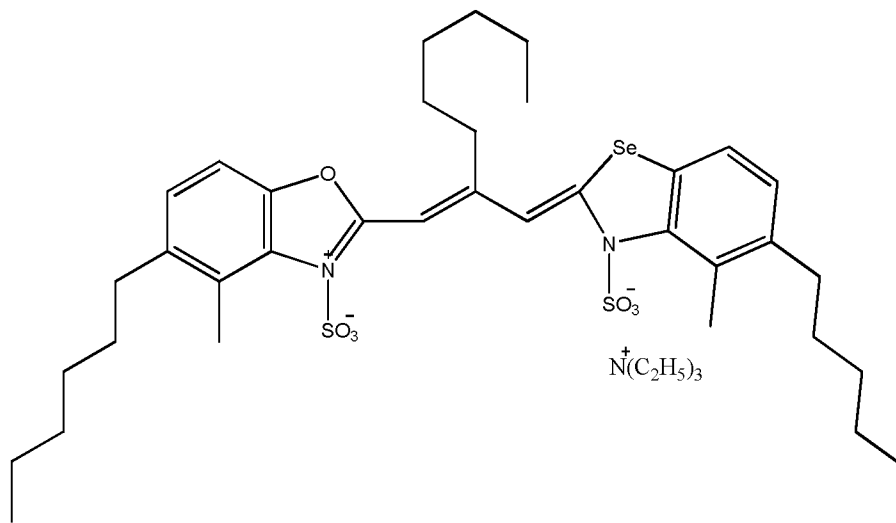
- 5 另外 3 个样本中加入待测尿液样本 1.5mL 并用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL，得到 3 个测试溶液，每个测试溶液中尿液样本占测试溶液体积的 75%。

3) 对比分析

- 10 将测试溶液的颜色与标准溶液样本的颜色进行比较，结果发现测试溶液 1 的颜色为蓝色，测试溶液 2 和测试溶液 3 的颜色为紫红色。因此测试溶液 1、2、3 的钾离子浓度在 0~100 的范围，通过稀释比例换算可以得出尿样 1、2、3 的钾离子浓度在 0~133 的范围，尿样 2、3 钾离子浓度高于尿样 1 钾离子浓度。该结果与尿样的实际浓度吻合。

实施例 21

- 15 本实施例对三个尿液样本的钾离子浓度进行验证，各尿液样本的实际钾离子浓度如下：尿样 1 为 5.57mmol/L、尿样 2 为 23.24mmol/L、尿样 3 为 39.16mmol/L，使用的 DNA 为 GGGCGCGGGAGGAATTGGGCGGG，使用的菁染料为下式的化合物：



1) 配制标准溶液样本

- 20 将一定量的 DNA 样品溶解于含有 20mmol/L NaCl 的 Tris-HCl (Tris-Na) 缓冲液 (pH7.0) 中，制备浓度为 200μmol/L 的 DNA 母液，备用。

取浓度为 200μmol/L 菁染料的甲醇溶液 300μL，加入 8.5ml Tris-Na 缓冲液，然后再加入 DNA 溶液 600μL 混匀。把上述样本平均分成 10 份，每份样本溶液为 1mL。

取其中的 7 个样本, 分别加入一定量的浓度为 200mmol/L KCl 的 Tris-Na 溶液, 然后用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL, 得到钾离子的浓度分别为 0、2、4、8、10、15、20 mmol/L 的标准样本溶液。标准溶液样本的颜色如下: 0~10mmol/L 的标准溶液样本的颜色从蓝色逐渐转变为紫红色, 10~20mmol/L 的标准溶液样本的颜色从紫红色逐渐转变为红色。

2) 配制测试溶液

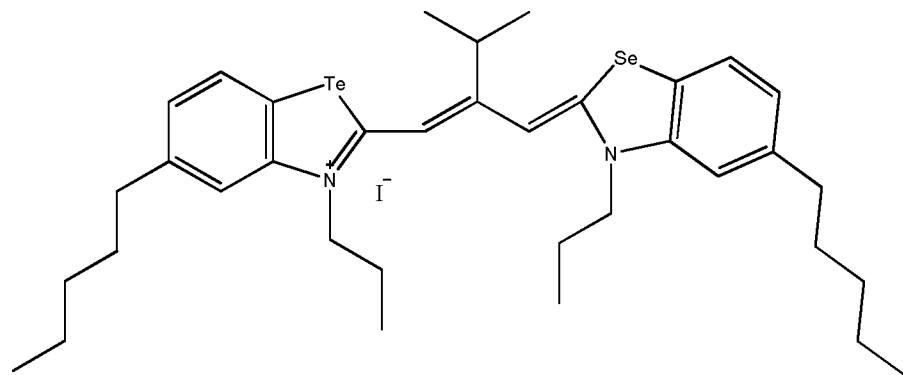
另外 3 个样本中加入待测尿液样本 1mL 并用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL, 得到 3 个测试溶液, 每个测试溶液中尿液样本占测试溶液体积的 50%。

3) 对比分析

将测试溶液的颜色与标准溶液样本的颜色进行比较, 结果发现测试溶液 1 的颜色为蓝色, 测试溶液 2 为紫红色, 测试溶液 3 的颜色为粉红色。因此测试溶液 1 的钾离子浓度在 0~10 的范围, 测试溶液 2 和测试溶液 3 的钾离子浓度在 10~20 的范围, 通过稀释比例换算可以得出尿样 1 的钾离子浓度在 0~20 的范围, 尿样 2 和尿样 3 的钾离子浓度在 20~40 的范围。该结果与尿样的实际浓度吻合。

实施例 22

本实施例对三个尿液样本的钾离子浓度进行验证, 各尿液样本的实际钾离子浓度如下: 尿样 1 为 85.32mmol/L、尿样 2 为 100.54 mmol/L、尿样 3 为 126.32mmol/L, 使用的 DNA 为 GGGCGCGGGAGGAAGGGGGCGGG, 使用的菁染料为下式的化合物:



1) 配制标准溶液样本

将一定量的 DNA 样品溶解于含有 300mmol/L NaCl 的 Tris-HCl (Tris-Na) 缓冲液 (pH6.2) 中, 制备浓度为 200μmol/L 的 DNA 母液, 备用。

取浓度为 200μmol/L 菁染料的甲醇溶液 1mL, 加入 7ml Tris-Na 缓冲液, 然后再加入 DNA 溶液 2mL 混匀。把上述样本平均分成 10 份, 每份样本溶液为 1mL。

取其中的 7 个样本, 分别加入一定量的浓度为 600mmol/L KCl 的 Tris-Na 溶液, 然后用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL, 得到钾离子的浓度分别为 0、50、100、150、200、250、300 mmol/L 的标准样本溶液。标准溶液样本的颜色如下: 0~150mmol/L 的标准溶液样本的颜色从蓝色逐渐转变为紫红色, 150~300mmol/L 的标准溶液样本的颜色从紫红色逐渐转变为粉红色。

2) 配制测试溶液

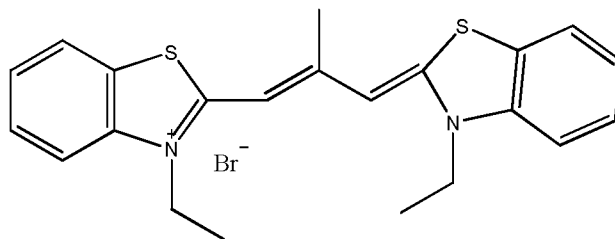
另外 3 个样本中加入待测尿液样本 1mL 并用 Tris-Na 缓冲液定容至 2mL, 得到 3 个测试溶液, 每个测试溶液中尿液样本占测试溶液体积的 50%。

3) 对比分析

将测试溶液的颜色与标准溶液样本的颜色进行比较, 结果发现测试溶液 1、2、3 的颜色为蓝色。因此测试溶液 1、2、3 的钾离子浓度在 0~150 的范围, 通过稀释比例换算可以得出 3 个尿样的钾离子浓度在 0~300 的范围。该结果与尿样的实际浓度吻合。

实施例 23

本实施例对三个尿液样本的钾离子浓度进行验证, 各尿液样本的实际钾离子浓度如下: 尿样 1 为 23.52mmol/L、尿样 2 为 45.28mmol/L、尿样 3 为 64.83mmol/L, 使用的 DNA 为 GGGGTTGGGG, 使用的菁染料为下式的化合物:



1) 配制标准溶液样本

将一定量的 DNA 样品溶解于含有 10mmol/L NaCl 的 Tris-HCl (Tris-Na) 缓冲液 (pH8.0) 中, 制备浓度为 200μmol/L 的 DNA 母液, 备用。

取浓度为 200μmol/L 菁染料的甲醇溶液 0.5mL, 加入 8.5ml Tris-Na 缓冲液, 然后再加入 DNA 溶液 1mL 混匀。把上述样本平均分成 10 份, 每份样本溶液为 1mL。

取其中的 7 个样本, 分别加入一定量的浓度为 200mmol/L KCl 的 Tris-Na 溶液, 然后用 Tris-Na 缓冲液定容至 1.2mL, 得到钾离子的浓度分别为 0、1、2、4、6、8、10 mmol/L 的标准样本溶液。标准溶液样本的颜色如下: 0~6mmol/L 的标准溶液样本的颜色从蓝色逐渐转变为紫红色, 6~8mmol/L 的标准溶液样本的颜色从紫红色逐渐转变为红色。

2) 配制测试溶液

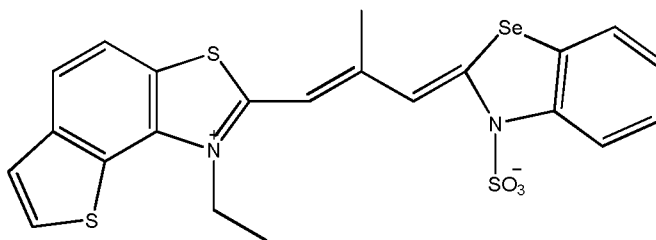
另外 3 个样本中加入待测尿液样本 200 μ L, 得到 3 个测试溶液, 每个测试溶液中尿液样本占测试溶液体积的 17%。

3) 对比分析

5 将测试溶液的颜色与标准溶液样本的颜色进行比较, 结果发现测试溶液 1 的颜色为蓝色, 测试溶液 2 和测试溶液 3 的颜色为粉红色。因此测试溶液 1 的钾离子浓度在 0~6 的范围, 测试溶液 2 和测试溶液 3 的钾离子浓度在 6~10 的范围, 通过稀释比例换算可以得出尿样 1 的钾离子浓度在 0~35 的范围, 尿样 2 和尿样 3 的钾离子浓度在 35~59 的范围。该结果与尿样的实际浓度吻合。

实施例 24

10 本实施例对三个尿液样本的钾离子浓度进行验证, 各尿液样本的实际钾离子浓度如下: 尿样 1 为 22.36mmol/L、尿样 2 为 48.72mmol/L、尿样 3 为 52.38mmol/L, 使用的 DNA 为 GGGCGCGGGAGGAAGGGGGCGGG, 使用的菁染料为下式的化合物:



1) 配制标准溶液样本

15 将一定量的 DNA 样品溶解于含有 50mmol/L NaCl 的 Tris-HCl (Tris-Na) 缓冲液 (pH6.2) 中, 制备浓度为 100 μ mol/L 的 DNA 母液, 备用。

取浓度为 200 μ mol/L 菁染料的甲醇溶液 200 μ L, 加入 4.5ml Tris-Na 缓冲液, 然后再加入 DNA 溶液 300 μ L 混匀。把上述样本平均分成 10 份, 每份样本溶液为 0.5mL。

20 取其中的 7 个样本, 分别加入一定量的浓度为 200mmol/L KCl 的 Tris-Na 溶液, 然后用 Tris-Na 缓冲液定容至 1.5mL, 得到钾离子的浓度分别为 0、10、20、30、40、50、60 mmol/L 的标准样本溶液。标准溶液样本的颜色如下: 0~30mmol/L 的标准溶液样本的颜色从蓝色逐渐转变为紫红色, 30~60mmol/L 的标准溶液样本的颜色从紫红色逐渐转变为粉红色。

2) 配制测试溶液

25 另外 3 个样本中加入待测尿液样本 1mL, 得到 3 个测试溶液, 每个测试溶液中尿液样本占测试溶液体积的 66%。

3) 对比分析

将测试溶液的颜色与标准溶液样本的颜色进行比较, 结果发现测试溶液 1 的颜色

为蓝色，测试溶液 2 和测试溶液 3 的颜色为紫红色。因此测试溶液 1 的钾离子浓度在 0~30 的范围，测试溶液 2 和测试溶液 3 的钾离子浓度在 30~60 的范围，通过稀释比例换算可以得出尿样 1 的钾离子浓度在 0~45 的范围，尿样 2 和尿样 3 的钾离子浓度在 45~91 的范围。该结果与尿样的实际浓度吻合。

5 本发明的显著特色之一是：基于钾离子调控 DNA 构像的变化实现检测，钾离子引起 DNA 构像变化，DNA 构像变化又引起菁染料聚集形态的改变，从而使得溶液颜色或吸收、荧光光谱上发生改变。体系成分简单，反应也简单，钾离子是整个反应的“引发剂”，保证了检测的精确度。

10 本发明的显著特色之二是：体系本身可带有大量的钠离子，这种情况可保证样本中钠离子所能引起的环境的变化忽略不计。

本发明的显著特色之三是：使用菁染料超分子探针，反应灵敏度高，有颜色变化，可实现肉眼观测。

15 总之，实验证明本发明的测定方法，完全可以通过紫外吸收光谱仪或荧光光谱仪，测定出样本中钾离子的浓度水平，测试灵敏度高，特异性好，精确度好。同时，还可通过溶液颜色的变化，用肉眼判断钾离子浓度水平的高低。此外，本发明提供的钾离子检测试剂盒，稳定性好，长时间存放之后仍然能够准确检测各种类型样品中钾离子的含量。

20 虽然已经以具体实施例的方式描述了本发明，但是对于本领域技术人员来说明显的是，在不脱离所附权利要求书所限定的本发明的精神和范围的情况下，可以对本发明进行各种变化和修改，这些变化和修改同样包括在本发明的范围内。

权 利 要 求

1. 一种检测液体样品中钾离子浓度的方法，所述方法包括以下步骤：

(1) 用 pH6.2~8.2 的缓冲溶液配制钾离子浓度不同的多个溶液样本，其中每个所述溶液样本中含有相同浓度的能够形成 G-四链体的 DNA 分子以及相同浓度的菁染料；

(2) 将所述多个溶液样本置于紫外可见光吸收光谱仪或分光光度计下，检测第一波长处的吸光度值及第二波长处的吸光度值，或者将所述多个溶液样本置于荧光光谱仪下，采用 560nm 的激发波长，检测波长在第三波长处的荧光强度值，其中所述第一波长在 560nm 至 590nm 范围，所述第二波长在 500nm 至 540nm 范围，所述第三波长在 580nm 至 640nm 范围；

(3) 以各个所述溶液样本的钾离子浓度作为横坐标或纵坐标，以步骤 (2) 中测得的第一波长处的吸光度值或第二波长处的吸光度值或者第一波长处的吸光度值与第二波长处的吸光度值的比值或者第三波长处的荧光强度值为纵坐标或横坐标作图，从而获得钾离子浓度的标准曲线；

(4) 在待测液体样品中加入能够形成 G-四链体的 DNA 分子、式 I 的化合物以及缓冲液，以使待测液体样品中的能够形成 G-四链体的 DNA 分子的浓度、式 I 的化合物的浓度以及 pH 值与步骤 (1) 中的溶液样本一致，从而得到测试溶液；

(5) 将步骤 (4) 中获得的测试溶液置于紫外可见光吸收光谱仪或分光光度计下，检测测试溶液在第一波长及第二波长处吸光度值，或者将所述测试溶液置于荧光光谱仪下，采用 560nm 的激发波长，检测第三波长处的荧光强度值；

(6) 利用步骤 (5) 中测得的第一波长处的吸光度值或第二波长处的吸光度值或者第一波长处的吸光度值与第二波长处的吸光度值的比值或者第三波长处的荧光强度值在步骤 (3) 中获得的钾离子浓度标准曲线中找到对应的测试溶液的钾离子浓度值，然后通过待测样品被的稀释倍数计算出待测样品的钾离子浓度。

2. 一种在钠离子背景下检测液体样品中钾离子浓度的方法，所述方法包括以下步骤：

(1) 用 pH6.2~8.2 的缓冲溶液配制钾离子浓度不同的多个溶液样本，其中每个所述溶液样本中含有相同浓度的能够形成 G-四链体的 DNA 分子、相同浓度

的钠离子以及相同浓度的菁染料,其中所述溶液样本中的钠离子浓度在 10 至 200 mmol/L 的范围;

5 (2) 将所述多个溶液样本置于紫外可见光吸收光谱仪或分光光度计下,检测所述溶液样本在第一波长及第四波长处的吸光度值,或者将所述多个溶液样本置于荧光光谱仪下,采用 560nm 的激发波长,检测波长在第三波长处的荧光强度值,其中所述第一波长在 560nm 至 590nm 范围,所述第四波长在 610nm 至 670nm 范围,所述第三波长在 580nm 至 640nm 范围;

10 (3) 以各个所述溶液样本的钾离子浓度作为横坐标或纵坐标,以步骤(2)中测得的各溶液样本在第一波长处的吸光度值或第四波长处的吸光度值或者第一波长处的吸光度值与第四波长处的吸光度值的比值或者第三波长处的荧光强度值为纵坐标或横坐标作图,从而获得钾离子浓度的标准曲线;

15 (4) 在待测液体样品中加入能够形成 G-四链体的 DNA 分子、式 I 的化合物以及缓冲液,以使待测液体样品中的能够形成 G-四链体的 DNA 分子的浓度、式 I 的化合物的浓度以及 pH 值与步骤(1)中的溶液样本一致,从而得到测试溶液;

(5) 将步骤(4)中获得的测试溶液置于紫外可见光吸收光谱仪或分光光度计下,检测所述测试溶液在所述第一波长及所述第四波长处的吸光度值,或者将所述测试溶液置于荧光光谱仪下,采用 560nm 的激发波长,检测波长在所述第三波长处的荧光强度值;

20 (6) 利用步骤(5)中测得的第一波长处的吸光度值或第四波长处的吸光度值或者第一波长处的吸光度值与第四波长处的吸光度值的比值或者第三波长处的荧光强度值在步骤(3)中获得的钾离子浓度标准曲线中找到对应的测试溶液的钾离子浓度值,然后通过待测样品被的稀释倍数计算出待测样品的钾离子浓度。

25

3. 一种检测液体样品中钾离子浓度的方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 用 pH6.2~8.2 的缓冲溶液以一定的钾离子浓度梯度配制多个溶液样本,其中每个所述溶液样本中含有相同浓度的能够形成 G-四链体的 DNA 分子、相同浓度的钠离子以及相同浓度的菁染料;

30 (2) 在待测液体样品中加入能够形成 G-四链体的 DNA 分子、菁染料以及缓冲液,以使待测液体样品中的能够形成 G-四链体的 DNA 分子的浓度、菁染料的浓度以及 pH 值与步骤(1)中的溶液样本一致,从而得到测试溶液,并记录

待测液体样品被稀释的比例；

(3) 将测试溶液与步骤(1)中获得的标准比色样品的颜色进行对比，颜色与测试溶液相同的标准比色样品的钾离子浓度与测试溶液的钾离子浓度一致，并通过待测样品的稀释比例计算待测样品的钾离子浓度。

5

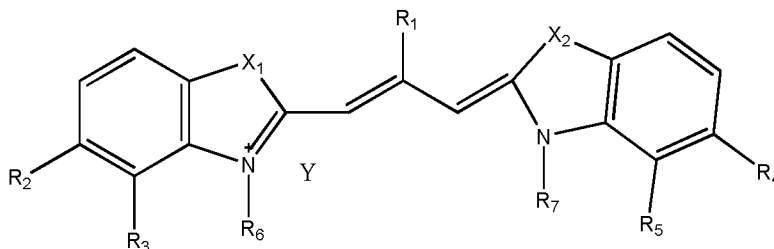
4. 如权利要求1所述的方法，其中所述缓冲液选自三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、硼酸-硼砂缓冲液、三乙醇胺缓冲液、咪唑-盐酸缓冲液、双甘氨酸缓冲液或2-氨基-2-甲基-1-丙醇缓冲液。

10

5. 如权利要求2或3所述的方法，其中所述缓冲液选自三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、硼酸-硼砂缓冲液、三乙醇胺缓冲液、咪唑-盐酸缓冲液、双甘氨酸缓冲液、2-氨基-2-甲基-1-丙醇缓冲液、磷酸钠-磷酸氢钠缓冲液、巴比妥钠-盐酸缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液、硼砂-氢氧化钠缓冲液或磷酸钠缓冲液。

15

6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法，其中所述菁染料为下式I的化合物



式 I

20

其中： R_1 为 C_1 - C_6 的烷基、苯基、烷基取代的苯基； R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自 H 或 C_1 - C_6 的烷基，或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的碳原子一起形成 5 元至 7 元的环结构，或者 R_4 和 R_5 与它们所连接的碳原子一起形成 5 元至 7 元的环结构； R_6 和 R_7 为 C_1 - C_6 烷基或者磺酸基取代的 C_1 - C_6 烷基；Y 为反离子，根据 R_6 和 R_7 所带电荷的不同而不同，若 R_6 和 R_7 为烷基，则 Y 为卤素阴离子；若 R_6 和 R_7 只有一个带有磺酸根，则无需 Y 作为反离子；若 R_6 和 R_7 均带有磺酸根，则 Y 为三乙胺阳离子； X_1 ， X_2 独立地选自碳、氧、硫、硒或碲。

25

7. 如权利要求6所述的方法，其中 C_1 - C_6 的烷基为碳原子数为 1-6 的直链或支链的烷基，包括但不限于，甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、

叔丁基、戊基、异戊基、正己基或异己基。

8. 如权利要求 6 所述的方法，其中 R_1 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、
5 正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、正己基、异己基、苯基、甲基苯基或
二甲基苯基。

9. 如权利要求 6 所述的方法，其中 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自甲基、乙基、
正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、正己基或异己基。

10 10. 如权利要求 6 所述的方法，其中 R_2 和 R_3 与它们所连接的碳原子可以形
成 5 元至 7 元的饱和环结构或不饱和环结构，所述环结构可以含或不含有氮或硫
原子。

11. 如权利要求 6 所述的方法，其中 R_4 和 R_5 与它们所连接的碳原子可以形
15 成 5 元至 7 元的饱和或不饱和环结构，所述环结构可以含或不含有 N 或 S 原子。

12. 如权利要求 6 所述的方法，其中 Y 优选为氟、氯、溴、碘阴离子或三乙
胺阳离子。

20 13. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法，其中所述溶液样本中钾离子浓
度的范围优选在 0 至 300 mmol/L 的范围，进一步优选在 0 至 200mmol/L 的范围，
更进一步优选在 0 至 150mmol/L 的范围，最优选在 20 至 100 mmol/L 的范围。

25 14. 如权利要求 2 或 3 所述的方法，其中所述溶液样本中钠离子浓度在 0 至
300 mmol/L 的范围，优选 10 至 200mmol/L，更优选在 40 至 160 mmol/L 的范围。

15. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法，其中所述菁染料在溶液样本中的
浓度在 3 至 20 μ mol/L 的范围，优选在 5 至 10 μ mol/L，所述能够形成 G-四链体
的 DNA 分子在溶液样本中的浓度在 3 至 30 μ mol/L 的范围，优选在 5 至 20 μ mol/L，
30 进一步优选在 10 至 20 μ mol/L。

16. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法，其中所述能够形成 G-四链体的

DNA 分子为分子序列中具有“GG”结构的 DNA 分子。

17. 如权利要求 16 所述的方法, 其中所述 DNA 分子选自 TTAGGGTTAGGG、
TTAGGG TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 、
5 AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 、 TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA 、
AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG 、 GGGCGCGGGAGGAATTGGGCGGG 、
GGTTGGTGTGGTTGG 、 TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG 、
TTGGGGTTGGGG、GGGGTTGGGG、GGGCGCGGGAGGAAGGGGGCGGG 或
GGGCGCGGGAGGAATTGGGCGGG。

10

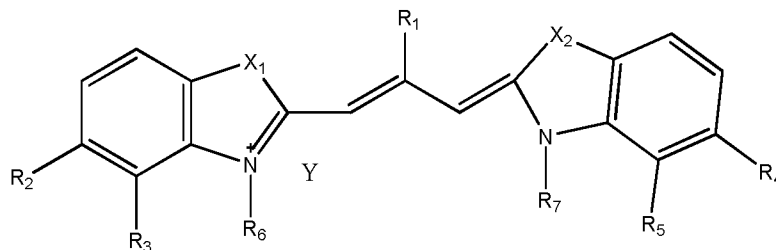
18. 一种检测钾离子浓度的试剂盒, 所述试剂盒包括: pH6.2~8.2 的缓冲液、
可溶性钾盐、能够形成 G-四链体的 DNA 分子和菁染料。

19. 如权利要求 18 所述的试剂盒, 还包括可溶性钠盐。

15

20. 如权利要求 19 所述的试剂盒, 还包括标准比色卡, 其中所述标准比色
卡中不同的颜色对应不同的钾离子浓度; 所述标准比色卡上的颜色通过以下方式
来确定: (i) 用 pH6.2~8.2 的缓冲溶液配制钾离子浓度不同的多个溶液样本, 使
每个所述溶液样本中含有相同浓度的能够形成 G 四链体的 DNA 分子、相同浓度
20 的钠离子以及相同浓度的菁染料; (ii) 按照溶液样本钾离子浓度由低到高的顺序
排列, 并通过例如数码相机等图像采集手段采集溶液样本的颜色并制作成标准比
色卡, 比色卡上不同的颜色对应不同的钾离子浓度。

21. 如权利要求 18 至 20 中任一项所述的试剂盒, 其中所述菁染料为下式 I
25 的化合物



式 I

其中: R_1 为 C_1 - C_6 的烷基、苯基、烷基取代的苯基; R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立
地选自 H 或 C_1 - C_6 的烷基, 或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的碳原子一起形成 5 元至

- 7 元的环结构，或者 R_4 和 R_5 与它们所连接的碳原子一起形成 5 元至 7 元的环结构； R_6 和 R_7 为 C_1 - C_6 烷基或者磺酸基取代的 C_1 - C_6 烷基；Y 为反离子，根据 R_6 和 R_7 所带电荷的不同而不同，若 R_6 和 R_7 为烷基，则 Y 为卤素阴离子；若 R_6 和 R_7 只有一个带有磺酸根，则无需 Y 作为反离子；若 R_6 和 R_7 均带有磺酸根，
- 5 则 Y 为三乙胺阳离子； X_1 ， X_2 独立地选自碳、氧、硫、硒或碲。

22. 如权利要求 21 所述的试剂盒，其中 C_1 - C_6 的烷基为碳原子数为 1-6 的直链或支链的烷基，包括但不限于，甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、正己基或异己基。

10

23. 如权利要求 21 所述的试剂盒，其中 R_1 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、正己基、异己基、苯基、甲基苯基或二甲基苯基。

15

24. 如权利要求 21 所述的试剂盒，其中 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、正己基或异己基。

25. 如权利要求 21 所述的试剂盒，其中 R_2 和 R_3 与它们所连接的碳原子可以形成 5 元至 7 元的饱和环结构或不饱和环结构，所述环结构可以含或不含有氮或硫原子。

26. 如权利要求 21 所述的试剂盒，其中 R_4 和 R_5 与它们所连接的碳原子可以形成 5 元至 7 元的饱和或不饱和环结构，所述环结构可以含或不含有 N 或 S 原子。

27. 如权利要求 21 所述的试剂盒，其中 Y 优选为氟、氯、溴、碘阴离子或三乙胺阳离子。

28. 如权利要求 18 至 20 中任一项所述的试剂盒，其中所述够形成 G-四链体的 DNA 分子为分子序列中具有“GG”结构的 DNA 分子。

30

29. 如权利要求 28 所述的试剂盒，其中所述 DNA 分子选自
TTAGGGTTAGGG 、 TTAGGG TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 、
AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 、 TGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAA 、
AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG 、 GGGCGCGGGAGGAATTGGGCGGG 、
5 GGTTGGTGTGGTTGG 、 TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG 、
TTGGGGTTGGGG、GGGGTTGGGG、GGGCGCGGGAGGAAGGGGGCGGG 或
GGGCGCGGGAGGAATTGGGCGGG。

30. 一种检测钾离子浓度的系统，所述系统包括权利要求 18 至 29 中任一项
10 所述的试剂盒和紫外可见光吸收光谱仪或分光光度计或荧光光谱仪。

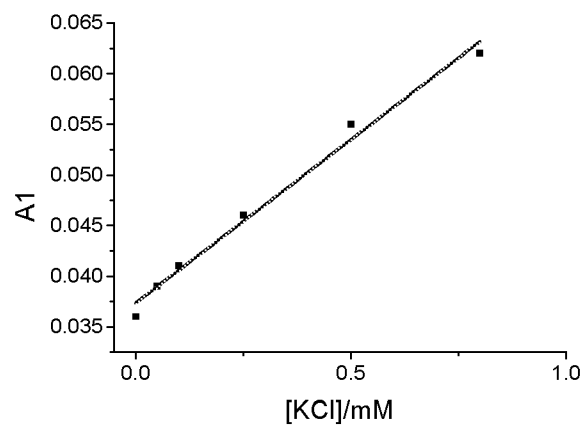


图 1

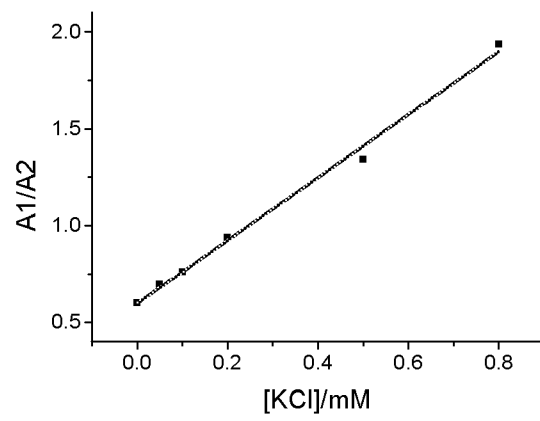


图 2

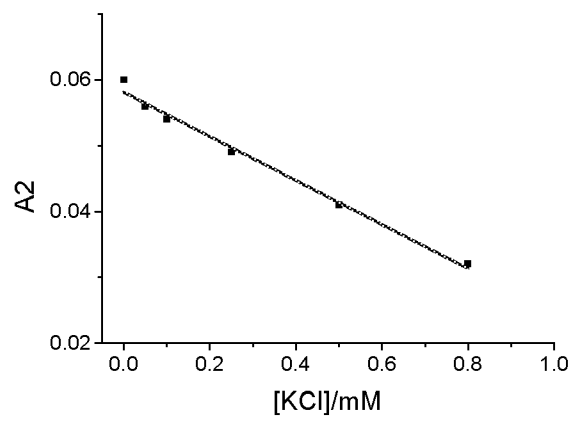


图 3

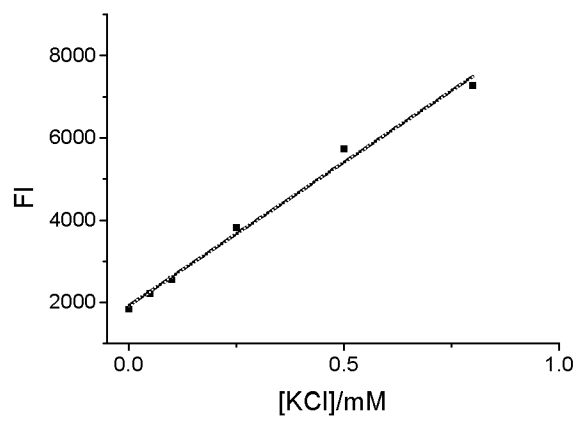


图 4

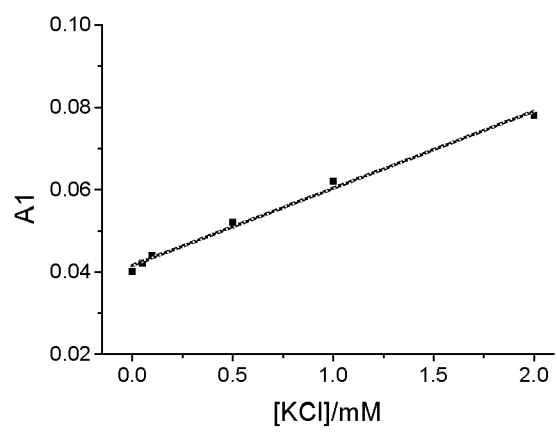


图 5

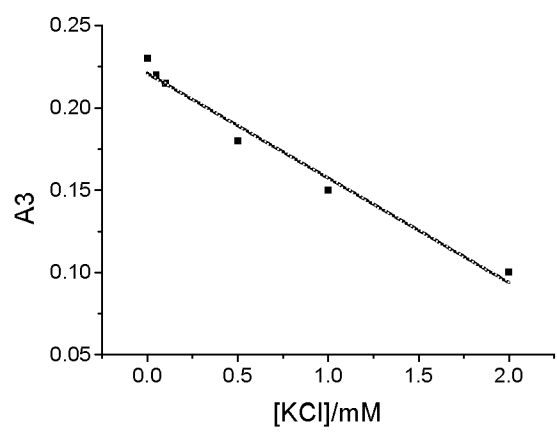


图 6

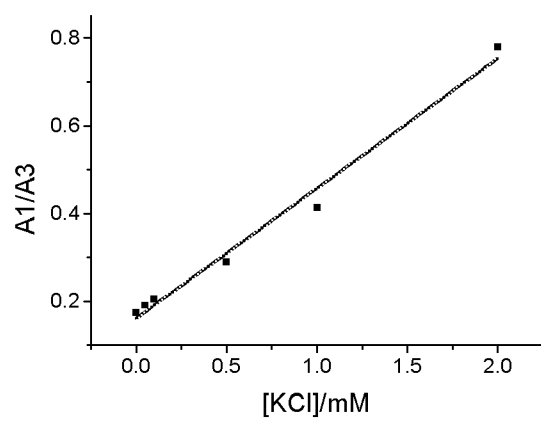


图 7

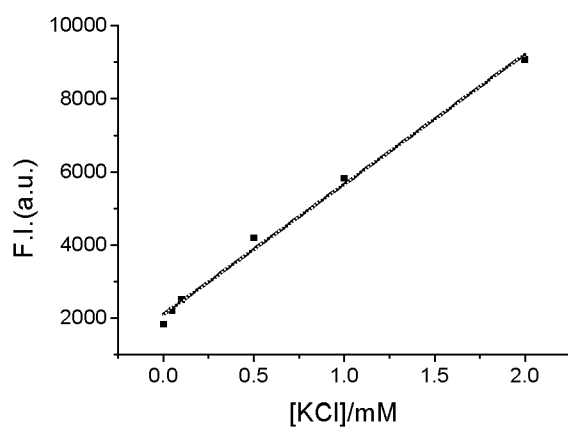


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/077335

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: G01N

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, ISI, google: ion?, determine?, potassium, dye, cyanine, colorimet+, concentration, dna, fluoresce+, sodium, G-quadruple+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	CN 102735623 A (INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 27 October 2012 (27.10.2012) the whole document	18-30
P, X	CN 102735664 A (INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 17 October 2012(17.10.2012) the whole document	1, 2, 4-17
P, X	CN 102866148 A (INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 09 January 2013 (09.01.2013) the whole document	3, 5-17
P, X	CN 102866149 A (INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 09 January 2013 (09.01.2013) the whole document	3, 5-17
P, A	CN 103048301 A (INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 17 April 2013 (17.04.2013) the whole document	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&"document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 11 September 2013 (11.09.2013)	Date of mailing of the international search report 26 September 2013 (26.09.2013)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer FU, Jing Telephone No. (86-10) 62085115

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2013/077335

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	G-Quadruplex-Modulated Fluorescence Detection of Potassium in the Presence of a 3500-fold Excess of Sodium Ions, Haixia Qin et al., American Chemical Society, 1 October 2010 (01.10.2010) the abstract, page 8357, the left column, paragraph [0002] to page 8360, the right column, paragraph [0002] and figures 2 to 4	1, 2, 4-19, 21-30
Y	The same as above	1-17, 20
Y	Fluorescence energy transfer probes based on the guanine quadruplex formation for the fluorometric detection of potassium ion, Satoru Nagatoishi et al., 15 August 2006 (15.08.2006) the abstract, section 3.2	1, 2, 4-17
Y	US 2003/0198966 A1 (UNIV COLUMBIA NEW YORK et al.) 23 October 2003 (23.10.2003)	3, 20
A	CN 101080497 A (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE INC.) 28 November 2007 (28.11.2007) the whole document	6-12, 21-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/077335

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 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 filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☒ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
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 in 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/CN2013/077335

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102735623 A	27.10.2012	None	
CN 102735664 A	17.10.2012	None	
CN 102866148 A	09.01.2013	None	
CN 102866149 A	09.01.2013	None	
CN 103048301 A	17.04.2013	None	
US 2003/0198966 A1	23.10.2003	WO 03089902 A3	10.06.2004
		WO 03089902 A2	30.10.2003
		AU 2003243145 A1	03.11.2003
		AU 2003243145 A8	27.10.2005
CN 101080497 A	28.11.2007	CN 101080497 B	29.12.2010
		EP 1828402 B1	13.06.2012
		US 2006134728 A1	22.06.2006
		US 7399608 B2	15.07.2008
		MX 2007007122 A	28.02.2009
		WO 2006065350 A3	10.08.2006
		KR 1225911 B1	24.01.2013
		MX 272146 B	26.11.2009
		KR 20070086272 A	27.08.2007
		EP 1828402 A2	05.09.2007
		WO 2006065350 A2	22.06.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/077335

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

G01N 21/29 (2006.01) i

G01N 21/33 (2006.01) i

G01N 21/64 (2006.01) i

G01N 21/78 (2006.01) i

G01N 33/52 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2013/077335

A. 主题的分类

参见附加页

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)

IPC: G01N

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,CNTEXT, CNKI: 离子, 钾离子, 钠离子, 菁染料, 染料, 染色, 菁, 比色, 浓度, 四链体, 鸟嘌呤, 荧光, 紫外

VEN, ISI, google: ion?, determine?, potassium, dye, cyanine, colorimetr+, concentration, dna, fluoresce+, sodium, G-quadruple+

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
P, X	CN 102735623 A (中国科学院化学研究所) 27.10 月 2012 (27.10.2012) 全文	18-30
P, X	CN 102735664 A (中国科学院化学研究所) 17.10 月 2012 (17.10.2012) 全文	1-2、4-17
P, X	CN 102866148 A (中国科学院化学研究所) 09.1 月 2013 (09.01.2013) 全文	3、5-17
P, X	CN 102866149 A (中国科学院化学研究所) 09.1 月 2013 (09.01.2013) 全文	3、5-17
P, A	CN 103048301 A (中国科学院化学研究所) 17.4 月 2013 (17.04.2013) 全文	1-30

☒ 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
11.9 月 2013 (11.09.2013)国际检索报告邮寄日期
26.9 月 2013 (26.09.2013)ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
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

付婧
电话号码: (86-10) 62085115

C(续). 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	G-Quadruplex-Modulated Fluorescence Detection of Potassium in the Presence of a 3500-fold Excess of Sodium Ions, Haixia Qin 等, American Chemical Society, 1.10 月 2010 (01.10.2010) 摘要、8357 页左栏第 2 段至 8360 页右栏第 2 段, 图 2、3、4	1-2,4-19,21-30
Y	同上	1-17,20
Y	Fluorescence energy transfer probes based on the guanine quadruplex formation for the fluorometric detection of potassium ion, Satoru Nagatoishi 等, 15.8 月 2006 (15.08.2006) 摘要, 第 3.2 节	1-2,4-17
Y	US2003/0198966 A1 (UNIV COLUMBIA NEW YORK 等) 23.10 月 2003 (23.10.2003)	3,20
A	CN101080497 A (金伯利-克拉克环球有限公司) 28.11 月 2007 (28.11.2007) 全文	6-12、21-27

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对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是在下列基础上进行的:

a. 序列表的提交或提供

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. 提交或提供时间

☐ 包含在申请提交时的国际申请中

☒ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

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申请中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/CN2013/077335

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 102735623 A	27.10.2012	无	
CN 102735664 A	17.10.2012	无	
CN 102866148 A	09.01.2013	无	
CN 102866149 A	09.01.2013	无	
CN 103048301 A	17.04.2013	无	
US2003/0198966 A1	23.10.2003	WO03089902 A3	10.06.2004
		WO03089902 A2	30.10.2003
		AU2003243145 A1	03.11.2003
		AU2003243145 A8	27.10.2005
CN101080497 A	28.11.2007	CN101080497 B	29.12.2010
		EP1828402 B1	13.06.2012
		US2006134728 A1	22.06.2006
		US7399608 B2	15.07.2008
		MX2007007122 A	28.02.2009
		WO2006065350 A3	10.08.2006
		KR1225911 B1	24.01.2013
		MX272146 B	26.11.2009
		KR20070086272 A	27.08.2007
		EP1828402 A2	05.09.2007
		WO2006065350 A2	22.06.2006

国际专利分类(IPC)或国家分类和 IPC 两种分类

G01N 21/29 (2006.01) i

G01N 21/33 (2006.01) i

G01N 21/64 (2006.01) i

G01N 21/78 (2006.01) i

G01N 33/52 (2006.01) i