



纳米银颗粒增强聚合酶链式反应长片段 DNA 反复扩增的特异性

王 群, 李 静, 曹小红, 张治洲

(泰达 BIO-X 系统生物技术研究中心, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘 要: 基因操作者经常需要把数量稀少的 DNA 样品进行反复扩增以供进一步研究之用. 在反复扩增过程中, 上一次扩增产物当作下一次扩增的模板使用. 对于较短的 DNA 片段 (几百个碱基), 一般反复扩增不会遇到特别的困难; 但是较长 DNA 片段 (几千到几万个碱基) 的反复扩增一般会极大地降低聚合酶链式反应 (PCR) 的特异性. 实验中发现, 当扩增较长片段基因时, 在常规 PCR 热循环体系中添加粒径平均为 70 nm 的银颗粒, 使反应体系纳米银颗粒浓度达到 0.1 ~ 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 可以在一定程度上保持 PCR 反复扩增反应的特异性. 其机理之一可能是常规 PCR 反应体系在添加了纳米银颗粒后改善了溶液的导热性能.

关键词: 聚合酶链式反应; 长片段; 纳米银; 特异性; 反复扩增

中图分类号: Q812 文献标识码: A 文章编号: 1672-6510 (2007) 02-0001-05

Silver Nanoparticles Enhance the Specificity of Repeated Long PCR Amplification

WANG Qun, LI Jing, CAO Xiao-hong, ZHANG Zhi-zhou

(Teda Bio-X Center for Systems Biotechnology, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Rare amount of DNA sample often needs repeated amplification in order to remain enough amount of DNA template for various analysis. In the repeated amplification by PCR (polymerase chain reaction), PCR product is used as template for further rounds of amplification. Some DNA fragments are hard to get high PCR yield and they need more repeated PCR manipulations. However, PCR specificity is normally dramatically lost during repeated amplifications, especially for longer DNA (several thousand to over ten thousand base pairs). In this study, we found that addition of silver nanoparticles (average diameter 70 nm, 0.1 ~ 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) can significantly remain long PCR specificity after three rounds of repeated amplification. Potential mechanisms are discussed as improvement of heat conductivity.

Keywords: PCR; long sequence; silver nanoparticle; specificity; repeated amplification

聚合酶链式反应 (PCR) 是现代生物学和医学领域经常用到的一项技术, 它的诞生极大地推动了需要基因操作的所有学科的发展^[1]. 使用 PCR 技术, 可以把甚至一个单拷贝的目的 DNA 片段扩增到可以检测到的水平, 以供测序、分子诊断或其他基因分析使用^[1-4]. 在实际工作中, 经常会遇到需要使用上次扩增产物作为下次模板的情况, 如刑侦工作中由于一次扩增产量不足或扩增产物使用殆尽、价格昂贵或提取十

分困难的 DNA 样品等. 对于较短的 DNA 片段 (几百个碱基), 一般反复扩增不会遇到特别的困难; 但是在反复扩增较长片段 (几千到几万个碱基) 基因的实验中, 经常会遇到非特异扩增问题. 在经过若干轮的扩增后, 扩增产物含有大量的非特异扩增产物, 甚至完全观察不到特异扩增的产物. 目前, 关于提高 PCR 反应特异性的研究主要集中在短片段一次扩增的研究^[5-7]. 本研究发现, 通过添加纳米银颗粒可以在长

收稿日期: 2006-11-22; 修回日期: 2007-03-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30570401); 天津科技大学特聘教授科研启动基金资助项目 (20550422)

作者简介: 王 群 (1978—), 男, 辽宁人, 硕士研究生; 通讯作者: 张治洲, 教授, 022-60601441.

片段的反复扩增实验中、在一定程度上保持 PCR 反应的特异性, 这为保持 PCR 反应特异性的研究提供了一个新的途径。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

BIO-RAD MyCycler 170-9703 型基因扩增仪, 美国 Biometra 公司; SpeedCycler 基因扩增仪, 德国耶拿公司; BIO-RAD 170-8026 型凝胶成像仪, 美国 Biometra 公司; 微量移液器, 加拿大 BBI 公司; 1500 μL 离心管, BBI; 200 μL PCR 薄壁管, BBI; 紫外分光光度计, 日本岛津; ZF-90 型暗箱式紫外投射仪, 上海顾村电光仪器厂; DYY-5 型稳压稳流电泳仪, 上海沪西分析仪器厂; Molecular/1015c 型超纯水机, 上海摩勒生物科技有限公司; LQP-B-型制冰机, 上海安亭科学仪器制造厂; XW-80A 微型漩涡混合仪, 上海沪西分析仪器厂有限公司。

1.2 主要试剂

基因组总 DNA 提取试剂盒 BS473, 加拿大 BBI 公司; λ DNA (0.5 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$)、Lambda DNA/Hind III Marker、琼脂糖、溴化乙锭, 加拿大 BBI 公司; 纳米银粉末, 70 nm, Cat. No. 576832-5G, Sigma 公司; 人类新鲜血液(抗凝血标本), 天津市血液中心; Pfu (2.5U/

μL), Taq (5U/ μL), 10 \times PCR buffer, dNTP (2.5 mmol/L), Mg^{2+} (25 mmol/L)、引物 (2 $\mu\text{mol} / \text{L}$), 北京博迈科技发展有限公司 (BM); 自制超纯水。

1.3 实验方法

首先, 优化调整 Mg^{2+} 、酶和模板的浓度, 优化热循环条件, 使调整之后的结果有足够的扩增特异性。一般情况下添加纳米金属银会增强扩增特异性。在此基础上进行反复扩增实验。所有图片的 A 部分为第一轮 PCR, 尽量使 A 部分的所有泳道具有相同或类似的扩增特异性, 这样后续的反复扩增结果之间就具备较高的可比性。

1.3.1 纳米银颗粒悬浮液的制备

实验前, 先将纳米银粉末置于紫外灯下照射 30 min, 使可能污染的核酸酶失活。然后称取 0.01g 纳米银粉末于 1500 μL 灭菌离心管中, 再加入 1000 μL 灭菌纯水, 使用漩涡混合仪混合, 超声悬浮 30 min。经过处理的纳米银颗粒悬浮液可以保存至少 6 h。

1.3.2 引物设计

实验选取了以人类基因组 DNA 作为模板扩增 3.73 kb、4.25 kb、6.77 kb 和以 λ DNA 作为模板扩增 9 kb、12 kb、14.4 kb。利用人类基因组 DNA 作为模板扩增 10 kb 以上的序列在本研究中扩增结果尚不稳定。相关 PCR 引物设计等信息如表 1。

表 1 PCR 设计信息
Tab. 1 PCR design information

扩增产物长度/kb	上游引物		下游引物		模板
	溶解温度/ $^{\circ}\text{C}$	序列 (5'-3')	溶解温度/ $^{\circ}\text{C}$	序列 (5'-3')	
3.73	54.9	TGATGCCCTGTTATTTGCTT	54.1	CTTTACTTTCTGGGTTTGCTC	人类基因组 DNA
4.25	62.3	AGACCCTTACTCACAGACCTTATTTT	62.1	GGTGCTATTACAGCCTTGCC	人类基因组 DNA
6.77	55.9	TGCCCAAAGACTTGTGATGT	55.7	TCCCCAATTAGGATACCTC	人类基因组 DNA
9.00	67.3	CCGAAAGCCAGAACTCCCGTA	67.5	TGGAAATCATTCAACACCCGCACTA	λ DNA
12.00	68.1	AAACCATCGGGAGAGCAGGCC	68.0	TCGTCAAAGGATAATCGGCGTG	λ DNA
14.40	57.0	TGGTTTATTGGAGTAGATGC	57.5	GAGAGTTGTTCCGTTGTGGG	λ DNA

1.3.3 血液人类基因组 DNA 的提取

该部分设计的 PCR 引物是针对人类基因组第 21 号染色体上的部分序列。按照可用于全血裂解提取试剂盒 (BS473, 加拿大 BBI 公司) 的说明进行: 在 1500 μL 灭菌离心管加入 200 μL 人类外周血液, 然后再添加 400 μL 细胞裂解液, 使用漩涡混合仪混合, 再添加 6 μL 蛋白酶 K, 55 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min。添加 600 μL 氯仿, 轻微震荡, 10 000 r/min 离心 2 min, 将表面上清液转移到另外一个 1500 μL 灭菌离心管中, 加入 500 μL 聚沉液, 室温下保持 2 min, 10 000 r/min 离心 2 min。去除上

清液, 添加 1.2 mol/L NaCl, 轻微震荡, 添加 3 μL RNA 酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。添加 300 μL 预冷酒精充分混合, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min。10 000 r/min 离心 5 min。移去上清液, 用 70% 酒精洗涤。将离心管在空气中保持至液体挥发完毕。加入 100 μL TE 溶液, 使沉淀溶解。使用紫外分光光度计测量, 换算后得出人类基因组 DNA 浓度是 280 ng/ μL 。

1.3.4 PCR 反应热循环体系

第一步: 93 $^{\circ}\text{C}$ 预热 2 min; 第二步: 包括 30—45 个循环, 每个循环包括: 93 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 按照引物不同

溶解温度和扩增产物长度的不同,实行退火45~63℃, 1~3 min; 72℃延伸3~8 min, 每循环一次, 延伸时间增加20 s; 第三步: 72℃延伸7~10 min. 25 μL反应体系中各个组分浓度: dNTP, 350 μmol/L; 引物, 300 nmol/L; Mg²⁺, 1.75 mmol/L; 人类基因模板, 10 ng/μL; λ DNA, 2 ng/μL; Taq, 2.5 u; Pfu, 1.25 u. 所有PCR扩增实验都进行3次或4次, 在几次都得到类似结果的前提下提供其中一次的电泳结果图.

1.3.5 PCR反复扩增设计

除第一次扩增外, 后续每次扩增条件与对应的上一次完全一样. 从上次产物中取 1 μL 作为下次扩增的模板.

1.3.6 PCR产物检测

对扩增后的DNA样品进行琼脂糖凝胶电泳, 检查扩增条带, 与对照体系进行比较. 琼脂糖(含染色剂溴化乙锭): 0.7%; 跑胶电压: 2V/cm.

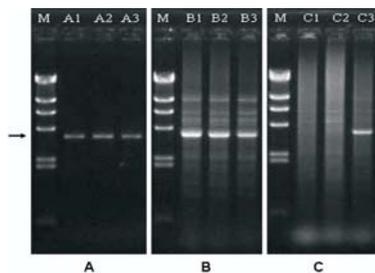
2 结果与讨论

2.1 较长片段的反复扩增

本研究设计了对较长片段DNA的系列反复扩增实验. 第一次实验A的扩增产物作为实验B的模板, 第二次实验B的扩增产物作为实验C的模板. 实验中选择了以人类基因为模板的3.73 kb、4.25 kb、6.77 kb和以λ DNA作为模板的9 kb、12 kb、14.4 kb的长片段作为模板.

2.1.1 长度为3.73 kb片段的反复扩增

在实验中选择以人类基因作为模板, 长度为3.73 kb作为扩增目标, 纳米银浓度为0~0.5 μg/μL. 采用琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 如图1所示.



M: Lambda DNA/HindIII Marker(BBI). A:第一次扩增. 纳米银浓度(μg/μL) A1:0.0, A2:0.3, A3:0.5; B:第二次扩增. 纳米银浓度(μg/μL) B1:0.0, B2:0.3, B3:0.5; C:第三次扩增. 纳米银浓度(μg/μL) C1:0.0, C2:0.3, C3:0.5. 箭头指示目标扩增条带所在位置.

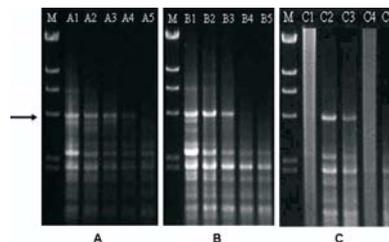
图1 纳米银颗粒对3.73 kb目标片段反复扩增的影响
Fig.1 Effect of nanosilver particles on 3.73 kb repeated amplification from genome DNA

从图中可以看到: 当样品中添加纳米银颗粒后, 经过三轮扩增, 没有添加纳米银颗粒的空白样品1除

了非特异扩增产物外, 目标产物已经消失(C1泳道). 样品2的扩增结果与空白样品类似(C2泳道). 样品3的非特异产物比例稍有增加(C3泳道).

2.1.2 长度为4.25 kb片段的反复扩增

在实验中选择一段长度为4.25 kb人类基因作为扩增目标序列, 纳米银浓度为0~1.0 μg/μL. 采用琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 如图2所示.



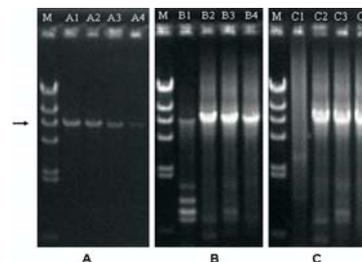
M: Lambda DNA/HindIII Marker(BBI). A: 第一次扩增. 纳米银浓度(μg/μL) A1:0.0, A2:0.4, A3:0.6, A4:0.8, A5:1.0; B:第二次扩增. 纳米银浓度(μg/μL) B1:0.0, B2:0.4, B3:0.6, B4:0.8, B5:1.0; C:第三次扩增. 纳米银浓度(μg/μL) C1:0.0, C2:0.4, C3:0.6, C4:0.8, C5:1.0.

图2 纳米银颗粒对4.25 kb目标片段反复扩增的影响
Fig.2 Effect of nanosilver particles on 4.25 kb repeated amplification from genome DNA

由图可见: 当样品中添加纳米银颗粒后, 经过三轮扩增, 没有添加纳米银颗粒的样品1除了非特异扩增产物外, 目标产物已经消失(C1泳道). 样品2的特异性基本没有变化(C2泳道). 样品3的非特异产物比例稍有增加(C3泳道). 由于样品4和5在第一次扩增(A)时的产量就很少, 所以在经过第二次(B)和第三次(C)扩增后, 没有特异性产物产生属于正常实验结果. 这说明纳米银保持长片段反复扩增的特异性是比较有效的, 但对纳米银的加入量有一定要求.

2.1.3 长度为6.77 kb片段的反复扩增

在实验中选择以人类基因作为模板, 长度为6.77 kb作为扩增目标, 纳米银浓度为0~0.3 μg/μL. 采用琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 如图3所示.



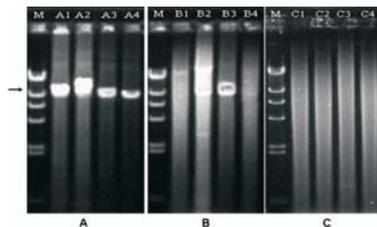
M: Lambda DNA/HindIII Marker(BBI). A:第一次扩增. 纳米银浓度(μg/μL) A1:0.0, A2:0.1, A3:0.2, A4:0.3; B:第二次扩增. 纳米银浓度(μg/μL) B1:0.0, B2:0.1, B3:0.2, B4:0.3; C:第三次扩增. 纳米银浓度(μg/μL) C1:0.0, C2:0.1, C3:0.2, C4:0.3.

图3 纳米银颗粒对6.77 kb目标片段反复扩增的影响
Fig.3 Effect of nanosilver particles on 6.77 kb repeated amplification from genome DNA

结果显示:当样品中添加纳米银颗粒后,经过三轮扩增,没有添加纳米银颗粒的空白样品1已经没有任何目标产物产生(C1泳道).样品2、3、4的扩增结果类似,有非特异扩增产物产生(C2、C3、C4泳道).

2.1.4 长度为 9kb 片段的反复扩增

实验中选用以 λDNA 作为模板,扩增长度为 9 kb 的片段,纳米银浓度为 0~1.2 μg/μL. 琼脂糖凝胶电泳如图 4 所示.



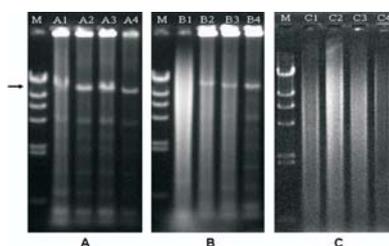
M: Lambda DNA/HindIII Marker(BBI).A:第一次扩增.纳米银浓度 (μg/μL) A1:0.0, A2: 0.4, A3: 0.8, A4:1.2;B:第二次扩增.纳米银浓度 (μg/μL) B1:0.0, B2: 0.4; B3: 0.8, B4:1.2; C:第三次扩增.纳米银浓度 (μg/μL) C1:0.0, C2: 0.4, C3: 0.8, C4:1.2.

图 4 纳米银颗粒对 9 kb 目标片段反复扩增的影响
Fig.4 Effect of nanosilver particles on 9 kb repeated amplification from lambda DNA

结果显示:在经过第二轮(B)扩增后,没有添加纳米银颗粒的 1 号空白样品除了拖尾条带外,没有观察到任何目标产物产生(B1 泳道). 2 号样品可以观察到大量的非特异扩增产物产生 (B2 泳道),4 号样品除拖尾外没有目的产物生成. 3 号样品(B3)虽然也有拖尾现象,但是其主带明显,非特异扩增要比 1、2 号样品弱得多. 第三轮(C)扩增已经看不到目的条带,显示该 9 kb 片段反复扩增的难度.

2.1.5 长度为 12kb 片段的反复扩增

实验中选用以 λDNA 作为模板,扩增长度为 12kb 的片段,纳米银浓度为 0~1.2 μg/μL. 琼脂糖凝胶电泳如图 5 所示.



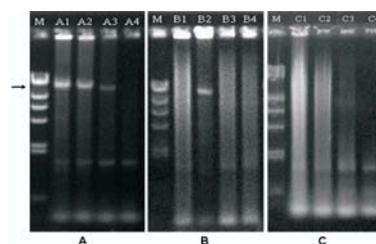
M: Lambda DNA/HindIII Marker(BBI).A:第一次扩增.纳米银浓度 (μg/μL) A1:0.0, A2: 0.4, A3: 0.8, A4:1.2;B:第二次扩增.纳米银浓度 (μg/μL) B1:0.0, B2: 0.4; B3: 0.8, B4:1.2; C:第三次扩增.纳米银浓度 (μg/μL) C1:0.0, C2: 0.4, C3: 0.8, C4:1.2.

图 5 纳米银颗粒对 12 kb 目标片段反复扩增的影响
Fig.5 Effect of nanosilver particles on 12 kb repeated amplification from lambda DNA

结果显示:在经过第二轮(B)扩增后,没有添加纳米银颗粒的 1 号空白样品除了拖尾条带外,没有观察到任何目标产物产生(B1 泳道). 2、3 号样品可以明显观察到目的产物,但是其有拖尾现象(B2、B3 泳道). 4 号样品(B4)非特异扩增要比 1 号空白样品弱得多. 添加纳米银颗粒的 2、3、4 号样品扩增结果都优于空白样品. 第三轮(C)扩增已经看不到目的条带,显示该 12 kb 片段反复扩增的难度.

2.1.6 长度为 14.4kb 片段的反复扩增

实验中选用以 λDNA 作为模板,扩增长度为 14.4 kb 的片段,纳米银浓度为 0~1.2 μg/μL. 琼脂糖凝胶电泳如图 6 所示.



M: Lambda DNA/HindIII Marker(BBI).A:第一次扩增.纳米银浓度 (μg/μL) A1:0.0, A2: 0.4, A3: 0.8, A4:1.2;B:第二次扩增.纳米银浓度 (μg/μL) B1:0.0, B2: 0.4; B3: 0.8, B4:1.2; C:第三次扩增.纳米银浓度 (μg/μL) C1:0.0, C2: 0.4, C3: 0.8, C4:1.2.

图 6 纳米银颗粒对 14.4kb 目标片段反复扩增的影响
Fig.6 Effect of nanosilver particles on 14.4kb repeated amplification from lambda DNA

结果显示:在经过第二轮(B)扩增后,没有添加纳米银颗粒的 1 号空白样品和 3、4 号样品除了拖尾条带外,没有得到任何目标产物(B1、B3、B4 泳道). 2 号样品虽然产量有所降低,但是可以明显观察到目的产物,而且特异性变化不大(B2 泳道). 第三轮(C)扩增已经看不到目的条带,显示该 15kb 片段反复扩增的难度.

2.2 讨论

实验结果表明,在 PCR 体系中添加纳米银,在反复扩增实验中可以在不同程度上保持 PCR 反应的特异性. 虽然对 10 kb 以上的片段反复扩增比较困难,但是在 3~6 kb 范围内添加纳米银的效果还是相当明显的. 原则上每次 PCR 过程中,每个热循环相对于上一次热循环都算是反复扩增,所以本研究结果不仅仅对提高反复扩增 PCR 的特异性有用,对一般性的提高 PCR 特异性都有直接应用的价值. 但是,较长片段的 PCR 产物不经过割胶纯化一般不宜直接作为下次扩增的模板,即使 PCR 产物的纯度很高可能也不行. 不管如何处理模板 DNA,添加纳米银对保持扩增的特异性是有利的.

当把粒径在1~100nm的固体纳米颗粒或纳米纤维悬浮在液体里时,就形成了纳米流体^[8,9]. 纳米流体相对于对应的普通流体具有更强的导热性^[10-15]. 据文献报道,当水中含有1mg/mL的10nm的纳米银颗粒时,溶液系统的热阻就会比原来降低52%;当水中含有10mg/mL的35nm的纳米银颗粒时,溶液系统的热阻就会比原来降低81%^[16]. 由于纳米流体具有更强的导热性,所以在添加了纳米金属颗粒的PCR热循环体系中,PCR反应设想会更快地达到目标温度,减少在非目标温度的停留时间,而在非目标温度停留时间过长,恰恰是引起非特异扩增的一个重要原因.在PCR反应体系中添加纳米银颗粒,不但可能缩短非目标温度停留时间,而且应该可以缩短整个体系达到温度平衡所用的时间.热平衡时间越短,非目标温度区域存在的时间也就越短,非特异扩增反应可能也就越弱.另外,除了上述可能的热传导改善机制外,纳米金属颗粒与不同状态DNA分子的选择性结合可能也对增强扩增特异性有贡献^[5,17-19].

3 结 论

纳米金属银颗粒添加到PCR反应系统对较长DNA片段的反复扩增之特异性有不同程度的增进作用.这项研究还处于初级阶段,但是为PCR扩增的优化拓展了思路.如何做到稳定地、高特异性地反复扩增很多次(而不是简单的两三次)是一个具有巨大实际应用价值的研究课题.我们将尽快系统地考察系列纳米金属材料对PCR反复扩增特异性的增强作用,并在此基础上可望研制出专门的有用试剂盒.而为了阐明纳米银颗粒可以增强反复扩增特异性的机理,还需要进行深入的研究.

参 考 文 献:

- [1] Mullis K B, Faloona F A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction [J]. *Methods Enzymol*, 1987, 155: 335—350.
- [2] Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase [J]. *Science*, 1988, 239: 487.
- [3] Lu J, Li H, An H, et al. Positioning isolation and biochemical analysis of single DNA molecules based on nano-manipulation and single-molecule PCR [J]. *JACS*, 2004, 126: 11136.
- [4] Ding C, Cantor C R. Direct molecular haplotyping of long-range genomic DNA with M1-PCR [J]. *PNAS*, 2003, 100: 7449.
- [5] Li H, Huang J, Lv J, et al. Nanoparticle PCR: nanogold-assisted PCR with enhanced specificity [J]. *Angew Chem*, 2005, 44 (32): 5100—5103.
- [6] Li M, Lin Y, Wu C C, et al. Enhancing the efficiency of a PCR using gold nanoparticles [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (21): e184.
- [7] 李海阔,黄洁欢,吕军鸿,等. 核酸聚合酶链式反应扩增的优化方法: 中国, 200410099186.7[P]. 2004-12-29.
- [8] Eastman J A, Phillipot S R, Choi S U S, et al. Thermal transport in nanofluids [J]. *Annu Rev Mater Res*, 2004, 34: 219.
- [9] Putnam S A, Cahill D G, Braun P V, et al. Thermal conductivity of nanoparticle suspensions [J]. *Journal of Applied Physics*, 2006, 99: 084308.
- [10] Eastman J A, Choi S U S, Li S, et al. Anomalous increase of effective thermal conductivities of ethylene glycol-based nanofluids containing copper nanoparticles [J]. *Applied Physics Letters*, 2001, 78: 718—720.
- [11] You S M, Kim J H, Kim K H. Effect of nanoparticles on critical heat flux of water in pool boiling heat transfer [J]. *Appl Phys Lett*, 2003, 83 (16): 3374—3376.
- [12] Yang Y, Zhang G, Grulke E A, et al. Heat transfer properties of nanoparticle-in-fluid dispersions (nanofluids) in laminar flow [J]. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2005, 48: 1107—1116.
- [13] Prasher R, Bhattacharya P, Phelan P E. Thermal conductivity of nanoscale colloidal solutions (nanofluids) [J]. *Phys Rev Lett*, 2005, 94 (2): 025901.
- [14] Putra N, Thiesen P, Roetzel W. Temperature dependence of thermal conductivity enhancement for nanofluids [J]. *Journal of Heat Transfer*, 2003, 125: 567—574.
- [15] Lee S, Choi U S, Li S, et al. Measuring thermal conductivity of fluids containing oxide nanoparticles [J]. *Journal of Heat Transfer*, 1999, 121: 280—289.
- [16] Kang S, Wei W, Tsai S, et al. Experimental investigation of silver nano-fluid on heat pipe thermal performance [J]. *Applied Thermal Engineering*, 2006, 26: 2377—2382.
- [17] Li H, Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101: 14036—14039.
- [18] 张治洲,王群,汪名春,等. 纳米银提高基因扩增效率的方法: 中国, 200610015612.3 [P]. 2006-09-07.
- [19] 张治洲,王群,汪名春,等. 基于纳米金属合金的核酸聚合酶链式反应扩增的优化方法: 中国, 200610016039.8 [P]. 2006-09-07.