

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2012.02.006

一种基于磁富集靶序列PCR的扩增方法 及其灵敏度检测

牟贤波¹, 刘洪娜², 李松^{1,2}, 刘丽赏³

(1. 湖南工业大学 绿色包装与生物纳米技术应用湖南省重点实验室, 湖南 株洲 412007;

2. 东南大学 生物电子学国家重点实验室, 江苏 南京 210096;

3. 庆熙大学 化学工程系, 韩国 首尔 446-701)

摘要: 以亲和素修饰的磁性纳米颗粒 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 为载体, 提出了基于磁富集靶序列 PCR 扩增方法。首先将结合有生物素标记特异性引物的靶序列富集到亲和素修饰的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米颗粒表面, 然后通过变性获取单链的靶序列, 再进行 PCR 扩增。同时, 优化了靶序列和特异性引物杂交的最适温度和磁性纳米颗粒 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 的最佳用量, 并对该方法的灵敏度进行了检测。通过实验得出: 该方法中, 最适的杂交温度为 $53\text{ }^\circ\text{C}$, 磁性纳米颗粒的最佳用量为 $90\text{ }\mu\text{g}$, 靶序列的最低检出浓度为 $5 \times 10^{-10}\text{ ng/mL}$ 。

关键词: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$; 磁富集; 杂交; PCR

中图分类号: O657.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2012)02-0027-05

A Method of PCR Amplification Based on Target Sequence Magnetic Enrichment and Sensitivity Detection

Mou Xianbo¹, Liu Hongna², Li Song^{1,2}, Liu Lishang³

(1. Hunan Key Laboratory of Green Packing and Application of Biological Nanotechnology, Hunan University of Technology,

Zhuzhou Hunan 412007, China; 2. State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096, China;

3. Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University, Yongin-si Gyeonggi-do 446-701, Korea)

Abstract: In this research, a method of magnetic enrichment of PCR amplification was built. First, target sequence was combined with biotin-modified specific primer and enriched to the surface of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Then single target sequence was gained through degeneration, and performed PCR amplification. Simultaneously, the experiment conditions were optimized, such as the optimal hybridization temperature of target sequence and specific primers and the dosage of magnetic nanoparticles $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Besides, the sensitivity of the method was detected. Through the experiment, the optimum temperature of hybridization was $53\text{ }^\circ\text{C}$, the optimum dosage of magnetic nanoparticles $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ was $90\text{ }\mu\text{g}$, and the lowest concentration of target sequence could be detected was $5 \times 10^{-7}\text{ ng/mL}$.

Key words: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$; magnetic enrichment; hybridization; PCR

收稿日期: 2011-09-20

作者简介: 牟贤波 (1986-), 男, 浙江台州人, 湖南工业大学硕士生, 主要研究方向为基因诊断及多重 PCR 技术,

E-mail: mouhaobin@163.com

通信作者: 刘洪娜 (1982-), 女, 河北石家庄人, 东南大学讲师, 主要研究方向为纳米材料和生物传感器防敏,

E-mail: hnliu82@gmail.com

0 引言

核酸分子体外扩增技术是开展分子生物学研究的基础。聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术以其灵敏度高、特异性强、实验周期短等优点,自 1985 年建立^[1]以来就得到了广泛的应用,逐渐成为分子生物学、基因组学、疾病诊断等领域的基本研究手段之一。PCR 反应过程包括变性、退火和延伸 3 个阶段。由于 PCR 技术灵敏度高,因而容易产生错配、引物二聚体等假阳性反应,严重影响实验结果的判读^[2]。因此,亟需一种有效方法来解决 PCR 技术的这一缺点。

固相 PCR (solid phase PCR) 技术^[3]是在固体表面进行的核酸扩增技术,即通过各种共价键将引物结合到固相基质上,使扩增反应在固相基质表面进行。这种方法可以在空间上阻止引物彼此接触并形成二聚体,但是却降低了反应效率,造成支持物表面反应物的损失。

由于磁性纳米颗粒 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 具有低或无生物毒性、无免疫原性、抗酶解能力强等优点,因而被作为一种固相基质广泛地应用于核酸分子体外扩增技术之中。如 2007 年, Lermo 等人研究了基于磁性纳米颗粒表面的 PCR, 并且用电化学的方法检测了食物中的病原体^[4]。同年, 刘洪娜等人利用磁性纳米颗粒 PCR (magnetic nanoparticles PCR, MNPs-PCR) 扩增和等位基因特异性双色荧光探针 (Cy3, Cy5) 杂交技术, 建立了一种单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 分型的新方法^[5]; 2009 年, 该方法被作为一种通用的分子生物学方法编入了 *Methods in Molecular Biology* 系列丛书之中^[6]。

本文拟建立一种磁富集靶序列 PCR 扩增方法, 并且对靶序列的最低检出浓度进行实验, 以期为恶性传染病的快速诊断和肿瘤等疾病的早期诊断提供借鉴。

1 实验

本实验中的实验样本为保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下的正常人体血液。

1.1 试剂与仪器

本实验中用到的主要试剂包括:

如表 1 中所列出的引物, 均为上海生工试剂有限公司合成;

DNA marker、Tag 酶、dNTP, 均为宝生物工程(大连)有限公司生产;

SYBR Premixture, 由 BIO-RAD 公司生产;

杂交液, 由 SIGMA 公司生产;

实验用水为自制去离子双重蒸馏水 ($18.25\text{ M}\Omega$)。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primer in experiment

引物名称	引物序列 (5'-3')
M235T Forward Primer	CCACGCTCTCTGGACTTCAC
M235T Reverse Primer	GAGGTTTGCTTACCTTGGGA
M235T Bio-Reverse Primer	Biotin-GAGGTTTGCTTACCTTGGGA

本实验中用到的主要仪器有:

纳米粒度仪, Nano-ZETA1 型, 由英国 Malvern 公司生产;

超声仪, KQ2200DE 型, 由昆山市超声仪器有限公司生产;

PCR 仪, PTC-220 型, 由美国 MJ 公司生产;

DNA Engine Opticon 2 型 Real-Time PCR 仪和 Universal Hood II 型凝胶成像仪, 均由 BIO-RAD 公司生产。

1.2 基因组 DNA 的提取

对于样本中 DNA 的提取, 采用 KI 法^[7], 具体的操作如下:

1) 取乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)- Na_2 抗凝血 $500\text{ }\mu\text{L}$, 并置于 1.5 mL 灭菌离心管中, 再加入 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 灭菌去离子水, 于 $10\text{ }000\text{ r/min}$ 速度下离心 5 min , 弃去上清液。

2) 在经上述操作后所得沉淀中加入 5 mol/L 的 KI 溶液 $120\text{ }\mu\text{L}$, 旋涡震荡 30 s 使其充分溶解。再加入质量分数为 0.9% 的 NaCl 溶液 $440\text{ }\mu\text{L}$, 体积比为 $24:1$ 的氯仿/异戊醇溶液 $560\text{ }\mu\text{L}$, 充分混匀, 并静置 2 min 。于 $10\text{ }000\text{ r/min}$ 速度下离心 5 min , 小心吸取上清液至另外的 1.5 mL 灭菌离心管中, 并加入 $400\text{ }\mu\text{L}$ 异丙醇溶液充分混匀, 静置 2 min 。

3) 于 $10\text{ }000\text{ r/min}$ 速度下离心 5 min , 然后弃去上清液。在所得沉淀中加入体积浓度为 70% 的冰乙醇 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$, 再次于 $10\text{ }000\text{ r/min}$ 速度下离心 5 min , 弃去上清液。

4) 将经操作 3) 后所得沉淀真空干燥, 再加入 TE (Tris-EDTA) 溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$, 于 $55\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中溶解, 最后将所得溶液于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存备用。

5) 定量结果, 通过紫外分光光度计测得所提取的基因组 DNA 的浓度为 $50\text{ ng/}\mu\text{L}$ 左右。

1.3 磁性纳米颗粒的制备与亲和素修饰

磁性纳米颗粒 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 的具体制备方法和过程以及亲和素修饰过程参见文献^[8]。磁性纳米颗粒 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 亲和素修饰的原理如图 1 所示。

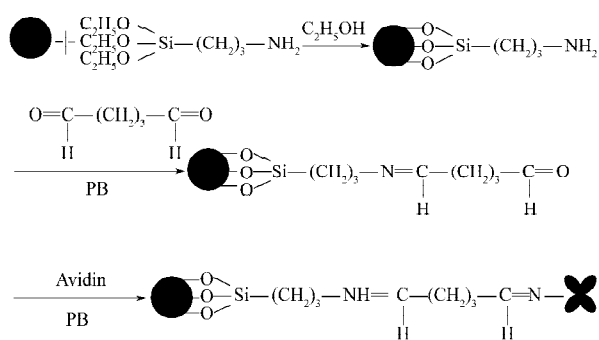


图1 磁性纳米颗粒 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 亲和素修饰原理

Fig. 1 Principle of magnetic nanoparticles $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ avidin-modification

1.4 靶序列的磁富集

将稀释10倍的基因组DNA(质量浓度为 $5\text{ ng}/\mu\text{L}$)和杂交液按等体积混合,各取 $40\ \mu\text{L}$,另加入 $1\ \mu\text{L}$ 的 $10\ \mu\text{mol/L}$ 生物素修饰的下游引物(M235T bio reverse primer, bio-RP),在一定条件下杂交 $30\ \text{min}$ 。取一定量亲和素修饰的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 磁性纳米颗粒于 $200\ \mu\text{L}$ 离心管中,磁分离,弃去上清液,然后将上述杂交后的溶液转移至该离心管中,于室温下吸附 $30\ \text{min}$,并每隔 $5\ \text{min}$ 混匀一次。磁分离,弃去上清液,并用灭菌去离子水清洗2遍,除去未吸附的DNA和其他组分,再加入 $8\ \mu\text{L}$ 的灭菌去离子水,于 $95\ ^\circ\text{C}$ 条件下变性 $5\ \text{min}$,骤冷。磁分离,将上清液转入新的 $200\ \mu\text{L}$ 离心管中,获取单链的靶序列,用于后续实验。

1.5 磁富集靶序列实验条件的优化

1.5.1 杂交温度的优化

首先,将质量浓度为 $5\ \text{ng}/\mu\text{L}$ 的基因组DNA等量分配于5个离心管中,于 $95\ ^\circ\text{C}$ 条件下变性 $5\ \text{min}$,然后分别在 $38.0, 43.5, 49.7, 52.5, 58.0\ ^\circ\text{C}$ (利用PCR仪自动生成的温度梯度)条件下与M235T bio-RP杂交。杂交结束后按1.4中的方法获取靶序列,并进行PCR扩增。PCR扩增体系($30\ \mu\text{L}$):每管加入 $10\times\text{Buffer}$ $3\ \mu\text{L}$; $25\ \text{mmol/L}$ 的 MgCl_2 $1.8\ \mu\text{L}$; $10\ \text{mmol/L}$ 的dNTP $0.6\ \mu\text{L}$; $10\ \mu\text{mol/L}$ 的M235T Forward Primer (FP)和M235T Reverse Primer (RP)各 $1\ \mu\text{L}$; $5\ \text{U}/\mu\text{L}$ 的Tag聚合酶 $0.3\ \mu\text{L}$;并用灭菌去离子水补体系溶液体积至 $30\ \mu\text{L}$ 。同时做1个对照组,加入 $2\ \mu\text{L}$ 稀释10倍的基因组DNA,不经过磁富集,直接PCR扩增,其他条件同实验组。

PCR扩增程序为:先在 $95\ ^\circ\text{C}$ 条件下预变性 $4\ \text{min}$,然后在 $95\ ^\circ\text{C}$ 条件下变性 $40\ \text{s}$,再在 $55\ ^\circ\text{C}$ 条件下退火 $30\ \text{s}$,接着于 $72\ ^\circ\text{C}$ 条件下延伸 $30\ \text{s}$,总共35个循环;最后在 $72\ ^\circ\text{C}$ 条件下延伸 $10\ \text{min}$ 。

1.5.2 磁性纳米颗粒用量的优化

取5个相同的靶序列(质量浓度为 $5\ \text{ng}/\mu\text{L}$ 的基

因组DNA)为实验组,在最适杂交温度下杂交,然后分别取 $5, 8, 12, 15, 18, 20\ \mu\text{L}$ 亲和素修饰的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (质量浓度为 $6\ \text{mg/mL}$)进行吸附。吸附结束之后按上面的方法获取单链靶序列及PCR扩增。

1.6 磁富集靶序列实验灵敏度的检测

首先将基因组DNA按10倍浓度梯度稀释至 $5\times 10^{-11}\ \text{ng}/\mu\text{L}$,然后分别取质量浓度为 $5\times 10^{-3}\sim 5\times 10^{-11}\ \text{ng}/\mu\text{L}$ 的基因组DNA,共9个不同浓度,在最适杂交温度和最佳颗粒用量下,按上面的方法获取单链靶序列,然后进行PCR扩增(扩增程序如1.5.1中所述)。同时做1个对照组。对照组中加入 $2\ \mu\text{L}$ 没有稀释,且没有经过磁富集的基因组DNA(质量浓度为 $50\ \text{ng}/\mu\text{L}$),其他组分同实验组。

1.7 琼脂糖凝胶电泳检测

取上述所有PCR产物 $5\ \mu\text{L}$ 与 $6\times\text{Loading Buffer}$ $1\ \mu\text{L}$ 混合点样,用1%琼脂糖凝胶电泳分别进行检测,电泳电压为 $110\ \text{V}$,电泳时间为 $20\ \text{min}$ 。

2 结果与分析

2.1 磁性纳米颗粒的粒径与亲和素修饰分析

2.1.1 粒径分布

图2为由纳米粒度仪测得的磁性纳米颗粒的粒径分布图。

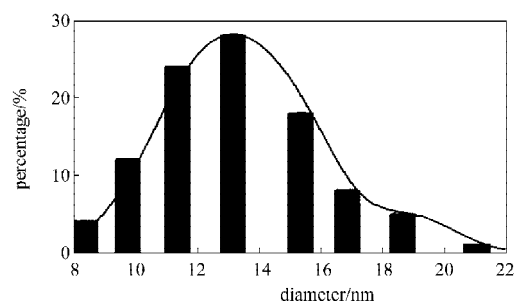


图2 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 粒径分布

Fig. 2 Particle size distribution of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

由图2可看出,所制备的磁性纳米颗粒的粒径主要分布在 $10\sim 18\ \text{nm}$ 之间。用纳米粒度仪测量粒径的过程中,显示颗粒的平均粒径为 $13.4\ \text{nm}$ 。

2.1.2 亲和素修饰效果分析

首先用生物素标记的M235T位点的下游引物(bio-RP)扩增了5管相同模板的PCR产物,再将5管PCR产物充分混合均匀,然后重新分配5份至5个离心管中。接下来分别加入亲和素修饰的磁性纳米颗粒 $0, 5, 10, 15, 20\ \mu\text{L}$,于室温条件下反应 $30\ \text{min}$,并每隔 $5\ \text{min}$ 漩涡震荡1次。最后取上清液点样,凝胶电泳,所得结果如图3所示。

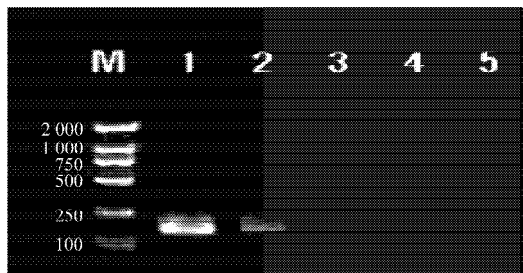


图3 亲和素修饰 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 的生物活性检测电泳图

Fig. 3 The electrophoresis figure of detection biological activity of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ avidin modification

从图3中可清楚地看到,电泳条带随着磁性纳米颗粒加入量的增加,其亮度逐渐减弱,层次分明。未加磁性纳米颗粒的产物的条带亮度最亮(泳道1);加入 $5\ \mu\text{L}$ 颗粒(泳道2)时,其亮度就有明显减弱;加入 $10\ \mu\text{L}$ 颗粒(泳道3)的时候,其条带只能依稀可见;当加入颗粒的量达到 $15\ \mu\text{L}$ (泳道4)的时候,已经完全看不到条带了。这一实验结果表明,结合到磁性纳米颗粒 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 表面的亲和素仍具有较高的生物活性,颗粒的亲和素修饰较成功。

2.2 磁富集 PCR 扩增实验条件优化结果分析

2.2.1 靶序列和特异性引物杂交温度的优化结果

本实验在不同杂交温度下所获单链靶序列的 PCR 扩增结果见图4。



图4 不同杂交温度的 PCR 电泳图

Fig. 4 PCR electrophoresis figure under different hybridization temperatures

杂交温度的高低会直接影响引物与靶序列杂交的特异性。温度过低,引物的非特异性结合就会增强,可能导致引物与除靶序列之外的非目的片段杂交,以及接下来 PCR 扩增时靶序列浓度的降低;一定范围内温度的增高,能增强引物与靶序列结合的特异性;而温度过高则会降低引物与靶序列杂交的效率,同样导致接下来 PCR 扩增时靶序列浓度的降低。图4中, M 为 Marker DNA, PC 为对照组(后图同),泳道1~5所对应的杂交温度分别为 $38.0, 43.5, 49.7, 52.5, 58.0\ ^\circ\text{C}$ 。从图4中可以明显地看出,当杂交温度较低时,1,2,3泳道3个实验组的电泳条带亮度相当,且均较弱;随着杂交温度的进一步升高,4泳道的电泳条带亮度有明

显增加,且为最亮,接近对照组;当杂交温度继续升高,5泳道的条带亮度虽然比1,2,3泳道的条带稍亮,但明显弱于4泳道。由此可知,靶序列和特异性引物的最佳杂交温度为 $52.5\ ^\circ\text{C}$ 左右。因此,最适杂交温度选 $53\ ^\circ\text{C}$ 。

2.2.2 磁性纳米颗粒 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 用量优化结果

实验中以不同添加量的纳米颗粒来获取单链靶序列的 PCR 扩增,结果见图5。

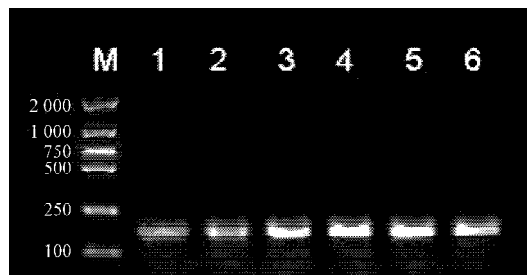


图5 不同颗粒加入量的 PCR 电泳图

Fig. 5 The PCR electrophoresis figure of different particle addition amount

图5中,1~6泳道亲和素修饰的磁性纳米颗粒 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (质量浓度为 $6\ \text{mg/mL}$) 的加入量分别为 $5, 8, 12, 15, 18, 20\ \mu\text{L}$ 。从图中可以看出,当颗粒的用量只有 $5\ \mu\text{L}$ 时,其最后的 PCR 产物的条带很弱。随着加入颗粒量的增加,其 PCR 产物电泳条带的亮度也明显增加。当颗粒加入量从 $15\ \mu\text{L}$ 增加到 $20\ \mu\text{L}$ 时,其电泳条带的亮度并没有明显增加。从经济的角度考虑,最后选定质量浓度为 $6\ \text{mg/mL}$ 的亲和素修饰的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 磁性纳米颗粒用量为 $15\ \mu\text{L}$, 即 $90\ \mu\text{g}$ 。

2.3 磁富集 PCR 扩增及其灵敏度的检测结果分析

在最适杂交温度 $53\ ^\circ\text{C}$ 和最佳磁性纳米颗粒 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 用量(浓度为 $6\ \text{mg/mL}$) $15\ \mu\text{L}$ 即 $90\ \mu\text{g}$ 下,进行磁富集 PCR 扩增。凝胶电泳检测所得到的条带亮度均较亮,如图6所示。同时,利用该方法对实验中所用靶序列的最低检出浓度进行了实验,PCR 产物凝胶电泳检测结果如图7所示。

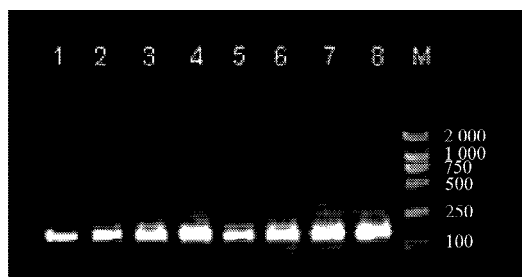


图6 磁富集 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 6 The electrophoresis figure of magnetic enrichment PCR amplification

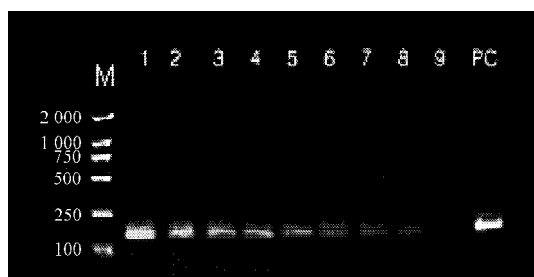


图7 磁富集靶序列实验灵敏度检测电泳图

Fig. 7 The electrophoresis figure of magnetic enrichment experiment sensitivity detection

在图7中,泳道1~9分别是以质量浓度为 $5 \times 10^{-3} \sim 5 \times 10^{-11} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的基因组DNA为靶序列的最终PCR扩增结果。从图中可以明显地看出,实验组中泳道1(质量浓度为 $5 \times 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{L}$)的条带最亮,比Marker DNA稍弱;之后随着靶序列浓度的降低,其条带亮度逐渐减弱;当质量浓度为 $5 \times 10^{-10} \text{ ng}/\mu\text{L}$ (泳道8)时,其条带虽然较弱但仍可见;稀释倍数再增大10倍(质量浓度为 $5 \times 10^{-11} \text{ ng}/\mu\text{L}$,泳道9)时,在图中已完全看不见条带了。所以本方法对于靶序列的最低检出质量浓度为 $5 \times 10^{-10} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

3 结论

本文介绍了一种以亲和素修饰的磁性纳米颗粒 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 为载体,将结合有生物素修饰的特异性引物的靶序列富集到其表面,然后通过变性获取单链靶序列,再进行PCR扩增的核酸体外扩增方法。

通过前述实验可以得出,本文的实验方法中,靶序列和特异性引物的最适杂交温度为 $53 \text{ }^\circ\text{C}$,质量浓度为 $6 \text{ mg}/\text{mL}$ 的亲和素修饰的磁性纳米颗粒 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 的最佳加入量为 $15 \mu\text{L}$,即 $90 \mu\text{g}$,靶序列的最低检出质量浓度为 $5 \times 10^{-10} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

本核酸扩增方法,通过磁富集,去除了非目的基因组DNA,降低了假阳性反应的可能,提高了PCR扩增的特异性;同时能去除DNA提取过程中残留的其他组分,有助于提高PCR扩增的灵敏度。由于在PCR扩增之前无需对目标DNA进行纯化处理,简化了实验步骤,所以能实现快速检测。

当一些恶性传染疾病(如SARS、禽流感、猪流感等)发生时,由于本方法操作简单,实验周期短,可为这些恶性传染病的快速诊断提供一种借鉴方法;同时,由于本方法能在很低的浓度水平下($5 \times 10^{-10} \text{ ng}/\mu\text{L}$)对靶序列进行有效地扩增和检测,能为一些疾病,如肿瘤等,提供早期诊断。

对于不同疾病或个体,其靶序列和特异性引物的最适杂交温度可能会有所不同,需要稍微调整。

参考文献:

- [1] Saiki R K, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia[J]. *Science*, 1985, 230 (4732): 1350-1354.
- [2] Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, et al. Detection of Bacteria Carrying the stx2 Gene by in Situ Loop-Mediated Isothermal Amplification[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69 (8): 5023-5028.
- [3] Adessi C, Matton G, Ayala G. Solid Phase DNA Amplification: Characterization of Primer Attachment and Amplification Mechanisms[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28 (20): E87.
- [4] Lermo A, Campoy S, Barbe J, et al. In Situ DNA Amplification with Magnetic Primers for the Electrochemical Detection of Food Pathogens[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22 (9/10): 2010-2017.
- [5] 刘洪娜, 李松, 王志飞, 等. 一种基于磁性纳米粒子PCR的高通量SNP分型方法[J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28 (6): 1035-1038.
Liu Hongna, Li Song, Wang Zhifei, et al. High-Throughput SNP Genotyping Method with PCR on Magnetic Nanoparticles[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2007, 28 (6): 1035-1038.
- [6] He Nongyue, Li Song, Liu Hongna. High-Throughput SNP Detection Based on PCR Amplification on Magnetic Nanoparticles Using Dual-Color Hybridization[M]. *American: Humana Press*, 2009: 393-402.
- [7] 赵书平, 张俊杰, 尤建, 等. 一种碘化钾提取外周血基因组DNA的方法[J]. *中华医学遗传杂志*, 1999, 16 (6): 395-396.
Zhao Shuping, Zhang Junjie, You Jian, et al. The Establishment and Application of Genomic DNA Extraction from Peripheral Blood[J]. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 1999, 16 (6): 395-396.
- [8] 刘丽赏, 刘洪娜, 李松, 等. 用于生物检测的链霉亲和素修饰 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@Au$ 复合颗粒的制备与表征[J]. *化学学报*, 2010, 68 (20): 2041-2046.
Liu Lishang, Liu Hongna, Li Song, et al. Fabrication and Characterization of Streptavidin $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@Au$ Nanocomposites for Biological Application[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2010, 68 (20): 2041-2046.

(责任编辑: 廖友媛)