

基于双纳米金探针杂交法检测 HBV DNA

邢亚斯^{1,2}, 邹能利¹, 毛红菊¹, 徐霞², 葛玉卿¹, 金庆辉¹, 赵建龙¹

(1. 中国科学院上海微系统与信息技术研究所传感技术联合国家重点实验室, 上海 200050;

2. 郑州大学药学院, 郑州 450001)

摘要 利用双纳米金探针结合基因芯片平台建立了一种检测乙肝病毒基因(HBV DNA)的新方法. 根据 HBV DNA 的保守序列设计捕获探针和信号报告探针, 通过一对互补的纳米金检测探针的双杂交法对 HBV DNA 进行信号放大, 最后进行银染, 达到对 HBV DNA 的可视化检测. 该方法的灵敏度高, 可检测 10 fmol/L 的 HBV DNA, 且能在 1.5 h 内完成检测. 其具有的快速、高灵敏度及低成本等优势使其有望发展成为一种检测 HBV DNA 的新方法.

关键词 双纳米金探针; 杂交; 基因芯片; 银染; 乙肝病毒基因(HBV DNA)

中图分类号 O657.39

文献标识码 A

DOI: 10.3969/j.issn.0251-0790.2012.07.010

乙型肝炎病毒(HBV)是指引起人类急、慢性肝炎的 DNA 病毒. 我国的乙肝病毒感染率约为 60% ~ 70%, 有 1 亿多人携带乙肝病毒, 其中乙肝患者有 3000 多万, 是严重威胁人类健康的传染病之一. 因此, 乙肝病毒基因检测对早期的诊断和治疗具有极其重要的意义^[1].

目前用于乙肝病毒基因检测的方法主要有竞争聚合酶链式反应(PCR)法、荧光定量 PCR 法、酶联免疫吸附法、荧光标记物法和 PCR 酶联化学发光等^[2~5]. 实验室诊断则主要依赖于血清特异性抗原抗体(ELISA)检测和乙肝病毒基因(HBV DNA)检测, 前者是临床诊断 HBV 的传统方法, 后者多采用定量 PCR 技术提高 HBV 的检出率, 但其检测成本较高, 在一定程度上限制了其应用. 以上方法各有其优缺点, 所用的仪器设备及试剂品质等条件不同^[6], 得出的检测结果也各不相同.

纳米金粒子(AuNPs)由于具有良好的生物相容性、较小的颗粒直径以及较大的比表面积等表面特性优势, 已被用于寡核苷酸的功能化修饰, 并在一系列的生物检测领域得以应用^[7~9], 其中纳米金探针结合银粒子的方法在核酸检测中也有广泛的研究. Taton^[10]和 Storhoff 等^[11]利用纳米金检测探针通过待检测的靶 DNA 与固定在固相支持物上的捕获探针杂交, 再用银染增强使信号放大, 从而形成可视的点阵来检测病毒 DNA. 此方法与传统的荧光检测方法相比, 灵敏度有所提高且操作过程简单省时, 适合快速检测, 但其检测灵敏度还有待进一步提高. Cao 等^[12]在芯片表面通过核酸杂交形成纳米金标记的探针, 建立了结合银粒子增强拉曼反射的电化学检测方法检测 DNA 和 RNA, 检出限达到 20 fmol/L, 使检测灵敏度大大提高. Xiong 等^[13]利用纳米金探针在其互补 DNA 存在时与银粒子之间的相互作用产生的颜色变化来检测该 DNA 分子, 得到了良好的效果, 此方法简单易操作, 无需昂贵的仪器设备.

本文以基因芯片为平台, 基于纳米金探针和银染的方法开发了一种基于双纳米金探针杂交的核酸检测方法. 通过一对互补的纳米金检测探针的杂交, 使检测信号得到 2 次放大, 最后进行银染增强, 从而形成能在显微镜下清晰观测的黑色点阵, 根据点阵灰度的强弱, 可直观得到 HBV DNA 的检测灵敏度. 该方法大大提高了 HBV DNA 的检出效率及检测的灵敏度, 且快速、简便、成本低, 是诊断 HBV 感染的一种有效手段. 检测过程及原理如图 1 所示.

收稿日期: 2011-08-22.

基金项目: 上海市科学技术委员会纳米专项(批准号: 11nm0505800, 1052nm061000)和国家自然科学基金(批准号: 31000791)资助.

联系人简介: 毛红菊, 女, 博士, 研究员, 主要从事生物传感器及纳米技术在重大疾病诊断治疗方面研究.

E-mail: hjmao@mail.sim.ac.cn

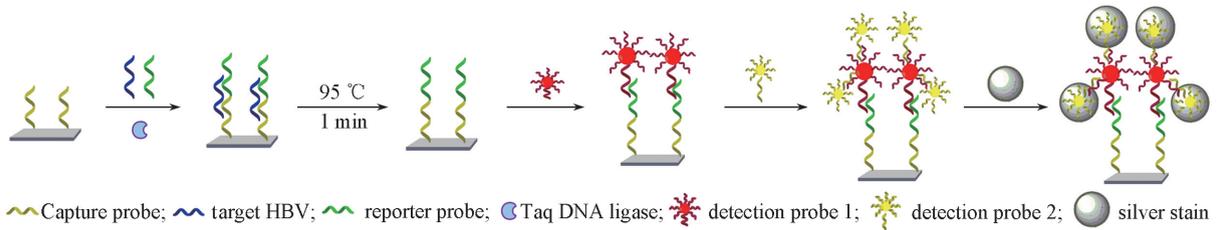


Fig.1 Scheme of the assay for HBV DNA detection based on dual nano-probes and hybridization

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

纳米金溶液[粒径为(15±3.5) nm]、基因芯片(上海百奥公司)、0.2×柠檬酸钠缓冲液[SSC, 含1 g/L 十二烷基硫酸钠(SDS)]、银染液(参见文献[14]方法配制)和硝酸钠(NaNO₃)洗液均由本实验室自行制备; Taq DNA 连接酶和 Taq 连接酶缓冲液(美国 Biolabs 公司); 杂交液(瑞士罗氏公司); 所用试剂均为分析纯, 实验用水为 Milli-Q 超纯水(18.3 MΩ/cm). 实验所需探针序列(表1)均由大连 Takara 公司合成.

Table 1 HBV DNA sequences tested in the experiment

Note	Sequence
Capture probe(HBV)	5'-PO ₄ -TGGATGATGTGGTAT(T) ₁₀ (CH ₂) ₃ NH-3'
Target DNA(HBV)	5'-ATACCACATCATCCATATAACTGAAAGCCA-3'
Reporter probe	5'-CGTGTCTCTCGTTGTCTGCTG(A) ₁₅ TGGCTTTCAGTTATA-3'
Detection probe 1	5'-GACAACGAGGACACG(CH ₂) ₃ -SH-3'
Detection probe 2	5'-CGTGTCTCTCGTTGTC(CH ₂) ₃ -SH-3'
Probe 3	5'-PO ₄ -ACTCCCAGCATGAAC(T) ₁₀ (CH ₂) ₃ NH-3'

Prosys5510A 型芯片点样仪(美国 Cartesian Technology 公司); V-670 型紫外-可见分光光度计(美国 Jasco 公司); DGG-9053A 型恒温干燥箱(韩国 Sumsung 公司); JEM-2100 型透射电子显微镜(TEM, 日本电子公司); BX51 型显微镜(日本 Olympus 公司).

1.2 实验过程

1.2.1 纳米金颗粒的制备 高质量的纳米金是制备高质量金标探针的前提. 本实验采用氯金酸还原法, 制备了粒径为(15±3.5) nm 的纳米金粒子^[15]. 制备前将所有的器皿用王水浸泡, 然后用去离子水冲洗, 最后于 120 °C 下烘干. 将配制好的氯金酸溶液(HAuCl₄)加热至 150 °C, 同时持续搅拌, 一定时间后迅速加入配制好的柠檬酸三钠溶液, 直到溶液最终变成酒红色, 持续加热搅拌 10 min, 停止加热, 搅拌下冷却至室温. 以 0.22 μm 的硝酸纤维尼龙膜过滤溶液, 即可得到颗粒均匀的纳米金溶液, 于 4 °C 下保存备用.

1.2.2 纳米金探针的标记 采用巯基修饰的 DNA 标记纳米金颗粒^[16], 取 1.0 mL 10 nmol/L 的纳米金溶液, 以 9000 r/min 转速离心 50 min; 移去上清液, 加入 97 μL 去离子水重悬纳米金, 同时加入 3 μL 100 μmol/L 巯基修饰的 DNA 检测探针序列, 充分混匀后于室温下放置 16 h 以上; 分 3 次加入 1 mol/L NaCl 溶液和 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液(PB, pH=7.2)至终浓度分别为 0.1 mol/L 和 10 mmol/L, 每次间隔 1~1.5 h, 充分混匀后于室温下放置 48 h 以上; 加入 0.1 mol/L NaCl 和 10 mmol/L PB 混合液, 将上述溶液补足至 1 mL, 混匀; 以 9000 r/min 转速离心 50 min; 移去上清液, 加入 100 μL 10 mmol/L PB 和 0.1 mol/L NaCl 混合液重悬, 于 4 °C 下储存备用.

1.2.3 芯片的制备 将氨基修饰的捕获探针(Capture probe)通过芯片点样仪固定在醛基化处理的芯片上. 将捕获探针用点样液稀释至浓度为 50 μmol/L, 点样直径为 100 μm, 点样间距为 500 μm, 点样量为 0.7 nL, 每个探针重复点样 5 次, 共点样 2 排. 将基因芯片置于 37 °C 下固定 48 h, 经硼氢化钠溶液处理, 封闭未反应的醛基, 干燥后备用^[17].

1.2.4 银染液的配制 分别配制 10 g/L 明胶、柠檬酸缓冲液(pH = 3.5)及对苯二酚溶液

(1.7 g 对苯二酚溶解于 30 mL 水), 再将 3 种溶液过滤, 按体积比 6:1:3 混合为 100 mL 溶液, 最后加入硝酸银溶液(80 mg 硝酸银溶解于 2 mL 水), 混匀后避光保存, 现配现用^[14].

1.2.5 芯片检测方法 芯片上的捕获探针和报告探针(Reporter probe)分别与 HBV 靶序列(Target DNA)的两端互补, 当反应体系中存在靶序列时, 经由反应体系中 Taq 连接酶的连接作用, 二者之间能够形成牢固的共价连接, 从而使报告探针被间接固定于芯片上, 作为后续检测的信号桥梁, 再分别杂交上 2 种纳米金检测探针(Detection probe 1 和 Detection probe 2), 最后经银染增强, 得到放大的信号. 具体操作过程如下: 取 HBV 靶序列、报告探针、Taq 连接酶及其缓冲液和水配成 10 μL 的体系, 置于离心管内充分混匀并均匀滴入芯片点阵区, 盖上盖玻片, 置于杂交湿盒中, 于 45 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 15 min, 然后置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中变性清洗 1 min, 以清除未连接的报告探针和其它多余成分, 然后用氮气吹干. 另取纳米金检测探针 1、杂交液和水共 8 μL , 得到混合均匀的体系, 滴加于芯片点阵区, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 30 min, 杂交完毕后以 0.2 \times SSC 洗液于室温下振荡清洗玻片 2 min, 用氮气吹干. 再取纳米金检测探针 2、杂交液和水共 8 μL 混合液, 滴加于芯片点阵区, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 15 min, 杂交完毕后以 0.2 \times SSC 洗液于室温下振荡清洗玻片 2 min, NaNO_3 配平以中和残存的 SSC 洗液并使银染的效率更高, 用氮气吹干. 最后在点阵区均匀加入 10 μL 新配制的银染液(避光操作), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min 后置于去离子水中以终止反应, 清洗 2 min, 用氮气吹干, 置于显微镜下观察.

1.2.6 HBV 靶序列的灵敏度检测 用浓度分别为 1 nmol/L, 100 pmol/L, 10 pmol/L, 1 pmol/L, 100 fmol/L, 10 fmol/L, 1 fmol/L, 100 amol/L 和 10 amol/L 的 HBV 靶序列与经醛基化处理的固定有捕获探针的芯片进行杂交, 银染显色, 以确定其最低检测浓度.

1.2.7 HBV 靶序列的特异性、重复性及稳定性检测 为验证本实验的特异性、重复性和稳定性, 设计了一组对照实验, 即在 2 排 HBV 捕获探针点阵的上方点 1 排点样液作为空白对照, 在其下方点 1 排与 HBV 靶序列不相关的一段序列(Probe 3)作为阴性对照探针, 用于特异性实验. 每个浓度的检测实验在 1 d 内、同等的实验条件下重复进行 3 次, 统计灰度值, 考察该方法的重复性. 在同等实验条件下每隔 5 d 检测 1 次, 共检测 3 次, 统计灰度值, 考察该方法的稳定性. 最后取每次实验结果的平均值作为最终的检测结果, 绘制灰度值的变化趋势图.

2 结果与讨论

2.1 纳米金探针的制备及表征

标记 DNA 探针前后的纳米金的透射电子显微镜图片如图 2 所示. 图 2(A) 为未标记的纳米金颗粒, 图 2(B) 为标记有检测探针 1 的纳米金颗粒, 图 2(C) 为标记有检测探针 2 的纳米金颗粒. 可见, 标记后的纳米金粒径增大, 大小均一, 且稳定性和分散性好.

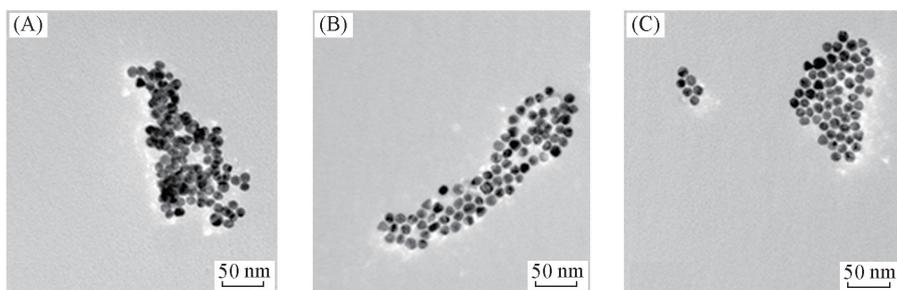


Fig. 2 TEM images of bare AuNPs(A) and AuNPs modified with detection probe 1(B) and detection probe 2(C)

由于纳米金颗粒对核酸中的碱基有很强的亲和力, 而单链 DNA 中的碱基外露, 所以单链 DNA 在纳米金表面会形成非特异性吸附. 将 DNA 探针经巯基修饰, 通过 Au—S 键自组装到纳米金表面, 能够有效减少 ssDNA 的非特异性吸附, 提高杂交效率. 纳米金探针标记前后的紫外-可见吸收光谱如图 3 所示, 未标记 DNA 探针的纳米金溶液在 520 nm 处有最大吸收波长, 而与巯基修饰的 DNA 探针结合后最大吸收峰都在 525 nm 处, 标记后纳米金的最大吸收波长比标记前红移了 5.0 nm. 由此可见, 标记

DNA 的纳米金粒径增大, 纳米金对应的最大吸收波长在紫外-可见光吸收光谱上呈现红移^[18].

2.2 HBV 靶序列的检测

2.2.1 纳米金检测探针浓度的影响 由吸光度值(OD 值)可估算出纳米金检测探针 1 和 2 的浓度均约为 13.4 nmol/L, 将 HBV 靶序列浓度固定为 1 nmol/L, 报告探针浓度固定为 100 nmol/L, 分别将纳米金检测探针 1 和 2 原液用 PBS 稀释 1, 2, 3 和 4 倍(即 6.7, 4.5, 3.4 和 2.7 nmol/L), 检测 2 种探针对检测结果的影响. 首先将纳米金检测探针 2 的浓度固定为 13.4 nmol/L, 将纳米金检测探针 1 的原液(13.4 nmol/L)按 1, 2, 3 和 4 倍梯度稀释, 分别进行杂交实验, 其检测结果的灰度值的变化趋势如图 4 曲线 *a* 所示. 检测结果表明, 信号强度在原液浓度和稀释 1 倍时变化不大, 随着探针的稀释其信号强度逐渐减弱, 为避免探针浪费且不影响检测信号强度, 选择稀释 1 倍的探针浓度(即 6.7 nmol/L)为纳米金检测探针 1 的用量.

在其它条件不变的情况下, 进一步筛选纳米金检测探针 2 的浓度. 将其原液(13.4 nmol/L)按 1, 2, 3 和 4 倍进行梯度稀释, 分别进行杂交实验, 其检测结果的灰度值的变化趋势如图 4 曲线 *b* 所示. 检测结果表明, 信号强度在其原液至稀释 2 倍时信号强度变化不大, 基本处于平台期. 随着探针 2 的稀释, 其信号强度也逐渐减弱, 由此得出当纳米金检测探针 2 的浓度为 4.5 nmol/L 时较为合适. 图 4 中 2 条曲线的变化幅度有所不同, 纳米金检测探针 1 的用量对信号强度的影响较大, 因其直接反映了 HBV 靶序列的量. 纳米金检测探针 2 在探针 1 的基础上进一步放大信号, 所以当固定探针 1 的量为 6.7 nmol/L 时, 改变探针 2 的浓度对其信号的影响相对较小. 为达到高灵敏度的检测效果并避免不必要的探针浪费, 实验选择纳米金检测探针 2 的浓度为 4.5 nmol/L.

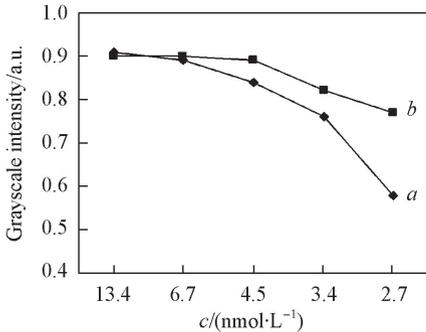


Fig. 4 Effects of concentration of AuNPs detection probes 1 (*a*) and 2 (*b*)

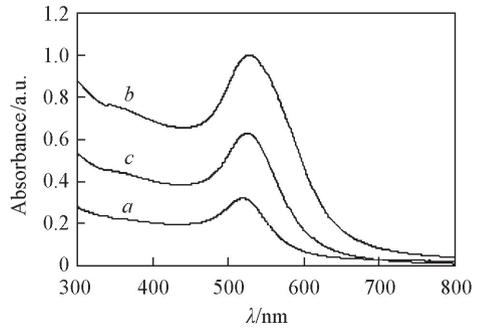


Fig. 3 UV-Vis spectra of bare AuNPs (*a*) and AuNPs modified with detection probe 1 (*b*) and detection probe 2 (*c*)

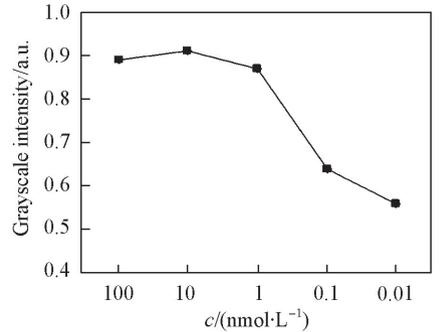


Fig. 5 Concentration optimization of reporter probe

2.2.2 报告探针用量的优化 当固定 HBV 靶序列的浓度为 1 nmol/L, 纳米金检测探针 1 和 2 的浓度分别为 6.7 nmol/L 和 4.5 nmol/L 时, 将报告探针的浓度分别稀释为 100, 10, 1, 0.1 和 0.01 nmol/L, 进行探针的杂交实验, 以筛选合适的报告探针浓度. 由图 5 可知, 检测结果的信号强度在报告探针浓度为 1 nmol/L 时基本达到平台期. 此浓度与 HBV 靶序列的浓度相对应, 当用量更大时, 未结合的报告探针被洗去, 造成浪费, 故实验选择报告探针的浓度为 1 nmol/L.

2.2.3 HBV 靶序列的灵敏度 将 HBV 靶序列从 1 nmol/L 开始进行倍比稀释, 分别对不同浓度的 HBV 靶序列进行检测. 检测结果随着靶序列浓度逐渐降低到 10 fmol/L, 杂交点显色越来越弱; 浓度在 1 fmol/L 以下时, 无明显检测结果; 1 fmol/L 的检测结果显示与空白无明显差别. 故该法可检测到 10 fmol/L HBV 靶序列. 图 6 的点阵清晰, 且不同浓度的结果差异明显, 说明了该结果的可靠性.

2.2.4 HBV 靶序列的特异性、重复性及稳定性 HBV 靶序列的检测结果如图 7 所示. 图 7(A) 中最上排为点样液, 下面 2 排为 HBV 靶序列的检测结果, 作为空白对照组的点样液无明显的黑色点阵.

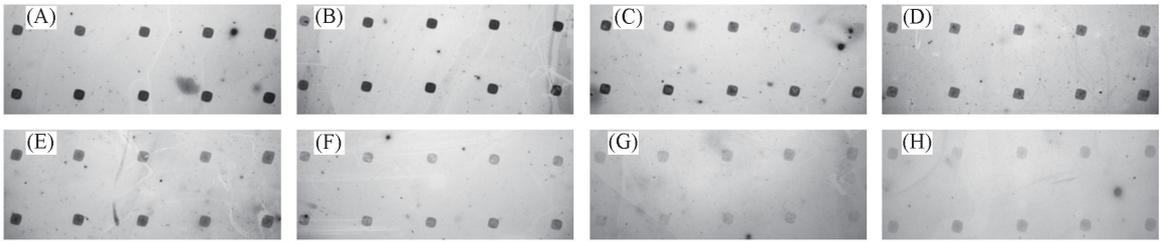


Fig. 6 Detection results of different concentrations of HBV DNA

$c(\text{HBV DNA})/(\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1})$ from (A) to (H): 1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.

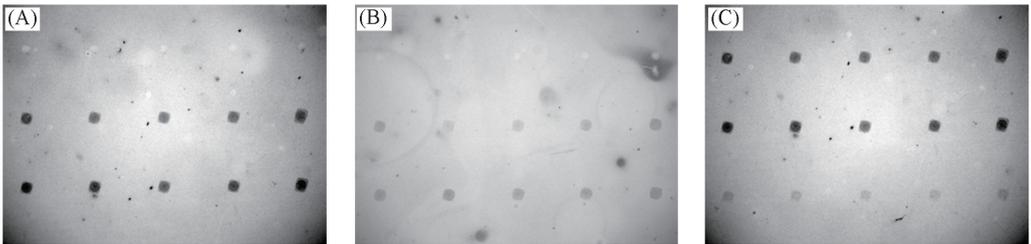


Fig. 7 Detection results about specificity of HBV DNA

(A) Blank control; (B) non-specific test; (C) specific test.

图 7(B) 中最上排为点样液, 作为空白对照组, 同样无明显的黑色点阵出现. 下面 2 排为不加 HBV 靶序列时的检测结果, 作为阴性对照组. 由于该法涉及两步纳米金探针的杂交, 故阴性对照组呈现出一定的背景信号. 但该背景信号较弱, 与 HBV 靶序列的检测信号[图 7(A) 中下面 2 排]有明显区别. 在图 7(C) 中, 上面 2 排为 HBV 靶序列的检测信号, 最下排为不相关的捕获序列, 即阴性对照探针 (Probe 3), 为特异性实验组, 该组的信号强度与背景信号没有差别, 说明在捕获探针不互补的情况下, 该序列 (Probe 3) 无明显的检测结果, 特异性较好.

重复性实验结果如图 8(A) 所示, 该曲线上的每个灰度值点均为 1 d 内 3 次独立重复实验的平均值. 稳定性实验结果如图 8(B) 所示, 该曲线上的每个灰度值点为每隔 5 d 的 3 次独立实验的平均值. 图 8 中 2 条曲线反映了检测结果的灰度值与不同浓度的 HBV 靶序列间的关系. 图 6 和图 8 反映了 HBV 靶序列的量, 在同等实验条件下点阵的亮度和灰度值随 HBV 靶序列浓度的降低而逐渐减小, 图 8 反映了二者间的线性关系. 由于人为的操作误差, 使检测结果有少许偏差, 但差别不大, 说明了该方法的可重复性和良好的稳定性.

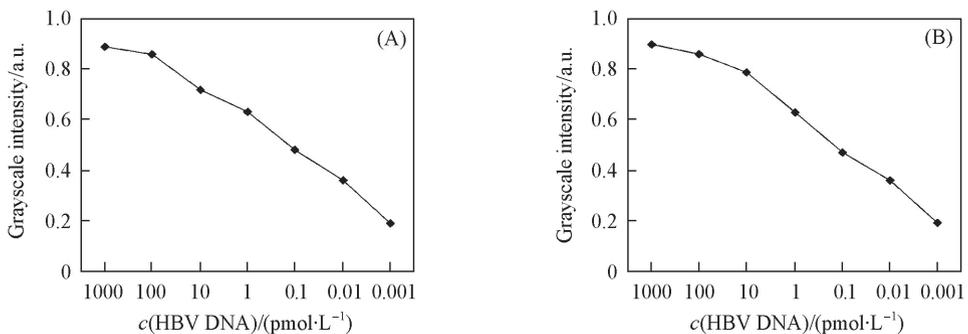


Fig. 8 Normalized grayscale intensities for different concentrations of HBV DNA

(A) Repeatability result; (B) stability result.

在芯片上利用纳米金探针和银染的方法在 DNA 检测领域已有很多应用, 但大多采用最简单的一步杂交法^[10,19]实现检测, 此方法虽简单易行, 但其灵敏度不够高. 最常用的荧光检测法的灵敏度也只能达到 1 nmol/L. 本方法利用双纳米金探针杂交, 将检测信号 2 次放大, 最终通过银染增强, 可检测最低浓度为 10 fmol/L 的目标 HBV DNA, 实现了对核酸的微量检测, 无需昂贵的检测仪器设备. 实验结果表明, 该方法准确可靠、操作过程简单、快速且成本低廉, 是一种低丰度 HBV DNA 检测的新方法.

参 考 文 献

- [1] LUO Rui-De(罗瑞德). Infection Lecture(传染病讲座)[M], Beijing: People's Hygiene Press, 2002: 120
- [2] Payan C. , Veal N. , Crescenzo C. B. , Belec L. , Pillot J. . Journal of Virological Methods[J], 1997, **65**: 299—305
- [3] Candotti D. , Temple J. , Owusu O. S. , Allain J. P. . Journal of Virological Methods[J], 2004, **118**: 39—47
- [4] Moriya T. , Kuramoto I. K. , Yoshizawa H. , Holland P. V. . Journal of Clinical Microbiology[J], 2002, **40**(3): 877—880
- [5] Aliyu S. H. , Aliyu M. H. , Salihu H. M. , Parmar S. , Jalal H. , Curran M. D. . Journal of Clinical Virology[J], 2004, **30**: 191—195
- [6] LI Mei-Zhong(李美忠), WANG Min(王敏). The Experimental and Clinical Infection Disease Magazine(中华实验和临床感染病杂志)[J], 2008, **2**(1): 7—12
- [7] White K. A. , Rosi N. L. . Nanomedicine[J], 2008, **3**(4): 543—553
- [8] Ma L. N. , Liu D. J. , Wang Z. X. . Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2010, **38**(1): 1—7
- [9] Thaxton C. S. , Georganopoulou D. G. , Mirkin C. A. . Clinica Chimica Acta[J], 2006, **363**(1/2): 120—126
- [10] Taton T. A. , Mirkin C. A. , Letsinger R. L. . Science[J], 2000, **289**(8): 1757—1760
- [11] Storhoff J. J. , Marla S. S. , Bao P. , Hagenow S. , Mehta H. , Lucas A. , Garimella V. , Patno T. , Buckingham W. , Cork W. , Muller U. R. . Biosensors and Bioelectronics[J], 2004, **19**(8): 875—883
- [12] Cao Y. C. , Jin R. C. , Mirkin C. A. . Science[J], 2002, **297**(30): 1536—1540
- [13] Xiong C. , Wu C. K. , Zhang H. , Ling L. S. . Spectrochimical Acta[J], 2011, **79**: 956—961
- [14] LIU Xi-Guang(刘锡光), QI Zi-Bai(祁自柏), XIONG Shi-Song(熊诗松). Laboratory Diagnostics of Viral Hepatitis(病毒性肝炎实验诊断学)[M], Beijing: People's Hygiene Press, 1999: 23—76
- [15] Grabar K. C. , Freeman R. G. , Hommer M. B. , Natan M. J. . Anal. Chem. [J], 1995, **67**: 735—743
- [16] Liu J. , Lu Y. . Angew. Chem. [J], 2006, **45**(1): 90—94
- [17] WANG Yi(汪毅), MAO Hong-Ju(毛红菊), ZANG Guo-Qing(藏国庆). Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2010, **38**(8): 1133—1138
- [18] Yan J. L. , Estevez M. C. , Smith J. E. , Wang K. M. , He X. X. , Wang L. , Tan W. H. . Nanotoday[J], 2007, **2**(3): 44—50
- [19] LI Wei(李玮), PANG Dai-Wen(庞代文). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2003, **24**(12): 2186—2188

Detection of Hepatitis B Virus DNA Hybridization Based on Dual Gold Nano-probes

XING Ya-Si^{1,2}, ZOU Neng-Li¹, MAO Hong-Ju^{1*}, XU Xia², GE Yu-Qing¹,
JIN Qing-Hui¹, ZHAO Jian-Long¹

(1. State Key Laboratories of Transducer Technology, Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology,
Chinese Academy of Science, Shanghai 200050, China;

2. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract A novel Hepatitis B virus (HBV) DNA detection method based on dual gold nano-probes and gene chip was developed. Two types of probes including capture probe and reporter probe were designed according to conservative HBV DNA. A pair of complementary gold nanoparticles probes was used to amplify the signal of HBV DNA and visualized by silver staining on gene chip. The optimized detection limit of this method was 10 fmol/L, and the entire test could be completed in 1.5 h. This strategy could be potentially used for HBV DNA detection due to its rapid, high-sensitivity and low-cost properties.

Keywords Dual gold nano-probes; Hybridization; Gene chip; Silver staining; Hepatitis B virus (HBV) DNA

(Ed. : I, K)