

Supporting Information

for Adv. Sci., DOI 10.1002/advs.202306088

Peptide Nucleic Acid Clamp-Assisted Photothermal Multiplexed Digital PCR for Identifying SARS-CoV-2 Variants of Concern

Lexiang Zhang, Rokshana Parvin, Siyue Lin, Mingshuo Chen, Ruixuan Zheng, Qihui Fan* and Fangfu Ye*

Supplementary Information for

Peptide Nucleic Acid Clamp-assisted Photothermal Multiplexed Digital PCR for Identifying SARS-CoV-2 Variants of Concern

Lexiang Zhang, Rokshana Parvin, Siyue Lin, Mingshuo Chen, Ruixuan Zheng, Qihui Fan*, Fangfu Ye*

Corresponding author: Qihui Fan, Fangfu Ye

Email: fanqh@iphy.ac.cn; fye@iphy.ac.cn

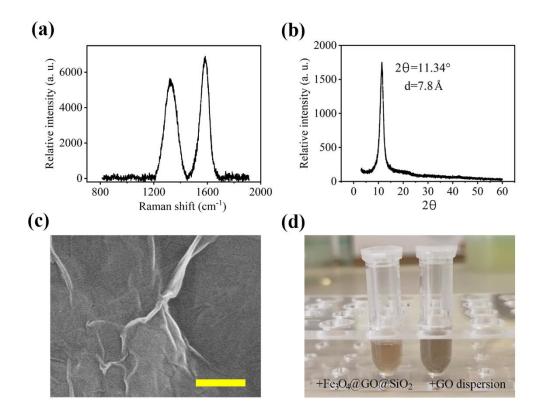


Figure S1. Morphology and physicochemical characteristic of GO nanosheets. (a) Raman spectra of graphene oxides showing characteristic peaks centered at ~1350 and 1585 cm⁻¹ respectively. (b) XRD analysis. (c) SEM image. (d) Photograph of the dispersion of GO nanosheet and Fe₃O₄@GO@SiO₂ in 10 % gelatin samples, respectively, after a few rounds of heating to 95 °C. Scale bar, 250nm in (c).

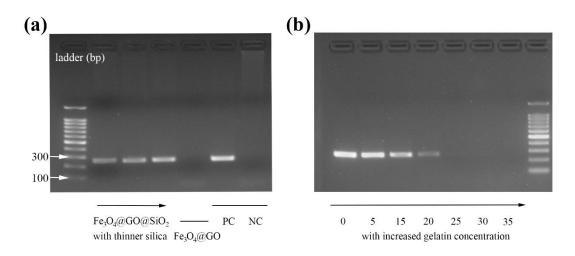


Figure S2. Electrophoresis gel images showing biocompatibility of nanocompositedoped gelatin substrate for PCR. PC and NC columns represent positive and negative controls without nanomaterial addition. PCR efficiency as functions of (a) silica shell thickness and (b) gelatin concentration.

	diameter	polydispersity index	standard deviation
Fe ₃ O ₄ @GO	335	0.213	146.6
E. O. @CO@SiO	1313	0.335	365.3
$Fe_3O_4@GO@SiO_2$	1235	0.542	236.5
(with four different	940	0.322	312.7
silica thickness)	742	0.314	246.9

Table S1. Size distributions with the polydispersity indexes and standard deviations

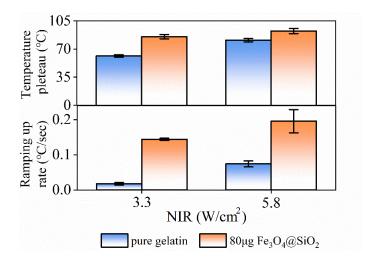


Figure S3. Temperature climbing evaluation of 50 μ L gelatin samples with and without Fe₃O₄@SiO₂ NPs addition. Error bar, mean \pm s.e.m. (n= 3).

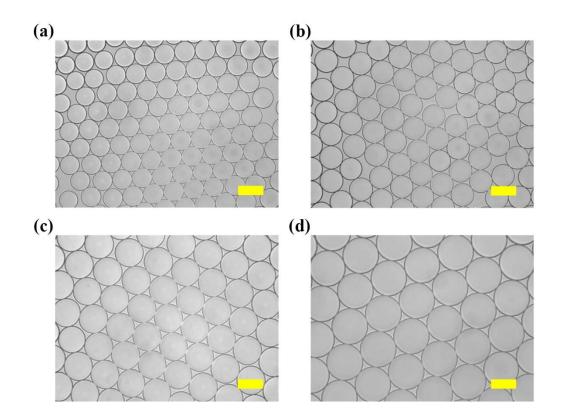


Figure S4. Uniformity of produced microcarriers with average diameter of 83, 95, 116, and 126 μ m, respectively. Scale bar, 100 μ m.

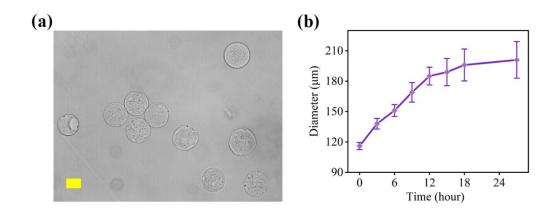


Figure S5. Characterization of microcarriers' swelling behavior. (a) Microcarriers with a diameter of 116 μ m exhibited a homogeneous size and swelled by 72% over a period of 27 hours. (b) Swelling curves in aqueous solution plotted as a function of time. Scale bar, 100 μ m. Error bars, mean \pm s.e.m. (n=3).

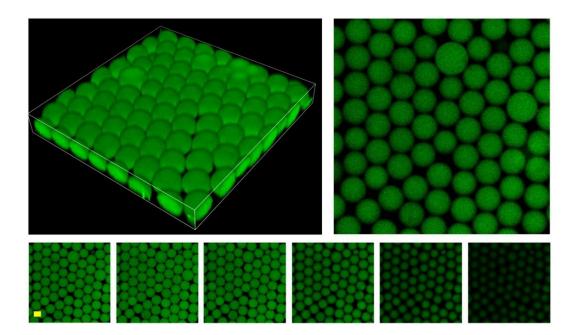


Figure S6. A broad field of fluorescence confocal view including a few dozens of microcarriers containing FITC-labelled nanocomposite and a series of slices acquired using the same z-scanning step. Scale bar, $100 \mu m$.

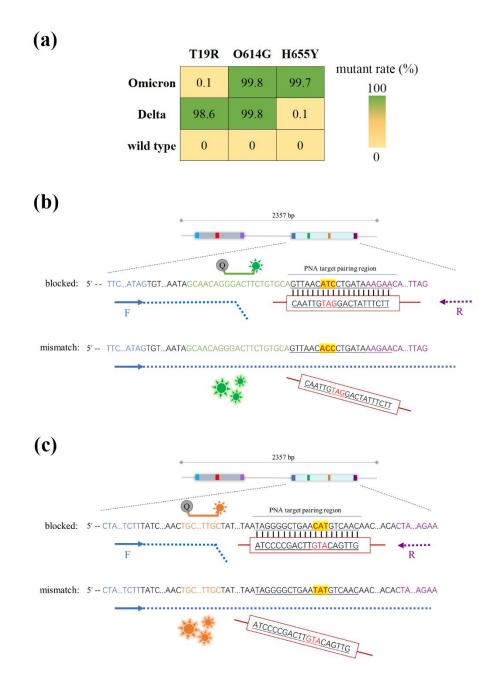


Figure S7. (a) Highly conserved SNP signatures used for distinguishing variants of interest based on official reported lineage comparisons. (<u>https://outbreak.info/</u>) Schematic of detecting (b) O614G and (c) H655Y mutations within SARS-CoV-2 spike protein gene. Strategy of designing PNA to selective block wild-type sequence and allow fluorescence signal only derive from targeted mutations. The sequences and positions of the targeted codons, PNA probes, primers, and TaqMan probes are indicated.

Name	Sequences (starting from 5')
PNA-614	TTCTTTATCAGGATGTTAAC
PNA-19	TTAATCTTACAACCAGAACT
PNA-655	AGTTGTTGACATGTTCAGCC
19-forward primer	GCCACTAGTCTCTAGTCAG
19-reverse primer	GGTAAGAACAAGTCCTGAG
19-TaqMan (Cy5)	CACACGTGGTGTTTATTACCCTGAC
614-forward primer	CTAACCAGGTTGCTGTTCTT
614-reverse primer	TTCTGCACCAAGTGACATAG
614-TaqMan (FAM)	TGCACAGAAGTCCCTGTTGC
655-forward primer	CTAACCAGGTTGCTGTTCTT
655-reverse primer	TTCTGCACCAAGTGACATAG
655-TaqMan (Cy3)	TGCACAGAAGTCCCTGTTGC
PNA-19-v2	TGTGTTAATCTTACAACCAG
PNA-19-v3	GTTCTGGTTGTAAGATTAAC
PNA-19-v4	TGAGTTCTGGTTGTAAGATT
PNA-655-v2	GTTGACATGTTCAGCCCCTA
PNA-655-v3	CTGAACATGTCAACAACTCA
PNA-19-fv	TTCTGGTTGTAAGATTAA
PNA-655-fv	TGTTGACATGTTCAGCC

Table S2. Sequencing of designed PNA clamps, primers and TaqMan probes. 19-2stands for the second design version targeting at codon 19 of the spike protein gene.

* v2 and fv represent version 2 of the other available designs and failed version, respectively.

fluorescent	mutant		Cy5			FAM			Cy3	
channel	template %	0.05	0.5	1	0.05	0.5	1	0.05	0.5	1
	0.05		***	***	ns	***	***	ns	***	***
Cy5	0.5			***	***	ns	***	***	ns	***
	1				***	***	ns	***	***	ns
	0.05					***	***	ns	***	***
FAM	0.5						***	***	ns	***
	1							***	***	ns
	0.05								***	***
Cy3	0.5									***
	1									

Table S3. Significance analysis of different groups in Figures 5b, where "ns" represents not significant.

Table S4. Back-to-back comparison with the bulk qPCR approach based on the assaypriming codon 19.

DNA template	Bulk qPC	CR (Ct)	dPCR (bright drop %			
input (×10 ⁴ copy)	average	SD.	average	SD.		
19.4	23.8	1.7	93.0	1.7		
11.6	25.5	1.6	81.7	1.2		
5.5	26.8	0.8	58.7	3.1		
0.6	30.8	1.2	12.7	1.5		
0 (blank)	32.7	1.0	0.2	0.1		

* DNA template inputs were deduced from bright drop percentage in dPCR assay.

* The LoD of bulk qPCR was around 5×10^4 copy, beyond which the Cq was indistinguishable from the blank control.

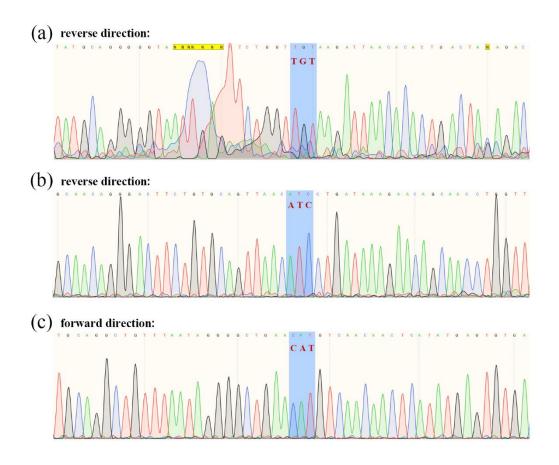


Figure S8. Sanger sequencing analysis of the NIR-responsive dPCR products harboring the wild type reads at codon (a) 19, (b) 614 and (c) 655.

Table S5. Synthetic plasmid containing the sequence of spike protein gene.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
	GACGGCCAGTGAATT	CGAGCTOGG	INCOTOGOGAI	ATGCATCTAG	ATATGTTTGT	PTTTCTTGTT	TTATTGCCAC	PAGTCTCTAG	ICAGTGTGTT.	AATCTTACAM	CAGAA
⊒	GACGGCCAGTGAATI	CGAGCTOGG	TACCTCGCGAJ	ATGCATCTAG			TTATTGCCAC TTATTGCCAC				
_	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
	CTCAATTACCCCCTC	CATACACTA	ATTCTTTCAC ³	CGTGGTGTT	TATTACCCTG	CAAAGPTTT	CAGATCCTCA	GTTTTACATT	CAACTCAGGA	CTTGTTCTTM	CTITC
	CTCAATTACCCCCTC CTCAATTACCCCCTC										
	230	240	250				290				330
_	TPPTCCAATGTTACT	TOOTTCCAT	SCTATACATO7	ICTCT003A0	CAATGGTACT	AGAOGPTTG	ATAACCCTOP	CCTACCATPT	AATGATGCTO	PTTATTTTGC	TOCAC
⊒	TPPTCCAATGPTACT TPPTCCAATGPTACT										
	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
	TGAGAAGTCTAACAT	MATAAGAGO	CTOGATTTTTC	GTACTACTT	TAGATTCGAA	SACCCAGTCC	CTACTTATTG	TTAATAACGC	TACTAATGTT	TTATTAAAG	ICTG7G
Ξ	TGAGAAGTCTAACAI TGAGAAGTCTAACAI										
_	450 AATTICAATTITIGTA	460 ATGATCCAT	470	480 PTATTACCAC	490 лаласалса	500 MAGTTOGAT	510 Одаластоло	520 TTCAGAGTPT	530	540	550
	AATTTCAATTTTGTA AATTTCAATTTTGTA										
_	560 GAATATOTCTCTCA	570 CCTTTTCTT			600			630		650	660
Ξ	GANTATOTCTCTCAC GANTATOTCTCTCAC					AAAAATCTTA		GTTTAAGAAT	TIGATGOTT	ATTTAAAAT/	TATTC
	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770
-	TAAGCACACGCCTAT	TAATTTACT					GTAGATTTOC		TAACATCACT	COTTICAAN	TTTAC
Ξ	TAAGCACACGCCTAT TAAGCACACGCCTAT TAAGCACACGCCTAT	TAATTTAGT	SCOTGATCTCC	CTCAOGGTT	TTTCGGCTTT	GAACCATTG		CAATAOGTAT	TAACATCACT	REGTTTCARA	
_	780	790 GTTATTIGA					840				880
⊒	ТТОСТТТАСАТАБАЛ ТТОСТТТАСАТАБАЛ	GTIATIGA	CTCCTGGTGAI	PTCTTCTTCA	GGTTGGACAG	TGTGCTGC	AGCTTATTAT	GIGGGTTATC	PTCAACC7AG	SACTIFICTA	TAAAT

	TATAATGAAAATOG	ACCATTACA	GATGCTGTAG	ACTOTOCACT	TGACCETCTC	тсадааасаа	AGTGTACGTT	GAAATCCTTC	ACTOTAGAAA	AAGGAATCTA	тсааа
	TATAATGAAAATGG TATAATGAAAATGG										
	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	11
	TTCTAACTTTAGAG	ICCAACCAAC	AGAATCTATT	GEINGATTIC	CTANTATTAC	AAACTTGTGC	CCTTTTOGTG	ANGT TTT IAN	CGCCACCAGA	TTTGCATCTO	TTTAT
	TTCTAACITTAGAG TTCTAACITTAGAG										
	1110										
_	CTTOGAACAOGAAG										
	CTTGGAACAGGAAG										
	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	13
	GATCTOTOCTETAC	TANTOTOTAT	CADATTCAT	TTOTAATTAG	ACCTCATCAL	GTCAGACAAA	TOOCTOCAGO	OCAAACTOGA	AAGATTOCTO	ATTATAATTA	TAAAT
-	GATCTCTGCTFTAC		AT	TTGTAATTAG	AGGTGATGAA	GTCAGACAAA	TEGETECAGE	GCAAACTOGA	AAGATTOCTO	ATTATAATTA	TAAA
-	1330	1340	AT 1350	1360	AGGTGATGAA 1370	GTCAGACAAA 1380	TCGCTCCAGG 1390	GCAAACTOGA 1400	AAGAPTGCTG 1410	1420	14 14
-	1330 ACCAGATGATTETA ACCAGATGATTETA ACCAGATGATTETA	1340 NOOCTOCOT 2AGOCTOCOT	AT 1350 LINTACTICA TATACTICA TATACTICA	ТТСТААТТАС 1360 1360 АЛТТСТАЛСА АЛТТСТАЛСА АА	аодтсатсаа 1370 лтеттолтте лтеттолтте	GTCAGACAAA 1380 ГАЛООТТООТ ТАЛООТТООТ	1390 1390 0077ATTATA 0077ATTATA	ССАЛАСТОСА 1400 1400 АТТАССТОТА АТТАССТОТА	AAGATTGCTG 1410 TAGATTGTTI TAGATTGTTI	аттатаатта 1420 маалатета лаалатета	TAAAT 14 ATCTC
-	1330 ACCAGATGATTFTM	1340 NOOCTOCOT 2AGOCTOCOT	AT 1350 LINTACTICA TATACTICA TATACTICA	ТТСТААТТАС 1360 1360 АЛТТСТАЛСА АЛТТСТАЛСА АА	аодтсатсаа 1370 лтеттолтте лтеттолтте	GTCAGACAAA 1380 ГАЛООТТООТ ТАЛООТТООТ	1390 1390 0077ATTATA 0077ATTATA	ССАЛАСТОСА 1400 1400 АТТАССТОТА АТТАССТОТА	AAGATTGCTG 1410 TAGATTGTTI TAGATTGTTI	аттатаатта 1420 маалатета лаалатета	TAAAT 14 ATCTC ATCTC ATCTC
-	1330 АССАВАТБАТТТИ АССАВАТБАТТТИ АССАВАТБАТТТИ АССАВАТБАТТТИ 1440	1340 2A00CTOCOT 2A00CTOCOT 2A00CTOCOT 2A00CTOCOT 2A00CTOCOT 2A00CTOCOT 2A00CTOCOT	AT 1350 TATAOCTION TATAOCTION TATAOCTION TATAOCTION 1460	ТТСТААТТАС 1360 1361 АЛТТСТААСА АЛТТСТААСА АЛТТСТААСА 1470	АООТСАТСАА 1370 АТСТТОЛТТС АТСТТОЛТТС АТСТТОЛТТС 1480	GTCAGACAAA 1380 17AAGOTTGOT TAAGOTTGOT TAAGOTTGOT 1490 1	1390 1390 0074ATTATA 0074ATTATA 0074ATTATA 0074ATTATA	GCAAACTOGA 1400 1400 АРТАССТОТА АРТАССТОТА АРТАССТОТА 1510 1	AAGATTGCTG 1410 TAGATTGTTT TAGATTGTTT TAGATTGTTT 1520	аттатаатта 1420 маалатетя жаалатетя жаалатетя 1530	ATCTC ATCTC ATCTC ATCTC ATCTC
	1330 Ассалияттта ассалиятта Ассалиятта Ассалиятта Ассалиятта Ассалиятта Ассалиятта Ассалията Ассалита Ас	1340 2000CTOCOT 2000CTOCOT 2000CTOCOT 2000CTOCOT 2000CTOCOT 1450 3474TTTCAM	AT 1350 INTROCTION INTROCTION INTROCTION INTROCTION 1460 CIGARATCIN CIGARATCIN	ТТОТААТТАО 1360 АЛТТСТААСА АЛТТСТААСА АЛТТСТААСА 1470 10.00000007 ГСАОЗССООТ	AGGTGATGAA 1370 ATCTTGATTC ATCTTGATTC ATCTTGATTC 1480 AGCACACCTT AGCACACCTT	GTCAGACAAA 1380 TAAOOTTOOT TAAGOTTOOT TAAGOTTOOT 1490 L	ТСОСТССАОЗ 1390 ОСТААТТАТА ОСТААТТАТА ОСТААТТАТА ССТААТТАТА 1500 ТСААСОТРТІ ТСААСОТРТІ	GCAAACTOGA 1400 ATTACCTOTA ATTACCTOTA ATTACCTOTA 1510 AATTOTACT AATTOTACT	AAGAPTIGUTG 1410 TAGAPTIGPTI TAGAPTIGPTI 1520 TTCCTTTAGA TTCCTTTAGA	АТТАТААТТА 1420 1420 1420 1420 1420 1420 1420 1530 1530 1530 1530 1530	TRAAN 14 ATCTO ATCTO ATCTO 15 LLLL TTOCA
	1330 Ассадатдаттта ассадатдаттта ассадатдаттта ассадатдатта 1440 Ассстатададад Ассстатададад Ассстатададад	1340 MOGCTOCOT ANGCTOCOT 2A00CTOCOT 1450 IATATITCAN IATATITCAN	AT 1350 INTROCTION TATROCTION TATROCTION TATROCTION 1460 LIGAAATCTW CIGAAATCTW CIGAAATCTW CIGAAATCTW	1360 1360 АЛТТСТААСА АЛТТСТААСА АЛТТСТААСА 1470 1470 1470 1470 1470 1470 1470	AGGTGATGAA 1370 ATCTIGATIC ATCTIGATIC ATCTIGATIC 1480 1480 AGCACACCTI AGCACACCTI AGCACACCTI	GTCAGACAAA 1380 TAAGGTTGGT TAAGGTTGGT TAAGGTTGGT 1490 L	теостеского 1390 сотлаттата сотлаттата сотлаттата сотлаттата сотлаттата тамооттта тамооттта тамооттта тамооттта	GCAAACTOGA 1400 ATTACCTOTA ATTACCTOTA ATTACCTOTA 1510 	AAGAPTIGUTG 1410 TAGAPTIGPTI TAGAPTIGPTI 1520 TTCCTTTAGA TTCCTTTAGA	аттатаатта 1420 1420 лодалотета лода лодалотета лодалотета лодалотета лодалотета лодалотета лода	TRAAN 14 ATCTO ATCTO ATCTO TTOCA TTOCA
	1330 Ассалияттта ассалиятта Ассалиятта Ассалиятта Ассалиятта Ассалиятта Ассалиятта Ассалията Ассалита Ас	1340 2000CT0CGT 2000CT0CGT 2000CT0CGT 1450 3074TTTCAM 3074TTTCAM 31560	AT 1350 INTROCTION INTROCTION INTROCTION INTROCTION I 460 I 460 I 460 I 460 I 570 I 570	ТТОТААТТАС 1360 ААТТСТААСА ААТТСТААСА ААТТСТААСА 1470 ТСАОЗССООТ ТСАОЗССООТ 1580	AGGTGATGAA 1370 ATCTTGATTC ATCTTGATTC ATCTTGATTC 1480 AGGACACCCT AGGACACCCT AGGACACCCT 1590	GTCAGACAAA 1380 TAAOOTTOOT TAAOOTTOOT TAAOOTTOOT 1490 GTAATGGTOT GTAATGGTOT GTAATGGTGT GTAATGGTGT 1600	теостеслова 1390 сотлаттата оотлатота оотлатота оотлатота оотлатота оотлатота оотлатота оотлатота оотлатота оотлатота оотла	GCAAACTOGA 1400 ATTACCTGTA ATTACCTGTA ATTACCTGTA 1510 AATTGOTACT AATTGOTACT 1620	AAGATTOCTO 1410 TAGATTOPTI TAGATTOPTI TAGATTOPTI 1520 TTCCTTTACA TTCCTTTACA TTCCTTTACA 1630	ATTATAATTA 1420 1400	TRAAT
=	1.330 Ассидаталтетти Ассмаяталитети Ассмаяталтети Ассидаталители Ассидатали Ассидаталители Ассидаталители Ассидаталители Ассидатали Ассида А	1340 2000CT0CCT 2000CT0CCT 2000CT0CCT 2000CT0CCT 1450 3ATATTTCAN 3ATATTTCAN 3ATATTTCAN 1560 100TTACCAN 100TTACCAN	AT 1350 TATAOCTOG TATAOCTOG TATAOCTOG 1460 CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN	1360 1360 ААТТСТААСА ААТТСТААСА ААТТСТААСА ААТТСТААСА 1470 ГСАОЗССОЗТ ГСАОЗССОЗ ГСАОЗССОЗ ГСАОЗССОЗТ ГСАОЗССОЗ ГСАОЗССОЗ ГСАОЗССОЗ ГСАОЗССОЗСО ГСАОЗССОЗТ	AGGTGATGAA 1370 ATCTTGATTG ATCTTGATTG ATCTTGATTG 1480 AGGACACCTT 1590 TTCTTTTGAA TTCTTTTGAA	TRAGACAAA 1380 TRAGGTIGGT TRAGGTIGGT TRAGGTIGGT 1490 GTAATGGTIGT GTAATGGTIGT GTAATGGTIGT GTAATGGTIGT CTICTACATG CTICTACATG	TOOCTCCAGG 1390 GOTAATTATA GOTAATTATA GOTAATTATA 1500 TGAAGOTTTT TGAAGOTTTT 1610 CACCAGCAAC CACCAGCAAC	300AAACTGGA 1400 ATTACCTGTA ATTACCTGTA ATTACCTGTA 1510 AACTGTFACT AACTGTFACT 1620 TGTFTGTGGA TGTFTGTGGA	AAGATTOCTC 1410 1410 1400 1400 1400 1400 1400 1400 1400 1520 1520 1520 1520 1520 1520 1630 0 1630 1630	АТТАТААТТА 1420 1420 1420 1420 1420 1420 1420 1530 леслитер леслитер 1640 стастаатте стастаатте	TRAAT ATCTO ATCTO ATCTO ATCTO TTOCA TTOCA TTOCA 14 14 14 14 15 14 14 15 14 15 14 15 15 16 16 16 16 16 16 16 16 16 16
=	1.330 Асслананалантеты Асслананантеты Асслананантеты Асслананантеты Ассланананан Асститиалам Асститиалам Асститиалам Асститиалам Сосасталар	1340 2000CT0CCT 2000CT0CCT 2000CT0CCT 2000CT0CCT 1450 3ATATTTCAN 3ATATTTCAN 3ATATTTCAN 1560 100TTACCAN 100TTACCAN	AT 1350 TATAOCTOG TATAOCTOG TATAOCTOG 1460 CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN CTGAAATCEN	1360 1360 ААТТСТААСА ААТТСТААСА ААТТСТААСА ААТТСТААСА 1470 ГСАОЗССОЗТ ГСАОЗССОЗ ГСАОЗССОЗ ГСАОЗССОЗТ ГСАОЗССОЗ ГСАОЗССОЗ ГСАОЗССОЗ ГСАОЗССОЗСО ГСАОЗССОЗТ	AGGTGATGAA 1370 ATCTTGATTG ATCTTGATTG ATCTTGATTG 1480 AGGACACCTT 1590 TTCTTTTGAA TTCTTTTGAA	TRAGACAAA 1380 TRAGGTIGGT TRAGGTIGGT TRAGGTIGGT 1490 GTAATGGTIGT GTAATGGTIGT GTAATGGTIGT GTAATGGTIGT CTICTACATG CTICTACATG	TOOCTCCAGG 1390 GOTAATTATA GOTAATTATA GOTAATTATA 1500 TGAAGOTTTT TGAAGOTTTT 1610 CACCAGCAAC CACCAGCAAC	300AAACTGGA 1400 ATTACCTGTA ATTACCTGTA ATTACCTGTA 1510 AACTGTFACT AACTGTFACT 1620 TGTFTGTGGA TGTFTGTGGA	AAGATTOCTO 1410 TAGATTOTTI TAGATTOTTI 1520 TTOCTTIXCA TTOCTTIXCA 1630 CCTAAAAGT	АТТАТААТТА 1420 1420 1420 1420 1420 1420 1420 1530 леслитер леслитер 1640 стастаатте стастаатте	TAAAT 14 ATCTC ATCTC ATCTC ATCTC TTCCA TTCCA 16 16 1007TA 007TA

 1770
 1780
 1790
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 1890
 <td

толасторализация стоского алекторатализация со состату с состату с состату с состату с состату с состату с сост толасторализация с состату с сос

AAOTOTA