



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103335984 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 28

(21) 申请号 201310231620. 1

US 2010/0164489 A1, 2010. 07. 01, 全文.

(22) 申请日 2013. 06. 09

US 2011/0009282 A1, 2011. 01. 13, 全文.

(73) 专利权人 清华大学

吴星怡等. 表面等离子体共振传感器在癌症早期诊断中的应用. 《化学学报》. 2013, 第 71 卷 (第 3 期), 期刊第 299-301 页.

地址 100084 北京市海淀区北京市 100084
信箱 82 分箱清华大学专利办公室

审查员 孙晓明

(72) 发明人 杜亚楠 谢丽萍 鄢晓君

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

G01N 21/55(2014. 01)

(56) 对比文件

CN 102175649 A, 2011. 09. 07, 全文.

CN 102180438 A, 2011. 09. 14, 全文.

CN 102648291 A, 2012. 08. 22, 全文.

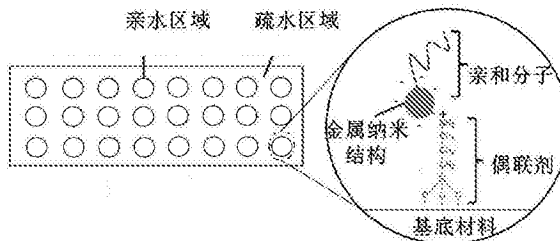
权利要求书2页 说明书9页
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

一种基于 LSPR 的无实体壁微阵列芯片及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种基于 LSPR 的无实体壁微阵列芯片及其应用。所述芯片的片基为亲疏水模式片基,包括基底和设于所述基底上的若干亲水区域及将所述亲水区域隔开的疏水区域,所述亲水区域表面为具有局域表面等离子共振属性的金属纳米材料层;所述亲水区域的外部区域无实体壁;所述疏水区域表面为疏水材料层。在本发明所提供的片基上结合检测待测物质的特异亲和分子,即得到本发明的芯片。本发明所提供的芯片具有使用简单方便、检测成本低、结果准确、可重复使用等优点,可以检测包括小分子、重金属离子、蛋白、细菌、病毒等多种物质,在医疗卫生、环境监测、科学实验等领域将有广阔的应用前景。



1. 一种基于 LSPR 的微阵列芯片专用的亲疏水模式片基,包括基底和设于所述基底上的若干亲水区域及将所述亲水区域隔开的疏水区域,其特征在于:所述亲水区域是在所述基底上通过偶联剂连接具有局域表面等离子共振属性的金属纳米材料;所述疏水区域是在所述基底上连接疏水材料;所述亲水区域的外部区域无实体壁。

2. 根据权利要求 1 所述的片基,其特征在于:

所述基底为玻璃,所述偶联剂为氨丙基三乙氧基硅烷,所述氨丙基三乙氧基硅烷通过硅氧端与所述玻璃中的硅通过共价键结合;所述金属纳米材料与所述氨丙基三乙氧基硅烷的铵根离子通过静电相结合;

所述疏水材料为十八烷基三氯硅烷,所述十八烷基三氯硅烷通过硅氧端与所述玻璃中的硅通过共价键结合;

和/或,所述金属为金;

和/或,所述片基为长方形,其宽为 76mm、长为 26mm;每个所述亲水区域呈直径为 7mm 的圆形;每个所述片基上共设所述亲水区域 24 个,呈 8×3 阵列均匀分布,相邻两个所述亲水区域的圆心距为 9mm。

3. 权利要求 1 或 2 所述基于 LSPR 的微阵列芯片专用的亲疏水模式片基的制备方法,包括如下步骤:将在所述疏水区域连接了所述疏水材料的所述基底浸泡于偶联剂溶液中,获得在所述亲水区域连接了所述偶联剂的、在所述疏水区域连接了所述疏水材料的基底;然后,再将该基底浸泡于含具有局域表面等离子共振属性的金属纳米颗粒的溶液中,获得所述基于 LSPR 的微阵列芯片专用的亲疏水模式片基。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于:

在两次所述浸泡间,还包括将所述基底用水洗后于 120℃加热 3 小时的步骤;

所述基底为玻璃、所述疏水材料为十八烷基三氯硅烷,

所述疏水区域连接了所述疏水材料的所述基底是按照包括如下步骤的方法制备得到:制备设有若干通孔的聚二甲硅氧烷平板,在所述平板一侧面的通孔外区域涂体积百分含量为 1% 的十八烷基三氯硅烷的正己烷溶液,再将该侧面扣压于玻璃基底上,去除所述平板,将所述基底晾干;进一步地,在将所述基底晾干后,还可包括将所述基底用 75% 乙醇擦拭后于 60℃加热 30 分钟的步骤;

所述基底为玻璃、所述偶联剂为氨丙基三乙氧基硅烷,所述偶联剂溶液的浓度为 100g/L,所述浸泡于所述偶联剂溶液中的时间为 15 分钟;所述浸泡于含具有局域表面等离子共振属性的金属纳米颗粒的溶液中的时间为至少 18 小时。

5. 权利要求 1 或 2 所述片基在制备基于 LSPR 的微阵列芯片中的应用。

6. 一种基于 LSPR 的微阵列芯片,为如下 1) 或 2) 的芯片:

1) 是在权利要求 1 或 2 所述片基亲水区域的所述金属纳米颗粒上连接特异检测待测物质的亲和分子,获得所述微阵列芯片;

2) 是在权利要求 1 或 2 所述片基亲水区域的所述金属纳米颗粒上连接特异检测待测物质的亲和分子和抗非特异性吸附分子,获得所述微阵列芯片。

7. 根据权利要求 6 所述的微阵列芯片,其特征在于:所述亲和分子为单链核酸分子 A,在 1) 或 2) 所述微阵列芯片的所述亲和分子上通过碱基互补配对的方式连接表面通过巯基修饰了单链核酸分子 B 的具有局域表面等离子共振属性的金属纳米颗粒;该金属纳米颗粒

中的金属为金。

8. 根据权利要求 7 所述的微阵列芯片,其特征在于:

所述待测物质为腺嘌呤核苷三磷酸,所述单链核酸分子 A 的核苷酸序列为序列表序列 1 所示序列,所述单链核酸分子 B 的核苷酸序列为序列表序列 2 所示序列;

或,所述待测物质为血管内皮生长因子,所述单链核酸分子 A 的核苷酸序列为序列表序列 3 所示序列;

或,所述待测物质为沙门氏菌,所述单链核酸分子 A 的核苷酸序列为序列表序列 4 所示序列。

9. 权利要求 6-8 任一所述微阵列芯片在检测核苷三磷酸分子、蛋白质或细菌中的应用;所述应用为非疾病治疗诊断方法。

10. 根据权利要求 9 所述的应用,其特征在于:所述检测包括如下步骤:将待测物质加入权利要求 6-8 任一所述微阵列芯片的所述亲水区域,检测所述加入后和所述加入前的所述亲水区域在波长为 540nm 光下的吸收强度的差值。

一种基于 LSPR 的无实体壁微阵列芯片及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于 LSPR 的无实体壁微阵列芯片及其应用。

背景技术

[0002] 贵金属纳米材料由于其独特的光学性质,被广泛应用于传感、热疗、成像等领域。局域表面等离子体共振(LSPR)是贵金属纳米结构的重要光学属性,当某频率的光入射到纳米粒子表面,光与纳米粒子表面自由电子耦合产生共振,这种共振宏观上表现为光谱选择性吸收,该共振模式对金属纳米结构周围区域介质折射率的变化非常敏感。基于 LSPR 纳米传感器已被证明是一种可用于定量检测生物标志物或是化学物质的有效平台。LSPR 借助纳米材料的新特性,不仅拥有高灵敏度、高选择性、实时测量、无标记、测试样品体积小等特点,同时借助于单粒子散射光谱测量,可达到传统 SPR 无法达到的分辨,且设备简单,开发成本低。

[0003] 临床应用中,多种生物标记物同时检测可以为疾病提供更精确的诊断信息,同时完成多个样品的检测分析或是同时检测同一样品中不同物质对高通量传感器提出了迫切的需求。LSPR 传感方法可以用来检测生物标志物或是金属离子等,但受检测方法限制检测通量通常较低。不同长径比的金纳米棒具有不同的等离子共振吸收峰,研究人员将不同长径比金纳米棒材料表面修饰不同目标分析物的特异性分子,同时检测多种蛋白(Yu, C. et al. *Analytical Chemistry*2006)或是细菌(Wang, C. et al. *Small*2008)。Huang 等采用同一长径比的金纳米棒检测到了溶液中的不同种类的金属离子,检测下限可以达到 10-10M (Huang, H. et al. *Analytical Chemistry*2013)。这些多通量检测方法局限于溶液状态,当检测复杂成分的待检测样品时,这种检测方式容易产生误判信号,因为纳米粒子在溶液状态下,容易受其他物质影响而产生团聚。Endo 等通过硅纳米球自组装形成的微纳米结构并结合金喷涂技术 (Endo, T., et al. *Analytical Chemistry*, 2006.), 获得了具有纳米微结构的金基底芯片,利用点样仪可以实现高通量检测。他们进一步对这项技术进行了改进,由于金价格相对昂贵,铜被用来替换上层的金涂层 (Kim, D., et al., *Analytical Chemistry*2011), 可以检测临床或是细菌样品中的 DNA 达到 10fM。这种芯片加样时需要使用微量移液设备(如单 / 多通道移液枪或者自动化加样设备),且这种形式的芯片需要反射式的自制光谱仪检测输出信号。有些研究采用分隔池的形式分成不同的检测区域,每个检测池可以检测出一种物质,如采用带孔的聚二甲基硅氧烷(PDMS)模板,将特异性分子修饰后的金膜分隔为不同的区域,用于多通量检测(Lin, C. et al. *Biosensors and Bioelectronics*2008)。类似的,Shin 等利用氨基硅烷将镀金层吸附到玻璃表面,通过退火形成金岛(Shin, Y. et al. *Biosensors and Bioelectronics*2007),采用光敏感剂 SU-8,在光掩模的辅助下,形成了一系列反应池。反应池起到了反应隔离的作用,在一定程度上实现了多通量测试,但由于池壁的影响,无法避免非特异性的吸附,给洗涤过程带来一定的困难。Zhang 等通过改装正常的光谱仪测试单元,制造了具有五通道的金岛微流道检测芯片(Zhang, Y. et al. *Lab on a Chip*2012),利用 PDMS 形成分隔的微流道,由于 PDMS 的透光性

的影响,测量吸收谱时需要将 PDMS 揭下测量,操作过程繁杂。

[0004] 基于单粒子的等离子检测使超灵敏、高空间分辨率 LSPR 检测成为可能。Chilkoti 等成功的利用单个纳米金棒检测链霉素,其检测下限可以达到 1nM (Nusz, G. J. et al. Analytical Chemistry 2008)。采用单个的金纳米棒可以检测到 1aM 的前列腺癌生物标志物 (Truong, P. L. et al. Lab on a Chip 2011)。但是基于单粒子检测的方式往往依赖于可以测量散射谱的暗视野散射光谱显微镜,需要比较贵重的检测仪器,不易实现低成本化检测。

[0005] 常规的吸收光谱同样可以作为检测信号输出端,如紫外可见光谱仪、酶标仪或是一些便携式光谱测试仪器,这种检测仪器普及面比较广,容易实现小型化、便携式、低成本检测。同时完成多个样品的检测分析或是同时检测同一样品中不同物质,可以为临床疾病提供更精确的诊断信息,这种检测需求对高通量传感器提出了迫切的需求。然而阵列式光谱检测仪器在技术水平上很容易实现,基于常规阵列光谱检测为高通量、低成本检测提供了可能性支撑。

[0006] 核酸适配体是人工合成的寡核苷酸片段,是一系列单链核苷酸分子。由于其高亲和性以及众多靶向物质从小分子(如药物、染料)到复杂生物大分子(如酶,肽、蛋白质)甚至细胞特异性选择,使其有可能成为抗体的替代物。常被作为特异性分子应用于检测当中。在高温、高盐浓度、络合剂等的作用下,适配体会产生变性,这种变性过程是可逆的,在适当条件下可以恢复其活性。这种可逆变形的能力可以释放靶向分子,这对于生物传感器的可重复使用具有重大意义。

[0007] 综上所述,如何用常规检测仪器低成本、高通量、高灵敏度、操作简便的实现对于多个目标分析物的检测仍然是 LSPR 研究领域中的一个亟待解决的问题。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种基于 LSPR 的无实体壁微阵列芯片及其应用。

[0009] 本发明所提供的微阵列芯片(或生物芯片)专用的亲疏水模式片基,包括基底和设于所述基底上的若干亲水区域及将所述亲水区域隔开的疏水区域,所述亲水区域是在所述基底上通过偶联剂连接具有局域表面等离子共振属性的金属纳米材料;所述疏水区域是在所述基底上连接疏水材料;所述亲水区域的外部区域无实体壁;

[0010] 所述无实体壁是指相邻亲水区域之间无实体物质围成亲水区域以隔离不同亲水区域;与所述无实体壁相对的有实体壁是指相邻亲水区域之间有实体物质围成亲水区域以隔离不同亲水区域(如传统的 96 孔板、384 孔板)。

[0011] 在上述片基中,所述偶联剂具体可为氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)、还可为巯丙基三乙氧基硅烷(MPTES)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或羧甲基葡聚糖(carboxymethyl dextran)等。

[0012] 在上述片基中,所述金属纳米材料中金属纳米颗粒可为球形,其粒径为 5—1000nm,或 5—100nm,或 39nm,所述金属纳米颗粒也可为蝶形、树枝状、三棱锥、三角形、棒状、哑铃形、立方体、星形、纳米壳、纳米笼状等。

[0013] 在上述片基中,所述金属纳米材料为金纳米材料,还可为银、铜、铝等其它金属或为含此类金属的复合金属纳米材料,如银壳金核,金壳磁纳米粒子,镀了石墨烯的金层等。

[0014] 在上述片基中,所述疏水材料为十八烷基三氯硅烷(OTS),也可为SU-8、碳氟化合物(如CHF₃)、聚二甲硅氧烷(PDMS)、正硫基十八醇、氟代烷基硅氧烷聚合物、聚四氟乙烯、三氧化铝/二氧化硅混合涂层、氧化钛,或通过形成纳米级别的粗糙表面使基底获得超疏水性性质等。

[0015] 在上述片基中,所述基底的材料可为玻璃、纸、石英、纤维膜、塑料、聚合物等;当所述基底的材料为玻璃时,所述偶联剂可为硅烷偶联剂,所述硅烷偶联剂具体可为氨丙基三乙氧基硅烷;所述疏水材料具体可为十八烷基三氯硅烷;所述氨丙基三乙氧基硅烷和所述十八烷基三氯硅烷通过硅氧端与所述玻璃中的硅通过共价键结合;所述金属纳米材料层与所述氨丙基三乙氧基硅烷的铵根离子通过静电结合。

[0016] 在上述片基中,所述亲水区域可因仪器需求,检测需求等制作成各种形状、面积、密度、阵列排布形式。

[0017] 在上述片基中,所述片基为长方形,其宽为76mm、长为26mm;每个所述亲水区域呈直径为7mm的圆形;每个所述片基上共设所述亲水区域24个,呈8×3阵列均匀分布,相邻两个所述亲水区域的圆心距为9mm。

[0018] 本发明提供上述微阵列芯片专用的亲疏水模式片基的制备方法,包括如下步骤:将在所述疏水区域连接了所述疏水材料的所述基底浸泡于所述偶联剂溶液中,获得在所述亲水区域连接了所述偶联剂的、在所述疏水区域连接了所述疏水材料的基底;然后,再将该基底浸泡于含具有局域表面等离子共振属性的金属纳米颗粒的溶液中,获得所述微阵列芯片专用的亲疏水模式片基。

[0019] 在上述方法中,在两次所述浸泡间,还包括将所述基底用水洗后于120℃加热3小时的步骤;

[0020] 当所述基底为玻璃、所述疏水材料为十八烷基三氯硅烷时,

[0021] 所述疏水区域连接了所述疏水材料的所述基底是按照包括如下步骤的方法制备得到:制备设有若干通孔的聚二甲硅氧烷平板,在所述平板一侧面的通孔外区域涂体积百分含量为1%的十八烷基三氯硅烷的正己烷溶液,再将该侧面扣压于玻璃基底上,去除所述平板,将所述基底晾干;进一步地,在将所述基底晾干后,还可包括将所述基底用75%乙醇擦拭后于60℃加热30分钟的步骤;

[0022] 当所述基底为玻璃、所述偶联剂为氨丙基三乙氧基硅烷时,

[0023] 所述偶联剂溶液的浓度为100g/L,所述浸泡于所述偶联剂溶液中的时间为15分钟;所述浸泡于含具有局域表面等离子共振属性的金属纳米颗粒的溶液中的时间为至少18小时。

[0024] 本发明保护上述任一所述的片基在制备微阵列芯片(或生物芯片)中的应用。

[0025] 本发明还提供一种微阵列芯片(或生物芯片),是如下1) — 3)中任一所述芯片:

[0026] 1)是在权利要求1或2所述片基亲水区域的所述金属纳米颗粒上连接特异检测待测物质的亲和分子,获得所述微阵列芯片;

[0027] 2)是在权利要求1或2所述片基亲水区域的所述金属纳米颗粒上连接特异检测待测物质的亲和分子和抗非特异性吸附分子,获得所述微阵列芯片;

[0028] 3)当所述亲和分子为单链核酸分子A时,是在1)或2)所述微阵列芯片的所述亲和分子上通过碱基互补配对的方式连接表面通过巯基修饰了单链核酸分子B的具有局域

表面等离子共振属性的金属纳米颗粒；该金属纳米颗粒中的金属具体可为金，其形状可为球形，其粒径可为 5—1000nm，或 5—100nm，或 39nm；该芯片通过增强信号的方式增强检测的灵敏度，即由于亲水区域表面外又连接了金属纳米颗粒，且通过所述单链核酸分子 A 与所述待测物质竞争结合所述单链核酸分子 B，可将检测结果放大或提高检测的灵敏度；

[0029] 所述待测物质可为核酸分子(如 DNA 或 RNA 分子)、短肽或多肽、细胞、微生物、病毒、抗体或抗原、蛋白质、小分子等；

[0030] 所述亲和分子可为单链核酸分子、短肽或多肽、抗体或抗原(如 IgG, IgM)、蛋白质(如酶)、糖蛋白(如亲和素,生物素)等。

[0031] 所述抗非特异性吸附分子具体可为 SH (CH₂)_m—修饰的寡聚乙二醇，m 具体可为 11，寡聚乙二醇具体可为三(乙二醇)。

[0032] 在上述微阵列芯片(或生物芯片)中，当所述待测物质为腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)时，所述单链核酸分子 A 的核苷酸序列为序列列表序列 1 所示序列，所述单链核酸分子 B 的核苷酸序列为序列列表序列 2 所示序列；

[0033] 当所述待测物质为血管内皮生长因子(VEGF)时，所述单链核酸分子 A 的核苷酸序列为序列列表序列 3 所示序列；

[0034] 当所述待测物质为沙门氏菌时，所述单链核酸分子 A 的核苷酸序列为序列列表序列 4 所示序列。

[0035] 本发明保护所述微阵列芯片(或生物芯片)在检测核苷三磷酸分子、蛋白质或细菌中的应用；所述应用为非疾病治疗诊断方法。

[0036] 在上述应用中，所述检测包括如下步骤：将待测物质加入所述微阵列芯片(或生物芯片)的所述亲水区域，检测所述加入后和所述加入前的所述亲水区域在波长为 540nm 光下的吸收强度的差值。

[0037] 本发明还提供一种用于固定所述微阵列芯片并与所述检测的仪器相匹配的适配器；所述适配器具体可由两块聚甲基丙烯酸甲酯平板通过紫外固化胶粘合制成；当所述仪器为微孔板检测系统 SpectraMax M5/M5e 时，所述适配器由如下两块聚甲基丙烯酸甲酯平板通过紫外固化胶粘合制成：

[0038] 一块为宽为 86mm、长为 128mm 的长方形，并在其内设 4 个间距为 4mm 的长为 71.2mm、宽为 23mm 的长方形通孔；

[0039] 另一块为宽为 86mm、长为 128mm 的长方形，并在其内设 4 个间距为 1.55mm 的长为 76mm、宽为 26mm 的长方形通孔。

[0040] 本发明所提供的芯片采用实验室常用的酶标仪或是便携式阵列光谱仪即可检测，成本低；操作简便，无需特别的专业技术和手段以及昂贵的设备就可以实现高通量的检测，大大降低了操作过程中对于人员技能、环境空间等各方面的使用要求，具有广泛的应用前景；应用灵活，能满足高通量、多样性(同时检测多种样品或是同种样品的不同物质)检测需求；芯片上的亲和分子可通过高盐、高热、高络合剂等方式获得再生芯片，达到重复使用的目的；检测区域外(即疏水区域)无实体壁，使检测结果更准确，且便于使用后的清洗。

附图说明

[0041] 图 1 为本发明芯片的亲疏水区域排列示意图及亲水区域的局部放大图。

- [0042] 图 2 为本发明检测适配器的结构示意图。其中,1 为芯片,2 为检测适配器。
- [0043] 图 3 为本发明芯片检测 ATP 的结果。
- [0044] 图 4 为本发明芯片检测 VEGF 的结果。
- [0045] 图 5 为本发明芯片检测沙门氏菌的结果。

具体实施方式

- [0046] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0047] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0048] 实施例 1、基于 LSPR 的无实体壁微阵列芯片片基的制备
- [0049] 1、用于制备亲疏水阵列的模具(即阵列模具)的制备
- [0050] 所述阵列模具为一具圆通孔的平板;所述圆通孔呈阵列 8×3 (即横向 8 排,纵向 3 列)的阵列分布,每个圆通孔呈圆柱型,其横截面为直径为 7mm 的圆形,每个圆形的圆心间距为 9mm。平板材料为聚二甲硅氧烷(PDMS)。
- [0051] 具体制作过程如下:
- [0052] 1) 首先,采用激光切割法获得用于形成所述阵列模具的模具池,具体如下:
- [0053] 利用 AutoCAD 软件绘图,绘制出宽 100mm,长 130mm 的长方形,记为图案 1;再绘制出宽 100mm,长 130mm 的长方形,并于此长方形内绘出 $80\text{mm} \times 110\text{mm}$ (宽 \times 长)的长方形,记为图案 2。按照 AutoCAD 软件绘制的图案 1 与图案 2,利用 Rayjet 激光雕刻机,在 3mm 的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)板上雕刻切割出所需的模具;激光雕刻机的设置为:切割能量 90,速度 1,切割次数 2 次;将切割好的两块 PMMA 通过紫外固化胶在紫外光照下粘合起来,获得用于形成所述阵列模具的模具,即由两块大小为 $100\text{mm} \times 130$ (宽 \times 长)PMMA 粘合而成的,在其中一块中心有个 $80\text{mm} \times 110\text{mm} \times 3\text{mm}$ (宽 \times 长 \times 深)长方形通孔的模具池。
- [0054] 2) 其次,制备厚度为 2mm 的 PDMS 平模板,具体如下:
- [0055] 首先,取出 SYLGARD® 184 Silicone Elastomer Kit 有机硅弹性体中的聚硅氧烷弹性体(Silicone Elastomer)和固化剂(Curing agent),以 10:1 的质量比配置共 22 克的液态胶体,充分调匀。使用抽真空泵把配置好的液态胶体中的气泡抽走直至无气泡存在。将无气体的液态胶体缓缓倒入步骤 1) 制备的模具池中,70℃加热 4 小时,使液态胶体充分交联形成固体 PDMS 平模板。PDMS 凝固后,用刀片沿模具池周边割开,慢慢把 PDMS 从模具池上揭下来,获得 PDMS 平模板。
- [0056] 3) 最后,利用 AutoCAD 软件绘图,并列绘制出四个宽 76mm、长 26mm 的长方形,并于此长方形内绘出直径为 7mm 的圆形,按照 8×3 的阵列分布排列,每个圆形的圆心间距为 9mm。按照 AutoCAD 软件绘制的图例,利用 Rayjet 激光雕刻机,在已经制备的 PDMS 板上切割出所需的模具;激光雕刻机的设置为:切割能量 80,速度 1,雕刻次数 2 次。切割完毕后,将模具取出,用水清洗,并烘干,获得用于制备亲疏水阵列的模具(即带孔的 PDMS 板或阵列模具,宽 \times 长为 $76\text{mm} \times 26\text{mm}$)。
- [0057] 2、具 LSPR 属性的金属纳米材料的合成
- [0058] 金纳米颗粒按照文献“Frens, G. Nat. Phys. Sci. 1973”中的 Frens 法合成,下面以合成粒径为 39nm 金球为例进行说明:
- [0059] 将用于合成金纳米球的玻璃圆底烧瓶以酸水洗净,120℃烘干备用。配置 0.5mM 氯

金酸(HAuCl_4)溶液和 10g/L 柠檬酸钠溶液,并用 0.22 μm 滤膜过滤。在烘干的玻璃圆底烧瓶中注入 100mL 过滤后的 0.5mM HAuCl_4 溶液,置于 100 $^\circ\text{C}$ 油浴中加热至溶液沸腾。沸腾后,加入过滤并预热的 1.97mL10g/L 柠檬酸钠溶液。反应过程中用转磁子充分搅拌。15 分钟后,把烧瓶从油浴转到空气中自然降温至室温,并用 0.22 μm 滤膜过滤,

[0060] 获得含粒径 39nm 金球的金纳米溶液,该溶液呈现酒红色,吸收峰为 530nm。

[0061] 3、采用微接触印刷术制作亲疏水无实体壁 LSPR 阵列玻片

[0062] 1) 采用大小为 76mm \times 26mm \times 1mm (宽 \times 长 \times 高)的玻璃片作为基底。首先制备干净的玻璃片,将玻璃片泡在去污剂中超声 10 分钟后,用纯净水充分清洗干净。洗好的载玻片浸泡在高温高浓度氢氧化钠中 20 分钟,再浸泡在纯净水中 10 分钟。用纯净水充分清洗干净。60 $^\circ\text{C}$ 烘干,以备后用。

[0063] 2) 采用微接触印刷术制作亲疏水 LSPR 阵列(如图 1 所示),具体如下:

[0064] A、在步骤 1 制备的亲疏水阵列的模具(即带孔的 PDMS 板)的一侧平面上通孔外的区域均匀涂上 200 μL 的体积百分含量为 1% 的十八烷基三氯硅烷(OTS)的正己烷溶液,然后将涂有 OTS 的一面扣在步骤 1 清洗干净的载玻片上,轻按 20 秒,去除带孔的 PDMS 板,将载玻片晾干 3 分钟,获得一面修饰了 OTS 的载玻片。用 75% 乙醇擦拭修饰了 OTS 的载玻片后,60 $^\circ\text{C}$ 加热 30 分钟,获得亲疏水无实体壁阵列玻片(以下简称无实体壁玻片),其中,载玻片上与带孔的 PDMS 板接触后形成的圆形区域以外的部分修饰了 OTS,为疏水区域。

[0065] B、将经步骤 A 处理过的载玻片依次浸泡在偶联剂和金纳米颗粒溶液中形成亲水区域,具体方法如下:

[0066] 将无实体壁玻片浸泡在 100g/L 的氨丙基三乙氧基硅烷(APTES,偶联剂)溶液中,15 分钟后取出,用纯净水充分冲洗,120 $^\circ\text{C}$ 加热 3 小时。将修饰了 APTES 的无实体壁玻片浸泡在步骤 2 制备的含粒径 39nm 金球的金纳米溶液中,湿盒中室温静置 18 小时以上。修饰上金纳米颗粒的无实体壁玻片(以下简称无实体壁 LSPR 玻片)用纯净水冲洗干净,置于纯净水中 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

[0067] 所述无实体壁 LSPR 玻片即为微阵列芯片专用的亲疏水模式片基,其形状、组成和结构如下:

[0068] 所述片基包括基底和设于所述基底上的若干个亲水区域及将所述亲水区域隔开的疏水区域,所述亲水区域是在所述基底上通过偶联剂连接具有局域表面等离子共振属性的金属纳米材料;所述疏水区域是在所述基底上连接疏水材料;所述亲水区域的外部区域无实体壁;

[0069] 所述片基为长方形,其宽为 76mm、长为 26mm;所述亲水区域为直径为 7mm 的圆形,共 24 个,呈 8 \times 3 阵列均匀分布,相邻两个所述亲水区域的圆心距为 9mm;

[0070] 所述基底的材料为玻璃,所述金属为金,所述金属纳米材料中金纳米颗粒的粒径为 39nm,所述疏水材料为十八烷基三氯硅烷;所述偶联剂为氨丙基三乙氧基硅烷;所述氨丙基三乙氧基硅烷和所述十八烷基三氯硅烷均通过硅氧端与所述玻璃中的硅通过共价键结合;所述金属纳米材料与所述氨丙基三乙氧基硅烷的铵根离子通过静电相结合。

[0071] 实施例 2、带有亲和分子的无实体壁 LSPR 阵列芯片的制备

[0072] 1、检测腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)的无实体壁 LSPR 芯片的制备

[0073] 采用竞争替换法获得具有高灵敏度的特异性检测腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)的无实

体壁 LSPR 芯片,其具体制备方法如下:

[0074] A) 将末端含巯基的识别 ATP 的特异性核酸适配体 5'-SH-(CH₂)₆-TTCTCCCCAGGTAA-3' (其核苷酸序列如序列列表序列 1 所示)和寡聚乙二醇即 (11- 巯基十一烷基) 三 (乙二醇) 同混于 PBS 缓冲液 (pH7.4) 中,浓度分别达到 1 μM 和 5 μM,获得适配体 / 寡聚乙二醇混合溶液。取 10 μL 该适配体 / 寡聚乙二醇溶液滴加在无实体壁 LSPR 玻片的亲水区域,湿盒中室温静置 3 小时以上,用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 冲洗 3 次,获得在金纳米材料层通过巯基修饰了亲和分子——适配体和寡聚乙二醇的无实体壁 LSPR 芯片,置于纯净水中 4℃ 保存;

[0075] B) 将 5nmol 的末端含巯基的识别 ATP 的单链 DNA 分子 5'-HS-(CH₂)₆-TTTTTACCTGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT-3' (其核苷酸序列如序列列表序列 2 所示)加入到 50 μL 实施例 1 中步骤 2 制备的含粒径为 39nm 金球的金纳米溶液中,反应 12h 后,取 10 μL 该溶液滴加在步骤 A) 获得的 LSPR 芯片的亲水区域,反应 1h,用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 冲洗 3 次,获得增强型的无实体壁 LSPR 芯片,置于纯净水中 4℃ 保存。修饰了单链 DNA 分子 5'-HS-(CH₂)₆-TTTTTACCTGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT-3' 的金纳米粒子与带有特异性核酸适配体 5'-SH-(CH₂)₆-TTCTCCCCAGGTAA-3' 的 LSPR 芯片通过特异性核酸适配体的碱基互补配对方式连接,产生吸收谱强度的增强,当分析物 ATP 存在的情况下,这种碱基互补配对被破坏,造成吸收谱强度的降低,这种变化可以表征分析物 ATP 的浓度。

[0076] 2、检测蛋白的无实体壁 LSPR 芯片的制备

[0077] 采用特异性结合蛋白(如 VEGF)的亲和分子修饰无实体壁 LSPR 玻片亲水区域表面的金纳米材料层,获得检测蛋白的 LSPR 芯片,其具体制备方法如下:

[0078] 将末端含巯基的识别 VEGF 的特异性核酸适配体 5'-HS-(CH₂)₆-TTCCCGTCTCCAGACAAGAGTGCAGGG-3' (其核苷酸序列如序列列表序列 3 所示)和寡聚乙二醇即 (11- 巯基十一烷基) 三 (乙二醇) 同混于 PBS 缓冲液 (pH7.4) 中,浓度分别达到 1 μM 和 5 μM,获得适配体 / 寡聚乙二醇混合溶液。取 10 μL 该适配体 / 寡聚乙二醇溶液滴加在无实体壁 LSPR 玻片的亲水区域,湿盒中室温静置 3 小时以上,用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 冲洗 3 次,获得在金纳米材料层通过巯基修饰上亲和分子——适配体和寡聚乙二醇的无实体壁 LSPR 芯片,置于纯净水中 4℃ 保存。

[0079] 3、检测沙门氏菌的无实体壁 LSPR 芯片的制备

[0080] 采用特异性结合沙门氏菌的亲和分子修饰无实体壁 LSPR 玻片亲水区域表面的金纳米材料层,获得检测蛋白的 LSPR 芯片,其具体制备方法如下:

[0081] 将末端含巯基的识别沙门氏菌的特异性核酸适配体 5'-HS-(CH₂)₆-TATGGCGGCGTCACCCGACGGGGACTTGACATTATGACAG-3' (其核苷酸序列如序列列表序列 4 所示)和寡聚乙二醇即 (11- 巯基十一烷基) 三 (乙二醇) 同混于 PBS 缓冲液 (pH7.4) 中,浓度分别达到 1 μM 和 5 μM,获得适配体 / 寡聚乙二醇混合溶液。取 10 μL 该适配体 / 寡聚乙二醇溶液滴加在无实体壁 LSPR 玻片的亲水区域,湿盒中室温静置 3 小时以上,用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 冲洗 3 次,获得在金纳米材料层通过巯基修饰上亲和分子——适配体和寡聚乙二醇的无实体壁 LSPR 芯片,置于纯净水中 4℃ 保存。

[0082] 实施例 3、检测适配器的制备

[0083] 按照实施例 1 步骤 1 所述阵列模具的模具池的制备方法,制作与检测设备相配合

的并可固定实施例 2 所述芯片的检测适配器,其尺寸可根据检测设备放置样品位置的大小确定,下面仅举出一个适用于微孔板检测系统 SpectraMax M5/M5e 的检测适配器作为例子进行说明:

[0084] 利用 AutoCAD 软件绘图,绘制出 86mm×128mm (宽×长)的长方形,并于此长方形内绘出 4 个 71.2mm×23mm 的长方形,他们之间的间距为 4mm,记为图案 1;再绘制出 86mm×128mm (宽×长)的长方形,并于此长方形内绘出 4 个 26mm×76mm 的长方形,他们之间的间距为 1.55mm,记为图案 2。PDMS 阵列模板大小为 26mm×76mm 的带通孔的阵列模板。

[0085] 按照 AutoCAD 软件绘制的图案 1 与图案 2,利用 Rayjet 激光雕刻机,在 3mm 的 PMMA 板上雕刻切割出所需的模具;激光雕刻机的设置为:切割能量 90,速度 1,切割次数 2 次;将切割好的两块 PMMA 通过紫外固化胶在紫外光照下粘合起来,得到检测适配器(如图 2 所示)。

[0086] 实施例 4、基于 LSPR 的无实体壁微阵列芯片的应用

[0087] 1、检测小分子——腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)

[0088] 1)将实施例 2 中步骤 1 中 2)制备的芯片从水中取出,去除表面多余液体,用无尘纸擦干芯片底面,放在实施例 3 制备的检测适配器中,用微孔板检测系统 SpectraMaxM5/M5e 测试 540nm 处的吸收强度(即反应前的吸收强度)。

[0089] 2)取浓度分别为 0.01、0.1、1、10、100、1000 μM 的 ATP 溶液(以 100 μM 的 GTP 溶液和 100 μM 的 dATP 溶液为对照),滴加 10 μL 于经步骤 1)处理的芯片的亲水区域中,湿盒中室温静置 1 小时。以 PBS 缓冲液 (pH7.4) 冲洗三次。

[0090] 3)将步骤 2)的芯片置于实施例 3 制备的适配器中,用微孔板检测系统 SpectraMaxM5/M5e 测试 540nm 处的吸收强度(即反应后的吸收强度)。将反应后的吸收强度减去反应前的吸收强度得到各样品吸收强度的变化,结果如表 1 和图 3 所示。

[0091] 表 1、基于 LSPR 的无实体壁微阵列芯片检测 ATP 的吸收强度(单位:a.u.)

[0092]

	0.01 μM 的 ATP	0.1 μM 的 ATP	1 μM 的 ATP	10 μM 的 ATP	100 μM 的 ATP	1000 μM 的 ATP	100 μM 的 GTP	100 μM 的 dATP
吸收强度 的变化	-0.00768	-0.01299	-0.01616	-0.01813	-0.02316	-0.02189	-0.00083	0.00007

[0093] 结果表明,实施例 2 中步骤 1 制备的芯片的检测 ATP 浓度与 540nm 吸收强度变化之间存在线性相关,方程为 $Y = -0.003 - 0.01529X$ ($R^2 = 0.9582$) (X 代表 ATP 浓度,单位为 μM ; Y 代表吸收强度的变化,单位为 a.u.),线性检测 ATP 浓度的范围为 0.01 μM -100 μM 。

[0094] 2、检测蛋白——血管内皮生长因子(VEGF)

[0095] 本实验所用的血管内皮生长因子(VEGF)为重组人血管内皮生长因子 165,其商业购买处为生工生物工程(上海)股份有限公司,产品目录编号为 RC034-10ug。

[0096] 1)将实施例 2 中步骤 2 制备的芯片从水中取出,去除表面多余液体,用无尘纸擦干芯片底面,放在实施例 3 制备的检测适配器中,用微孔板检测系统 SpectraMaxM5/M5e 测试 540nm 处的吸收强度(即反应前的吸收强度)。

[0097] 2)取浓度分别为 1、10、100、500、1000ng/ml 的 VEGF 溶液(以 PBS 为对照),滴

加 10 μ L 于经步骤 1) 处理的芯片的亲水区域中,湿盒中室温静置 1 小时。以 PBS 缓冲液 (pH7.4) 冲洗三次。

[0098] 3) 将步骤 2) 的芯片置于实施例 3 制备的适配器中,用微孔板检测系统 SpectraMaxM5/M5e 测试 540nm 处的吸收强度(即反应后的吸收强度)。将反应后的吸收强度减去反应前的吸收强度得到各样品吸收强度的变化,结果如表 2 和图 4 所示。

[0099] 表 2、基于 LSPR 的无实体壁微阵列芯片检测 VEGF 的吸收强度(单位 :a. u.)

[0100]

VEGF 浓度 (ng/mL)	1	10	100	1000	PBS
吸收强度的变化	0.00131	0.00204	0.00279	0.00374	0.00062

[0101] 结果表明,实施例 2 中步骤 2 制备的芯片的检测 VEGF 浓度与 540nm 吸收强度变化之间存在线性相关,方程为 $Y=0.0013+8.05 \times 10^{-4}X$ ($R^2=0.9938$) (X 代表 VEGF 浓度,单位为 μ M; Y 代表吸收强度的变化,单位为 a. u.),线性检测 VEGF 浓度的范围为 1ng/mL-1000ng/mL。

[0102] 3、检测细菌——沙门氏菌

[0103] 1)将实施例 2 中步骤 3 制备的芯片从水中取出,去除表面多余液体,用无尘纸擦干芯片底面,放在实施例 3 制备的检测适配器中,用微孔板检测系统 SpectraMaxM5/M5e 测试 540nm 处的吸收强度(即反应前的吸收强度)。

[0104] 2)取浓度为 10^9 - 10^{10} CFU/mL 的沙门氏菌,用 PBS 梯度稀释成浓度为 10^8 - 10^6 CFU/mL 的悬浮液(以 PBS 为对照),滴加 10 μ L 于经步骤 1) 处理的芯片的亲水区域中,湿盒中室温静置 1 小时。以 SSC 缓冲液冲洗反应后的芯片,再以 PBS 缓冲液 (pH7.4) 冲洗两次,最后用纯净水冲洗。

[0105] 3)将步骤 2)的芯片置于实施例 3 制备的适配器中,用微孔板检测系统 SpectraMax M5/M5e 测试 540nm 处的吸收强度(即反应后的吸收强度)。将反应后的吸收强度减去反应前的吸收强度得到各样品吸收强度的变化,结果如表 3 和图 5 所示。

[0106] 表 3、基于 LSPR 的无实体壁微阵列芯片检测沙门氏菌浓度的吸收强度(单位 : a. u.)

[0107]

菌液浓度 (CFU/mL) 的 lg 值	6.87	7.57	7.87	8.27	8.57	PBS
吸收强度的变化	0.0002	0.0011	0.0015	0.0020	0.0028	-0.00067

[0108] 结果表明,实施例 2 中步骤 3 制备的芯片的检测沙门氏菌浓度与 540nm 吸收强度变化之间存在线性相关,方程为 $Y=0.0015X-0.0099$ ($R^2=0.9835$) (X 代表沙门氏菌浓度 (CFU/mL) 的 lg 值; Y 代表吸收强度的变化,单位为 a. u.),线性检测沙门氏菌浓度的范围为 10^9 CFU/mL- 10^7 CFU/mL。

[0001]

序 列 表

 <110> 清华大学

<120> 一种基于 LSPR 的无实体壁微阵列芯片及其应用

<130> CGGNQAD136041

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

ttctccccca ggtaa

15

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

tttttacct gggggagtat tgcggaggaa ggt

33

[0002]

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

ttecegtett ccagacaaga gtgcaggg

28

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

tatggcggcg tcaccegacg ggaattgac attatgacag

40

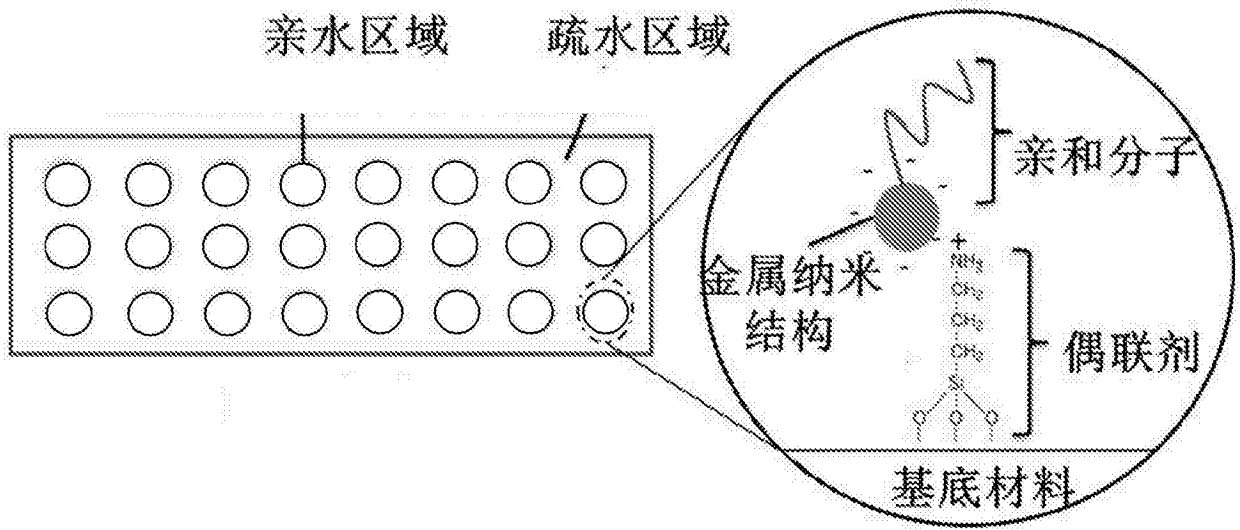


图 1

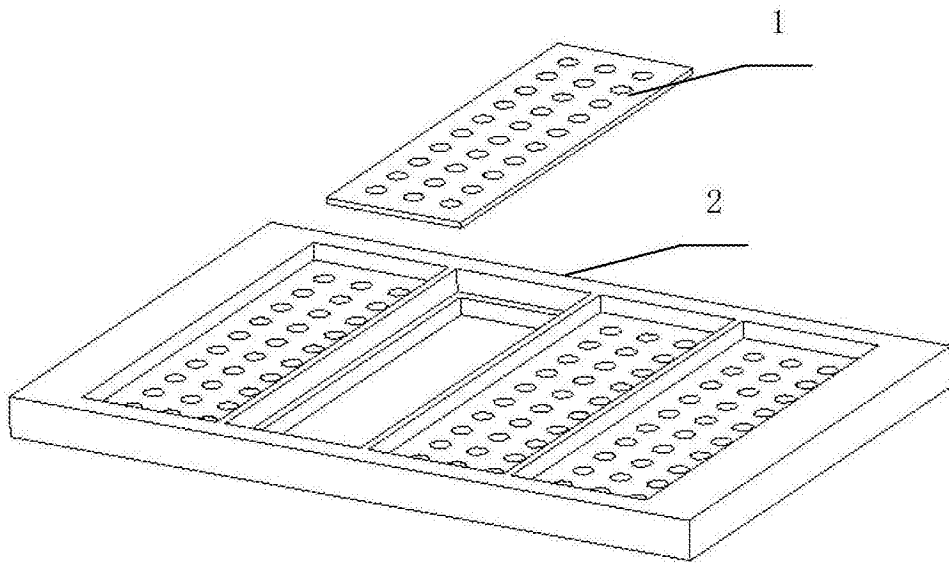


图 2

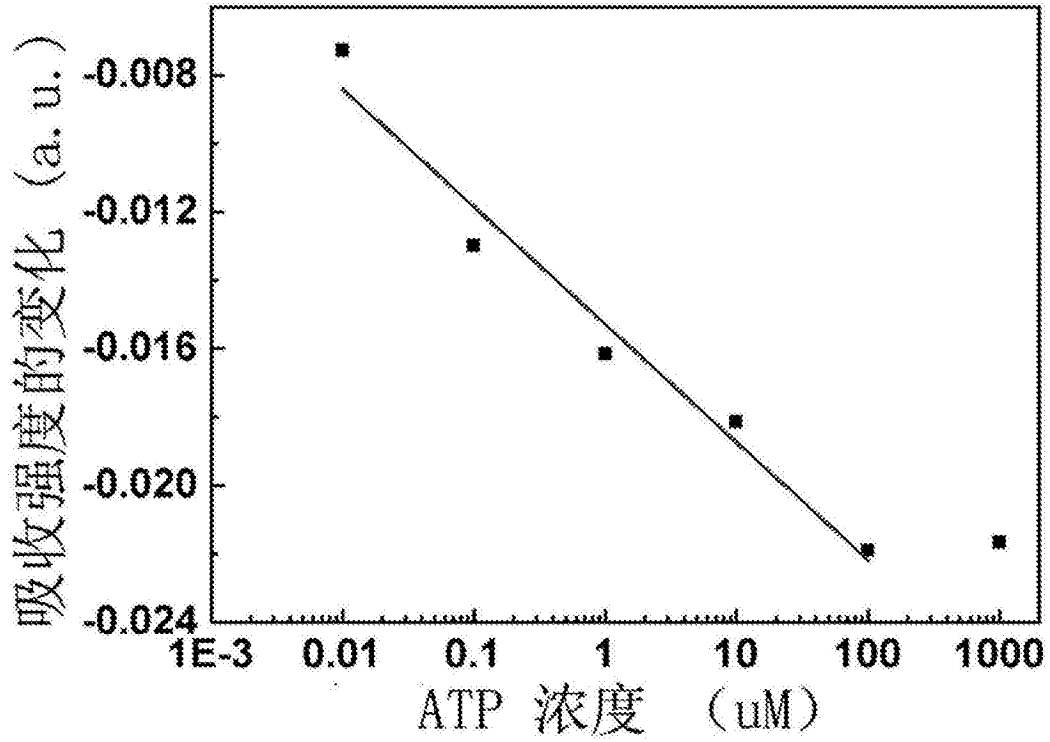


图 3

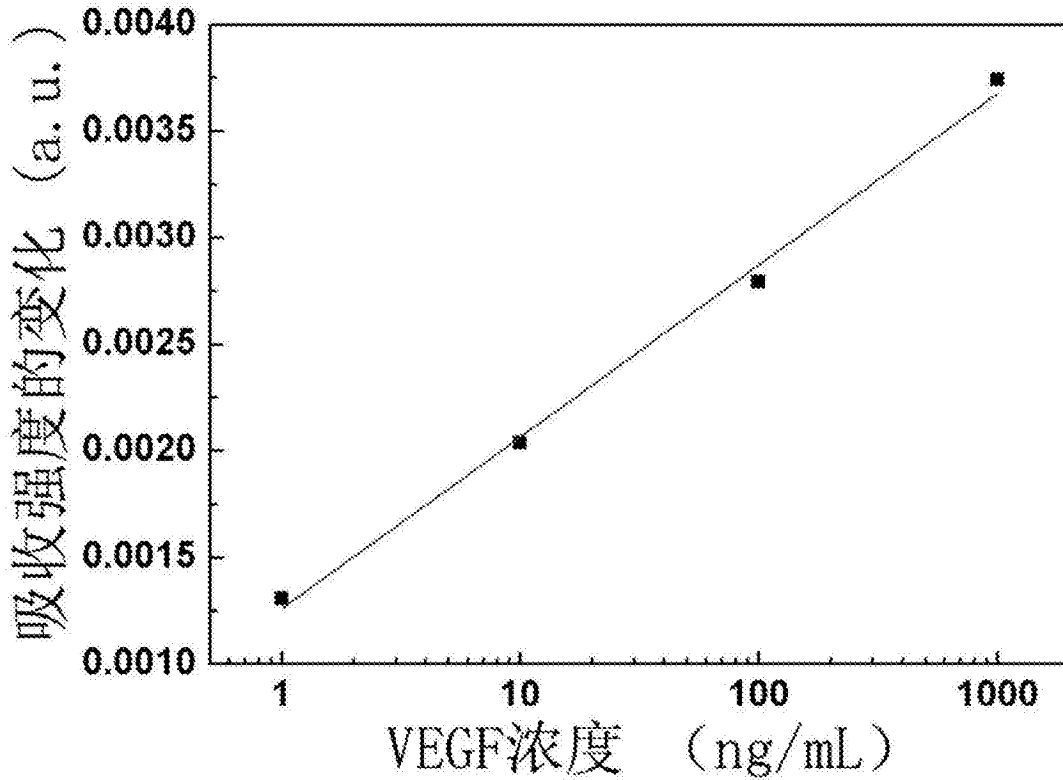


图 4

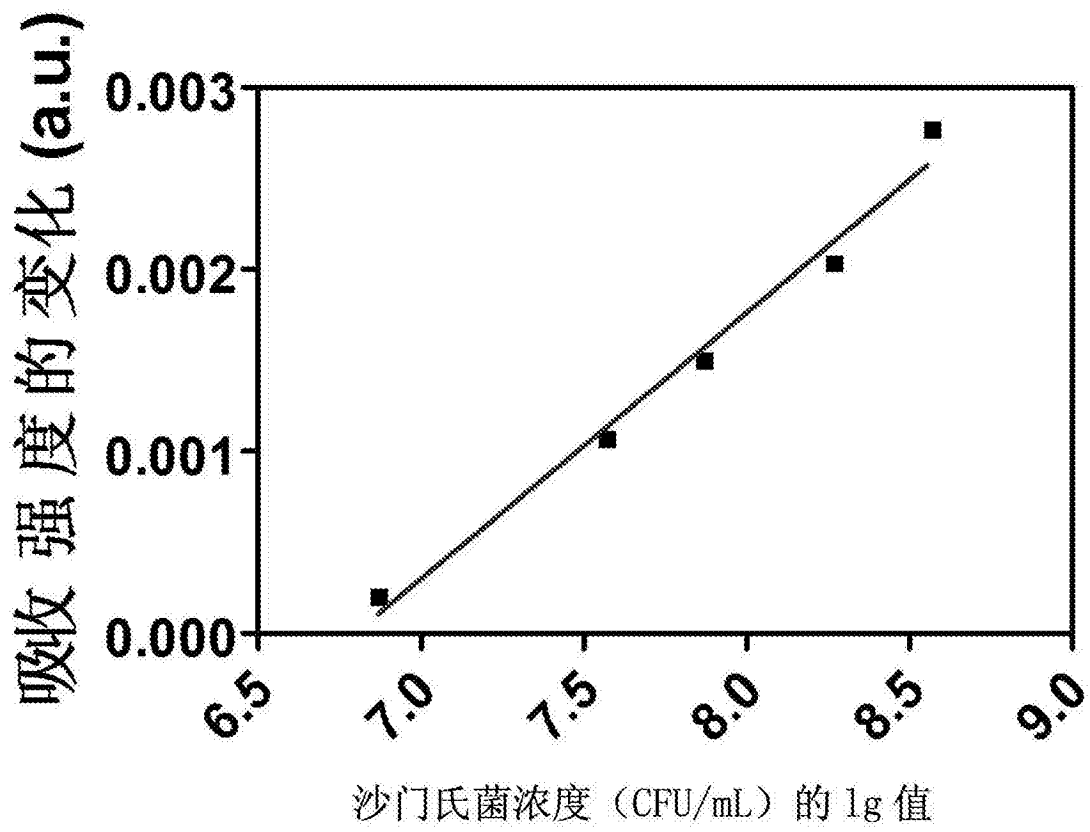


图 5