

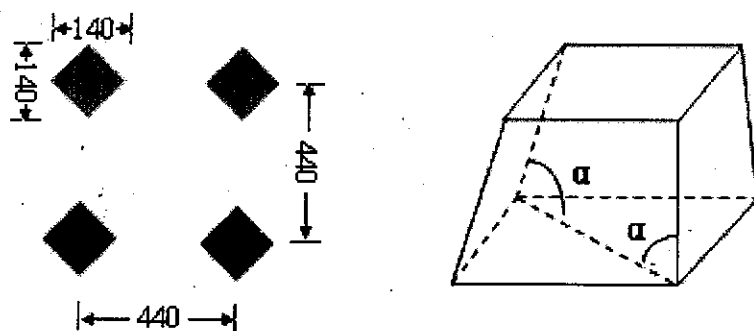


图 4.10 DDA 模拟计算参数设计模型

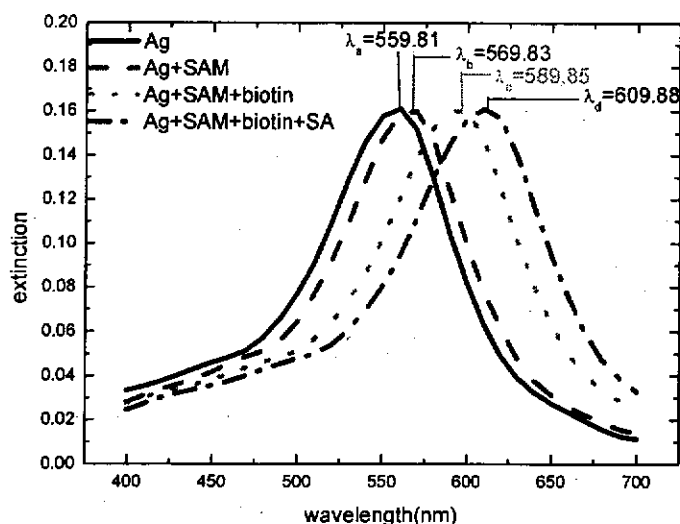


图 4.11 DDA 模拟计算结果

如图 4.11 所示, 黑色曲线表示单独金属结构时的消光谱, 计算时将其金属周围介质的折射率等效为 1.097; 红黑色曲线表示金属结构进行活化处理后的消光谱, 计算时将其金属周围介质的折射率等效为 1.1; 绿色曲线表示结合生物素后的消光谱, 计算时将其金属周围介质的折射率等效为 1.169; 蓝色曲线表示结合链亲合素后的消光谱, 计算时将其金属周围介质的折射率等效为 1.2。则矩形分布的菱形纳米结构子阵列 LSPR 传感芯片的折射率灵敏度为消光谱峰值移动大小除以折射率变化的大小, 经计算其最大灵敏度为 330nm/RIU。

为了检验 DDA 计算的可靠性, 我们将其与实验结果进行比较, 将实验结果和理论结果如图 4.12 所示, 通过对 DDA 计算结果与实验结果的分析, 可以

得到结论, DDA 算法用于计算银纳米结构阵列的光学性质是完全可行的。

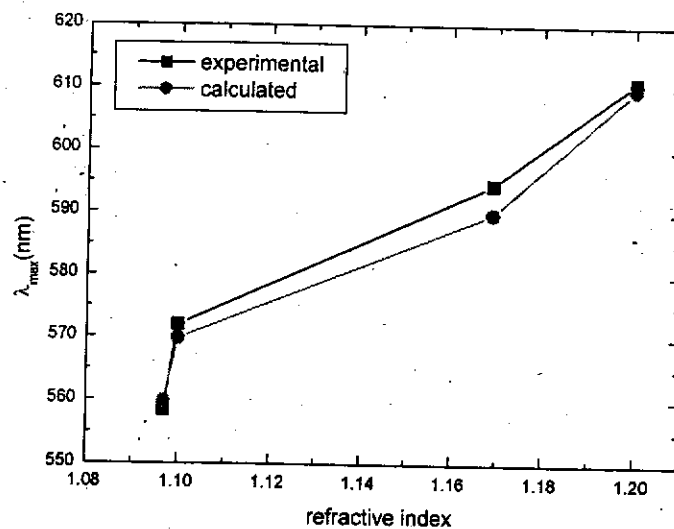


图 4.12 在金属周围介质折射率改变时理论计算的共振峰值与实验数值的比较

如图 4.12 所示, 图线表明当金属周围介质折射率改变时理论计算的共振峰值与实验数值之间的相互关系。正方形 (■) 代表实验测得的当金属纳米结构分别进行自组装、结合生物素、结合抗生物素后的共振峰值的大小, 圆 (●) 表示理论上计算的当金属周围介质的等效折射率分别为 1.05、1.1、1.05、1.2 时的共振峰值的大小。数值表明: 理论计算和实验观察的数值定性的保持一致; 当金属周围介质折射率增大时, 金属纳米结构的共振峰值也随之增大。理论计算模型数值和实验结果的差异部分是由于实验中金属阵列的不均匀性和样品的污染以及理论计算时的一些等效、近似引起的。

4.4. 免疫实验结果和讨论

为了比较矩形分布的菱形金属银纳米结构阵列传感芯片和六角形分布的三角形金属纳米结构阵列芯片的传感特性, 相同实验条件下, 测试的相同阵列周期, 相同金属厚度的菱形和三角形纳米结构阵列芯片结合相同浓度的链亲合素前后的消光效率曲线, 如图 4.13 所示:

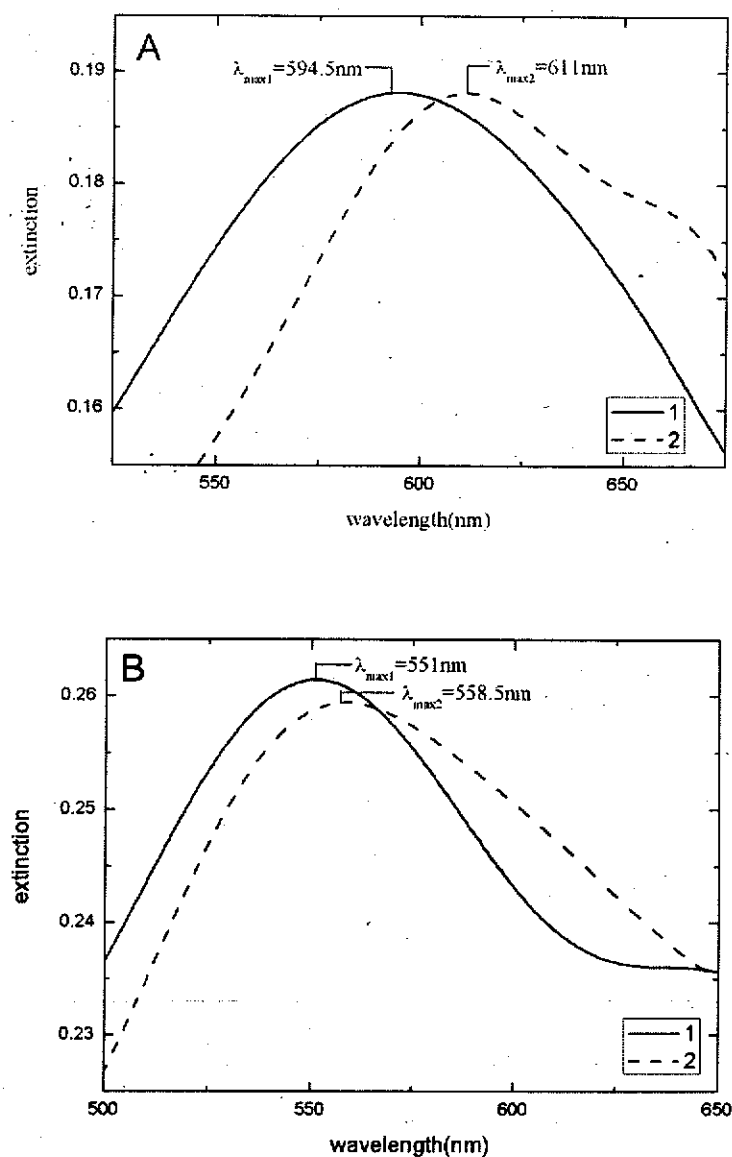


图 4.13 菱形 (A) 和三角形 (B) 纳米结构阵列芯片结合相同浓度的链亲合素前后的消光效率曲线

从以上消光效率谱线我们可以看出, 相同实验条件下, 菱形和三角形纳米结构阵列芯片结合相同浓度的链亲合素前后的消光效率曲线谱峰移动, 菱形的移动大小为 16.5 nm, 而三角形的移动只有 7.5 nm, 菱形结构的金属纳米结构的消光效率峰值移动的大小为三角形的 2.2 倍, 因为折射率灵敏度的定义为 $\Delta\lambda_{max} / \Delta n$, 而二者探测的目标分子相同, 所以以上实验结果表明矩形排布的菱形银纳米结构芯片的折射率灵敏度为三角形的 2.2 倍。

4.5. 入射光偏振方向对金属纳米结构消光效率的影响

我们实验上测试入射光的偏振方向对金属纳米结构消光效率的影响时,所用基片为三角形金属纳米结构阵列,阵列周期为 400nm,金属银厚度为 40nm,入射光的偏振角度从 $0^\circ \sim 90^\circ$, 即 $0^\circ, 15^\circ, 30^\circ, 45^\circ, 60^\circ, 75^\circ, 90^\circ$ 。测试结果如图 4.14 所示:

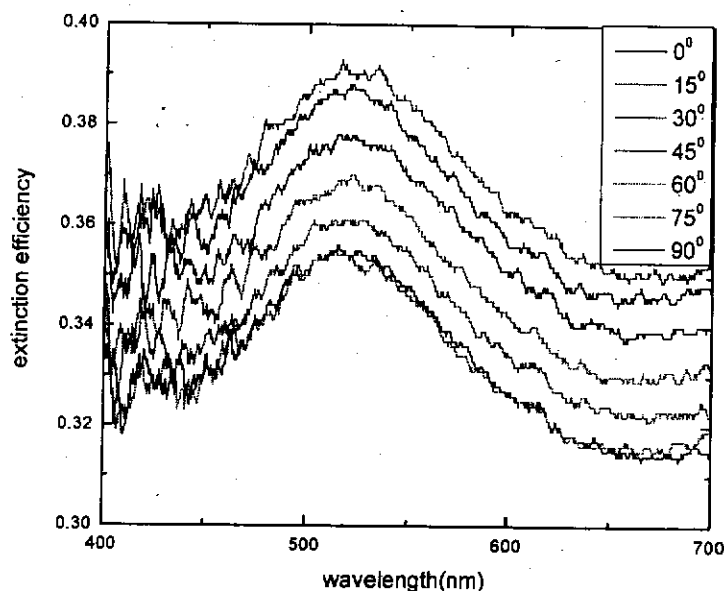


图 4.14 入射光不同偏振方向对消光效率影响的实验结果

图 4.14 表明,对于三角形金属粒子阵列,入射光的偏振方向对消光效率谱峰的峰值位置无影响,对强度的大小变化有影响,在入射光的偏振角度为 15° 时,消光效率的强度达到最大值,入射光的偏振角度为 75° 时,消光效率的强度达到最小值。

为了进一步说明偏振光的影响,我们用离散偶级近似 (DDA) ^[2-5] 的计算方法对当入射光的偏振方向变化时,消光谱的变化情况进行了计算。计算时所用参数是根据实验结果选取的:底面边长 $l=100\text{nm}$,金属银厚度 $h=40\text{nm}$;棱与底面的夹角 $\alpha=60^\circ$,周围介质的折射率大小根据文献选取为 1.2^[6],截断四面体的底面所在平面为 yz 平面,入射光方向为 x 轴方向,当银纳米结构阵列的入射光的偏振方向分别为 0° (y 轴), $15^\circ, 30^\circ, 45^\circ, 60^\circ, 75^\circ, 90^\circ$ (z 轴),其它参数不变时的消光效率曲线如图 4.15 所示:

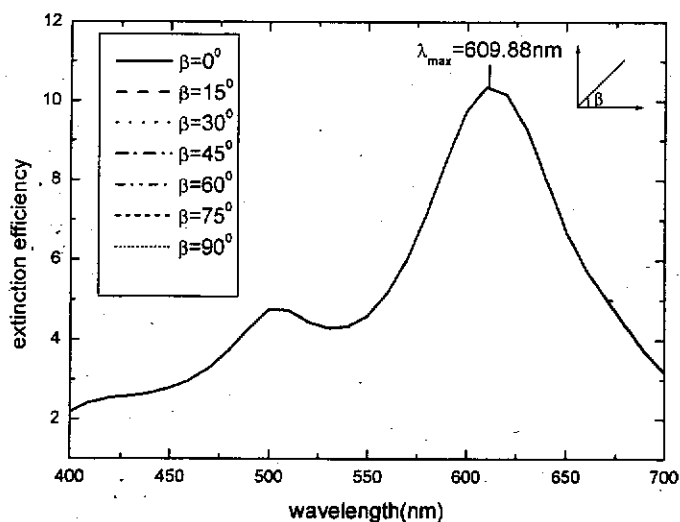


图 4.15 不同偏振方向的入射光对消光效率影响的计算结果

由计算和实验结果可以看出,入射光的偏振方向对二维无限对称纳米结构阵列的消光效率没有影响,原因是偏振光对每一个纳米粒子的极化被平均分配在粒子的每一部分,由于阵列对称,所以表现的整体的消光效率谱线没有变化。所以在对二维无限对称的金属纳米结构的消光效率进行测试时不用考虑入射光偏振方向的影响,免除在测试系统中加入偏振片的要求,使测试系统更加简化,这也是 LSPR 生物传感芯片的一个优势所在。

4.6.多通道 LSPR 传感芯片的实现

对于 LSPR 传感芯片,芯片上的微结构的材料对传感器的灵敏度具有很大的影响。银膜具有很高的反射率和较高的测量灵敏度,是 LSPR 首选的金属膜。金膜的稳定性最好,具有较强的化学惰性,尤其适用银膜不能使用的体系。从 LSPR 光谱的三个特征参数(共振波长,共振宽度,共振深度)来看,在同样的条件下,银膜的共振波长的变化明显比金膜灵敏,共振深度约大于金膜,共振峰宽明显小于金膜。但是金属银由于放置时间太久会发生氧化的问题,严重影响芯片的保存,针对这一问题我们提出用金银混合结构代替单纯的金属银结构,解决金属银的氧化问题,具体解决方法是在金属银上再蒸镀一层金属金,将金属银包在里面,这就解决了金属银氧化的问题。在实验室中,我们制作出混合金属结构,并对其消光效率进行了测试,结合芯片均匀性的问题一起进行了研究。

为了解决不同微纳芯片之间的消光谱测试差异问题,我们在一个芯片上设计了 49 个小孔,在每个孔中进行微纳结构的制作,使制作出来的微纳结构得到很大的提高。设计多通道传感芯片时的模板如图 4.16 所示:

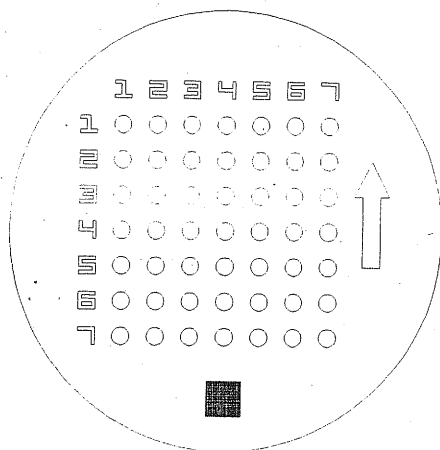


图 4.16 设计多通道传感芯片的多孔模板

芯片直径 25mm, 厚度: 3mm, 孔的直径 1mm, 周期 2mm, 图中的数字便于在实验测试时对每一个小孔进行定位, 箭头便于放置样片时控制样片的放置方向。

制作过程: 先用激光直写系统将设计图形写在光刻胶上, 然后用曝光机将图形转移到基片的金属铬层上, 铬层的厚度 200nm 左右。再在每一个小孔中进行自组装, 将干燥后的样片进行真空镀膜, 最后超声振荡去掉 PS 微球得到三角形金属微纳结构。制作成的多通道传感芯片实物如图 4.17 所示:

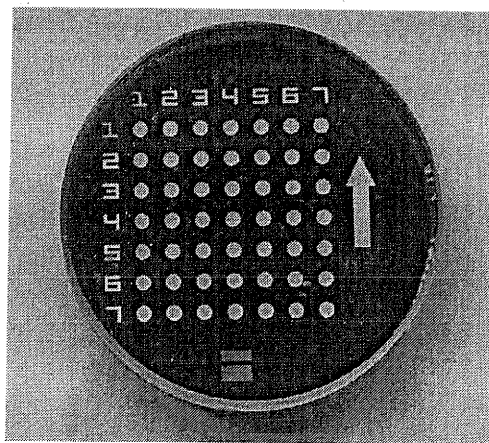


图4.17 多通道传感芯片的实物图

对多通道传感芯片进行测试的测试系统为 Ocean Optics USB4000, 系统如图 4.18 所示:

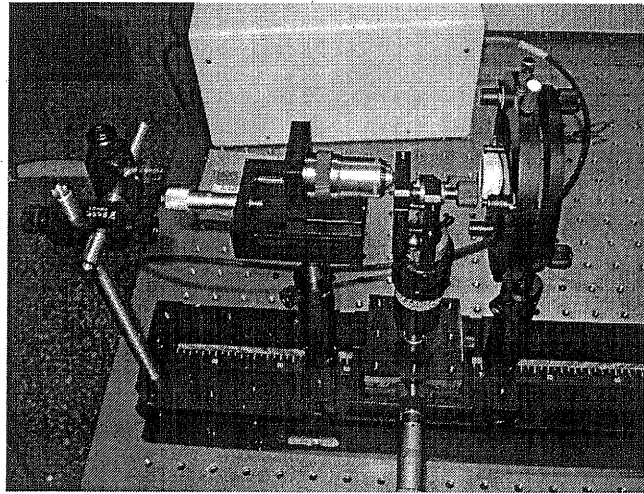


图4.18 多通道传感芯片的测试系统图

从复色光源出射的光经光纤, 通过准直透镜入射至 $\times 20$ 倍的物镜上, 然后入射至芯片上, 芯片由一个三维调节架支撑, 可以对微孔位置进行调节, 经芯片的光再通过双胶合透镜聚焦入射到连接在接收光纤的聚焦透镜上, 经光纤的光进入到光谱仪 (带 CCD), 得到的数据传输至计算机, 通过相应软件得到所测试的结果, 如图 4.19 所示:

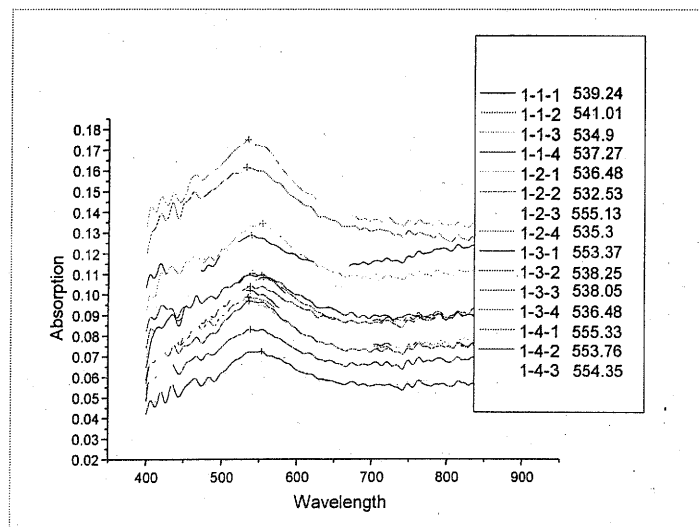


图4.19 芯片的测试结果

测试的芯片微结构为三角形金属混合结构, 阵列周期 400nm, 银层厚度 40nm, 上面一层金属金的厚度 10nm。图 4.19 中, 横坐标为入射光波长, 纵坐标为光的

吸收值的大小。从图中可以看出吸收峰值的大小集中在 540nm 左右, 芯片的均匀性良好。

4.7. 本章小结

本章对上一章中设计的三角形和矩形分布的菱形金属纳米结构阵列进行了免疫实验研究, 对有代表性的生物素—链亲合素之间的特异性反应进行探测, 探测结果表明, 对于相同浓度的目标分子, 矩形分布的菱形金属纳米结构阵列传感芯片比三角形具有更高的探测灵敏度, 并且通过加长探测分子直链长度的办法降低了抗原—抗体之间的空间阻碍, 使特异性结合效果更加明显。另外, 利用我们自行设计的金包银的复合金属结构和多通道 LSPR 传感芯片解决了目前 LSPR 传感技术普遍存在的金属银氧化问题和芯片均匀性差的问题, 为 LSPR 传感技术的发展注入新的活力。这种利用 LSPR 的纳米传感芯片进行测量的方法在医学诊断和食品检测上将会有很大的应用前景。

参考文献

- [1] 钱军民、李旭祥. 固定化技术在生物传感器中的应用. 传感技术. 2001. vol. 20(7):6-10
- [2] R. Jin, and Y. W. Cao, et al., "Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms[J]," Science 294, 1901-1903 (2001).
- [3] B. T. Draine, and P. J. Flatau, "Discrete-dipole approximation for scattering calculations[J]," J. Opt. Soc. Am. A. 11, 1491-1499 (1994).
- [4] N. Felidj, and J. Aubard, et al., "Discrete dipole approximation for ultraviolet-visible extinction spectra simulation of silver and gold colloids[J]," J. Phys. Chem. 111, 1195-1208 (1999).
- [5] G. C. Schatz, "Electrodynamics of nonspherical noble metal nanoparticles and nanoparticle aggregates[J]," Journal of Molecular structure(Theochem) 573, 73-80 (2001).
- [6] P. B. Johnson and R. W. Christy, Phys. Rev. B, 1972, 6:4370.

第5章 LSPR 生物传感器用于老年痴呆症的检测

上一章中, 我们利用六角形分布的三角形和矩形分布的菱形银纳米结构芯片对抗原(生物素)-抗体(链亲合素)之间的特异性反应进行了研究。以此为基础, 在本章, 我们针对 LSPR 传感芯片的典型应用-老年痴呆症(ADDL)的检测开展了实验研究, 并且对实验中遇到的由于金属粘接层铬(Cr)引起的非特异性反应问题, 提出利用正丙基三甲氧基硅烷(PTMS)对 Cr 层进行钝化的方法, PTMS 中的硅烷基团与 Cr 结合强烈, 但与银不结合, 很好的消除了粘接层 Cr 引起的非特异性反应问题。

1986 年, 美国罗奈尔得·里根总统在某些政党交锋的时刻常以「我想不起来」, 「我不记得」... 这类显得蹩脚的答案来回应对手。然而, 他的回应很可能是真心话而非玩弄政治语言。因 1994 年, 卸任的里根总统宣布他罹患阿兹海默症(Alzheimer's disease)。

在美国约有 5-6% 的人口罹患阿兹海默症或是有相关的痴呆症状。这表示有将近四百万的美国人罹患阿兹海默症。随着患者们老化退化, 照顾者及社会的负担也日益沉重。据估计, 到了 2050 年, 在美国将有一千四百万人罹患阿兹海默症。在美国, 阿兹海默症高居成人死因第四位, 仅次于心脏病、癌症及脑中风。每年有 10 万人死于阿兹海默症。超过六十五岁的人口中有 5-10 % 罹患阿兹海默症。85 岁以上的人口有一半是阿兹海默症患者。年龄是阿兹海默症相关因素之一, 而研究显示「遗传」也扮演着重要角色。因为女性的寿命普遍较男性长, 因此罹患阿兹海默症的女性也比男性多。此外, 80 % 的阿兹海默症照顾者是女性, 因此她们也间接受到阿兹海默症的影响。

由于阿兹海默症最可靠的诊断得在患者死后检查脑部才能确立, 因此在病人活着时必须藉着排除法来诊断出病人是否得了阿兹海默症。这意味着要先排除它可能会造成痴呆的疾病。没有办法仅仅依赖一项检验来断定一个人是否得了阿兹海默症, 但是某些检验有助于推测就诊的人是否出现阿兹海默症。

分析脑脊髓液时, 如有某些特定的蛋白质含量上升, 像是乙型-淀粉样蛋白(amyloid beta protein), 则表示就诊人可能罹患阿兹海默症。

当影像技术变的越来越精良、容易获得,医疗专业人员可以利用电脑断层扫描(Computerized Axial Tomography, 简称 CAT scans)来观测脑部收缩的程度。当大脑表面的凹纹(sulci)变宽、脑室(脑内充满着脑脊髓液的空间)变大,这些都是阿兹海默(其它神经性疾病也有)会有的特征。

也可以利用脑部影像技术来获取不同脑区的血流和代谢活性的状态。

以上三种检测方法,分析脑脊髓液中是否乙型-淀粉样蛋白含量上升是有效和快速的检测方法,由此,我们提出利用 LSPR 生物传感器来检测老年痴呆症的方法,即检测脑脊髓液中乙型-淀粉样蛋白的含量。由于这种方法具有方便快捷、灵敏度高、应用范围广、实时监控等多项特点,所以可以被用作阿兹海默症(Alzheimer's disease)的早期检测。

LSPR 生物传感器是将表面等离子体局域在表面传播的一种共振现象,是当金属纳米粒子或结构被光激发时能够引起表面自由电子(等离子体)的集体振荡,从而引起对入射光子的吸收或散射,这种振荡主要集中于金属颗粒的表面区域附近,称之为局域的表面等离子体共振。

LSPR 生物传感器是由微细加工技术组装形成的平面集成金属纳米粒子阵列,在其金属粒子表面修饰生物分子,通过生物分子发生生化反应前后的 LSPR 光谱的变化,得到生化反应动力学的一系列信息。作为纳米结构平面生物传感器,在临床医学、临床检验与疾病诊断、生理学、生物化学、分子生物学等方面有广泛的应用前景。如果平板上集成多种不同的纳米结构,可形成多色粒子探测体系,实现多通道探测。实验表明测量金属纳米粒子消光谱或散射谱的变化,可以定量研究生化反应的动力学过程。与传统的平面传播型等离子体共振波探测生化反应的 Bicore 生物传感器相比,新方法在灵敏度、成像分辨率、温控、成本、便携性等许多方面具有相当大优势。

国外虽然在纳米粒子和结构用于生物分子标记物和检测方面做了相当一部分初步的实验研究工作,但是检测方法尚不完善, LSPR 生物传感器用于老年痴呆症的检测有待进一步突破,国内还没有检索到相关的研究。在本章,我们着重阐述了 LSPR 生物传感器在老年痴呆症检测方面的应用研究。

5.1. 基本原理

进一步理解纳米科学和纳米尺度的现象对于发展和建立在纳米技术的基础上的装置是很重要的。与这一工作相关的,发展高灵敏度和特殊的传感器来检测生物对象的潜力激发着这一研究领域。这一新型的,纳米尺度的传感器,叫做局域表面等离子体共振纳米传感器,是一种建立在折射率传感基础上的装置,主要依靠重金属纳米粒子(Ag, Au, Cu)的特殊的光学性质^[1-5]。这里 LSPR 指纳米粒子中具有传导能力的电子^[6],在纳米粒子周围产生电磁场,这就决定了折射率敏感基础上的传感的量^[5,7]。由于传导电子集体振荡只发生在特殊波长,所以纳米粒子展现出选择性的光子吸收,这种吸收能够很容易的用紫外-可见光谱仪探测到。前面已经表明 LSPR 消光谱波长的最大值 $\lambda_{\max}$ 依赖于纳米粒子的成分、大小、形状和纳米粒子之间的间距以及他们局域环境的介电特性,(例如,基底、溶剂和表面吸附的分子。)^[5,7-9]

以前的工作,我们已经表明 LSPR 纳米传感器对探测生物分子很有用^[2,4,10],利用纳米球刻蚀法制作的银纳米粒子的消光谱的最大值能够产生红移,这一移动与被吸附层的密度和厚度的增加一致。已经表明该生物传感可以应用于大蛋白和抗体的检测。波长移动大小的响应是由纳米粒子表面分子的大小和包裹密度决定的,探测系统的局限性由表面捕获基团和溶液中的目标分子的表面覆盖率常数决定。因为系统显示没有非特异性结合^[2],整个响应都归结于分子间选择的特异性反应。后来,优化的 LSPR 纳米传感器已经可以实现调节纳米粒子的大小和形状^[5,7]。这些研究,与理论计算相结合,揭示了提高局域在纳米粒子尖角处的电磁场强度的范围,和所有可调传感器一样都由纳米粒子周围平均产生的电磁场决定。这些发现鼓励我们将有关纳米粒子基础上的传感器知识运用到生物学的相关领域,使其有可能诊断阿兹海默症。

阿兹海默症是引起 65 岁以上人们痴呆的主要原因,并且影响大约 4 百万的美国人^[11]。现在关于此病的机理还没有统一的观点。但是,现有的数据已经表明,包括这一疾病的早期很可能是由神经影响的可溶性低聚物集结淀粉状蛋白 β (amyloid β , 简称 A β) 引起的^[12]。A β 是一种 42-氨基酸,最早是作为单节显性亚单位的大的不可溶的缩氨酸淀粉状蛋白原纤维阿兹海默症的色斑发现的。

在过去的几年里,已经发现除了低聚物外, $A\beta$ 也可以自聚成小的可溶性低聚物,对于淀粉状蛋白的扩散性配合基 (amyloid-derived diffusible ligands, 缩写为 ADDLs), 在实验上, ADDLs 将引起与记忆功能有关的神经功能紊乱^[13-15]。而且,从已患阿兹海默症的人的脑部的尸体解剖中发现, ADDL 的含量明显提高^[16]。ADDLs 的致病机理和大脑病理学中提到的检测体液中的 ADDLs 的含量能够为临床实验室诊断阿兹海默症提供分子学基础。目前,还没有这样的实验室检测存在。而且,因为 ADDLs 是有效的免疫原^[17],所以检测 ADDL-特效的抗体可以提供一种相关的诊断方法。对 ADDL 或抗-ADDL 抗体检测的很灵敏的方法是用 LSPR 纳米传感技术,它提供了在临床诊断实验室初步检测阿兹海默症的方法。这里是利用 LSPR 光谱来证明 ADDL 处理的纳米粒子对抗-ADDL 抗体之间反应的灵敏度。在实验中也表明,纳米粒子粘接层的影响是对这种传感器灵敏度的限制因素。

5.2. 芯片制作

用纳米球光刻 (NSL) 技术制作单分散性的,限制在表面的三角形银纳米粒子^[2,5]。将聚苯乙烯球 ($\sim 2.2\mu\text{L}$, 直径=400nm) 旋涂在用清洗液清洗的玻璃基底上,然后自然晾干,形成六角形闭合的单层纳米球,这就提供了一种掩模板。将样片平放在加固的真空蒸发沉积室中。先将一薄层粘接层铬 ($\sim 4\text{nm}$) 蒸镀到纳米球掩模上,以促进纳米粒子的粘接。下一步,将35nm的金属银蒸镀到样品上。蒸镀完成后,将样品放在乙醇中超声3—5分钟来去掉聚苯乙烯球掩模,玻璃基底上只留下单独的粘接层铬和银纳米粒子。用SEM测试纳米粒子的表面形貌 (图5.1)。SEM的测试结果表明单独的纳米粒子是三角形,其垂直平分线为 $\sim 90\text{nm}$,高度为 $\sim 35\text{nm}$ 。

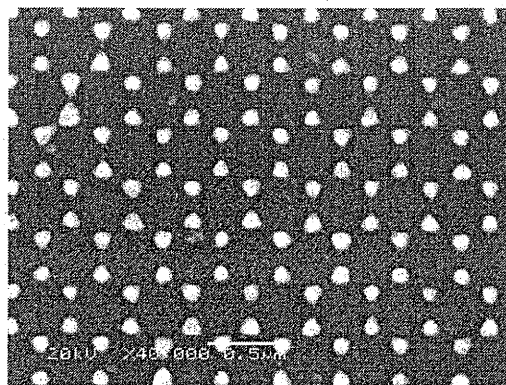


图5.1 三角形金属结构SEM表面形貌测试图

5.3.ADDL 探测

由于铬粘接层的影响, 纳米粒子的LSPR谱会有轻微的展宽和抑制(对于无铬的纳米粒子的谱的改变小于10%); 而且, 实验中增加的纳米粒子粘接层必须有苛刻的流程和化学条件, 所以, 在进行ADDL探测时, 玻璃基片和金属银之间没有蒸镀金属粘接层铬, 这不仅简化了制作步骤, 而且消除了粘接层可能对探测结果造成的影响。图5.2是纳米粒子结构和处理的示意图。当样片在乙醇溶液中浸泡24小时后, 在其表面形成一层由1:3的11-MUA/1-OT组成的自组装单分子层(SAM)。彻底清洗后, 用EDC, 零距离耦合试剂耦合1h, 将ADDLs共价结合到表面的羧基上。他们之间的反应效率, 每一个纳米粒子大约是一个整的ADDLs单层。最后, 配制低浓度的兔多克隆anti-ADDLs IgG抗体, 并且将样品浸泡在其中30min来完成化验(图5.2)。所有的生物溶液都是用10mM PBS缓冲液制备的, 而且所有的样品都是用10mM PBS和20mM PBS缓冲液彻底清洗的。

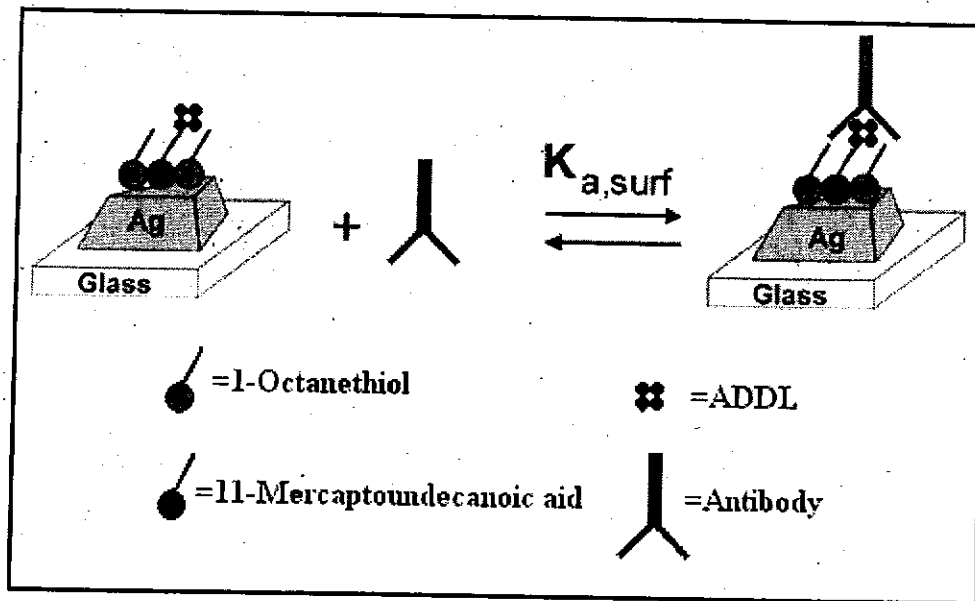


图5.2 ADDL和anti-ADDL 反应过程

每个样品在每一步浸泡之前、之中和之后的 (SAM, ADDL和anti-ADDL) 消光谱的最大值, $\lambda_{\max}$ 是用紫外-可见 (UV-vis) 光谱仪跟踪和记录的。宏观的 UV-vis 消光谱测量是用带有 CCD 探测器的 ocean optics USB4000 光纤光学耦合光谱仪来测试的。这一研究中, 所有光谱都是在标准传输几何光学, 利用非偏振光, 在宏观测量的条件下完成的, 探测直径大约 2mm。每一次消光谱的最大值是利用 ocean optics 自带软件直接测试得到的, 测试系统和所制作芯片的实物如图 5.3 所示。一般向长波长移动叫做红移, 用 (+) 表示, 往短波长方向的移动叫蓝移, 用 (-) 表示。这些波长的移动对于纳米粒子表面的物理和化学变化是比峰值强度变化更可信的表示。虽然消光谱最大值的绝对值是从一个样品变化到另一个样品, 但它并不影响 LSPR 传感器的相对响应的变化。这些变化是由于水的吸附层的介电环境的微小差别引起的, 就如同纳米粒子表面粗糙度的微小差异, 并且并不影响生物传感器的灵敏度。因此, 只用波长的相对移动 $\Delta \lambda_{\max}$ 来表示被分析物之间的结合。

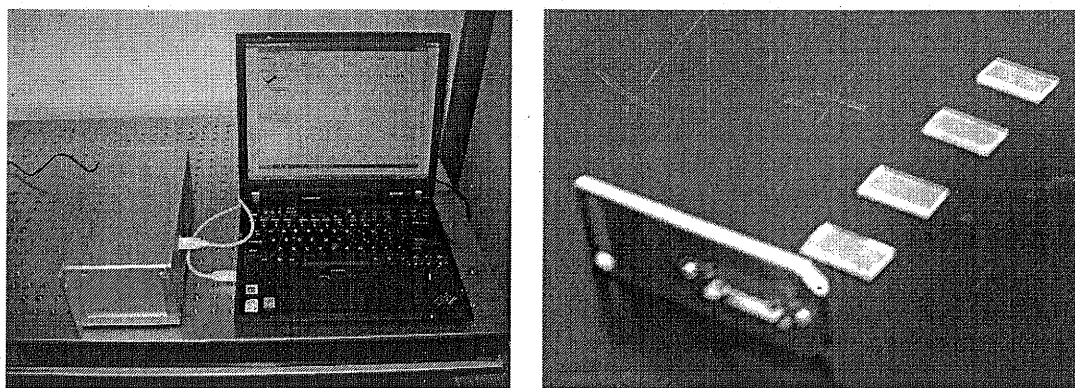


图5.3 ocean optics USB4000光纤光学耦合光谱测试系统和芯片实物图

用3:1的1mM 1-OT /1mM 11-MUA SAM层处理的Ag纳米粒子,样品的稳定性明显增强,并且在浸泡在给定浓度的ADDLs时产生了一致的红移。由于假设 anti-ADDL的出现阻止了阿兹海默症的发展,所以,这里设计的是化验探测抗体。给出ADDL ($4.5 \times N$ kDa, $N=3-24$) 和 anti-ADDL (150kDa) 分子的大小,假设所有覆盖的ADDL可以引起LSPR相对于anti-ADDL的等价的微小的上浮。另外,离Ag表面近的分子比离纳米粒子表面远的分子引起的LSPR移动的大小大。相对于 anti-ADDL来说,这一作用将放大由ADDLs引起的LSPR移动。

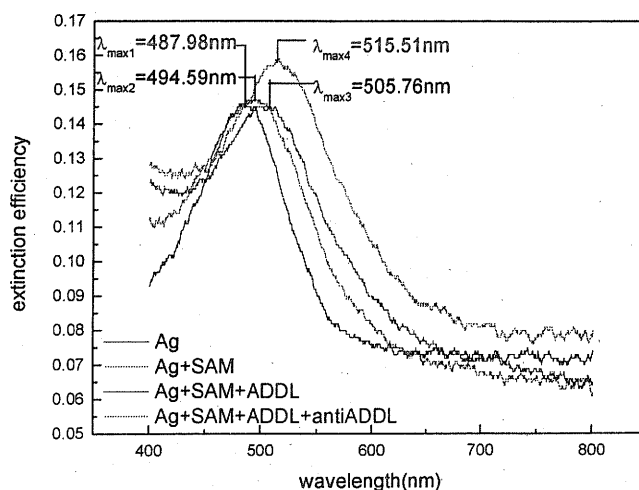


图5.4 探测低浓度100nM的anti-ADDL的Ag纳米生物传感器每一步处理的LSPR谱

单独的纯金属Ag在没有进行任何化学处理以前的测量的典型的LSPR消光波长是487.98nm (图5.4-1)。在SAM中浸泡24小时后,测量的典型的Ag纳米粒子

的LSPR消光波长是494.59nm (图5.4-2)。然后将样品浸泡在100mM EDC/100nM ADDL中1h, 以确保ADDLs中的胺基基团与表面的羧基基团之间的氨基化合物的形成。这一结合反应的LSPR波长移动是+11.76nm, 产生的LSPR消光波长是505.76nm (图5.4-3)。现在Ag纳米粒子生物传感器准备探测anti-ADDL的特殊结合。将样品在100nM anti-ADDL中浸泡30min, 结果产生LSPR波长移动为10.0 nm左右, $\lambda_{\max}$ 为515.51nm (图5.4-4)。以上实验结果表明ADDL和anti-ADDL之间发生了特异性结合, 可以用 LSPR生物传感器探测anti-ADDL的存在, 即可以用LSPR生物传感器探测阿兹海默症。需要注意的是所有测试都是在周围空气的环境下进行的。

为了研究粘接层金属铬的影响, 将玻璃基底与金属纳米粒子之间增加4~5nm的粘接层, 完成了几个非特异性结合实验。将SAM处理的纳米粒子浸泡在100nM的anti-ADDL中, 如果anti-ADDL分子只选择性的结合在ADDLs的表面, 波长移动响应, $\Delta \lambda_{\max}$ 应该在或接近0nm附近。然而, 当anti-ADDLs与SAM覆盖的纳米粒子接触时, 结果表明平均的移动是 $\Delta \lambda_{\max}=7.56\text{nm}$ (图5.5)。这一结果令人吃惊, 而我们以前研究的非特异性结合抗体与SAM处理的纳米粒子的结合所得到的波长移动是零。这表明纳米粒子和anti-ADDL分子之间发生了非特异性反应。

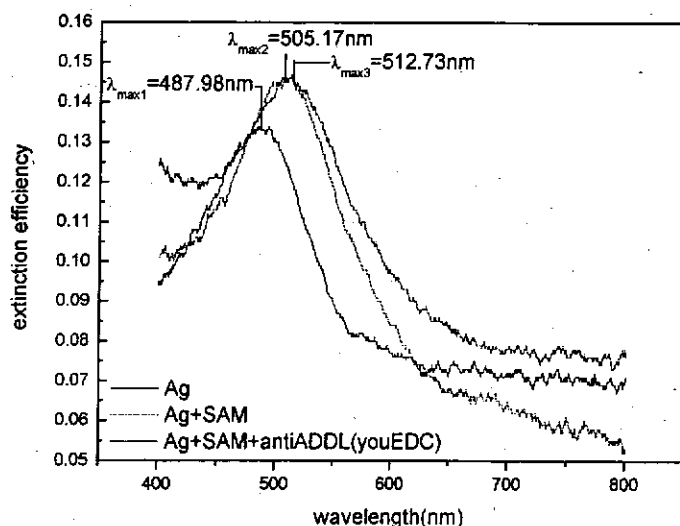


图5.5 探测100nM的anti-ADDL的Ag纳米生物传感器非特异性反应每一步处理的LSPR谱

如图5.5所示,进行探测100nM的anti-ADDL的Ag纳米生物传感器非特异性反应实验时,单独的纯金属Ag在没有进行任何化学处理以前的测量的典型的LSPR消光波长是487.98nm(图5.5-1)。在SAM中浸泡24小时后,测量的典型的Ag纳米粒子的LSPR消光波长是505.17nm(图5.5-2)。然后将样品浸泡在100mM anti-ADDL中1h,这一结合反应的LSPR波长移动是+7.56nm,产生的LSPR消光波长是512.73nm(图5.5-3)。这就提出这一研究中应用的铬粘接层妨碍生物传感器的选择性。当非特异性之间的反应的细节还没有理解时,我们假设相对于COOH, Cr比烷烃硫醇基团中的SH基团具有更高的结合亲和力^[18], Jung 等人表明Cr优先与羧基基团结合,留下可用的硫醇与anti-ADDL分子中的半胱氨酸结合形成二硫化物,增加了在纳米粒子的包含Cr的一部分之间的非特异性反应。以前的实验已经表明在三角形银纳米粒子上的拐角和结构底部存在热点。因为存在Cr的区域具有高的电磁场强度,所以由这一层引起的非特异性反应被放大。

为了分析是否Cr引起的非特异性反应能够被减弱,在SAM处理前利用正丙基三甲氧基硅烷(PTMS)来钝化Cr层。PTMS中的硅烷基团与Cr结合强烈,但与Ag不结合,并且甲基钝化表面深层的污垢。这一研究中,去掉纳米球后立即将样品浸泡在1mM PTMS溶液(乙醇)中,然后浸泡在SAM(3:11-OT/11-MUA)中24h。非特异性反应通过将SAM处理后的纳米粒子浸泡在100nM的anti-ADDL溶液中(无EDC偶联剂)1h观测。实验测试结果如图5.6所示。进行Ag纳米生物传感器钝化实验时,没有经过PTMS钝化(图5.6A)的单独的纯金属Ag测量的典

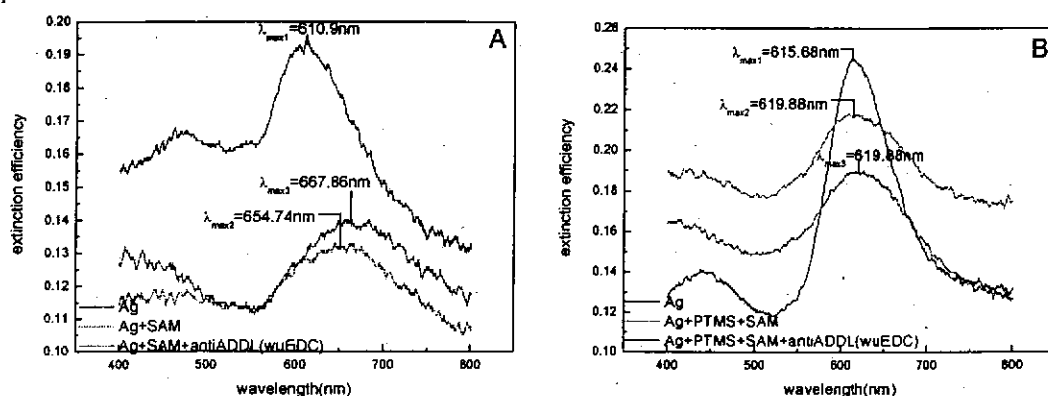


图5.6 Ag纳米生物传感器钝化实验每一步处理的LSPR谱。A 没有用PTMS钝化的LSPR谱 B 利用PTMS钝化后的实验结果

型的LSPR消光波长是610.9nm (图5.6A-1)。在SAM中浸泡24小时后,测量的典型的Ag纳米粒子的LSPR消光波长是654.74nm (图5.6A-2)。然后将样品浸泡在100mM anti-ADDL (无EDC) 中1h, 这一结合反应的LSPR波长移动是+13.12nm, 产生的LSPR消光波长是667.86nm (图5.6A-3)。经过PTMS钝化(图5.6B), SAM后然后将样品浸泡在100mM anti-ADDL (无EDC) 中1h, 这一结合反应的LSPR波长移动是0nm。这一技术极大的降低了由anti-ADDL在SAM覆盖表面所引起的非特异性反应的程度。虽然我们利用PTMS钝化Cr粘接层降低了非特异性反应的水平, 但是在钝化过程中又出现了金属银缓慢氧化的问题, 所以为了保留玻璃和Ag之间的Cr的粘接性, 又降低由Cr引起的非特异性反应的水平, 硅烷钝化方法有待于进一步优化。最好是基底和金属银之间不用粘接层就可以牢固的粘接在一起。

5.4. 折射率灵敏度标定

利用我们自行设计的样品池, 我们对图 5.3 中的 ocean optics USB4000 光纤光学耦合光谱测试系统进行了折射率标定, 流通池实物图如图 5.7 所示, 流通池有四个通道, 上下两个通道为光纤接口, 左右两个通道为液体流通通道, 用来标定的液体通过蠕动泵流经芯片表面。所用芯片为六角形排布的三角形金属纳米结构芯片, 芯片规格为, 阵列周期 400nm, 金属银厚度 50nm, 蠕动泵流速为 0.42ml/min, 具体标定过程如下: 首先是没有通入任何液体(即芯片周围为空气, 折射率 $n=1.0$) 时测试芯片的消光效率谱线(如图 5.8 黑色曲线), 然后用蠕动泵将三次蒸馏水通过芯片表面, 当谱线稳定后, 测试芯片的消光效率曲线(如图 5.8 红色曲线), 再利用 ZWA-J 阿贝折射仪测试三次蒸馏水的折射率大小为 1.3325 (测试时环境温度 $20^{\circ}\text{C} \pm 0.1$, 折射仪灵敏度 ± 0.0002), 则传感芯片的折射率灵敏度为: $\Delta \lambda_{\text{max}} / \Delta n = (564.90 - 524.63) / (1.3325 - 1.0) = 121\text{nm/RIU}$ 。

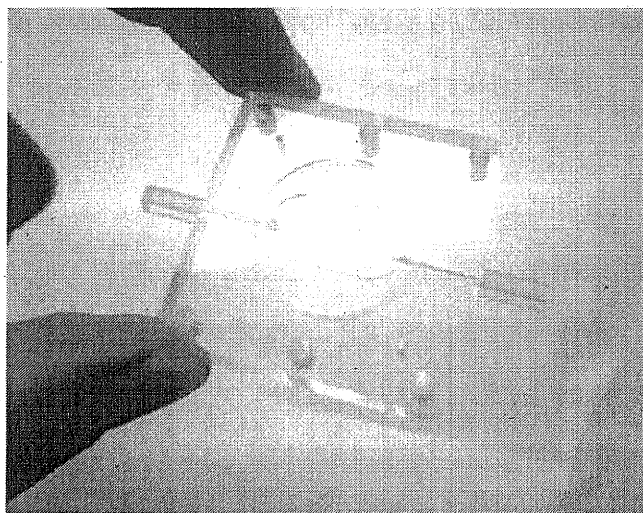


图 5.7 折射率标定的流通池实物图

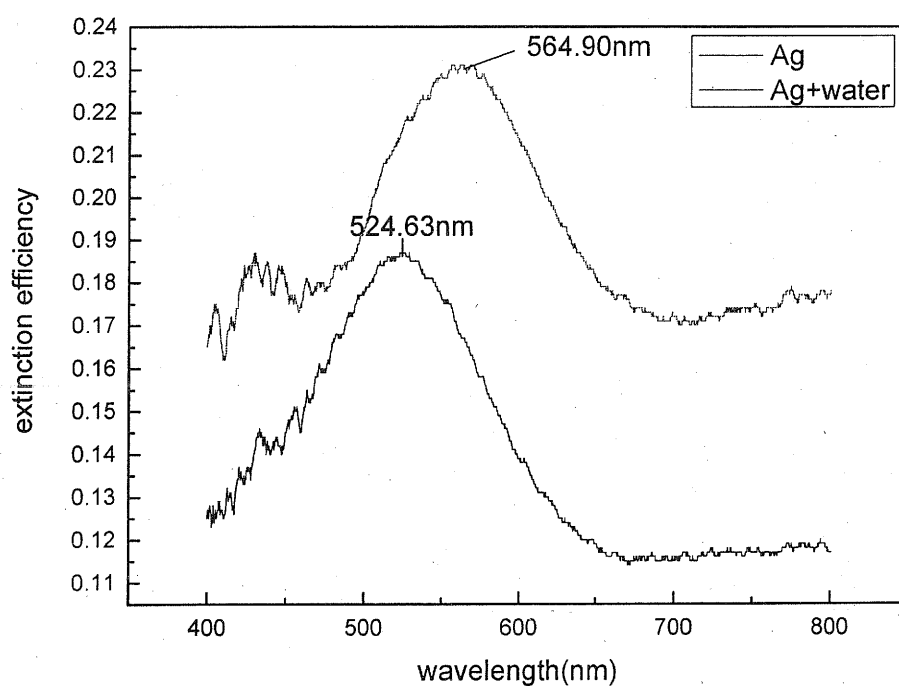


图 5.8 三角形金属纳米结构芯片表面为空气和水时的消光效率谱线

5.5.本章小结

本章提出以下两条重要发现：（1）建立在 Ag 纳米粒子的 LSPR 谱测量基础上的纳米生物传感器能够用来观测 ADDLs 和 anti-ADDLs（很可能显示阿兹海默症的分子）之间的反应；（2）Cr 粘接层限制了 Ag 纳米粒子生物传感器特异性反应的探测能力。虽然 Cr 经常被用作纳米传感器的粘接层，但是如何排除或

代替这一层从而降低非特异性反应的影响仍然是一项重要的研究内容。我们虽然利用 PTMS 钝化 Cr 粘接层降低了非特异性反应的水平, 但并没有彻底消除这一不需要的结果, 最好利用另外一些粘接方法或基底来消除粘接层与所探测目标分子之间的非特异性反应水平。

展望未来, 我们期望这一方法对理解阿兹海默症具有重要作用。通过降低非特异性反应的水平, 能够完成 anti-ADDL 的化验, 可能可以帮助理解阿兹海默症的机制。发展精确诊断阿兹海默症的方法是至关重要的, 并且将帮助数百万的人赢得时间和适当的对症治疗。随着选择性和灵敏度的进一步提高, LSPR 生物传感器将变成一种相对于传统临床化验方法更精确经济的选择。

参考文献

- [1] Malinsky, M. D.; Kelly, K. L.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 1471.
- [2] Haes, A. J.; Van Duyne, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 10596.
- [3] Haes, A. J.; Van Duyne, R. P. *Laser Focus World* 2003, 39, 153.
- [4] Riboh, J. C.; Haes, A. J.; McFarland, A. D.; Yonzon, C. R.; Van Duyne, R. P. *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 1772.
- [5] Haes, A. J.; Zou, S.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 109.
- [6] Jensen, T. R.; Kelly, K. L.; Lazarides, A.; Schatz, G. C. *J. Cluster Sci.* 1999, 10, 295.
- [7] Haes, A. J.; Zou, S.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *J. Phys. Chem. B* 2004, in press.
- [8] Jensen, T. R.; Malinsky, M. D.; Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P. *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 10549.
- [9] Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P. *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 5599.
- [10] Van Duyne, R. P.; Haes, A. J.; McFarland, A. D. *SPIE* 2003, 5223, 197.
- [11] Facts About Alzheimer's Disease (www.alz.org); Alzheimer's Disease and Related Disorders Association, Inc., 2004.

- [12] Selkoe, D. J.; Hardy, J. 2002, 298, 963.
- [13] Lambert, M. P.; Barlow, A. K.; Chromy, B. A.; Edwards, C.; Freed, R.; Liosatos, M.; Morgan, T. E.; Rozovsky, I.; Trommer, B.; Viola, K. L.; Wals, P.; Zhang, C.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998, 95, 6448.
- [14] Walsh, D. M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J. V.; Cullen, W. K.; Anwyl, R.; Wolfe, M. S.; Rowan, M. J.; Selkoe, D. J. 2002, 416, 35.
- [15] Chromy, B. A.; Nowak, R. J.; Lambert, M. P.; Viola, K. L.; Chang, L.; Velasco, P. T.; Jones, B. W.; Fernandez, S. J.; Lacor, P. N.; Horowitz, P.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L. 2003, 42, 12749.
- [16] Gong, Y.; Chang, L.; Viola, K. L.; Lacor, P. N.; Lambert, M. P.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100, 10417.
- [17] Lambert, M. P.; Viola, K. L.; Chromy, B. A.; Chang, L.; Morgan, T. E.; Yu, J. X.; Venton, D. L.; Krafft, G. A.; Finch, C. E.; Klein, W. L. *J. Neurochem.* 2001, 79, 595.
- [18] Jung, D. R.; Czanderna, A. W. *J. Vac. Sci. Technol. A* 1995, 13, 1337.
NL049670J

第6章 结束语

6.1. 全文总结

LSPR 生物传感芯片是建立在局域表面等离子共振效应的基础上的,它具有检测过程方便快捷、始终保持生物分子的活性、实验始终不需要标记物、能够实现实时检测、检测灵敏度高等优点,因此对它的研究具有重要的科学和产业价值。然而,在基片设计、工艺制作过程、芯片活化以及生物分子结合过程等方面都不同于传统的生物传感芯片。目前,业内对 LSPR 生物传感芯片的研究上仍然缺乏系统性和完整性,本文紧紧围绕 LSPR 传感芯片的制作、表面活化、生物分子结合和传感芯片的应用等方面系统的开展了深入而细致的研究工作,不仅在理论设计上发展了离散偶级近似的设计方法,而且借助于发展的设计方法,针对应用设计了几种不同金属结构的 LSPR 传感基片,并开展了实验研究工作。其主要创新点体现在:

- 1、发展了 LSPR 传感基片的金属纳米粒子结构参数的辅助设计方法。在对单个纳米粒子结构参数进行设计的方法的基础上,提出了利用离散偶级近似方法进行纳米粒子阵列结构参数辅助设计的思想,从而发展了离散偶级近似方法的设计理论,提出的具体的设计步骤对 LSPR 传感基片的结构参数设计具有重要的指导意义。
- 2、提出了通过加长与被探测的目标分子相对应的抗原分子直链长度提高抗原与目标分子(抗体)之间特异性反应的新方法。由于加长分子的臂长可以在微观构象里加大反应基团和另一反应基团的反应空间,空间构象又影响反应基团之间的反应效果,臂长越长,反应效果越明显。实验结果表明,采用将抗原臂长加长的方法,使抗原-抗体之间的特异性反应效果增强了一倍左右。
- 3、提出利用矩形分布的菱形金属纳米粒子阵列进行免疫反应的新方法。利用矩形分布的菱形金属纳米结构阵列和传统的六角形分布三角形金属纳米结构阵列对有代表性的生物素-链亲合素之间的特异性反应进行探测,探测结果表明,对于相同浓度的目标分子,矩形分布的菱形金属纳米结构阵列传感芯片

比三角形具有更高的探测灵敏度,该方法为增强抗原-抗体之间特异性反应提供了新的思路。

4、提出了解决 LSPR 传感芯片金属银氧化问题和芯片均匀性问题的解决方案。

利用我们自行设计的金包银的复合金属结构和多通道 LSPR 传感芯片解决了目前 LSPR 传感技术普遍存在的金属银氧化问题和芯片均匀性差的问题,为 LSPR 传感技术的发展注入可新的活力。

5、在探测老年痴呆症标志性蛋白 (ADDL) 的实验中,提出利用正丙基 三甲氧基硅烷 (PTMS) 来钝化 LSPR 传感芯片上的金属粘接层 Cr 层的方法,以消除非特异性反应对探测结果的影响。PTMS 中的硅烷基团与 Cr 结合强烈,但与 Ag 不结合,并且甲基钝化表面深层的污垢。所以在对 LSPR 传感芯片的基底进行活化以前利用 PTMS 对金属粘接层 Cr 层进行钝化,能够极大的降低在探测目标分子 anti-ADDL 过程中的非特异性反应。

6.2.未来工作展望

尽管我们所做的工作目前在国内处于领先地位,但是想把本领域的研究工作更进一步的向前推进,有几个问题值得思考:

- 1、 发展纳米结构参数设计的新方法。我们在第三章中提出了 DDA 辅助设计纳米结构参数的方法,但是 DDA 算法本身存在的不足之处包括:①形状文件的编写程序复杂;②计算量较大。有望解决的途径:利用 FDTD Solutions 计算消光谱,利用 FDTD Solutions 进行计算和模拟时,图形输入简单,计算量的大小可以通过调节计算步长的方法进行控制,有效的弥补了 DDA 算法的不足之处。
- 2、 突破 LSPR 传感基片的自组装制作方法的技术屏障。自组装方法在制作 LSPR 传感基片方面,具有方法简单易学、所用设备简单,可批量制作等优点。该方法要解决的主要问题是,如何克服自组装过程中所产生的缺陷,制作出大面积、少缺陷的 LSPR 传感基片?
- 3、 把 LSPR 传感芯片的折射率灵敏度做的更高。我们在第四章曾得出矩形分布的菱形纳米粒子阵列 LSPR 传感芯片的折射率灵敏度达到了 330nm/RIU 的结论,但是,矩形分布的菱形金属纳米粒子阵列还不是对生

物分子探测最灵敏的结构,如果在以后的工作中制作出尖角更多的金属微纳结构,例如五角星阵列、六角结构等金属微纳结构,那么 LSPR 传感芯片的探测灵敏度将随之提高。

攻读博士学位期间发表的论文及申请的专利:

- 1、 Shaoli Zhu, Xiangang Luo, Chunlei Du, Fei Li, Shaoyun Yin, Qiling Deng, and Yongqi Fu, "Hybrid metallic nanoparticles for excitation of surface plasmon resonance", **JOURNAL OF APPLIED PHYSICS** 101, 064701, 2007 (SCI 源刊)
- 2、 ZHU Shao-li, LUO Xian-gang, DU Chun-lei, "Discrete Dipole Approximation Aided Design Method for Nanostructure Arrays", **CHIN.PHYS.LETT**, Vol 24, No10, 2902-2905, 2007 (SCI 源刊)
- 3、 Shaoli Zhu, Fei Li, Xiangang Luo, Chunlei Du, Yongqi Fu, "A Localized Surface Plasmon Resonance Nanosensor Based on Rhombic Ag Nanoparticle Array", **Sensors and Actuators B Chemical**(accepted)
- 4、 Shaoli Zhu, Xiangang Luo, Chunlei Du, "Fabrication and characterization of rhombic silver nanostructure array used as nanosensor chip", **J. Vac. Sci. Technol. B** (submitted)
- 5、 Shaoli Zhu, Fei Li, Xiangang Luo, Chunlei Du, Yongqi Fu, "A novel bio-nanochip based on localized surface plasmon resonance spectroscopy of rhombic nanoparticles", **Nanomedicine** (submitted)
- 6、 Shaoli Zhu, Fei Li, Chunlei Du, Yongqi Fu, "Influence of Cr buffer layer on detection of amyloid-derived diffusible ligands based on localized surface plasmon polaritons", **Sensors and Actuators B Chemical**(submitted)
- 7、 李飞 罗先刚 朱少丽 杜春雷 邓启凌, 一种用于 LSPR 传感的纳米金属阵列制作方法 **纳米技术与精密工程** Vol 5, No 2, 121-124
- 8、 杜春雷 朱少丽 罗先刚 杨欢 邓启凌 一种高灵敏度的纳米生物传感器制作方法 200710176010.0
- 9、 罗先刚 朱少丽 杨欢 杜春雷 一种局域表面等离子体生化传感器的制作方法 200710176015.3
- 10、 李飞 杜春雷 朱少丽 罗先刚 光刻定位自组装填充法 2007100994977

攻读博士学位期间参与的科研项目：

- 1、中国科学院知识创新工程重要方向项目“新型传感器研究”
- 2、中国科学院创新项目“基于纳光子学的免标记生化传感技术研究”

攻读博士学位期间获奖情况：

中科院成都分院 2007 年优秀创新团队奖

中科院研究生院 2006—2007 学年三好学生