

第1章 前言

近年来,纳米材料的独特光学、磁学、电子学和力学特性已经受到研究者的广泛关注。由于纳米尺度的材料和生物高分子、蛋白质、核酸等具有相同的尺寸量级,因此它们成为了生物科学领域的研究热点。生物领域中的很多应用,诸如探测、生物传感、细胞标记、定点诊断、分子动力学研究甚至于载体治疗等,都是以生物分子和纳米材料之间的相互作用为基础的。重金属纳米颗粒由于其独特的光学特性,在这方面尤为受到关注,因为它们表现出强烈的等离子体共振光谱吸收带,而这个吸收带在普通金属的光谱中是不存在的^[1]。

金属纳米颗粒的等离子体共振吸收特性来自于它们能产生局部表面等离子体共振(LSPR)。LSPR 是金属中自由电子的一种共振现象,它发生在金属纳米结构中^[2], LSPR 的共振条件对纳米颗粒周围的介质环境十分敏感,颗粒周围吸附的生物分子将导致 LSPR 共振波长的红移。由于 LSPR 中的消光现象是由纳米颗粒对光的吸收和散射造成的,因此 LSPR 的实现不需要表面等离子体共振(SPR)那样庞大的实验装置。基于 LSPR 技术可以实现体积小、系统设置简单的生物传感实验装置,较传统的 SPR 生物传感器具有明显优势。利用这种新型研究手段对于生命科学的基础研究、医学诊断以及治疗等方面有着十分重要的意义。国内外对纳米粒子结构用于生物分子标记物和检测方面的研究工作方兴未艾,但是在设计基片上的纳米粒子阵列的过程中,存在参数多、难于设计的问题;生物分子结合过程中存在灵敏度低以及测试实验装置过于庞大等问题。本文紧密结合实际需要,对 LSPR 金属纳米粒子结构的辅助设计方法、抗原-抗体的检测、实验系统集成以及典型的医学检测应用等方面进行了深入的研究,提出了利用发展的离散偶极近似(DDA)方法对纳米结构参数进行辅助设计,并结合实际设计三角形和菱形金属纳米结构的参数;利用实验室所制作的 LSPR 三角形和菱形金属纳米结构基片对有代表性的低浓度的生物素和链亲合素之间的特异性反应进行探测;将 LSPR 实验测试系统进行集成化,制作成可直接测试的可携带型 LSPR 测试系统;最后利用集成的 LSPR 光谱测试系统对老年痴呆症的标志性蛋白-淀粉状蛋白的扩散性配合基(amyloid-derived diffusible ligands, 缩写为 ADDLs)进

行探测,实验结果证实了我们研制的 LSPR 生物传感芯片的有效性和实用性。

本章的第一节将对生物传感技术进行概述。在第二节我们结合实际需要阐述了局域表面等离子体共振生物传感技术的国内外研究现状和依然存在的问题。最后一节我们将阐述本论文的主要研究工作和进展。

1.1.生物传感技术概述

生物传感研究起源于 20 世纪 60 年代,1967 年 Updike 和 Hicks 把葡萄糖氧化酶(GOD)固定化膜和氧电极组装在一起,首先制成了第一种生物传感器,即葡萄糖酶电极。到 80 年代生物传感器研究领域已基本形成。其标志性事件是:1985 年“生物传感器”国际刊物在英国创刊;1987 年生物传感器经典著作在牛津出版社出版;1990 年首届世界生物传感器学术大会在新加坡召开,并且确定以后每隔二年召开一次。

此后包括酶传感器的生物传感器研究逐渐兴旺起来,从用一种或多种酶作为分子识别元件的传感器,逐渐发展设计出用其它的生物分子作识别元件的传感器,例如酶—底物、酶—辅酶、抗原—抗体、激素—受体、DNA 双螺旋拆分的分子等,把它们的一方固定化后都可能作为分子识别元件来选择地测量另一方。除了生物大分子以外,还可以用细胞器、细胞、组织、微生物等具有对环境某些成分识别功能的元件来做识别元件。甚至还可以用人工合成的受体分子与传感器结合来测定微生物、细胞和相关的生物分子。

与生物活性材料组合的传感器可以是多种类型的物理或化学传感器,如电化学(电位测定、电导测定、阻抗测定)、光学(光致发光、共振表面等离子体)、机械(杠杆、压电反应)、热(热敏电阻)或者电(离子或者酶场效应晶体管)等。所有这些具有生物识别功能的组合体通称为生物传感器。

按期召开的世界生物传感器学术大会记录了生物传感器技术发展的历程,总汇了这一领域的发展新动向。例如 1992 年在德国慕尼黑“国际生物传感器流动注射分析与生物工艺控制”学术会议上对生物工艺控制和在线系统进行研讨,至今仍是研究者攻关的课题。2004 年在西班牙格拉纳达会展中心召开的第八届世界生物传感器大会可以说是世界生物分析系统领域的一次大的盛会^[3],代表人数和发表论文数量都创造了历史新高,共有 700 余名来自世界各地的学者参加了本

届大会,大会涉及领域内容空前广泛,对9个专题进行了分组讨论:包括核酸传感器和DNA芯片、免疫传感器、酶传感器、组织和全细胞传感器、用于生物传感器的天然与合成受体、新的信号转导技术、系统整合/蛋白质组学/单细胞分析、生物电化学/生物燃料/微分析系统、商业发展和市场。其中,单分子/细胞分析和生物印迹生物传感器由于它们良好的发展态势及在生命科学研究中的重要位置成为与会学者讨论的热点问题。

当今的生物技术和医学诊断急需一些能够进行选择性地探测生物分子的器件。随着现代电子及生物技术的迅速发展,生物传感技术已形成一个独立的新兴的高科技领域。与传统的分析方法相比,生物传感器^[4-9]这种新的检测手段具有以下优点:(1)生物传感器是由特异性好的生物材料构成的分子识别元件,因此选择性好,一般不需要样品的预处理,样品中的被测组分的分离和检测同时完成,且测定时一般不需要加入其它试剂;(2)体积小,可以实现连续的在线监测;(3)响应快,样品用量少,且由于敏感材料是固定化的,所以可以反复多次使用;(4)传感器连同测定仪的成本远低于大型的分析仪器,便于推广普及。由于它具有选择性好、测定速度快、灵敏度高的优点,能提供有效而快速的分析手段代替传统的实验室技术,从而为生物医学、环境监测、食品医药工业及军事医学领域直接带来新的技术革命。

生物传感器是一种以生物活性物质(如酶、抗体、核酸、细胞等)为敏感单元,对被分析物具有高度选择性的现代分析仪器,利用其敏感单元对目标物进行分子识别,通过各种物理、化学换能器进行信号转换,从而检出被分析物。现代生命科学研究表明,许多生命现象无不和生物膜上物质的信息感受与物质的交换传输有关,分子识别是生物体内极其重要的基本过程。能够利用生物物质作传感器材料的最重要的因素是生物敏感膜固定化技术的发展与成熟。不仅酶、抗体、结合蛋白质等生物分子,而且细胞内的细胞器的分子集合体或细胞也可以不失其原有功能的把溶解状态固定化,这是划时代的成就,可以把生物物质做成膜、粒子、纤维等所需要的各种形状。生物传感器的基本原理如图1.1所示。

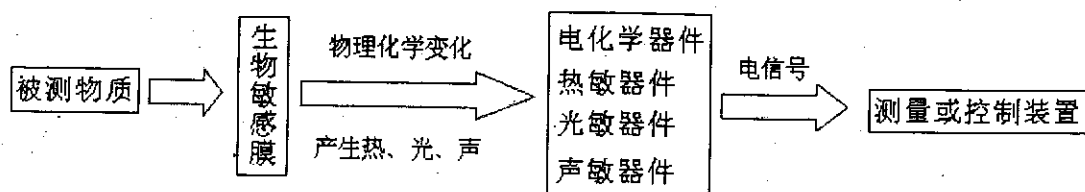


图 1.1 生物传感器的基本原理

生物传感器一般从以下 3 个角度进行分类：

(1) 根据生物传感器中生物分子识别元件上的敏感物质可分为酶传感器、微生物传感器、组织传感器、基因传感器、免疫传感器等。

(2) 生物传感器的信号转换器有电化学电极（离子选择电极）、离子敏场效应管、热敏电阻、光电转换装置、压电器件（QCM/SAM）等。据此可分为电化学生物传感器、半导体生物传感器、测热型生物传感器、测光型生物传感器、测声型生物传感器等。

(3) 根据生物分子识别信号的产生方式，传感器又可以分为生物亲和型生物传感器（基因传感器、免疫传感器）、代谢型生物传感器（微生物传感器等）和催化型生物传感器（酶传感器）。其中亲和型生物传感器（Biological affinity sensor）是指基底底物分子与固定化的敏感成分具有生物亲和作用，两者特异性的结合引起敏感成分分子结构和/或固定介质发生物理化学变化，由此构成生物传感器。以上三种分类方法可以相互交叉。

进入二十一世纪，生物传感器的研究和开发得到突飞猛进的发展。催化型生物传感器是生物传感器研究最为基础的领域，它们归根结底涉及到酶的催化反应，因而能够极大的放大生物结合信号。亲和型生物传感器的应用更为广泛，是当前研究的热点和难点，存在的主要问题是分子间结合不涉及酶的催化反应，不能够放大信号，因而很难满足实际应用的需要，所以提高信号检测灵敏度，实现亲和生物传感器的免标记检测，减少实验步骤，降低检测成本，缩短检测时间，实现实时检测分子间作用，是当前研究的热点。

生物芯片^[10]（biochip）是近年来在生命科学领域中迅速发展起来的一项高新技术，它主要是指通过微加工技术和微电子技术在固定芯片表面构建的微型生物化学分析系统，以实现细胞、蛋白质、DNA 以及其它生物组分的准确、快速、

大信息量的检测。与生物传感器用于单项检测相比,生物芯片适用于多元检测。生物芯片是由活性生物靶向物(如基因、蛋白质等)构成的微阵列(microarrays)。其概念来源于计算机芯片,它们的外形也有几分相似。常用的生物芯片分为三大类:即基因芯片、蛋白质芯片和芯片实验室。目前,基因芯片(或DNA芯片)和芯片实验室作为生物芯片的代表,已经走出实验室,开始产业化了。相对于基因芯片和芯片实验室的发展,蛋白质芯片的检测还存在着很多问题,其中最主要的是操作过程中蛋白质活性保存的问题。

众所周知,对于活性生物分子的识别,传统方法是用放射性同位素、酶或荧光做为标识物,这些方法存在安全性差、稳定性差和灵敏度低的缺点,而且还会对环境造成污染;在生物分子结构检测及生化反应动力学分析方面,激光拉曼光谱分析是常用的手段。然而,由于传统方法激发的拉曼散射截面极小,大约比荧光发射截面低12到14个数量级,如此低的拉曼光谱强度不足以提供精确数据以反映生物分子样品的结构变化。

所以现有的探测与分析手段已经不能满足生命科学技术的发展需要,急需发展高灵敏度、高效、准确的生物分子检测手段。

表面等离子体光学及微细加工技术的发展为研制集成化、多参数、多功能的传感技术提供了坚实的基础。局域表面等离子体共振(Local Surface Plasmon Resonance, LSPR)生物传感技术就是在这种环境下产生并发展起来的,它将局域表面等离子共振现象用于生物传感技术,实现集成化、多参数、多功能的检测。

LSPR生物传感技术以其无法比拟的优点,深受研究人员的青睐^[11-17],解决了传统方法无法解决的问题,利用这种新型研究手段对于生命科学的基础研究、医学诊断以及治疗等方面有着十分重要的意义。首先,检测过程方便快捷。由于LSPR生物传感技术利用生物样品的折射率的不同检测生物大分子的反应,因此无需任何物质标记被测样品,极大的简化了操作过程。若只进行定性检测,则检测结果与分析物的浓度无关,因此在检测之前,免去了对分析物进行复杂的处理过程,并避免了对分析物的损害。因此相比传统的方法,它极大的节省了人力、物力、财力,并且能以最快速度得到检测结果。其次,始终保持生物分子的活性。由于生物分子未被标记,至始至终保持着结构的完整以及天然活性,因此克服了许多传统方法如酶联免疫吸附测定(ELISA),放射免疫荧光技术等不能解决的

问题。众所周知,在 ELISA 实验中,抗原抗体结合之后,抗体的结合活性几乎完全被破坏。另外,实验中不需要标记物如:荧光染色剂以及放射性同位素,因此能避免环境污染。再次,能够实现实时检测。实时检测是 LSPR 生物传感技术独有的特点。检测生物分子的相互作用是通过计算机转换从光电池上得到的电信号来实现的。因此,它能动态地监测生物分子相互作用的全过程,作用过程中的每一时间点的变化,它都能记录下来,这是传统的检测方法所办不到的。对于比较复杂的作用过程,如有第二抗体参加的过程或有多种单克隆抗体参加,在这种情况下,传统的实验方法不能胜任,即使能勉强进行,但实验过程复杂,而且效果不佳。如果利用 LSPR 生物传感技术,就能像“流水线”一样,按照原先设计好的实验过程来执行,实时监测每一过程的进行情况,省去了许多中间复杂的处理过程。实时监测不仅能十分快速的得到实验结果,而且能得到反应过程中的相关数据,如相互作用的生物分子之间的亲和常数,解离常数以及反应开始时的结合速率等等。这些数据有助于深入探讨生物分子特异性相互作用的细节问题。而且,应用范围广泛。LSPR 生物传感技术不仅适用于抗原抗体之间的相互特异性反应检测,各种脂类、蛋白、多糖、生物膜上的信号分子以及许多生物大分子之间的相互作用都能用此方法进行检测。它还可以直接检测半抗原,而利用 ELISA 是不能直接检测半抗原的。最后,检测灵敏度高。LSPR 生物传感技术的检测灵敏度可以与放射性元素标记技术媲美。LSPR 生物传感技术的检测灵敏度是用生物样品能被检测到的最低浓度表示的,其浓度可低于 10^{-2} ng/ml。如果将这种仪器用于临床医疗检测,那么如爱滋病,乙型肝炎之类的常规化验只需要抽取病人少量的血,就立即可以得到化验结果。所以利用 LSPR 生物传感技术不但可以提高检测速度,保持生物分子的活性,还可以实现免标记,实时检测,提高检测灵敏度,而且应用范围广泛。本论文将重点研究以局域表面等离子共振现象为基础的亲和型生物传感技术,它具有方便快捷、灵敏度高、应用范围广、实时监控等多项特点。

1.2.局域表面等离子体共振生物传感技术国内外研究现状

自 Liedberg 等人于 1983 年首次运用表面等离子体共振 (SPR) 技术进行抗原抗体相互作用分析并且逐步将此项技术引入生物传感器领域以来,基于 SPR

的基础生命科学研究进行的如火如荼。经过近 30 年的发展, SPR 技术已经渗透到分子生物学、医学、环境科学等领域。国内赵晓君等人利用自行设计组装的全波长 SPR 传感装置, 对糖尿病、肾病患者蛋白进行检测, 收到了良好的效果。1993 年, Minunni 将 SPR 技术引入环境检测领域, 他们借助此项技术检测饮用水中除草剂的含量。SPR 生物传感器以其无法比拟的优点, 深受研究人员的青睐, 并走在了传感器研究的前沿, 并被认为是最有潜力的一类生物传感器。

表面等离子体共振现象在 20 世纪初被 Wood 发现。早期是在真空中利用电子束轰击金属表面产生等离子共振。在 20 世纪 60 年代, 西德科学家 Otto 和 Kretschmann 分别发明了用可见光激发表面等离子激元的方法, 到了 80 年代瑞典科学家 Liedberg 将这一技术用于生物大分子相互作用的检测。接着, 瑞典乌普萨拉的 Pharmacia 公司率先利用 SPR 技术研制新型的生物传感器, 并在 1990 年推出第一台商业化的 SPR 生物传感器, 取名为 BIAcore。从此以后, 各国便掀起了研制这种新型传感器的热潮, 相继有 BIAcore 2000、SPREETA sensor、IBIS system 以及 Quantech DPX 的问世。

我国关于 SPR 传感器的研究工作尚处于初级阶段。北京电子所及清华大学隋森芳教授在 90 年代初率先开始了这项研究, 吉林大学化学系于 1996 年开始组装 SPR 装置并开展了一些研究工作。

局域表面等离子体共振(LSPR)生物传感技术最早是 1983 年由 Bohren, C. F. 和 Huffman, D. R.^[118]提出的, 由微细加工技术组装形成的平面集成金属纳米粒子列阵, 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, 可以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 BIAcore 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。LSPR 与传统的 SPR 的各项性能比较如表 1^[118]所示:

表 1 SPR 与 LSPR 传感性能比较

特征	SPR	LSPR
免标记探测	Yes	Yes
依赖距离大小	$\approx 1,000\text{nm}$	$\approx 30\text{nm}$ (尺寸调节)
折射率灵敏度	$2 \times 10^6 \text{ nmRIU}^{-1}$	$2 \times 10^2 \text{ nmRIU}^{-1}$
模式	角度移动, 波长移动, 成像	消光, 散射, 成像
压强控制	Yes	No
化学鉴定	SPR-Raman	LSPR-SERS
可携带性	No	Yes
商业应用	Yes	No
费用	\$150,000-300,000	\$5,000(多粒子) \$ 50,000(单个纳米粒子)
空间分辨率	$\approx 10 \times 10 \mu\text{m}$	1 个纳米粒子
非特异结合	最小	最小
实时监测	时间尺度 = $10^{-1} - 10^3$, 平面传播	时间尺度 = $10^{-1} - 10^3$, 辐射传播
多元应用	Yes	Yes-possible
小分子灵敏度	Good	Better
与微流控的兼容性	Yes	Possible

由表 1 可以看出, LSPR 具有很高的空间分辨率, SPR 的空间分辨率在微米量级, 而 LSPR 的空间分辨率可以达到纳米量级; LSPR 不需要压强控制、可携带性很强, 不需要 SPR 那样庞大的实验设备, 所以产生的费用大大降低; LSPR 在

小分子检测方面的灵敏度也远远大于 SPR, 能够检测出单个纳米粒子大小的生物小分子。

国外虽然在纳米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,在设计基片上的纳米粒子阵列的过程中,存在参数多、难于设计的问题;生物分子结合过程中存在灵敏度低以及测试实验装置过于庞大等问题;这些关键的理论问题、设计方法、加工技术、实验方法等有待突破。因此研究金属纳米粒子阵列的 LSPR 光谱激发的物理机制,为实验方案设计和实验结果分析提供指导,并实现生物分子的多通道的标记与检测技术,实现在一个生物芯片上检测多种生物分子的研究成为当前纳米生物检测技术研究和发展的主要任务。

优化设计芯片的微纳结构,提高检测信号的灵敏度也是纳米生物传感的发展的主攻目标。目前制作生物芯片主要用的是原来的化学方法和一些新发展的方法如,纳米球光刻技术(nanosphere lithography, NSL),通过纳米球的自组装,在平板上得到一定排布、不同尺寸和形状的金属纳米粒子阵列。但在较大的尺度上,用这种方法会出现组装误差,难以制作大尺寸的纳米生物传感器件。为了深入、系统地研究各种形状的金属纳米粒子和不同结构在生化分析检测方面的差异,以设计最优粒子结构和检测方案,需要制作各种尺寸、形状和排布方式且能够精确控制的金属纳米粒子结构。因此优化设计芯片的微纳结构,提高检测信号的灵敏度对于推动我国纳米生物医学技术的进步,在国际学术舞台上占有一席之地具有不可估量的学术和社会价值。

LSPR 生物传感技术需要解决的问题:

(1) 进一步提高检测准确度,现在的 LSPR 传感器对低质量浓度、小分子量物质做检测是不够的,在优化 LSPR 传感结构的同时,进一步探讨相关原理、数据处理方法和提高元件的分辨力。

(2) 开拓多信道传感器:在医药研究方面,电子显示系统迫切需要多信道采集信号传感器。

(3) LSPR 生物传感技术的发展趋势是使其探测生物分子的数量、效率和灵敏度得到大大提高,而且这种局域表面等离子体(LSPR)的纳米传感技术测量方法在医学诊断上也将会有很大的应用前景。

1.3. 论文主要研究工作和进展

纵观上一节局域表面等离子体共振生物传感技术的国内外发展情况可以看出,国外的研究者已经意识到提高生物传感器的灵敏度、特异性和多通道检测的重要性,这是生物传感器走向实用化的必经之路,而国内在这方面还没有检索到相关研究。

我们在研究国外的方法中发现,几乎所有的研究者都把研究的重点放在了单色光对金属纳米粒子的电磁场分布的影响,对复色光入射时纳米粒子形状、周围介质有效折射率以及偏振光的入射光方向对其消光特性的影响却没有作更多的关注。唯一对复色光入射时周围介质有效折射率对其消光特性的影响作过分析的是美国西北大学的 Draine B T, Flatau P J 和 Schatz G C, 他们认为实验测试得到的金属纳米粒子的消光特性曲线可以利用离散偶级近似 (DDA) ^[19,20] 的方法进行数值拟合,并给出了数值拟合结果,而没有利用 DDA 的方法对金属纳米粒子的结构、周围介质有效折射率以及偏振光的入射光方向对其消光特性的影响进行辅助设计,得到相关的结构参数,用以指导实验。

除此之外,根据我们掌握的资料,国内外还没有对菱形金属纳米结构应用于抗原-抗体之间结合检测的相关研究,菱形金属纳米粒子结构具有比传统三角形金属结构更多的结合热点,可以激发更强的局域表面等离子体效应,所以在抗原-抗体检测过程中能够增强检测信号,大大提高检测灵敏度;而且在用直链型的抗原进行结合时,由于链长的影响产生的光谱信号的移动大小有待研究。

在 LSPR 传感技术的典型应用—老年痴呆症的检测^[21]的研究中,对于芯片上的金属粘接层铬对 ADDL 探测过程中非特异性反应的影响,以及利用化学试剂对金属铬进行钝化以消除粘接层的影响的方法有待突破。这其实给从事 LSPR 传感技术的研究者提出了新的要求。

基于上述问题,本论文对金属纳米粒子阵列的辅助设计方法,实验制作过程,以及金属纳米粒子的局域表面等离子体增强效应在生物分子检测方面的应用开展了深入的研究工作。为了描述局域表面等离子体共振的特点,在第二章,我们引入了局域表面等离子体共振 (LSPR) 的概念,根据 LSPR 传感技术光谱探测的原理以及传感技术的定量解释的方法,深入分析和讨论了满足实验条件下的

LSPR 金属粒子设计的方法和基本原理。以提出的优化设计理论为基础,在第三章,我们针对实验中不同的需求,优化设计了几种不同的 LSPR 金属纳米粒子的结构参数,并对其折射率灵敏度进行了理论计算,另外在本章的最后一节对计算当中采取的形状近似引起的误差进行了分析。在第四章,我们对优化设计的金属纳米粒子结构芯片进行了实验研究,实验测试的消光效率曲线与理论设计及分析的结论吻合,消光谱的峰值在误差允许的范围内一致,从而也证实了我们提出的辅助设计方法的正确性。LSPR 生物传感芯片的典型应用是作为医学检测的手段,为此我们也开展了这方面的研究工作。在第五章,我们将对研制的 LSPR 生物传感芯片在老年痴呆症标志性蛋白(ADDL)检测方面进行分析和实验,实验结果证明了研制的 LSPR 传感芯片的有效性和实用性。最后一章是我们对全文工作的总结和展望。

参考文献

- [1] Stuart DA, Haes AJ, Yonzon CR, et al. Biological applications of localised surface plasmonic phenomena[J]. *IEE Proc. Nanobiotechnol*, 152(1):13-32(2005).
- [2] Kotaro Kaiikawa, Keita Mitsui. Optical fiber bio-sensor based on localized surface plasmon resonance in gold nanoparticles[C], *SPIE*, 5593: 494-501(2004).
- [3] 周亚凤, 第八届世界生物传感器大会在格拉纳达召开, 中国科学院武汉病毒所网站, 2004 年 6 月 30 日.
- [4] 马立人、蒋中华. 生物芯片. 北京: 化学工业出版社.2001
- [5] 许春向. 生物传感器及其应用. 北京: 科学出版社.1993
- [6] 铃木周一. 生物传感器. 第一版. 北京: 科学出版社.1988
- [7] 司士辉. 生物传感器. 北京: 化学工业出版社.2003
- [8] 张先恩. 生物传感技术原理与应用. 吉林: 吉林科学技术出版社.
- [9] 彭承琳. 生物医学传感器原理及应用. 北京: 高等教育出版社.2000
- [10] Tuan Vo-Dinh. Development of a DNA biochip: principle and applications. *Sensors and Actuators B5*,152-59 (1998)
- [11] Malinsky MD, Kelly KL, Schatz GC, Van Duyne RP. Chain length dependence and sensing capabilities of the localized surface plasmon resonance of silver

- nanoparticles chemically modified with alkanethiol self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* 123(7), 1471–1482 (2001).
- [12] Haes AJ, Van Duyne RP. A nanoscale optical biosensor: sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 124(35), 10596–10604 (2002).
- [13] Haes AJ, Van Duyne RP. Nanosensors enable portable detectors for environmental and medical applications. *Laser Focus World* 39, 153–156 (2003).
- [14] Riboh JC, Haes AJ, McFarland AD, Yonzon CR, Van Duyne RP. A nanoscale optical biosensor: real-time immunoassay in physiological buffer enabled by improved nanoparticle adhesion. *J. Phys. Chem. B* 107, 1772–1780 (2003).
- [15] Haes AJ, Zou S, Schatz GC, Van Duyne RP. A nanoscale optical biosensor: the long range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of noble metal nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 108(1), 109–116 (2004).
- [16] Nylander C, Liedberg B and Lind T. Gas detection by means of surface-plasmon resonance[J]. *Sensor & Act*, 1982,3:79
- [17] Bohren, C. F.; Huffman, D. R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*; John Wiley & Sons: New York, 1983.
- [18]<http://www.springerlink.com/media/MGAT4EFQVJ2KUGT33/CONTRIBUTIONS/C/L>
- [19] Draine B T, Flatau P J, Discrete-dipole approximation for scattering calculations, *J. Opt. Soc. Am. A* 11, 1491-1499 (1994).
- [20] Draine B T, Flatau P J, 2004 User Guide for the Discrete Dipole Approximation Code DDSCAT.6.1 <http://arxiv.org/abs/astro-ph/0409262>
- [21] Facts About Alzheimer's Disease (www.alz.org); Alzheimer's Disease and Related Disorders Association, Inc., 2004.

第2章 局域表面等离子体共振生物传感技术原理

从前面一章的分析中可以得知,局域表面等离子体共振(LSPR)是近几年来新兴的一个研究领域,LSPR现象在很多领域都有重要的应用,其中LSPR生物传感技术是其中很重要的一部分。众所周知,贵金属散发的散射和吸收的光的强度是彩色玻璃美丽色彩的来源,并且已经引起几代科学家的兴趣。虽然科学家已经知道贵金属纳米粒子悬浮液的特征色彩来源于他们与光的强相互作用,纳米粒子光学领域的产生允许对材料特征(如成分、大小、形状和局域介电环境)和所观察到的金属悬浮液的颜色有更深入的理解。这对贵金属纳米粒子的光学特性的理解具有基础和实际意义。而且对系统的探测纳米尺度的结构和局域环境特征引起光学特性改变也提供一些参考。实际上,调整纳米结构的光学特征可以用来做表面增强光谱的材料^[1-5],光学过滤器^[6-7],表面等离子体装置^[8-11]和传感器^[12-26]等。LSPR微纳传感技术就是利用纳米结构的光学性质实现对生物分子进行探测。那么LSPR传感技术的基本原理是什么呢?利用LSPR传感技术所探测出来的信号又怎样进行定量解释?局域表面等离子体吸收峰的位置用什么计算方法来确定?带着这些问题,本章将详细阐述我们在LSPR生物传感技术原理方面的研究成果,这些研究成果为后面章节中纳米粒子的形状设计以及LSPR生物传感技术实验奠定了必要的理论基础。

本章的第一节介绍了局域表面等离子体共振的基本原理。在第二节,我们对共振波长位移量响应进行了定量解释。第三节对局域表面等离子体吸收峰位置的确定方法进行了阐述,这一节中,除了介绍离散偶极子模型、金属纳米结构的截面特性、DDA方法的适用判据、消光系数的求解等,还对DDA程序进行了分析和评价。最后一节是我们对本章的小结。

2.1.局域表面等离子体共振原理

金属纳米粒子的结构对光的调制作用主要依赖于纳米粒子的大小,形状,金属的种类和金属周围介质的折射率等。贵金属(如银,金,铜)纳米粒子^[12,16,19,27]都具有特殊的光学特性,即透过率光谱的峰值 $\lambda_{\max}$ 对纳米粒子的大小,形状以

及周围介质的折射率等的变化敏感。

在特定的条件下,当入射光子频率等于导电电子的集体激发频率时可以激发局域表面等离子体波 (local surface plasmon wave, LSPW), 产生局域表面等离子体共振即 LSPR (图 2.1)。LSPR 谱是入射波长与透过率的关系曲线, 利用 LSPR 谱峰对金属表面上电介质变化敏感的特点, 先在金属表面固定一层受体分子, 加在缓冲液中的配体与固定的受体的反应将导致 LSPR 谱峰发生可以观测到的位移, 这些信息数据均被传输到计算机上。通过解谱^[28]可以实时地、定量地、灵敏地监测到生物大分子的相互作用。基于这种原理的检测技术被称为 LSPR 生物传感技术。

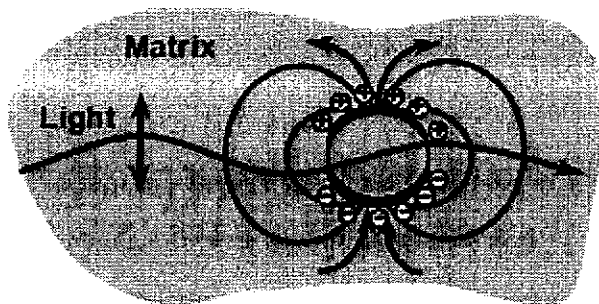


图 2.1 金属纳米粒子表面等离子体共振激发示意图

如图 2.1, 当入射光子频率与金属纳米颗粒中的自由电子的集体振动发生共振时, 会产生 LSPR。最简单的纳米颗粒光学响应模型是 Mie 理论, Mie 利用 Maxwell 方程定量的描述了表面等离子体共振, 金属纳米球消光特性的简单物理模型为: ^[29]。

$$E(\lambda) = \frac{24\pi N_A a^3 \epsilon_m^{3/2}}{\lambda \ln(10)} \left[\frac{\epsilon_i}{(\epsilon_r + \chi \epsilon_m)^2 + \epsilon_i^2} \right] \quad (2-1)$$

其中, $E(\lambda)$ 是消光效率 (即吸收和散射的和), N_A 是纳米粒子的面密度, a 是金属纳米球的半径, ϵ_m 是金属纳米球周围介质的介电常数 (假设为正值, 实数和不依赖于波长), λ 是吸收辐射的波长, ϵ_i 是金属纳米粒子介电常数的虚部, ϵ_r 是金属纳米粒子介电常数的实部, χ 是描述纳米粒子纵横比的量 (对于球等于 2)。很明显一个嵌入到外部介质的金属纳米球的 LSPR 光谱依赖于纳米粒子的半

径 a , 纳米粒子材料 (ε_i 和 ε_r), 和纳米粒子环境的介电常数 (ε_m)。而且, 当纳米粒子不是球形时, 消光谱将依赖于纳米粒子的平面内直径, 平面外高度, 和形状 (χ)。对于 5:1 纵横比的纳米粒子 χ 的值从 2 (对球) 向上增加到 17。另外, 这里考虑的样品包括由基底支持的纳米粒子。因此, LSPR 也依赖于粒子间距和基底介电常数。

假设球体颗粒材料是理想的自由电子金属, ε_r 可以由 Drude 模型表示:

$$\varepsilon_r = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma^2} \quad (2-2)$$

其中, γ 是金属的衰减频率, ω_p 是金属的共振频率^[30], 可由下式表示:

$$\omega_p = (Ne^2 / m\varepsilon_0)^{1/2} \quad (2-3)$$

其中, N 是自由电子密度, m 是电子质量。

在可见光和紫外波段, $\gamma \ll \omega_p$, 由此, Drude 模型可以简化为

$$\varepsilon_r = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (2-4)$$

发生共振时

$$\omega = \frac{\omega_p}{\sqrt{2\varepsilon_m + 1}} \quad (2-5)$$

该式又可以写为

$$\lambda = \lambda_p \sqrt{2\varepsilon_m + 1} \cong \sqrt{2} \lambda_p n_m \quad (2-6)$$

其中, $\lambda_p = 2\pi c / \omega_p$ 。

因此, 在 n_m 足够小的情况下, 共振波长和外界介质的折射率应该成线性关系。生物分子的吸附会导致金属纳米颗粒外界介质折射率的改变, 从而引起共振波长的漂移, 因此, 基于金属纳米颗粒 LSPR 现象的生物传感技术是将金属颗粒表面附近的折射率的微小变化转换成可测量的波长位移, 从而实现高灵敏度的传感。不同尺寸、不同形状的纳米颗粒有着不同的局部表面等离子体共振吸收峰。当环境介电常数变化时, 它们对应于不同的共振波长位移量, 即不同的灵敏度。

下面对共振波长位移量的响应进行定量解释。

2.2. 共振波长位移量响应的定量解释

类似于坎贝尔(姓氏)对 SPR 光谱的数量解释的处理方式^[31], LSPR 的 $\lambda_{\max}$ 移动响应, $\Delta\lambda_{\max} = \Delta R$, ΔR 以 nm 为单位, 由下式给出:

$$\Delta R = m\Delta n_{\text{eff}} \quad (2-7)$$

其中 m 表示源自纳米球自组装的银粒子形成的 LSPR 生物传感器的折射率的灵敏度。 n_{eff} 是纳米粒子表面的三层结构的有效折射率(例如, 第一层为生物素, 第二层为链亲合素, 第三层为 N_2)。这个结构的有效折射率由依赖于距离的折射率 $n(z)$, 乘以电磁场 $E(z)$ 的平方, 从 0 到无穷积分确定^[31]。

$$n_{\text{eff}} = \frac{2}{l_d} \int_0^{\infty} n(z)[E(z)]^2 dz$$

$$n(z) = \begin{cases} n_{\text{SAM}}, 0 \leq z \leq d_{\text{SAM}} \\ \theta n_{\text{AB}} + (1-\theta)n_{\text{ext}}, d_{\text{SAM}} \leq z \leq d_{\text{SAM}} + d_{\text{AB}} \\ n_{\text{ext}}, d_{\text{SAM}} + d_{\text{AB}} \leq z \leq \infty \end{cases} \quad (2-8)$$

其中 n_{SAM} , n_{AB} 和 n_{ext} 分别是自组装 (SAM) 层, 抗生物素 (AB) (或调整过的折射率用以补偿饱和状态结合的单层信息的不完整), 和外层介质的折射率, d_{SAM} 和 d_{AB} 分别是 SAM 和 AB 层的厚度。和以前的文献报道一样^[12], 电磁场表示为 $E(z) = \exp(-z/l_d)$, 这里 $l_d \sim 5-6\text{nm}$, 虽然已知真正场的分布有比较复杂的形式^[32]。对于 $d_{\text{SAM}} \leq z \leq d_{\text{SAM}} + d_{\text{AB}}$, $n(z)$ 是 AB 和 n_{ext} 的折射率的加权平均值。两种折射率根据 AB, θ 的部分覆盖率来加权, 由 Langmuir 吸附等温线给出。

$$\theta = \frac{\Gamma_{\text{AB}}}{\Gamma_{\text{AB,max}}} = \frac{K_{\text{a,surf}}[\text{AB}]}{1 + K_{\text{a,surf}}[\text{AB}]} \quad (2-9)$$

其中 Γ_{AB} 和 $\Gamma_{\text{AB,max}}$ 分别是平衡和饱和状态表面 AB 的多余量, $K_{\text{a,surf}}$ 是表面结合的亲和力常数。为了确定 LSPR 生物传感技术作为 θ 的函数, Δn_{eff} 由下式决定:

$$\Delta n_{eff} = n_{eff}(\theta) - n_{eff}(\theta = 0) \quad (2-10)$$

对方程 2-9 赋值, 并且代入方程 2-7 得到 AB LSPR 生物传感技术的绝对响应:

$$\Delta R = m\theta(n_{AB} - n_{ext}) \exp(-2d_{SAM}/l_d) [1 - \exp(-2d_{AB}/l_d)] \quad (2-11)$$

当 $\theta = 1$ 归一化的 LSPR 响应时, 传感器响应 ΔR_{max} 达到最大值, $\Delta R / \Delta R_{max}$ 由下式给出:

$$\frac{\Delta R}{\Delta R_{max}} = \theta = \frac{K_{a,surf}[AB]}{1 + K_{a,surf}[AB]} \quad (2-12)$$

因此, AB LSPR 生物传感技术的归一化响应是直接测量 AB 的部分表面覆盖率, 并且与 Langmuir 吸收等温线有相同的函数形式。归一化的传感器响应的另一个值得注意的特点是不像绝对传感器响应, 它不受纳米粒子周围电磁场分布的影响。传感器全部响应可以由以下方程描述^[33]:

$$\Delta \lambda_{max} = m\Delta n(1 - e^{-2d/l_d}) \quad (2-13)$$

这里 $\Delta \lambda_{max}$ 是波长移动响应, m 折射率的灵敏度, Δn 是由被吸附物引起的折射率的变化, d 是有效被吸附物的厚度, l_d 是特征电磁场的延迟长度。

为了研究波长移动 $\Delta \lambda_{max}$ 与蛋白质覆盖率 θ 之间的关系, 我们针对平面内长度为 100nm, 平面外高度为 50nm 的金属银纳米粒子^[34]进行描述, 具体的计算公式^[35]为:

$$\Delta \lambda_{max} = m\theta(n_{target} - n_{environment}) \exp(-2d_{SAM}/l_d) [1 - \exp(-2d_{target}/l_d)] \quad (2-14)$$

式中: m 为金属纳米粒子的折射率灵敏度, θ 目标分子的覆盖率, n_{target} 目标分子的折射率, $n_{environment}$: 金属周围介质的折射率, d_{SAM} 生物分子膜厚度, l_d 金属的电磁场衰减长度, d_{target} 目标分子的有效厚度。在其它量已知, 目标分子的覆盖率变化时, 波长移动 $\Delta \lambda_{max}$ 与覆盖率 θ 之间的关系曲线如图 2.2 所示:

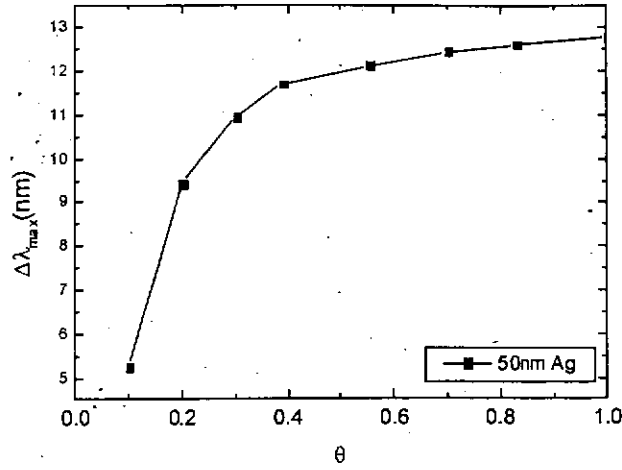


图 2.2 波长移动与平面外高度为 50nm 的银纳米粒子的蛋白质覆盖率之间的关系曲线

由图 2.2 可以看出随着蛋白质覆盖率的增加, 波长移动的大小也随之增加, 当 θ 增加到 0.8 左右后, $\Delta\lambda_{\max}$ 成为一常量。由这一变化规律可以看出, 在进行生物分子结合时, 可以利用化学试剂增大蛋白质在金属纳米粒子上的覆盖率, 以增大波长移动值的大小的方法来提高探测灵敏度。

同样对于平面内长度为 100nm, 平面外高度为 50nm 的金属银纳米粒子, 其折射率灵敏度与其它参量之间的关系为:

$$\frac{\Delta\lambda_{\max}}{n_{\text{target}} - n_{\text{environment}}} = m\theta \exp(-2d_{\text{SAM}}/l_d) [1 - \exp(-2d_{\text{target}}/l_d)] \quad (2-15)$$

上式中, 当 $m=191\text{RIU}^{-1}$, $g=1$, $d_{\text{SAM}}=6.08\text{nm}$, $l_d=6\text{nm}^{[35]}$ 时, 折射率灵敏度与目标分子的有效厚度之间的关系曲线如图 2.3 所示:

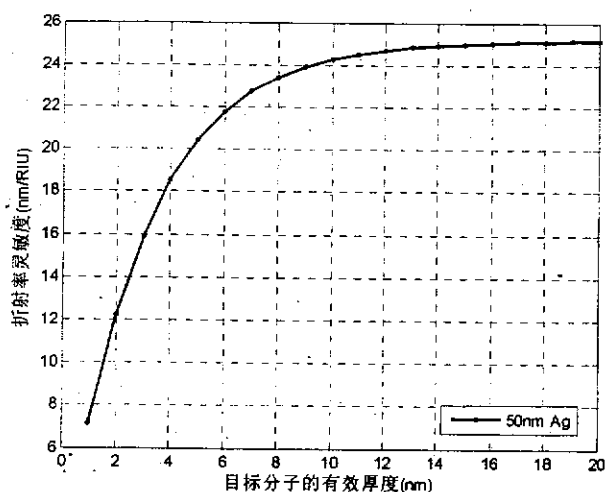


图 2.3 目标分子的有效厚度与传感芯片折射率灵敏度之间的关系曲线

由图 2.3 可以看出：折射率灵敏度与目标分子的有效厚度有关，在 1~5nm 范围内近似呈线性增长趋势，所以在实验中可以根据以上的变化趋势适当取值，使实验反应效果达到最佳。

2.3.局域表面等离子体吸收峰位置的确定

上一节中所叙的共振波长位移量响应的定量解释是进行估计计算的方法，不能具体确定局域表面等离子体吸收峰的位置，所以急需能够确定 LSPR 吸收峰位置的计算方法来设计指导实验。原则上，金属纳米粒子的光学特性，如表面等离子体的吸收峰位置可利用 TEM（扫描透射显微镜）、AFM（原子力显微镜）或 STM（扫描探针显微镜）得到的粒子形貌结合麦克斯韦方程组得到定量结果。然而，除了较小尺寸的球状及椭球状纳米粒子可利用静电近似的方法求得解析解外，对任意形状及尺寸的金属纳米粒子的光学性质的理论分析迄今依然是十分困难的。为此，人们发展了以 T 矩阵^[38]及修正长波近似理论(MLWA)^[37,39]为中心的数值处理方法，但前者对计算机要求较高且因为程序处理十分繁琐而很难得到广泛应用，后者又不能对任意形状的粒子(包括对在 SER 实验及理论上非常重要的针状及扁平状的椭球粒子)与光的相互作用进行处理^[36,37]。因此，很有必要找到一种能对任意尺寸及形状的纳米粒子的光学性质进行计算的方法。

Purcell 和 Pennypacker (1973) 提出了离散偶极子近似的方法 (DDA)^[40],

这是一个非常灵活实用的计算任意形状粒子光学属性的方法。DDA 把粒子用 N 个点偶极子来代替, 偶极子之间的距离小于波长, 每个偶极子对应一个由入射场与其它 $N-1$ 个偶极子产生场所激发的振动。通过解一个方程组可以得到电场的自洽解。这就需要在将所计算的目标粒子离散成很多个点偶极子, 建立计算模型, 以提高计算效率。

2.3.1. 离散偶极子模型

Purcell 和 Pennypacker 假设单个的偶极子排列成简单立方点阵, 让 $j=1, \dots, N$ 来标识这 N 个偶极子, 每一个偶极子 j 由一个极化张量 α_j 来表征, 可得^[41]:

$$P_j = \alpha_j E_{ext,j} \quad (2-16)$$

P_j 为第 j 个粒子的电偶极矩, $E_{ext,j}$ 为入射源与其它 $N-1$ 个偶极子振动所产生的电场之和。

如果粒子材料为各向同性, 偏振张量为对角矩阵且由相同的对角元素:

$\alpha_{j,xx} = \alpha_{j,yy} = \alpha_{j,zz}$, 即 α_j 是一个标量。

如果粒子是各向异性, 对于每一个偶极子可选一套坐标系, 偏振张量可以化为一个对角矩阵。对角元素为: $\alpha_{j,xx}$, $\alpha_{j,yy}$, $\alpha_{j,zz}$ 。

Purcell 和 Pennypacker 利用 Clausius-Mossotti 关系得到了零阶的估计值:

$$\alpha_{j,0}^0 = \frac{3}{4\pi\rho} \frac{\epsilon_{||} - 1}{\epsilon_{||} + 2} \quad (2-17)$$

ρ 是偶极子密度, 对于位于立方点阵中的点偶极子, 这个关系式在频率为零的时候是准确的。但是每一个偶极子处于激发场与辐射场的共同作用之下, 所以:

$$P_j = \alpha_j E_{ext} = \alpha_j^0 (E_{ext,j} + E_{rad,j}) \quad (2-18)$$

其中: $E_{rad,j} = \left(\frac{2}{3}\right) ik^3 P_j$, 由此可得:

$$\alpha_{j,||} = \frac{\alpha_{j,||}^0}{1 - (2/3) ik^3 \alpha_{j,||}^0} = \alpha_{j,||}^0 \left(1 - \frac{2i}{3N} (ka_{eq})^3 \frac{\epsilon_{||} - 1}{\epsilon_{||} + 2}\right)^{-1} \quad (2-19)$$

a_{eq} 是有效半径, 有: