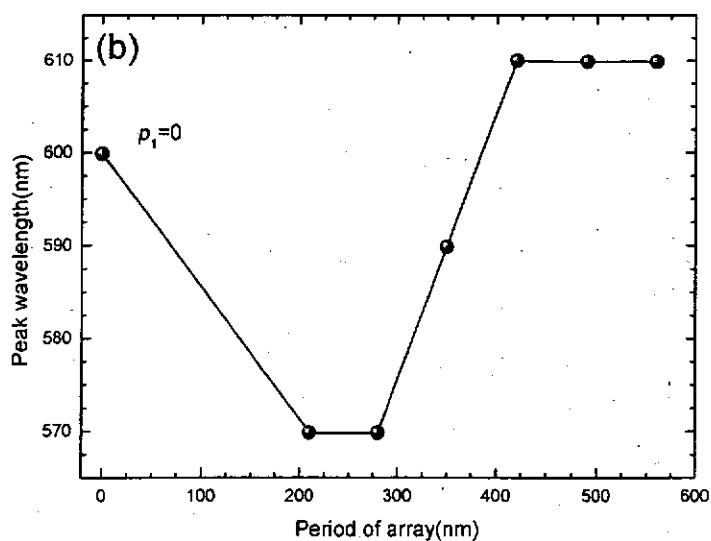
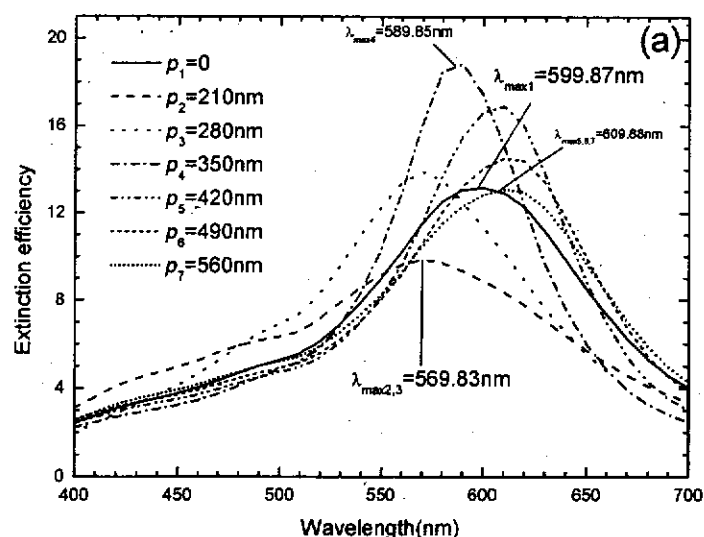


## ③ 矩形分布的菱形金属纳米粒子阵列周期参数的优化

在制作金属结构的实验中，我们可以通过不同直径的聚苯乙烯球（PS）对金属纳米粒子阵列的周期进行调节，所以通过计算周期对菱形纳米粒子阵列的影响，能够给出粒子阵列周期变化时消光效率相应的变化趋势。根据前面确定的当厚度为 40nm，当银纳米粒子阵列的周期分别取 0nm、210nm、280nm、350nm、420nm、490nm、560nm，其它参数不变时的消光效率曲线如图 3.5 所示：



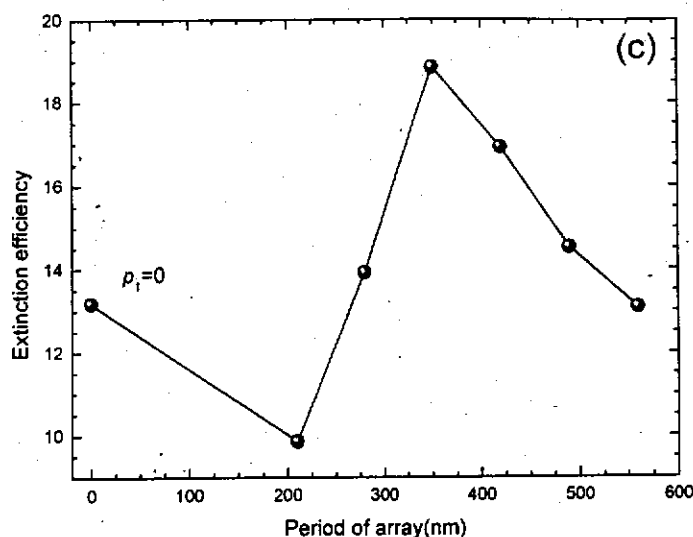


图 3.5(a) 不同周期的菱形银纳米粒子阵列消光效率理论计算结果, (b) 菱形银纳米粒子阵列的周期与消光谱峰值之间的关系曲线, (c) 菱形银纳米粒子阵列的周期与消光效率之间的关系曲线

从图 3.5(a)中可以看出, 当阵列周期为 0 时, 阵列变为单个菱形纳米粒子, 其消光效率曲线的峰值和强度不同于阵列周期变化的情况; 周期为 350nm 时消光效率谱线的半高全宽小于单个粒子, 当阵列周期为 210nm 时消光效率谱线的半高全宽大于单个粒子情况, 所以可以通过阵列的周期调节消光谱峰的位置和半高全宽的大小。由图 3.5(b)中可以看出, 除了单个粒子的情况, 随着阵列周期的增大, 消光谱峰值发生相应的红移, 到粒子阵列周期增大时, 粒子阵列之间的耦合作用减弱, 消光谱峰极值位置就不会发生红移; 由图 3.5(c)中曲线知当阵列周期取 350nm 时, 消光效率的强度达到最大, 且结合图 3.5(a)和图 3.5(b)知其消光效率的峰值在 589.85nm 处, 半高全宽达到最小, 为实验测试的最佳值。由于实验制作时材料的限制, 周期限制在 350nm~560nm 范围内时, 实验效果可以达到预期效果。根据实验条件确定周期为 440nm。

### 3.3. 折射率灵敏度的计算

#### ① 三角形金属纳米粒子折射率灵敏度的计算

银纳米粒子的消光效率对粒子周围介质的有效折射率特别敏感, 在纳米粒子应用于生物传感领域时, 就是利用的金属纳米粒子的这一性质, 所以研究金属纳

米粒子的消光效率对周围介质的敏感特性具有重要的作用。当三角形银纳米粒子周围介质的有效折射率分别取 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4，其它参数按照前面优化设计的参数得到的消光效率曲线如图 3.6 所示：

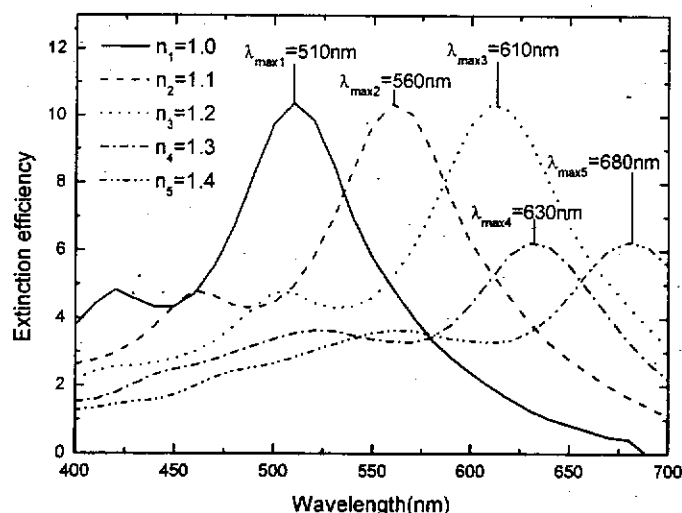


图 3.6 三角形银纳米粒子折射率灵敏度的 DDA 计算结果

由图 3.6 可以看出，当银纳米粒子周围介质的有效折射率分别取 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4 时，消光效率极值的位置分别出现在 510nm、560nm、630nm、680nm 处，计算结果表明当银纳米粒子周围介质的有效折射率增加时，消光效率的极值位置发生相应的红移，当折射率变化 0.1 时，消光效率的极值位置发生的最大红移大小为 50nm，所以该三角形金属纳米粒子的最大的折射率灵敏度为：

$$S_{\max} = \frac{\lambda_{\max 3} - \lambda_{\max 2}}{n_3 - n_2} = \frac{610 - 560}{1.2 - 1.1} = 500 \text{ nm/RIU}。由此可以推出三角形金属纳米粒子$$

对折射率的灵敏度最大可以达到 500nm/RIU。当其周围介质的折射率大于 1.4 或小于 1.0 时，消光效率的极值的位置出现在 400nm 和 700nm 以外，超出了可见光范围，对实验测试仪器的要求较高，所以不加阐述。

## ② 矩形分布的菱形金属纳米粒子阵列折射率灵敏度的计算

根据上面确定的菱形银纳米粒子阵列的结构参数，金属厚度 40nm，阵列周期 440nm，我们从理论计算上确定了这一结构参数的折射率灵敏度的大小。当菱形银纳米粒子阵列周围介质的有效折射率分别取 1.0、1.1、1.2、1.3，其它参数

不变时的消光效率曲线如图 3.7 所示:

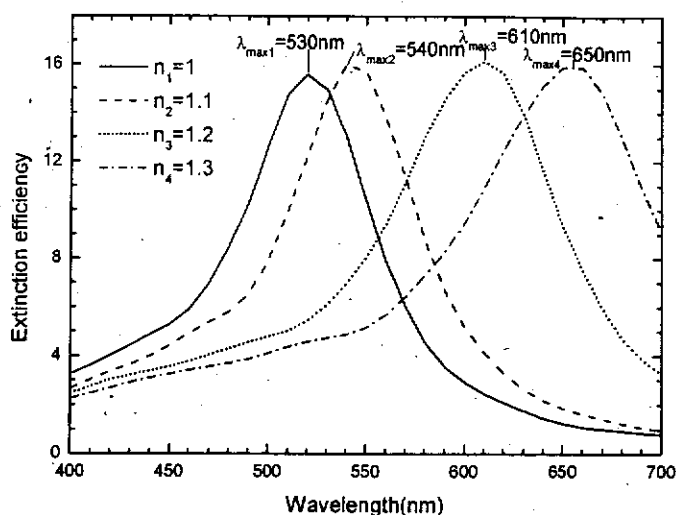


图 3.7 菱形银纳米粒子阵列的折射率灵敏度的 DDA 计算结果

由图 3.7 可以看出, 当银纳米粒子阵列周围介质的有效折射率分别取 1.0、1.1、1.2、1.3 时, 消光效率极值的位置分别出现在 530nm, 540nm, 610nm, 650nm 处, 计算结果表明当银纳米粒子阵列周围介质的有效折射率从 1.1 增加到 1.2 时, 消光效率的极值位置发生最大的红移, 大小为 70nm, 所以该阵列的最大的折射

率灵敏度为:  $s_{\max} = \frac{\lambda_{\max 3} - \lambda_{\max 2}}{n_3 - n_2} = \frac{610 - 540}{1.2 - 1.1} = 700 \text{ nm/RIU}$ 。由此可以推出菱形金

属纳米粒子阵列对折射率的灵敏度最大可以达到 700nm/RIU。当其周围介质的折射率大于 1.3 或小于 1.0 时, 消光效率的极值的位置出现在 400nm 和 700nm 以外, 对实验测试仪器的要求提高, 所以不加研究。

从图 3.7 的谱线还可以看出金属银周围介质的折射率增加时光效率的峰值的高低无明显变化, 所以菱形金属银纳米粒子阵列周围介质的折射率对消光效率的峰值的强度没有明显影响。

### 3.4. 形状近似引起的误差分析

为了分析在计算过程中的形状近似 (即将圆弧形的边等效为直边) 引起的误差, 我们将三角形结构与菱形结构的误差情况进行了对比研究, 两者的周期都为 440nm。其示意图如图 3.8 所示:

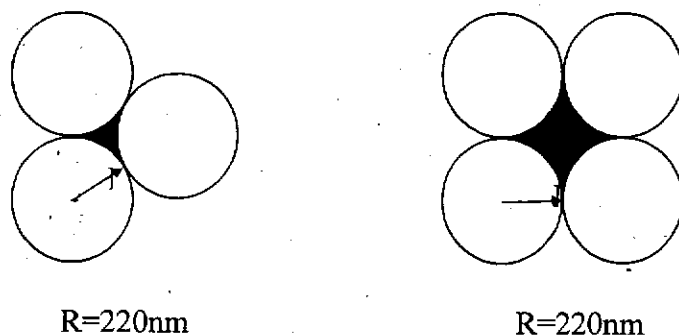


图 3.8 相同周期的三角形与菱形的结构排布示意图

## ①三角形

$$\text{弧长: } l_3 = \frac{n\pi r}{180} = \frac{60\pi}{180} \times 220 = \frac{1}{3}\pi \times 220$$

$$\text{边长: } d_3 = r = 220$$

$$\text{弧长/边长: } \frac{l_3}{d_3} = \frac{1}{3}\pi = 1.05,$$

$$\text{弧长-边长: } l_3 - d_3 = \left(\frac{1}{3}\pi - 1\right) \times 220 = 10.38346$$

$$\text{误差: } \Delta = \frac{l_3 - d_3}{l_3} = \frac{\left(\frac{1}{3}\pi - 1\right) \times 220}{\frac{1}{3}\pi \times 220} = 0.04507 = 4.5\%$$

## ②菱形

$$\text{弧长: } l_4 = \frac{n\pi r}{180} = \frac{90\pi}{180} \times 220 = \frac{1}{2}\pi \times 220$$

$$\text{边长: } d_4 = \sqrt{2} \times r = \sqrt{2} \times 220$$

$$\text{弧长/边长: } \frac{l_4}{d_4} = \frac{1}{2\sqrt{2}}\pi = 1.11$$

$$\text{弧长-边长: } l_4 - d_4 = \left(\frac{1}{2}\pi - \sqrt{2}\right) \times 220 = 34.495$$

$$\text{误差: } \Delta = \frac{l_4 - d_4}{l_4} = \frac{\left(\frac{1}{2}\pi - \sqrt{2}\right) \times 220}{\frac{1}{2}\pi \times 220} = 0.0998 = 9.98\%$$

从以上计算结果可以看出,用 DDA 进行消光效率的计算时,三角形和菱形将圆弧等效为直边所引起的误差都不大,而且对 DDA 计算的形状参数进行调节,可以使计算形状与实际制作的形状很接近。

### 3.5. 计算与实验结果的对比

根据 DDA 辅助设计的参数和实际微纳加工的能力,我们在实验室中利用自组装的方法制作出厚度为 40nm,周期为 440nm 的六角形分布的三角形银纳米粒子阵列和矩形分布的菱形银纳米粒子阵列,两者的消光效率用 Sciencetech 9055 单色仪进行了探测,实验探测和 DDA 辅助设计选择参数计算的消光效率如图 3.9 (三角形阵列)和 3.10 (菱形阵列)所示:

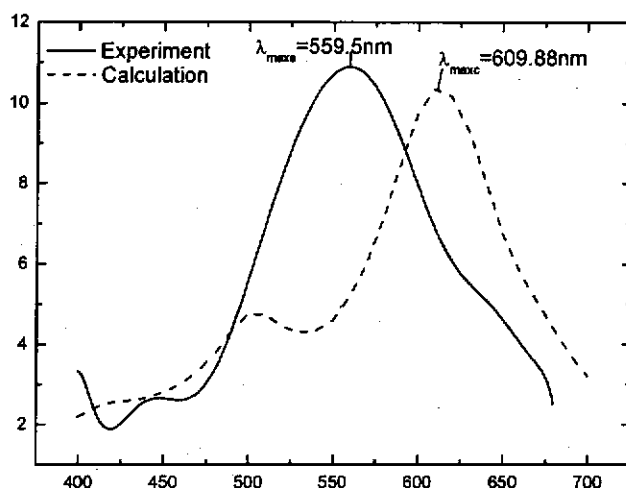
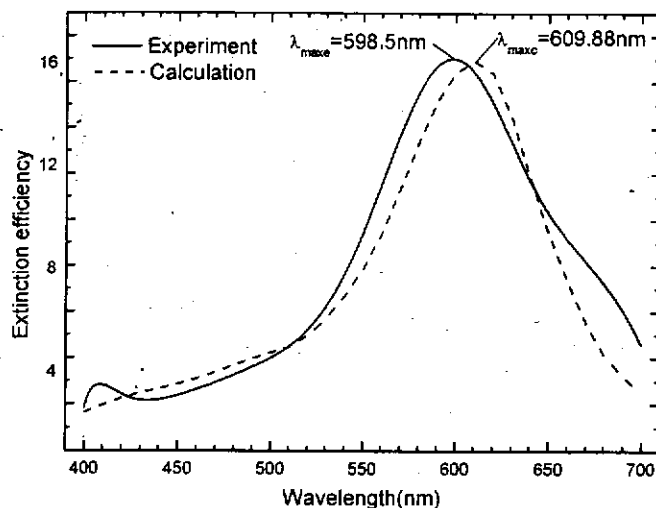


图 3.9 三角形纳米粒子阵列理论设计计算结果与实验测试结果比较图

由图 3.9 可知实验测试的三角形金属阵列消光效率的最大值出现在波长为 559.5nm 处。DDA 计算的消光效率的最大值出现在波长为 609.88nm 处(如图 3.9 虚线),实验测试的值与计算值相差比较大的原因是由于计算时,我们实验测试的是六角形分布的三角形金属纳米粒子阵列的消光效率与波长之间的关系,但是计算时由于粒子之间的距离比较大,所以忽略了粒子之间的相互耦合作用,取单个三角形金属纳米粒子进行计算,而且将粒子的弯曲的弧形边等效为直边、基底折射率等效为金属周围的有效折射率,取值为 1.2<sup>[12]</sup>,这些都是引起谱线差异的原因。



3.10 菱形阵列理论设计计算结果与实验测试结果比较图

由图 3.10 可以得到实验测试的菱形金属阵列消光效率的最大值出现在波长为 598.5nm 处。而用 DDA 计算的消光效率的最大值出现在波长为 609.88nm 处 (如图 3.10 虚线), 此值与实验测试值比较符合, 与实验测试的值相差 10nm 的原因是我们用 DDA 计算时将金属纳米粒子的形状进行了相关近似, 将基底折射率等效为金属周围的有效折射率, 而且认为粒子形状完全一致, 但是实验中的粒子形状和大小存在误差, 且实验中粒子阵列缺陷的存在也导致相关的测量误差。

总体上说, 数据比较结果表明利用我们发展的 DDA 的方法计算三角形金属纳米粒子和菱形金属阵列的消光效率是可行的。

### 3.6.本章小结

本章是上一章中发展的 DDA 方法的具体实施过程。我们针对三角形金属纳米粒子和矩形分布的菱形银纳米粒子阵列, 分四个小节分别阐述了优化设计模型、具体优化设计过程、折射率灵敏度的计算和形状近似所引起的误差分析, 从而解决了 LSPR 生物传感芯片结构参数难于设计的问题。我们优化设计了不同形状的金属纳米粒子的最佳工艺加工参数, 并对形状近似引起的误差进行了分析, 最后将实验测试结果与理论计算结果进行了比较分析。计算结果表明金属纳米颗粒的消光谱对于周围介质的介电特性具有很高的灵敏度。当环境的折射率增加时, 纳

米颗粒的共振吸收峰将产生红移。本文从理论上分析了颗粒的尺寸和形状对于传感灵敏度的影响:菱形银纳米颗粒的消光谱对于外界折射率的变化比三角形纳米银颗粒敏感。从图3.7的曲线中可以看出,最敏感的纳米颗粒可以将0.001的外部介质折射率变化转换成1nm的局部表面等离子体共振吸收峰红移,即达到700 nm/RIU的灵敏度,从而实现超高灵敏度的生物传感。

上述系统的理论设计计算结果证实了利用 DDA 计算方法辅助设计 LSPR 金属纳米粒子结构参数的正确性。为了进一步说明辅助设计的参数在实践中的可行性,在下一章,我们将对设计结果开展实验研究。

### 参考文献

- [1] R. Jin, Y. W. Cao, et al. *Science*, 2001,294:1901
- [2] B. M. I. van der Zande, M. R. Bohmer et al. *Langmuir*, 2000,16:451.
- [3] N. R. Jana, L. Gearheart, et al. *Langmuir*, 2000,17:6782.
- [4] C. J. Murphy, N. R. Jana. *Adv. Mater.*, 2002, 14:80.
- [5] Y. Y. Yu, S. S. Chang, et al. *J. Phys.Chem. B*, 1997,101:6661.
- [6] T. R. Jensen, M. L. Duval, et al. *J. Phys.Chem. B*, 1999,103:9846.
- [7] B. T. Draine, P. J. Flatau, *J. Opt. Soc. Am. A*, 1491 (1994).
- [8] N. Felidj, J. Aubard, et al. *J. Phys.Chem.*, 1999,111:1195.
- [9] G. C. Schatz. *Journal of Molecular structure (Theochem)*,2001,573:73.
- [10] B. T. Draine, P. J. Flatau, User Guide for the Discrete Dipole Approximation Code DDSCAT.6.1, <http://arxiv.org/abs/astro-ph/0409262> (2004).
- [11] P. B. Johnson and R. W. Christy, *Phys. Rev. B*,1972,6:4370.
- [12] K. L. Kelly, E. Coronado, L. Zhao, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 668.

## 第4章 LSPR 生物传感芯片的实验研究

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。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。为了验证上一章中的理论设计和分析结果的正确性，我们利用现有微细加工光学技术国家重点实验室的微细加工设备进行了 LSPR 生物传感芯片的实验研究。上一章中的三角形金属纳米结构和矩形分布的菱形金属纳米结构阵列的结构参数是我们针对生物分子检测需求而设计的，这两种形状的金属纳米结构具有对特定的抗原—抗体之间反应敏感的特性，本章将着重阐述两种结构应用于特定的抗原（生物素）—抗体（链亲合素）之间反应的实验过程，并对实验过程中引起的误差进行了分析和讨论。

LSPR 生物传感芯片的检测过程实质上是先将基片上的金属纳米结构进行活化，使金属纳米结构表面固定上活性基团—羧基，然后通过零距离耦合试剂将与被探测目标分子相对应的蛋白固定在羧基基团上，最后目标分子通过特异性反应与相对应的蛋白结合，每一步处理后都通过光学测试系统检测其波长与消光效率之间的关系谱线，以确定每一步反应的进行情况。利用这一方法，能够探测的目标分子的最低浓度达到 100nM。

### 4.1.LSPR 生物芯片的制作技术

自组装技术最初是基于带正、负电荷的高分子在基片上交替吸附原理的制膜技术，其成膜驱动力是库仑力或称静电相互作用，所以一开始选用于成膜的物质仅限于阴、阳离子聚电解质，或水溶性的天然高分子，并在水溶液中成膜。到现在用于自组装膜的材料已不限于聚电解质或水溶性的天然高分子，其成膜驱动力也从静电力扩展到氢键、电荷转移、液体表面张力、范德华力等相互作用，并已成功地制备了各种类型的聚合物纳米级超薄膜和纳米结构，同时也初步实现了自组装膜和结构的多种功能化，使其成为一种重要的超薄膜制备技术和纳米加工手

段。在纳米材料的应用过程中,纳米团簇或纳米结构的组装将是非常关键的一步。纳米团簇的超分子化学组装方法可分为两类,即胶态晶体法和模板法。胶态晶体法是利用胶体溶液的自组装特性将纳米团簇或纳米球颗粒组装成超晶格,可得到二维或三维有序的超晶格。模板法是利用纳米团簇与组装模板间的识别作用来带动团簇的组装,可应用的模板有固体膜、单分子膜、有机分子、生物分子等。

纳米球自组装技术主要采用胶态晶体法,因为胶体具有自组装的特性,而纳米球或纳米团簇又很容易在溶剂中分散形成胶体溶液,因此,只要具备合适的条件,就可以将纳米团簇或纳米球颗粒组装起来形成有规则的排布。如果将纳米团簇“溶解”于适当的有机溶剂中形成胶体溶液,就可进一步组装得到纳米团簇或纳米球颗粒的超晶格。这一自组装过程所需要的条件是:(1)硬球排斥,(2)统一的粒径,(3)粒子间的范德华力和液体表面张力,(4)体系逐渐的去稳定。其中条件(1)和(3)是纳米团簇胶体溶液体系本身固有的性质,条件(2)主要通过纳米球或团簇制备条件的控制和适当分离方法的应用来实现,因此实际上组装过程中的可操作因素主要是胶体溶液体系稳定性的控制。影响体系稳定性的重要因素包括粒径、团簇包敷分子的性质、溶剂的种类和纳米团簇的“浓度”等,由于采用胶态晶体法受上述四种条件的限制只能制作呈梅花状紧密排布的纳米球结构。

在上述方法的基础上我们发展了全新的四边形纳米球自组装技术,四边形纳米球自组装技术的核心是通过改变胶态晶体法所必需的统一的粒径这一条件来实现,即选取两种不同粒径、浓度的纳米球按一定比例进行混合配比,通过纳米球粒径、浓度和配比比例的精确控制,再选取合适的条件,将纳米球颗粒组装起来形成有规则的四边形排布。最后把制作的四边形纳米球结构通过进一步刻蚀、镀膜等工艺手段制作出多种 LSPR 结构。

#### 4.1.1. 六角形分布的三角形银纳米结构阵列

##### ① 实验所需材料

银(99.99%),金属钨蒸镀槽,玻璃基底(直径25mm),玻璃基底的预处理需要  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{NH}_4\text{OH}$ 。没有用表面活性剂,聚苯乙烯乳胶纳米球(直径为  $440\text{nm} \pm 19.5\text{nm}$ ),铬,磷酸盐缓冲液  $\text{pH} = 7.2 \sim 7.4$  (PBS),含氢硫基的十一醇酸,1-辛烷硫醇,碳二亚胺盐酸盐(EDC),牛血清蛋白(BSA),链亲合素;

生物素，纯酒精。

## ② 基底的制作过程

玻璃基底的预处理分为两步：（1）彻底清洗。在80℃时，用1:3 30%  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ 清洗基底0.5h。（2）基底处理。5:1:1  $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}/30\% \text{H}_2\text{O}_2$ 超声1h，这就进行了基底表面的亲水性处理。基片清洗和基底处理过程都要带上安全手套和穿上实验防护服。将大约2  $\mu\text{L}$ 的未掺水的纳米球溶液(10%固体)旋涂在已经预处理过的玻璃基片上，然后将纳米球放在周围环境中干燥，以形成二维的六角形闭合的紧密阵列。用一个改进的带有加固真空系统(系统压强 $10^{-7}\text{Torr}$ )的镀膜机热蒸发的方法，将金属银蒸镀到基片上。镀完银后，将样片放在无水乙醇中超声3min，将聚苯乙烯球（PS）微球去掉即可得到六角形排布的三角形银纳米结构阵列。制作出的六角形排布的三角形金属银纳米结构阵列的表面形貌图如图4.1所示，三角形金属粒子阵列的周期为440nm，金属银的厚度为40nm。

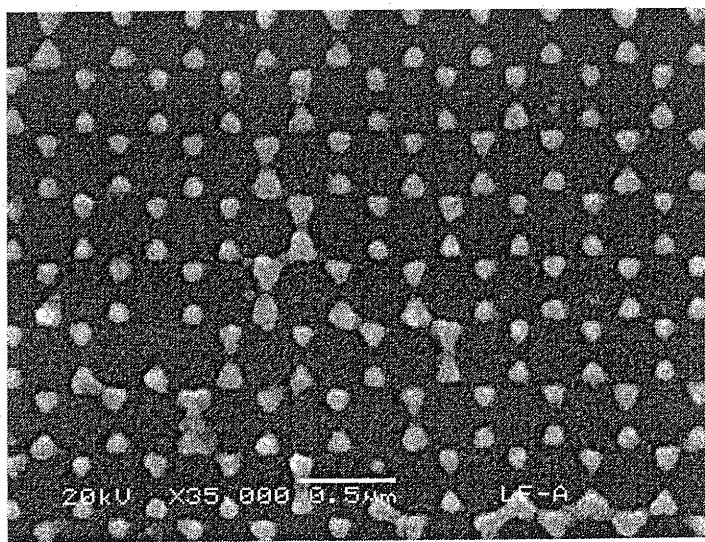


图4.1 六角形排布的三角形金属银纳米结构阵列的SEM表面形貌图

### 4.1.2. 矩形分布的菱形银纳米结构阵列

菱形金属纳米尺度的生物传感芯片的基底是利用PS微球自组装技术、金属层的真空蒸镀技术和超声技术制作而成。在制作成传感器以前基底的处理就分为五步：第一步：清洗K9玻璃基底；第二步：将500nm的PS微球乳液0.5ml、200nm玻璃微球乳液0.1ml、蒸馏水5ml、FSO（一种表面活性剂）5  $\mu\text{L}$ 混合制成

的混合微球乳液  $10\ \mu\text{l}$  滴加在基片的铬层表面, 实现自组装; 第三步: 用 HF 腐蚀掉玻璃微球; 第四步: 用真空沉积厚度约为  $50\text{nm}$  左右的银膜; 第五步: 超声波振荡去掉基片上的 PS 微球, 得到所需的矩形分布的菱形结构, 具体制作过程如图 4.2 所示:

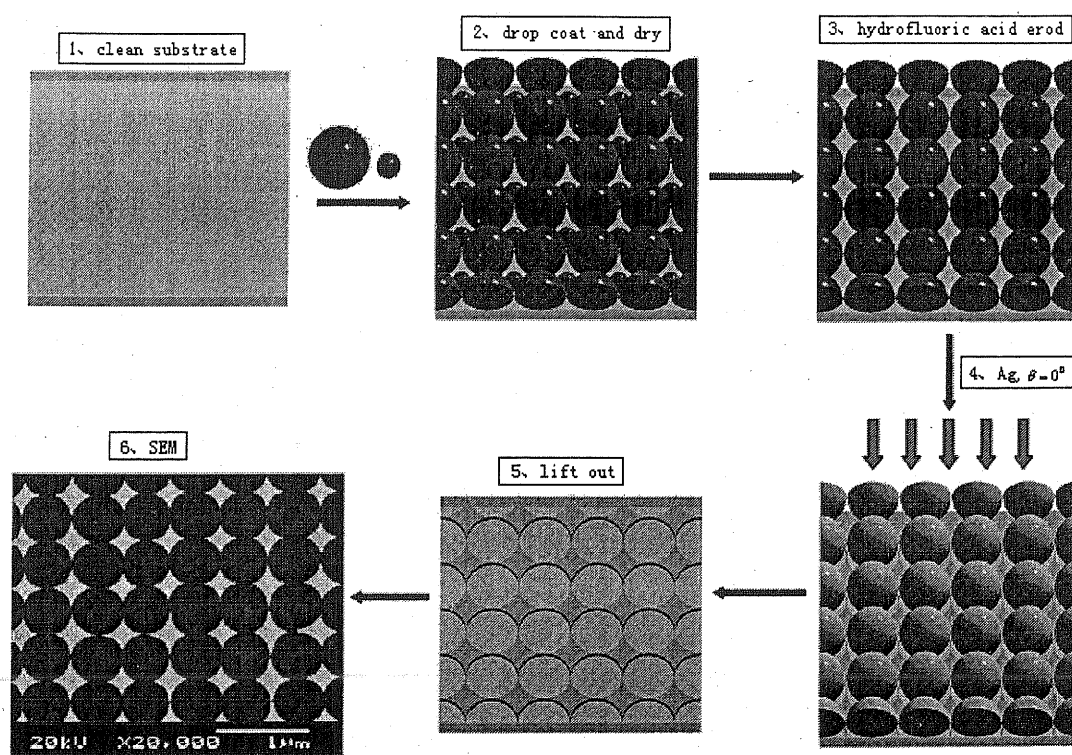


图 4.2 菱形金属结构制作过程示意图

样片测量是在室温下进行的, 扫描电镜 (SEM) 测量结果显示菱形金属的基片内宽度为  $\sim 250\text{nm}$ , 基片外高度为  $\sim 47\text{nm}$ ; 由于自组装方法本身的限制, 在自组装过程当中由于表面张力的不均匀性, PS 微球和玻璃微球的形状的不均匀性造成制作出的菱形结构大小不规则。所制作的菱形结构比相同直径的 PS 微球制作的三角形结构具有更大的表面积, 如 PS 微球直径为  $500\text{nm}$  时, 菱形结构在基底外的表面积约为  $195700\text{nm}^2$ , 三角形结构在基底外的表面积约为  $77062.5\text{nm}^2$ , 菱形结构的表面积大小是三角形的 2.5 倍, 为以后生物分子的结合提供了更大的结合面积。而且菱形结构具有 8 个尖角, 比三角形结构多 2 个尖角, 所激发的表面等离子体现象增强现象更加明显, 进一步提高了检测的效率和灵敏度。

这时的基底才可以结合生物样品, 制作成生物传感芯片, 我们的实验是利用蛋白质生物分子: 生物素和链亲合素 (抗原和抗体) 结合到金属微结构上, 形成一层生物膜, 通过特异性反应观察样品消光效率谱线的移动来检测生物分子。

## 4.2. 固定化技术研究

目前各种不同生物功能物质的固定化方法<sup>[1]</sup>大致可分为 5 类: 物理或化学吸附法、包埋法、共价键固定法、交联法和 LB 膜法。

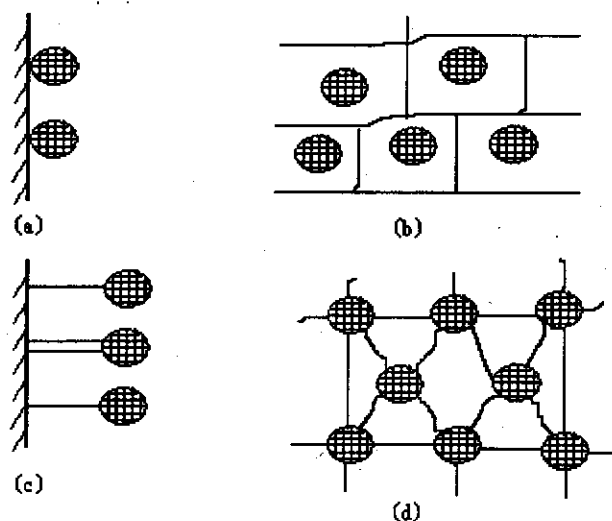


图 4.3 固定化技术

(a) 吸附法 (b) 包埋法

(c) 共价键固定法 (d) 交联法

物理吸附法无需化学试剂、极少的活化和清洗步骤, 同其它化学法相比, 对生物分子活性影响较小。但对溶液的 pH 变化、温度、离子强度和电极基底较为敏感, 需要对实验条件进行相当程度的优化, 而且生物组分容易从电极表面脱落, 所以不被广泛采用; 同其它固定化技术相比, 生物组分的寿命较短。此法主要通过极性键、氢键、疏水力或  $\pi$  电子的相互作用将生物组分吸附在不溶性的惰性载体上。常用的惰性载体有多孔玻璃、活性炭、氧化铝、纤维素膜、聚苯乙烯膜等, 以用此法固定的酶如脂肪酶、过氧化物酶等。离子交换吸附法选用具有离子交换性质的载体, 在适宜的 pH 下, 使生物分子与离子交换剂通过离子键结合起来, 形成固定化层。常用的这类载体有羧甲基纤维素、阴离子交换树脂等。用此法制备的固定化酶有葡萄糖淀粉酶等。

包埋法是将生物组分包埋于高分子三维空间网状结构中,形成稳定生物组分敏感膜。该技术的特点是:可采用温和的实验条件及多种凝胶聚合物;大多数生物组分可以很容易掺入聚合物膜中,一般不产生化学修饰,对生物组分的活性影响小;膜的孔径和几何形状可任意控制,可固定高浓度的活性生物组分等。其局限性为必须控制很多实验因素;聚合物形成过程中产生的自由基对生物组分可能产生去活化作用等。它分为聚合物膜包埋法、电聚合物膜包埋法和溶胶-凝胶膜包埋法等。

共价键合法使生物活性分子通过共价键与不溶性载体结合而固定,也称载体结合法,它多用于酶膜和免疫分子膜的制作,通常要求在低温( $0^{\circ}\text{C}$ )、低离子强度的生理 pH 条件下进行。通常包括 3 个步骤:基底电极表面的活化、生物分子的偶联、剩余价键的封闭及除去键合疏松的组分。这些步骤中每一步合适的实验条件则取决于生物组分及偶联试剂的特性。信号转换器探头的基底材料多为金属、氧化物及石墨等,所以,首先必须在基底表面引入可修饰的功能团,其主要方法有单层膜共价键固定法和聚合物膜共价键固定法、交联共聚法。这种方法的特点是结合牢固,蛋白质分子不易脱落,载体不易被生物降解实用寿命长;缺点是操作繁琐。

交联法使通过双功能基团试剂,在生物活性分子之间及分子同电极之间交联形成网状结构而使生物分子固定化的方法就称为交联法,也可将生物组分直接与载体共价交联。常用的载体如胶原蛋白膜、肠衣膜、尼龙膜、透析膜等。最常用的交联试剂是戊二醛(GA),它能在温和的条件下与生物活性分子的自由氨基反应,而发生交联反应。戊二醛分子两端的两个醛基可以分别与载体及配基上的氨基形成 Schiff 碱,将它们以五碳桥的形式连接起来。这一反应条件温和,可在  $4\sim 40^{\circ}\text{C}$  及  $\text{pH}6.0\sim 8.0$  内进行,操作亦简单,因而应用广泛。交联膜的厚度及戊二醛的含量对传感器的响应具有决定影响。当膜较厚时,由于扩散受到阻碍,致使响应信号下降,响应时间延长;戊二醛的浓度较低时,生物活性分子不会被固定化,而戊二醛的浓度较高,又易使生物活性分子失活;同时,双功能团试剂也可能不是选择性的,既可能发生分子间键合又可能发生分子内键合。采用这种方法的局限性是膜的形成条件不易确定,须仔细地控制 pH、离子强度、温度及反应时间。若生物活性分子较少时,可加入惰性蛋白质,如牛血清蛋白,以代替部分

活性物质。惰性蛋白质浓度一般不宜过大,否则,会使反应底物扩散阻力增大,使响应变慢。

LB (Langmuir-Blodgett) 膜法可把液面上有序排列的某些有机化合物逐层的转移到固定基片上,实现基片上的特定分子的高度有序排列。膜排列规则,均一性好,可以获得相当高的表面积/体积比,是制作仿生膜的有用技术。LB 膜具有如下特点:

- a) 膜厚度可精确控制,可精确到纳米级;
- b) 膜内分子排列有序而致密;
- c) 膜质双层膜同生物膜相似,是理想的仿生膜,具有极佳的生物相容性;
- d) 把功能分子固定在 LB 膜的预定位置上进行分子识别的组合设计,从而制成具有特殊功能的生物传感器。

生物传感器膜制作是一门精细的生物工艺,要求小心的操作,否则难以获得均一性的膜。此外,固定化过程中,生物材料的活性会有所损失,损失的程度因固定化方法不同而异,对每一种生物材料尽可能地寻求保留最高残余活力的方法。

由于传感器表面的固定化技术的多样性,我们针对金属银的特点,选用共价连接法对金属银表面进行活化,活化方法是利用化学试剂使金属表面带上活性的羧基基团,羧基基团可以与生物分子的活性成分发生反应,以固定生物分子。我们采用含氢硫基的十一醇酸 (11-Mercaptoundecanoic acid), 1-辛烷硫醇 (1-octanethiol (1-OT)) 两种化学试剂对金属银表面进行活化,测试其消光效率的大小,以确认活化的效果,并在此基础上进行了抗原-抗体之间的免疫实验研究,活化及免疫实验研究过程如下面一节所述。

### 4.3. 抗原-抗体免疫实验研究

抗原-抗体之间的免疫反应过程中所测试的消光效率谱线是由 Sciencetech 9055 光谱测试系统测量的,包括氙灯光源 (波长范围取 400~700nm), 光纤, 样品室, 单色仪, 光电倍增管, 电脑等。其示意图如图 4.4 所示:

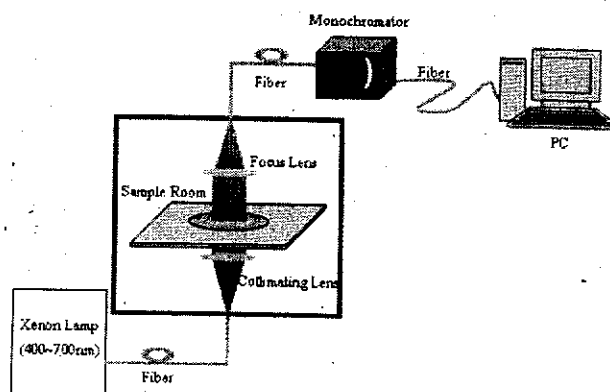


图 4.4 用 sciencetech 光谱测试系统测量银纳米结构消光效率曲线示意图

从白色光源出射的复色光经过准直透镜组后变成均匀平行光垂直照射到样品室的样品上, 经过样品后的光传输到单色仪上, 再经过光电倍增管, 光电倍增管通过数据线与个人电脑直接相连, 从电脑上就可以直接显示出透过率曲线, 然后通过后期数据处理, 对透过率取负对数就得到消光效率。测量过程分为三步: 首先确定入射波长范围 400nm~700nm 扫描背景光; 然后样品室中不放样品, 对参考光进行扫描; 最后, 将样品垂直于入射光放入样品室中进行扫描, 通过软件显示得到透过率谱线。利用 sciencetech 光谱测试系统由于预先对背景光进行了扫描, 去除了背景光, 所以可以直接得到透过率谱线, 对数据的进一步的处理提供了方便, 而且操作简单。

#### 4.3.1. 六角形分布的三角形银纳米结构阵列免疫实验过程

##### ①特异性免疫反应

为了准备用于生物传感的LSPR纳米传感器, 三角形的银纳米结构先用3:1的辛烷硫醇:1的含氢硫基的十一醇酸即(1-OT:11-MUA)浸泡, 最后在表面形成了覆盖率为0.1的单层羧酸盐活性点。由于每一个纳米结构上的硫醇分子的最大数量是60000, 也就相当于每个纳米结构上有大约~6000的羟基酸活性点。下一步, 利用零距离波长耦合试剂将生物素共价结合到羟基酸上。最后生物素结合点的多少由这种耦合试剂的产率决定。由于这个产率大约在~1-5%, 所以每个纳米结构的最大覆盖率大约只有60-300个生物素活性点。反应过程中的所需试剂的空间结构分布如图4.5所示, 生物素与链亲合素之间的反应如图4.6所示:

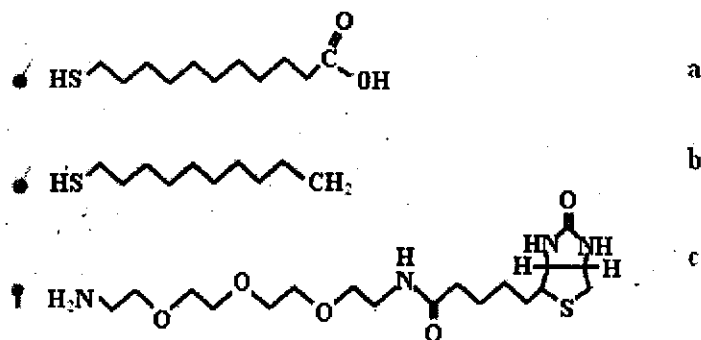


图 4.5 实验中所需试剂的空间结构分布图 a、11-MUA b、1-OT c、生物素

图 4.5 中在选择生物素 c 时, 考虑到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, 因为两物质靠近, 空间构象影响反应的效果, 臂长越长, 反应效果越明显。所以将生物素的臂长加长, 使反应效果更加明显。

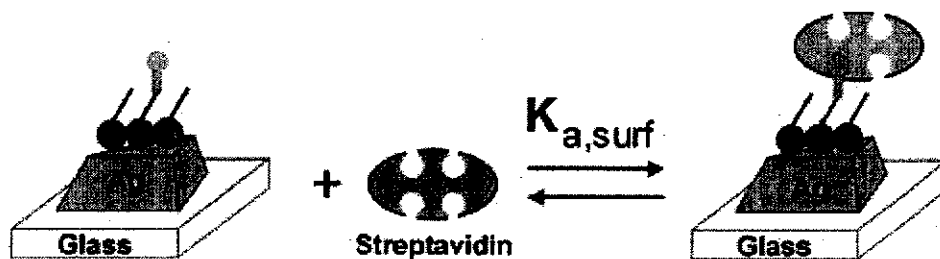


图 4.6 生物素与链亲合素的反应示意图

以上是结合生物分子以前对微结构的处理过程, 以下是对每一步结合过程的监测, 是通过光谱移动来监测的。在这一研究中, 对每一步表面处理的银纳米结构的  $\lambda_{\max}$  都要进行监测。首先测试单独的纳米结构 LSPR 光谱的  $\lambda_{\max}$ , 大小为 501.5nm。为了在银纳米结构上得到排列均匀的自组装单层 (SAM), 将样品浸泡在硫醇溶液中 24 小时。仔细清洗后用氮气干燥, 测量 SAM 后 LSPR 光谱的  $\lambda_{\max}$ , 大小为 537nm。谱线发生了红移。然后将生物素通过带有两个单位聚乙烯己二醇的氨化物结合群系共价结合到羧基酸表面的活性点上。测量结合生物素后的 LSPR 的光谱的  $\lambda_{\max}$ , 其大小为 551nm, 峰值又向右发生了移动。现在 LSPR 生物传感器才可以结合目标分析物。将样品放在 100nM 的链亲合素中, 测试

LSPR 的光谱的  $\lambda_{\max}$ ，其大小为 558.5nm，峰值又向右发生了移动。对芯片的每一步表面处理，其消光效率峰值移动的大小分别为： $\Delta\lambda_{\max ba} = 35.5nm$ ， $\Delta\lambda_{\max cb} = 14nm$ ， $\Delta\lambda_{\max dc} = 7.5nm$ 。实验测试结果如图 4.7 所示：

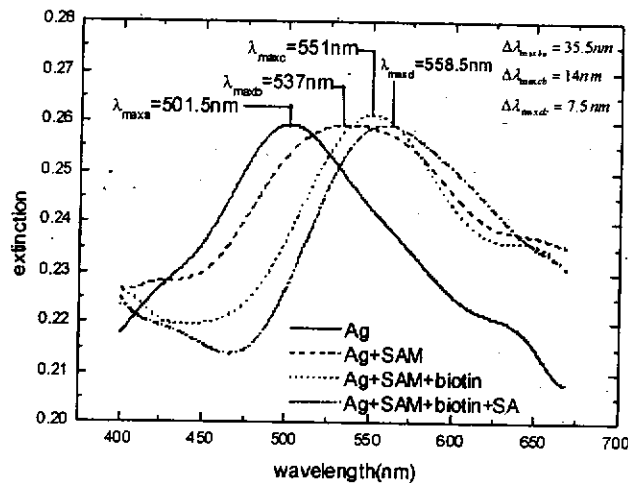


图 4.7 生物素—链亲合素消光效率测试曲线图

从以上消光效率或透过率谱线我们可以看出，由于对样片的每一步处理都引起了金属纳米结构周围折射率的变化，金属纳米结构所激发的表面等离子体共振强度对周围折射率的变化敏感，金属周围介质折射率发生变化时，消光效率谱线峰值都发生了相应的移动。

需要注意的是，实验中消光效率的测试都是在普通的大气环境下进行的，对测试条件的要求明显降低，如果将样片放在氮气环境中进行测试，测试精度将大大提高，但是对实验仪器的要求也明显提高。

## ②免疫反应的特异性和非特异性实验研究

生物芯片的免疫反应包括特异性反应和非特异性反应，抗原与非对应抗体之间不存在共价键的结合，二者不发生反应，反应过后用缓冲液冲洗，则抗体被冲洗掉，这种反应为非特异性反应。而抗原与所对应的抗体之间存在共价键的结合反应，当用缓冲溶液对芯片进行冲洗时，共价结合在芯片上的抗体不会被冲走，

多余的抗体被缓冲液冲洗干净。为了验证我们的传感芯片的特异性,我们进行了特异性和非特异性结合的实验验证,活化方法和步骤与上一节相同,在最后一步结合目标分子时,结合的为与生物素分子非对应抗体牛血清蛋白(BSA),和对应抗体链亲合素(SA),实验所用芯片为三角形金属银结构,周期400nm,厚度50nm。反应结果如图4.8所示:

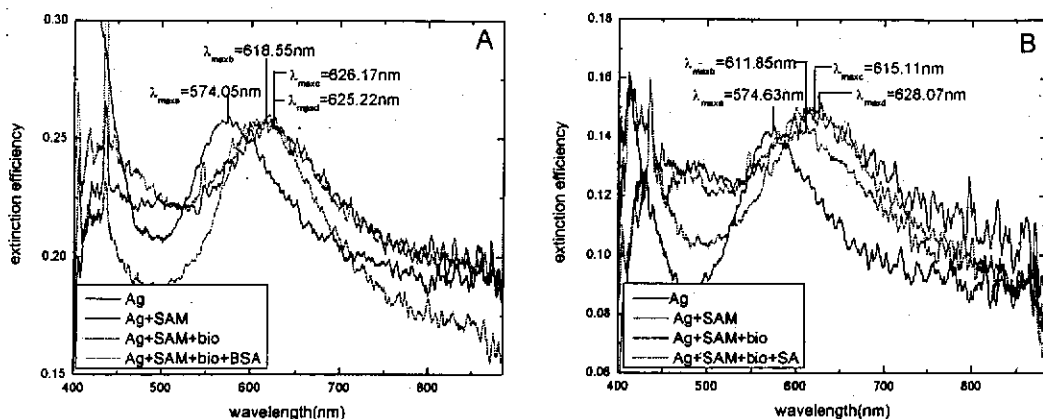


图 4.8 生物素分子的(A)非特异性结合和(B)特异性结合消光效率谱线

由反应结果可以看出当生物素发生非特异性反应时,消光谱峰值移动的大小为1nm左右(图4.8A,谱线c和d),而发生特异性反应时,消光谱峰值移动的大小为13nm左右(图4.8B,谱线c和d),特异性反应明显。检测的目标分子链亲合素的最低浓度为100nM。

#### 4.3.2. 矩形分布的菱形银纳米结构阵列免疫实验过程

##### ①免疫反应过程

为了测试生物传感器的传感特性,我们测量了对样片表面每一步处理后的样品消光效率的变化,测试范围是400~700nm。实验中每进行一次样片处理,我们都测量了相应的消光效率的峰值 $\lambda_{\max}$ (图4.9)。首先测量了单独金属结构样片的消光效率,得到样品消光效率的峰值 $\lambda_{\max}$ 大小为558.5nm(图4.9a)。然后在银纳米结构上用1-OT和11-MUA进行自组装活化处理,用乙醇溶液冲洗,氮气干燥后测量其消光效率的峰值大小为572nm(图4.9b),相应的消光效率谱线峰值移动大小为+13.5nm;这里“+”表示红移,“-”表示蓝移。接着将基片浸泡在生物素溶液中一段时间后取出,用PBS缓冲液冲洗,氮气干燥后测量消

光效率的峰值大小为 594nm (图 4.9c), 相应的消光效率谱线峰值移动大小为 +22nm; 最后结合目标分析物—链亲合素, 将样片浸泡在 100nM 的链亲合素中, 常温下反应后, 用 PBS 缓冲液冲洗, 氮气干燥后测量透过率峰值大小为 611nm (图 4.9d), 相应的消光效率谱线峰值移动大小为 +17nm, 如图 4.9 所示:

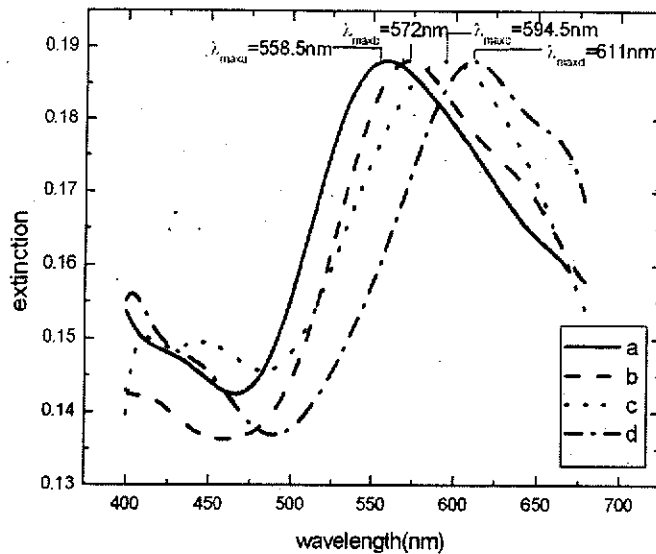


图 4.9 生物素—链亲合素结合过程消光效率测试曲线图

## ②理论解释 (离散偶级近似)

利用我们发展的离散偶级近似 (DDA) 的方法从理论上对实验中的菱形金属结构芯片的每一步探测过程进行了仿真模拟, 我们首先采用 Draine 和 Flatau 应用快速傅立叶变换和复共轭梯度方法编写的能计算纳米结构的光学性质 (包括吸收、散射和消光截面) 的 DDA Fortran 语言源程序, 并经过改进后对矩形分布的菱形银纳米结构阵列的消光性质随介电环境的变化进行了计算。计算中银的介电常数取自文献<sup>[6]</sup>, 矩形分布的菱形银纳米结构阵列中, 菱形在基底上的表面内长度为 140nm, 表面外高度为 40nm, 阵列周期为 440nm (图 4.10), 其周围介质的折射率  $m$  分别取 1.05、1.1、1.15 及 1.2, 所取折射率为有效折射率, 即将空气、基底、生物试剂的混合折射率等效为一个金属周围都存在的折射率。计算结果见图 4.11。正如静电近似理论所预言的那样, 随着纳米结构所处环境介电常数的增大, 其最大消光位置逐渐红移, 极值位置分别出现在 559.812、569.832、599.868、609.876nm。