



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106940310 B

(45)授权公告日 2019.08.23

(21)申请号 201710128016.4

(22)申请日 2017.03.06

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106940310 A

(43)申请公布日 2017.07.11

(73)专利权人 宁波大学  
地址 315000 浙江省宁波市江北区风华路  
818号

(72)发明人 曲兆珠 周骏 罗海清 吴冠毅  
姜丹 吴莎

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569  
代理人 王加贵

(51)Int.Cl.  
G01N 21/65(2006.01)  
G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件

CN 104999071 A,2015.10.28,

CN 104911819 A,2015.09.16,

CN 101450380 A,2009.06.10,

CN 104759617 A,2015.07.08,

Amey Apte等.Self-assembled vertically aligned gold nanorod superlattices for ultra-high sensitive detection of molrculed.《Nano Research》.2014,第2页第1段-第12页第1段.

审查员 林琳

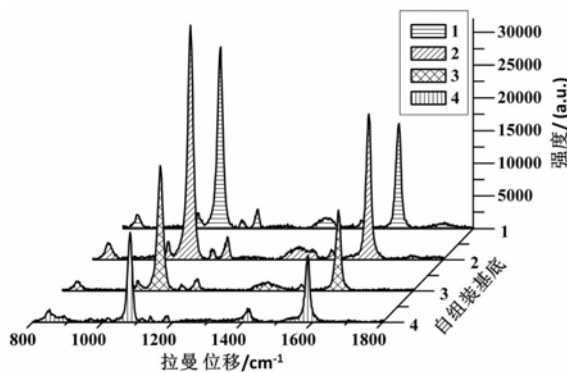
权利要求书1页 说明书11页 附图4页

(54)发明名称

一种自组装金纳米棒SERS免疫基底及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种可控自组装金纳米棒SERS免疫基底的制备方法。所述的SERS免疫基底包括单面抛光的硅片、固定在所述硅片抛光面上的金纳米棒和链接在所述金纳米棒表面的抗体。本发明首先采用双表面活性剂法制备金纳米棒，并将所述的金纳米棒滴加到经亲水处理过的所述硅片的抛光面上，所述的金纳米棒在硅片的抛光面上排列成连续的自组装结构。在制备的过程中，保持硅片相对地面倾斜35~45°，以克服咖啡圈效应，使得自组装金纳米棒SERS免疫基底具有优良的SERS增强特性和可重复性，应用于高灵敏度的免疫检测。此外，所述自组装金纳米棒SERS免疫基底的制备工艺简单、成本低廉、耗时少、产率高，易于推广，便于应用。



1. 自组装金纳米棒SERS免疫基底的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将0.45~0.55mmol/L的氯金酸溶液、0.15~0.25mmol/L的十六烷基三甲基溴化铵溶液、0.005~0.02mmol/L硼氢化钠溶液和去离子水按照体积比为10~15:10~15:5.0~6.0:1混合,静置,得到金种溶液;

2) 将0.0768mmol/L十六烷基三甲基溴化铵和0.0162mmol/L油酸钠溶液按照体积比为1:1混合至完全溶解,得到混合液;再向所述的混合液中依次加入4mmol/L硝酸银溶液,1mmol/L氯金酸溶液,体积浓度37%的盐酸溶液和10mmol/L抗坏血酸溶液,得到成长液;在所述的混合液中加入的4mmol/L硝酸银溶液,1mmol/L氯金酸溶液,37%的盐酸溶液和10mmol/L抗坏血酸溶液的体积比为50~80:1:5~8:2~4;

3) 将所述步骤1)得到的金种溶液与所述步骤2)得到的成长液按照体积比为1:2500混合,静置,得到溶胶;将所述溶胶离心1~2次后,将沉积在离心管底部的溶胶复溶并进行超声处理,得到分散的金纳米棒溶液;

4) 将单面抛光的硅片亲水处理,干燥,得到预处理的硅片;

5) 将所述步骤3)得到的金纳米棒溶液滴加到所述步骤4)得到的硅片的抛光面上,对滴加有金纳米棒溶液的硅片在10~50℃条件下干燥处理,得到固定在硅片上的金纳米棒金纳米棒;所述的金纳米棒连续排列成自组装结构;滴加金纳米棒溶液时,需将所述硅片倾斜,倾斜角度为35~45°;

6) 将抗体溶液滴加到所述步骤5)得到的固定在硅片上的金纳米棒表面,静置后,清洗硅片,对清洗后的硅片在35~38℃条件下干燥处理,得到链接有抗体的金纳米棒;

7) 向所述步骤6)得到的链接有抗体的金纳米棒上滴加封闭溶液,静置后清洗,对清洗后的硅片干燥处理,得到自组装金纳米棒SERS免疫基底;所述步骤1)~3)与步骤4)之间没有时间顺序的限制。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤3)中离心的转速为5000~6000r/min;所述离心的时间为15~25min;金纳米棒溶液的质量浓度为0.10~0.60g/L。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤5)中滴加到单位面积的所述硅片的抛光面上的金纳米棒溶液体积为0.8~2 $\mu$ L/cm<sup>2</sup>。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤6)中抗体溶液的质量浓度为1~3mg/mL。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤7)中封闭溶液为牛血清白蛋白溶液;所述牛血清白蛋白溶液的质量浓度为5~20mg/mL。

6. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述滴加到单位面积的硅片抛光面上的牛血清白蛋白溶液的体积为1~4 $\mu$ L/cm<sup>2</sup>。

## 一种自组装金纳米棒SERS免疫基底及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于纳米材料制备与纳米技术领域,具体涉及到金纳米棒的合成和一种自组装金纳米棒SERS免疫基底的制备方法。

### 背景技术

[0002] 自表面增强拉曼散射(SERS)现象被发现以来,SERS光谱技术就因其高灵敏度和无损检测的优势而被广泛关注,并得到快速发展。利用化学或者物理方法合成贵金属纳米粒子,并制备成具有SERS增强能力的活性基底,则利用SERS光谱技术就可以对位于SERS活性基底表面的分析物进行高灵敏度的指纹谱检测。因此,制备极大SERS增强能力的高性能SERS活性基底,应用于生物传感、医学成像、癌症治疗、药物传输等生物医学领域具有重要意义。

[0003] 一般地,对贵金属纳米粒子组成的SERS活性基底的性能要求主要关注它能否提供稳定的、灵敏的、可重复的SERS信号。我们知道,SERS活性基底的性能与其形貌密切相关,也与制备过程密切相关。目前,利用贵金属纳米粒子制备SERS基底的常用方法包括以下三种:第一种是将化学合成制备的贵金属纳米粒子溶胶直接滴加在基片(如硅片或玻璃等)上自然形成SERS基底;第二种是利用化学方法修饰贵金属纳米粒子和基片的表面,在静电力作用下金属纳米粒子固定在基片表面形成SERS基底;第三种是利用物理刻蚀或电化学沉积等方法,制备具有贵金属纳米粒子阵列结构的SERS基底。实际上,上述制备SERS基底的方法也存在不足。例如,第一种方法相对简单,但通常制备的SERS基底上的贵金属纳米粒子分布不均,导致SERS信号的重复性较差;第二种方法得到的SERS基底具有较强的SERS信号,但稳定性不够好;第三种方法制备的SERS基底可得到强的SERS信号,并且稳定性和重复性好,但制作工艺复杂,成本较高。

[0004] 由上可见,采用化学方法合成特殊形貌的贵金属纳米粒子,并在一定的物理条件下实现特定贵金属纳米粒子自组装结构的SERS基底的可控制备,将是一种低成本和简单高效的方法。我们根据金纳米棒特有的各向异性、独特的表面等离子体共振特性、良好的稳定性和生物相容性等特点,将金纳米棒溶胶通过溶剂蒸发法沉积到亲水处理过的硅片上形成金纳米棒连续排列的自组装结构,从而得到适合用作高性能SERS活性基底的纳米制备材料。例如现有技术中申请号为201310015549.3的专利公开的免疫活性基底的制备方法,虽然方法制备过程简单,但是所制备的金纳米粒子组装结构规模小,容易受咖啡圈效应影响,应用范围受到限制。

### 发明内容

[0005] 本发明提供一种自组装金纳米棒SERS免疫基底及其制备方法,所述的免疫基底上金纳米棒为连续排列的自组装结构,并使所述的免疫基底产生的SERS信号具有强度高和稳定的特点。

[0006] 本发明为解决上述技术问题提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供的一种自组装金纳米棒SERS免疫基底所需的材料包括单面抛光的硅片、固定在所述单面抛光硅片的抛光面上的金纳米棒和链接在所述金纳米棒表面的抗体。

[0008] 所述的单面抛光的硅片可以采用单晶硅硅片或多晶硅硅片。

[0009] 固定在所述单面抛光硅片的抛光面上的金纳米棒的侧面长度的优选范围为60~80nm。

[0010] 固定在所述单面抛光硅片的抛光面上的金纳米棒的横向直径的优选范围为20~30nm。

[0011] 固定在所述单面抛光硅片的抛光面上的金纳米棒的质量浓度的优选范围为0.10~0.60g/L。

[0012] 所述的链接在所述金纳米棒表面的抗体的质量浓度的优选范围为1~3mg/mL。

[0013] 在所述单面抛光硅片的抛光面上的金纳米棒连续排列成自组装结构,所述的自组装结构包括金纳米棒横向排列的自组装结构和金纳米棒纵向排列的自组装结构;所述的横向排列的自组装结构由所述的金纳米棒的侧面固定在硅片的抛光面上且相邻金纳米棒的侧面相连形成的肩并肩自组装结构;所述的纵向排列的自组装结构由所述的金纳米棒的端面固定在硅片的抛光面上且相邻金纳米棒的侧面相连形成的竖直排列自组装结构。

[0014] 所述的链接是抗体与所述的金纳米棒的表面以价键的形式实现的结合。

[0015] 本发明提供的所述的自组装金纳米棒SERS免疫基底的制备方法,包括以下步骤:

[0016] 1) 将0.45~0.55mmol/L的氯金酸溶液、0.15~0.25mol/L的十六烷基三甲基溴化铵溶液、0.005~0.02mol/L硼氢化钠溶液和去离子水按照体积比为10~15:10~15:5.0~6.0:1混合,静置,得到金种溶液;

[0017] 2) 将0.0768mol/L十六烷基三甲基溴化铵和0.0162mol/L油酸钠溶液按照体积比为1:1混合至完全溶解,得到混合液;再向所述的混合液中依次加入4mmol/L硝酸银溶液,1mmol/L氯金酸溶液,体积浓度37%的盐酸溶液和10mmol/L抗坏血酸溶液,得到成长液;在所述的混合液中加入的4mmol/L硝酸银溶液,1mmol/L氯金酸溶液,37%的盐酸溶液和10mmol/L抗坏血酸溶液的体积比为50~80:1:5~8:2~4;

[0018] 3) 将所述步骤1)得到的金种溶液与所述步骤2)得到的成长液按照体积比为1:2500混合,静置,得到溶胶;将所述溶胶离心1~2次后,将沉积在离心管底部的溶胶复溶并进行超声处理,得到分散的金纳米棒溶液;

[0019] 4) 将单面抛光的硅片经亲水处理和干燥后得到预处理的硅片;

[0020] 5) 将所述步骤3)得到的金纳米棒溶液滴加到所述步骤4)得到的硅片的抛光面上,在所述的金纳米棒溶液滴加到所述的硅片的抛光面上时,将所述的硅片相对于水平面保持倾斜角度为35~45°;对滴加有所述的金纳米棒溶液的硅片在10~50℃条件下干燥处理,得到固定在所述的硅片的抛光面上的金纳米棒;所述金纳米棒连续排列成自组装结构;

[0021] 6) 将所述的抗体溶液滴加到所述步骤5)中得到的所述的金纳米棒上,静置,用磷酸盐缓冲液清洗硅片,对清洗后的硅片在35~38℃条件下干燥处理,所述的抗体被链接到所述的金纳米棒表面;

[0022] 7) 向所述步骤6)中链接有所述抗体的金纳米棒上滴加牛血清白蛋白溶液,静置约4h后,用磷酸盐缓冲液缓清洗,经干燥处理,即得到自组装金纳米棒SERS免疫基底。

[0023] 所述步骤1)~3)与步骤4)之间没有时间顺序的限制。

[0024] 所述步骤3)中优选的离心转速的范围为5000~6000rpm;所述步骤3)中优选的离心时间的范围为15~25min。

[0025] 所述步骤5)中滴加到单位面积的所述硅片的抛光面上的金纳米棒溶液体积的优选范围为0.8~2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。

[0026] 所述步骤6)中滴加的抗体溶液的质量浓度的优选范围为1~3mg/mL;所述滴加到单位面积的所述固定有金纳米棒的硅片抛光面上的抗体溶液体积的优选范围为1~4 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ;

[0027] 所述步骤7)中所述牛血清白蛋白溶液的质量浓度的优选范围为5~20mg/mL;所述滴加到单位面积的硅片抛光面上的牛血清白蛋白溶液体积的优选范围为1~4 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。

[0028] 综上所述,本发明提供的自组装金纳米棒SERS免疫基底的制备方法,通过用双表面活性剂法制备尺寸均一的金纳米棒,所述的金纳米棒被滴加到亲水处理过的硅片的抛光面上形成可控的自组装结构,滴加时硅片与水平面倾斜一定角度克服了咖啡圈效应的影响,保证了所述的金纳米棒在所述硅片的抛光面上连续排列形成自组装结构,形成的自组装结构极大地增强了SERS信号强度,在极大地提高检测灵敏度的同时也极大地提高了检测的可靠性。本发明提供的自组装金纳米棒SERS免疫基底的制备方法,工艺简单、成本低廉、耗时小、产率高,易于推广,便于应用。

## 附图说明

[0029] 图1为实施例1得到的金纳米棒肩并肩自组装结构的扫描电子显微镜照片;

[0030] 图2为实施例2得到的金纳米棒竖直排列自组装结构的扫描电子显微镜照片;

[0031] 图3为实施例3得到的金纳米棒连续排列的多层自组装结构的扫描电子显微镜照片;

[0032] 图4是实施例4得到的金纳米棒连续排列的单层自组装结构的扫描电子显微镜照片;

[0033] 图5为实施例5中在实施例1~4制备的金纳米棒自组装结构上链接的拉曼标记分子4MBA的SERS光谱图;

[0034] 图6为实施例6中由实施例2的金纳米棒自组装结构制备的免疫基底检测不同浓度的前列腺特异性抗原(PSA)对应的SERS光谱图;

[0035] 图7为实施例6中由实施例2的金纳米棒自组装结构制备的免疫基底检测固定浓度PSA抗原时,在基底上不同检测点采集的1078 $\text{cm}^{-1}$ 的SERS峰强度柱状图。

## 具体实施方式

[0036] 本发明提供了一种自组装金纳米棒SERS免疫基底所需的材料包括单面抛光的硅片、固定在所述单面抛光硅片的抛光面上的金纳米棒和吸附在所述金纳米棒表面的抗体。

[0037] 本发明中,所述单面抛光的硅片的尺寸没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的硅片尺寸即可;所述单面抛光的硅片的制备方法没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的单面抛光的硅片的制备方法即可。本发明实施例中,所述单面抛光的硅片的来源购自常州天合光能有限公司。

[0038] 本发明中,所述的固定在所述单面抛光硅片的抛光面上的金纳米棒的质量浓度的

优选为0.10~0.60g/L,更为优选为0.25~0.45g/L。

[0039] 本发明中,所述的固定在所述单面抛光硅片的抛光面上的金纳米棒连续排列成自组装结构,所述的自组装结构包括金纳米棒横向排列的自组装结构和金纳米棒纵向排列的自组装结构;所述的横向排列的自组装结构由所述的金纳米棒的侧面固定在硅片的抛光面上且相邻金纳米棒的侧面相连形成的肩并肩自组装结构;所述的纵向排列的自组装结构由所述的金纳米棒的端面固定在硅片的抛光面上且相邻金纳米棒的侧面相连形成的竖直排列自组装结构。

[0040] 本发明中,所述金纳米棒的侧面长度的优选范围为60~80nm,更为优选的范围为70~75nm;所述金纳米棒的横向直径的优选范围为20~30nm,更为优选的范围为22~27nm,最优化的横向直径为25nm。

[0041] 本发明中,所述吸附在所述金纳米棒表面的抗体的质量浓度的优选范围为1~3mg/ml,更为优选的范围为1.5~2.5mg/ml,最优化的质量浓度为2.0mg/ml。所述抗体的种类包括前列腺特异性抗原抗体(anti-PSA)、甲胎蛋白抗体(anti-AFP)或糖类抗原抗体(anti-CA19-9)等抗体。

[0042] 本发明提供所述的自组装金纳米棒SERS免疫基底的制备方法,包括以下步骤:

[0043] 1) 将0.45~0.55mmol/L的氯金酸溶液,0.15~0.25mol/L的十六烷基三甲基溴化铵溶液,0.005~0.02硼氢化钠溶液和去离子水按照体积比为10~15:10~15:5.0~6.0:1混合,静置,得到金种溶液;

[0044] 2) 将0.0768mol/L和0.0162mol/L油酸钠溶液按照体积比为1:1混合至完全溶解,向混合液依次加入4mmol/L硝酸银溶液,1mmol/L氯金酸溶液,体积浓度37%的盐酸溶液和10mmol/L抗坏血酸溶液,得到成长液;所述混合液依次加入的4mmol/L硝酸银溶液,1mmol/L氯金酸溶液,37%的盐酸溶液和10mmol/L抗坏血酸溶液的体积比为50~80:1:5~8:2~4;

[0045] 3) 将所述步骤1)得到的金种溶液与所述步骤2)得到的成长液按照体积比为1:1混合,静置,将静置后的溶胶离心1~2次,离心后将沉积在离心管底部的溶胶用去离子水复溶进行超声处理,得到分散的金纳米棒溶液;

[0046] 4) 将单面抛光的硅片亲水处理,干燥,得到预处理的硅片;

[0047] 5) 将所述步骤3)得到的金纳米棒溶液滴加到所述步骤4)得到的硅片的抛光面上,对滴加有金纳米棒溶液的硅片10~50℃干燥处理;所述滴加时将硅片倾斜角度为35~45°;

[0048] 6) 将抗体溶液滴加到所述步骤5)中固定有金纳米棒的硅片抛光面上,静置后,清洗硅片,对清洗后的硅片在35~38℃条件下干燥处理,得到固定有金纳米棒链接抗体的硅片;

[0049] 7) 向所述步骤6)中固定有金纳米棒链接抗体的硅片抛光面上滴加封闭溶液,静置后清洗,对清洗后的硅片干燥处理,得到自组装结构的金纳米棒SERS免疫基底;

[0050] 所述步骤1)~3)与步骤4)之间没有时间顺序的限制。

[0051] 在本发明所述步骤1)中,所述氯金酸溶液的最优化的摩尔浓度为0.50mmol/L;所述十六烷基三甲基溴化铵溶液的最优化的摩尔浓度为0.20mol/L;所述硼氢化钠溶液的最优化的摩尔浓度为0.01mol/L。

[0052] 在本发明所述步骤1)中,所述的静置时间的优选范围为2~6h,最优化的静置时间为4h。

[0053] 在本发明所述步骤1)中,所述氯金酸溶液、十六烷基三甲基溴化铵溶液、硼氢化钠溶液和去离子水的最优化的体积比为12.5:12:5.5:1。

[0054] 在本发明所述的步骤2)和步骤3)中,所述的溶液的混合方式没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的混合溶液的技术方案即可。

[0055] 在本发明所述的步骤3)中,所述离心转速的优选范围为5000~6000rpm,更为优选的范围为5500rpm;所述离心时间的优选范围为15~25min,最优化的离心时间为20min。

[0056] 在本发明所述的步骤3)中,所述的静置时间的优选范围为10~12h,最优化的静置时间为11h。

[0057] 在本发明所述的步骤3)中,所述的溶胶复溶的溶剂是去离子水,去离子水的电导率是 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 。

[0058] 在本发明所述的步骤3)中,所述超声清洗功率的优选范围为100~150w,最优化的超声清洗功率为120w;所述超声清洗时间的优选范围为15~30min,最优化的超声清洗时间为20min。

[0059] 在本发明所述的步骤4)中,将单面抛光的硅片亲水处理,干燥,得到预处理的硅片。所述硅片亲水处理的方法优选包括以下步骤:

[0060] I、将单面抛光的硅片置于酸性溶液进行超声清洗;

[0061] II、将超声清洗后的硅片用去离子水冲洗;

[0062] III、将去离子水冲洗后的硅片置于碱性清洗液进行超声清洗,超声清洗后的硅片用去离子水冲洗;

[0063] IV、将所述步骤III冲洗后的硅片用酸性清洗液超声清洗,最后用去离子水冲洗,得到亲水处理的硅片。

[0064] 本发明所述硅片亲水处理的步骤I中,所述酸性溶液包括体积浓度为50%的 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 溶液和体积浓度为20%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液。

[0065] 本发明所述硅片亲水处理的步骤III中,所述碱性清洗液包括体积浓度为10%的 $\text{NH}_4\text{OH}$ 和体积浓度为20%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的水溶液。

[0066] 本发明所述硅片亲水处理的步骤IV中,所述酸性清洗液包括体积浓度为20%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和体积浓度为10%的 $\text{HCl}$ 的水溶液。

[0067] 本发明所述硅片亲水处理的步骤中,所述超声清洗过程采用的超声清洗功率的优选范围为100~150w,最优化的超声清洗功率为120w;所述超声清洗时间的优选范围为15~30min,最优化的超声清洗时间为20min。

[0068] 在本发明所述的步骤4)中,所述的硅片干燥温度的优选范围为35~38 $^{\circ}\text{C}$ ,最优化的干燥温度为37 $^{\circ}\text{C}$ ;所述的硅片干燥时间的优选范围为10~14h,最优化的干燥时间为12h。

[0069] 在本发明所述的步骤5)中,所述金纳米棒溶液滴加到所述硅片的抛光面上单位面积的体积的优选范围为0.8~2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ,更为优选的范围为1.2~1.8 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ,最优化的体积为1.5 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。

[0070] 在本发明所述的步骤5)中,所述滴加有金纳米棒溶液的硅片的干燥温度的优选范围为10~20 $^{\circ}\text{C}$ ,最优化的干燥温度为15 $^{\circ}\text{C}$ 。所述滴加有金纳米棒溶液的硅片的干燥时间的优选范围为2~6h,最优化的干燥时间为4h。

[0071] 在本发明所述的步骤5)中,所述滴加时倾斜硅片的最优化倾斜角度为40 $^{\circ}$ 。

[0072] 在本发明所述的步骤6)中,所述抗体溶液的质量浓度的优选范围为1~3mg/mL,更为优选的范围为1.5~2.5mg/mL,最优化的质量浓度为2mg/mL。所述抗体溶液滴加到所述固定有金纳米棒的硅片抛光面上的单位面积的体积的优选范围为1~4 $\mu$ L/cm<sup>2</sup>,最优化的体积为3 $\mu$ L/cm<sup>2</sup>。所述抗体溶液为一种抗体溶液或多种抗体的混合溶液。所述抗体的种类没有特殊限制,采用本领域技术人员研究的抗体即可。

[0073] 在本发明所述的步骤6)中,所述静置的温度的优选范围为2~8 $^{\circ}$ C,更为优选范围为3~5 $^{\circ}$ C,最优化的温度为4 $^{\circ}$ C。所述静置的时间优选范围为10~12h,最优化的时间为11h。

[0074] 在本发明所述的步骤6)中,所述的清洗剂为含有0.05%Tween 20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液。所述含有0.05%Tween 20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液的pH值的优选范围为7.5~8.0,最优化的pH为7.6。所述三羟甲基氨基甲烷缓冲液清洗后的硅片再用去离子水进行冲洗。

[0075] 在本发明所述的步骤6)中,所述干燥温度的优选范围为35~38 $^{\circ}$ C,最优化的温度为37 $^{\circ}$ C。

[0076] 在本发明所述的步骤7)中,所述封闭溶液为牛血清白蛋白溶液。所述牛血清白蛋白溶液的质量浓度的优选范围为5~20mg/mL,最优化的质量浓度为10mg/mL。滴加到单位面积的所述固定有金纳米棒的硅片抛光面上的牛血清白蛋白溶液体积的优选范围为1~4 $\mu$ L/cm<sup>2</sup>。

[0077] 在本发明所述的步骤7)中,所述牛血清白蛋白溶液滴加到固定有金纳米棒的硅片抛光面上后的静置温度的优选范围为20~27 $^{\circ}$ C,最优化的温度为25 $^{\circ}$ C。所述静置的时间的优选范围为2~4h,最优化的时间为3h。

[0078] 在本发明所述的步骤7)中,所述的清洗溶液为含有0.05%Tween 20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液。所述含有0.05%Tween 20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液的pH值的优选范围为7.5~8.0,最优化的pH为7.6。所述三羟甲基氨基甲烷缓冲液清洗后的硅片再用去离子水进行冲洗。

[0079] 在本发明所述的步骤7)中,所述干燥温度的优选范围为35~38 $^{\circ}$ C,最优化的温度为37 $^{\circ}$ C。

[0080] 下面结合实施例对本发明提供的一种自组装金纳米棒SERS免疫基底及其制备方法进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0081] 实施例1

[0082] 制备单分散的均匀金纳米棒溶液,具体过程为:a1、在室温下将5mL 0.50mM的氯金酸溶液和5mL 0.20M的十六烷基三甲基溴化铵溶液搅匀,迅速向其中加入冰冻的0.6mL 0.01M硼氢化钠溶液,并加入0.4mL去离子水,得到金种溶液,在室温下静置至少2h待用;a2、将2.5mL 0.0768M十六烷基三甲基溴化铵和2.5mL 0.0162M油酸钠溶液混合至完全溶解,向其中加入180 $\mu$ L 4mM硝酸银溶液,静置15min,再向其中加入2.5mL 1mM氯金酸溶液,搅拌15min后,即溶液变成无色后,加入21 $\mu$ L 37%的盐酸溶液,接着再加入12 $\mu$ L 10mM抗坏血酸溶液,得到成长液;a3、将8 $\mu$ L由a1步骤制备的金种溶液加入到由a2步骤制备的成长液中,在室温下静置12h,最后得到金纳米棒溶胶。制备得到的金纳米棒溶液注入离心管,然后对金纳米棒溶液进行离心清洗,接着在离心清洗结束后去除上清液,保留沉淀在离心管底部的金纳米棒溶胶并加入去离子水,离心多次,超声处理,得到单分散的均匀金纳米棒的悬浮溶

液;在此,对金纳米棒溶液进行离心清洗的转速为6000r/min,离心时间是20min,往沉淀在离心管底部的金纳米棒溶胶中加入的去离子水是40mL,离心次数是2次。进行超声处理的处理时间为25min。

[0083] 制备自组装的金纳米棒基底,具体过程为:取一块边长为5mm的正方形的单面抛光的硅片,然后采用硅片清洗工艺对硅片进行清洗,清洗流程为:首先将硅片用酸性液超声清洗,然后用去离子水冲洗,再用碱性清洗液超声清洗,再经去离子水冲洗后用酸性清洗液超声清洗,最后用去离子水冲洗;所述酸性液为体积浓度为50%的 $H_2SO_4$ 溶液和体积浓度为20%的 $H_2O_2$ 溶液;所述碱性清洗液包括体积浓度为10%的 $NH_4OH$ ,体积浓度为20%的 $H_2O_2$ 的水溶液;所述酸性清洗液包括体积浓度为20%的 $H_2O_2$ ,体积浓度为10%的 $HCl$ 的水溶液。对清洗干净的硅片进行干燥处理以备用,将由质量浓度0.60g/L的金纳米棒溶液40 $\mu$ L滴加到处理过的硅片的抛光面上,并保持硅片与水平面倾斜 $40^\circ$ ,然后保持在 $10^\circ C$ 的恒温箱中进行干燥处理,即制得了自组装金纳米棒基底。

[0084] 由本实施例制备的基底上的金纳米棒呈肩并肩排列的自组装结构,如图1所示。在图1中,沉积在硅片上的金纳米棒的大小均一,其单个金纳米棒的大小为:纵向长 $75 \pm 5$ nm,横向直径是 $25 \pm 2$ nm。

[0085] 实施例2

[0086] 制备单分散的均匀金纳米棒溶液,具体过程为:a1、在室温下将5mL 0.45mM的氯金酸溶液和5mL 0.25M的十六烷基三甲基溴化铵溶液搅匀,迅速向其中加入冰冻的0.6mL 0.005M硼氢化钠溶液,并加入0.4mL去离子水,得到金种溶液,在室温下静置至少2h待用;a2、将2.5mL 0.0768M十六烷基三甲基溴化铵和2.5mL 0.0162M油酸钠溶液混合至完全溶解,向其中加入180 $\mu$ L4mM硝酸银溶液,静置15min,再向其中加入2.5mL 1mM氯金酸溶液,搅拌15min后,即溶液变成无色后,加入21 $\mu$ L 37%的盐酸溶液,接着再加入12 $\mu$ L 10mM抗坏血酸溶液,得到成长液;a3、将8 $\mu$ L由a1步骤制备的金种溶液加入到由a2步骤制备的成长液中,在室温下静置12h,最后得到金纳米棒溶胶。制备得到的金纳米棒溶液注入离心管,然后对金纳米棒溶液进行离心清洗,接着在离心清洗结束后去除上清液,保留沉淀在离心管底部的金纳米棒溶胶并加入去离子水,离心多次,超声处理,得到单分散的均匀金纳米棒的悬浮溶液;在此,对金纳米棒溶液进行离心清洗的转速为6000r/min,离心时间是20min,往沉淀在离心管底部的金纳米棒溶胶中加入的去离子水是40mL,离心次数是2次。进行超声处理的处理时间为25min。

[0087] 制备自组装的金纳米棒基底,具体过程为:取一块边长为5mm的正方形的单面抛光的硅片,然后采用硅片清洗工艺对硅片进行清洗,清洗流程为:首先将硅片用酸性液超声清洗,然后用去离子水冲洗,再用碱性清洗液超声清洗,再经去离子水冲洗后用酸性清洗液超声清洗,最后用去离子水冲洗;所述酸性液为体积浓度为50%的 $H_2SO_4$ 溶液和体积浓度为20%的 $H_2O_2$ 溶液;所述碱性清洗液包括体积浓度为10%的 $NH_4OH$ ,体积浓度为20%的 $H_2O_2$ 的水溶液;所述酸性清洗液包括体积浓度为20%的 $H_2O_2$ ,体积浓度为10%的 $HCl$ 的水溶液。对清洗干净的硅片进行干燥处理以备用,将由质量浓度0.45g/L的金纳米棒溶液50 $\mu$ L滴加到处理过的硅片的抛光面上,并且硅片与水平面倾斜 $45^\circ$ ,然后保持在 $15^\circ C$ 的恒温箱中进行干燥处理,即制得自组装金纳米棒基底。

[0088] 由本实施例制备的基底上的金纳米棒呈竖直排列的自组装结构,如图2所示。在图

2中,沉积在硅片上的金纳米棒的大小均一,其单个金纳米棒的大小为:纵向长 $70 \pm 5\text{nm}$ ,横向直径是 $27 \pm 2\text{nm}$ 。

#### [0089] 实施例3

[0090] 制备单分散的均匀金纳米棒溶液,具体过程为:a1、在室温下将5mL 0.55mM的氯金酸溶液和5mL 0.15M的十六烷基三甲基溴化铵溶液搅匀,迅速向其中加入冰冻的0.6mL 0.02M硼氢化钠溶液,并加入0.4mL去离子水,得到金种溶液,在室温下静置至少2h待用;a2、将2.5mL 0.0768M十六烷基三甲基溴化铵和2.5mL 0.0162M油酸钠溶液混合至完全溶解,向其中加入180 $\mu\text{L}$ 4mM硝酸银溶液,静置15min,再向其中加入2.5mL 1mM氯金酸溶液,搅拌15min后,即溶液变成无色后,加入21 $\mu\text{L}$  37%的盐酸溶液,接着再加入12 $\mu\text{L}$  10mM抗坏血酸溶液,得到成长液;a3、将8 $\mu\text{L}$ 由a1步骤制备的金种溶液加入到由a2步骤制备的成长液中,在室温下静置12h,最后得到金纳米棒溶胶。制备得到的金纳米棒溶液注入离心管,然后对金纳米棒溶液进行离心清洗,接着在离心清洗结束后去除上清液,保留沉淀在离心管底部的金纳米棒溶胶并加入去离子水,离心多次,超声处理,得到单分散的均匀金纳米棒的悬浮溶液;在此,对金纳米棒溶液进行离心清洗的转速为6000r/min,离心时间是20min,往沉淀在离心管底部的金纳米棒溶胶中加入的去离子水是50mL,离心次数是3次。进行超声处理的处理时间为25min。

[0091] 制备自组装的金纳米棒基底,具体过程为:取一块边长为5mm的正方形的单面抛光的硅片,然后采用硅片清洗工艺对硅片进行清洗,清洗流程为:首先将硅片用酸性液超声清洗,然后用去离子水冲洗,再用碱性清洗液超声清洗,再经去离子水冲洗后用酸性清洗液超声清洗,最后用去离子水冲洗;所述酸性液为体积浓度为50%的 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 溶液和体积浓度为20%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液;所述碱性清洗液包括体积浓度为10%的 $\text{NH}_4\text{OH}$ ,体积浓度为20%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的水溶液;所述酸性清洗液包括体积浓度为20%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,体积浓度为10%的 $\text{HCl}$ 的水溶液。对清洗干净的硅片进行干燥处理以备,将由质量浓度0.25g/L的金纳米棒溶液50 $\mu\text{L}$ 滴加到处理过的硅片的抛光面上,并且硅片与水平面倾斜 $38^\circ$ ,然后,硅片保持在 $40^\circ\text{C}$ 的恒温箱中进行干燥处理,即制得自组装金纳米棒基底。

[0092] 由本实施例制备的基底上的金纳米棒呈连续排列的多层自组装结构,如图3所示。在图3中,沉积在硅片上的金纳米棒的大小均一,其单个金纳米棒的大小为:纵向长 $72 \pm 5\text{nm}$ ,横向直径是 $25 \pm 2\text{nm}$ 。

#### [0093] 实施例4

[0094] 制备单分散的均匀金纳米棒溶液,具体过程为:a1、在室温下将5mL 0.50mM的氯金酸溶液和5mL 0.20M的十六烷基三甲基溴化铵溶液搅匀,迅速向其中加入冰冻的0.6mL 0.01M硼氢化钠溶液,并加入0.4mL去离子水,得到金种溶液,在室温下静置至少2h待用;a2、将2.5mL 0.0768M十六烷基三甲基溴化铵和2.5mL 0.0162M油酸钠溶液混合至完全溶解,向其中加入180 $\mu\text{L}$ 4mM硝酸银溶液,静置15min,再向其中加入2.5mL 1mM氯金酸溶液,搅拌15min后,即溶液变成无色后,加入21 $\mu\text{L}$  37%的盐酸溶液,接着再加入12 $\mu\text{L}$  10mM抗坏血酸溶液,得到成长液;a3、将8 $\mu\text{L}$ 由步骤a1制备的金种溶液加入到由a2步骤制备的成长液中,在室温下静置12h,最后得到金纳米棒溶胶。制备得到的金纳米棒溶液注入离心管,然后对金纳米棒溶液进行离心清洗,接着在离心清洗结束后去除上清液,往沉淀在离心管底部的金纳米棒溶胶加入10ml去离子水中,离心多次,超声处理,得到单分散的均匀金纳米棒的悬浮

溶液;在此,对金纳米棒溶液进行离心清洗的转速为6000r/min,离心时间是20min,往沉淀在离心管底部的金纳米棒溶胶中加入的去离子水是10mL,离心次数是2次。进行超声处理的处理时间为25min。

[0095] 制备自组装的金纳米棒基底,具体过程为:取一块边长为5mm的正方形的单面抛光的硅片,然后采用硅片清洗工艺对硅片进行清洗,清洗流程为:首先将硅片用酸性液超声清洗,然后用去离子水冲洗,再用碱性清洗液超声清洗,再经去离子水冲洗后用酸性清洗液超声清洗,最后用去离子水冲洗;所述酸性液为体积浓度为50%的 $H_2SO_4$ 溶液和体积浓度为20%的 $H_2O_2$ 溶液;所述碱性清洗液包括体积浓度为10%的 $NH_4OH$ ,体积浓度为20%的 $H_2O_2$ 的水溶液;所述酸性清洗液包括体积浓度为20%的 $H_2O_2$ ,体积浓度为10%的 $HCl$ 的水溶液。对清洗干净的硅片进行干燥处理以备用,将由质量浓度0.10g/L的金纳米棒溶液50 $\mu$ L滴加硅片的抛光面上,并且硅片与水平面倾斜 $38^\circ$ ,然后,硅片保持在 $50^\circ C$ 的恒温箱中进行干燥处理,即制得自组装金纳米棒基底。

[0096] 由本实施例制备的基底上的金纳米棒呈连续排列的单层自组装结构,如图4所示。在图4中,沉积在硅片上的金纳米棒的大小均一,其单个金纳米棒的大小为:纵向长 $70 \pm 5$ nm,横向直径是 $30 \pm 2$ nm。

[0097] 实施例5

[0098] 本实施例给出一种将上述实施例所制备的自组装金纳米棒基底链接拉曼标记分子并检测其SERS光谱的实施过程。以实施例1制备的自组装金纳米棒基底为例,具体步骤如下:

[0099] 1) 对巯基苯甲酸(4MBA)作为拉曼标记分子,制备浓度为10mM的对巯基苯甲酸溶液(4MBA)溶液。

[0100] 2) 将实施例1制备的自组装金纳米棒基底浸泡在4MBA溶液中4h,用去离子水清洗未链接4MBA标记分子的基底,清洗2~3次后,在 $37^\circ C$ 恒温箱中保持12h干燥。

[0101] 3) 测量由所述的步骤2)制备的自组装金纳米棒基底链接的4MBA标记分子的SERS光谱。检测时,使激光器发射的激光经聚焦后垂直照射于组装基底上,照射的激光经标记分子的基底反射后由拉曼光谱仪接收,拉曼光谱仪记录的4MBA标记分子的特征SERS光谱如图5中曲线1所示。采集SERS光谱的积分时间为1~10s,照射激光的功率为49.55mw,激光波长为785nm。

[0102] 按照上述同样步骤,测量由本发明的实施例2、实施例3和实施例4制备得到的自组装金纳米棒基底的SERS光谱,结果分别如图5中曲线2、曲线3和曲线4所示。

[0103] 由图5可见,不同自组装金纳米棒基底链接相同浓度的4MBA拉曼标记分子后对应的4MBA的SERS光谱的特征峰强度的大小有明显不同。所以,自组装金纳米棒基底的SERS特性依赖于金纳米棒在硅片抛光面上的不同的排列方式,而当金纳米棒在硅片抛光面上自组装形成竖直排列时,由实施例2制备的自组装金纳米棒基底得到的4MBA的特征拉曼信号最强。

[0104] 实施例6

[0105] 本实施例给出制备一种自组装金纳米棒SERS免疫基底的实施过程。以实施例2制备的自组装金纳米棒基底为例,具体步骤如下:

[0106] 1) 将用于进行PSA抗原检测的anti-PSA抗体溶液滴加到经处理的实施例2制备的

自组装金纳米棒基底,并在温度为2~8℃的条件下静置10~12h,之后依次用0.05%Tween 20三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水冲洗硅片,以去除未吸附到金纳米棒上的anti-PSA抗体,最后对吸附有anti-PSA抗体的自组装金纳米棒基底进行干燥处理,滴加与anti-PSA抗体溶液相同体积的牛血清白蛋白溶液,在25℃下反应2~4h,之后用含有0.05%Tween 20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水对硅片进行冲洗,以去除未吸附到金纳米棒上的牛血清白蛋白,再对硅片进行干燥处理,所述的干燥是在37℃恒温箱中保持12h,制备得到具有特异性选择功能的SERS免疫基底。

[0107] 2) 从浓度为0fg/mL、2.1fg/mL、210fg/mL、21pg/mL和2.1ng/mL的待测PSA抗原溶液样品中分别取20μL滴加到由步骤1)制备的5个自组装金纳米棒SERS免疫基底上,在温度为30~38℃的条件下反应2h;用含有0.05%Tween 20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水对SERS免疫基底进行冲洗,再对SERS免疫基底进行干燥处理,得到5个对应不同PSA抗原浓度的SERS免疫基底。

[0108] 3) 按照现有技术,如申请号为201310015549.3的专利公开的金纳米球溶胶的制备方法,制备直径大小为20nm的金纳米球溶胶。在浓度为10mM的对巯基苯甲酸溶液(4MBA)溶液中取10μL滴加到1mL的所述的金纳米球溶胶中,充分混合并静置4~6h后,制备得到修饰有4MBA的20nm的金纳米球探针溶液。在室温条件下放置12h后,进行离心处理,以11000rpm的转速离心30min,之后去除离心管中的上层清液,再将沉积物溶于1mL的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中。在缓慢搅拌的情况下,向经步骤c处理后得到的溶液中,加入20μL且浓度为2mg/mL的anti-PSA抗体溶液,在4℃恒温下反应1.5h,再离心处理,以11000rpm的转速离心30min,以去除未吸附在金纳米粒子表面的anti-PSA抗体,之后去除离心管中的上层清液,再在超声波振荡环境下,将离心管中的沉积物溶于1mL的磷酸盐缓冲溶液中。在此,加入的抗体溶液的量可以控制在15~30μL范围内,浓度可控制在1~3mg/mL范围内;磷酸盐缓冲溶液的PH值可以为7.0;磷酸盐缓冲溶液的量可控制在1~3mL范围内。由此,制备得到金纳米球免疫探针溶液。

[0109] 4) 将用于进行PSA抗原检测的anti-PSA抗体溶液滴加到经处理的实施例2制备的自组装金纳米棒基底,并在温度为2~8℃的条件下静置10~12h,之后依次用0.05%Tween 20三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水冲洗硅片,以去除未吸附到金纳米棒上的anti-PSA抗体,最后对吸附有anti-PSA抗体的自组装金纳米棒基底进行干燥处理,滴加与anti-PSA抗体溶液相同体积的牛血清白蛋白溶液,在室温下反应2~4h,之后用含有0.05%Tween 20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水对硅片进行冲洗,以去除未吸附到金纳米棒上的牛血清白蛋白,再对硅片进行干燥处理,所述的干燥是在37℃恒温箱中保持12h,制备得到具有特异性选择功能的SERS免疫基底。

[0110] 5) 从步骤4)制备的免疫探针液中分别取20μL滴加到步骤2)制备的链接有待测抗原的5个SERS免疫基底上,在温度为4℃的恒温条件下反应1.5~3h,使所滴加的待测PSA抗原溶液中的抗原与SERS免疫基底上的anti-PSA抗体以及免疫探针中的anti-PSA抗体发生免疫复合反应。之后,用含有0.05%Tween 20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水对每个SERS免疫基底进行冲洗,再对所有SERS免疫基底进行干燥处理,在37℃恒温箱中保持12h的干燥,即得到5个“三明治”结构的检测样品。

[0111] 6) 利用拉曼光谱仪对步骤4)处理后得到的5个“三明治”结构的检测样品进行SERS

光谱测量,检测免疫探针中拉曼标记物的特征指纹谱。由本实施例得到的5个样品的SERS光谱如图6所示。

[0112] 从图6中可以看出,在PSA抗原溶液浓度低至 $2.1\text{fg/mL}$ 时,在拉曼位移 $1078\text{cm}^{-1}$ 处仍然有明显的SERS信号。所以,由实施例2制备得到的自组装金纳米棒SERS免疫基底进行PSA抗原浓度检测,具有高灵敏度。

[0113] 为验证本实施例中采用的自组装金纳米棒SERS免疫基底结构的重现性、和信号的稳定性,对于PSA抗原浓度为 $2.1\text{ng/mL}$ 的样品进行多次检测,如图7所示,在基底上25个不同检测点采集 $1078\text{cm}^{-1}$ 的SERS峰强度大小,从图中可以看出该基底重现性、稳定性较好。

[0114] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

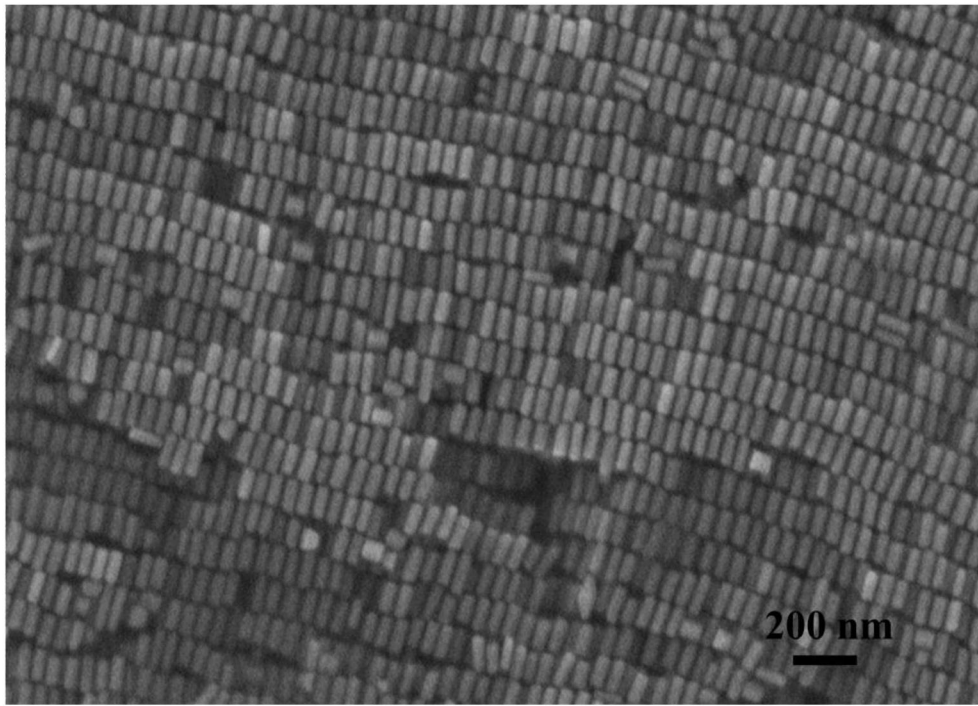


图1

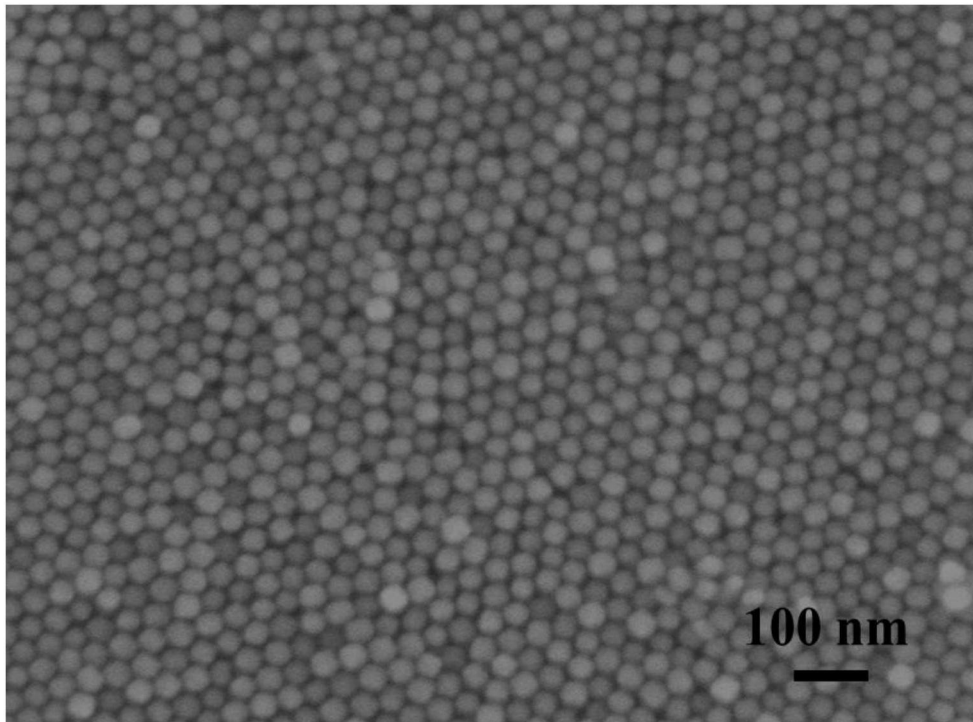


图2

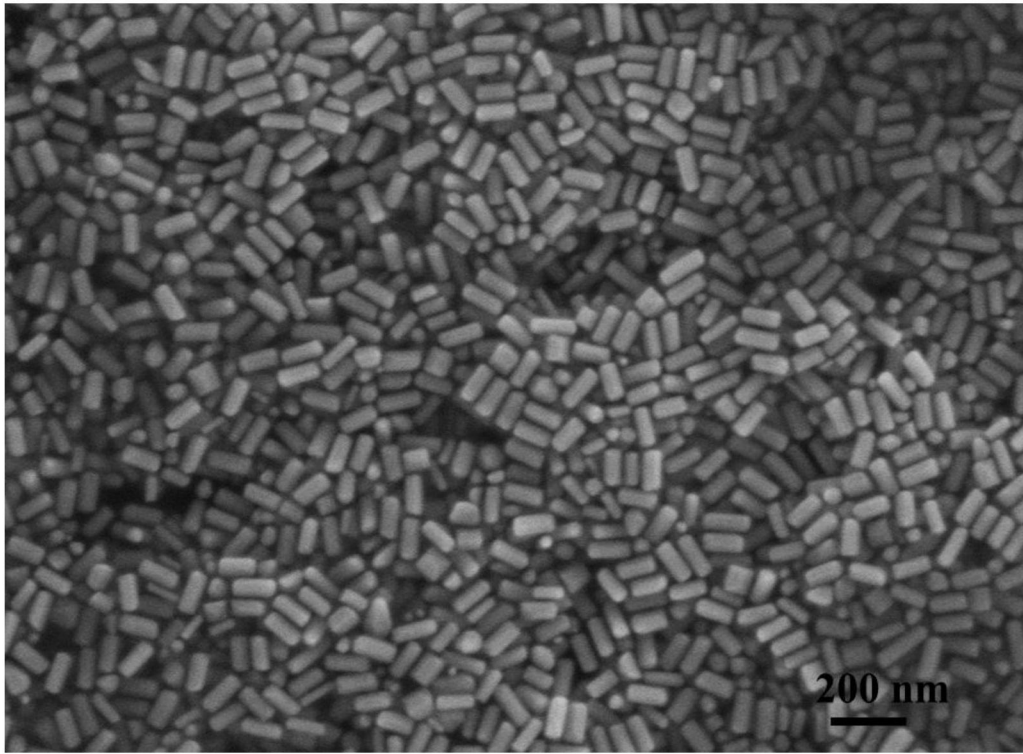


图3

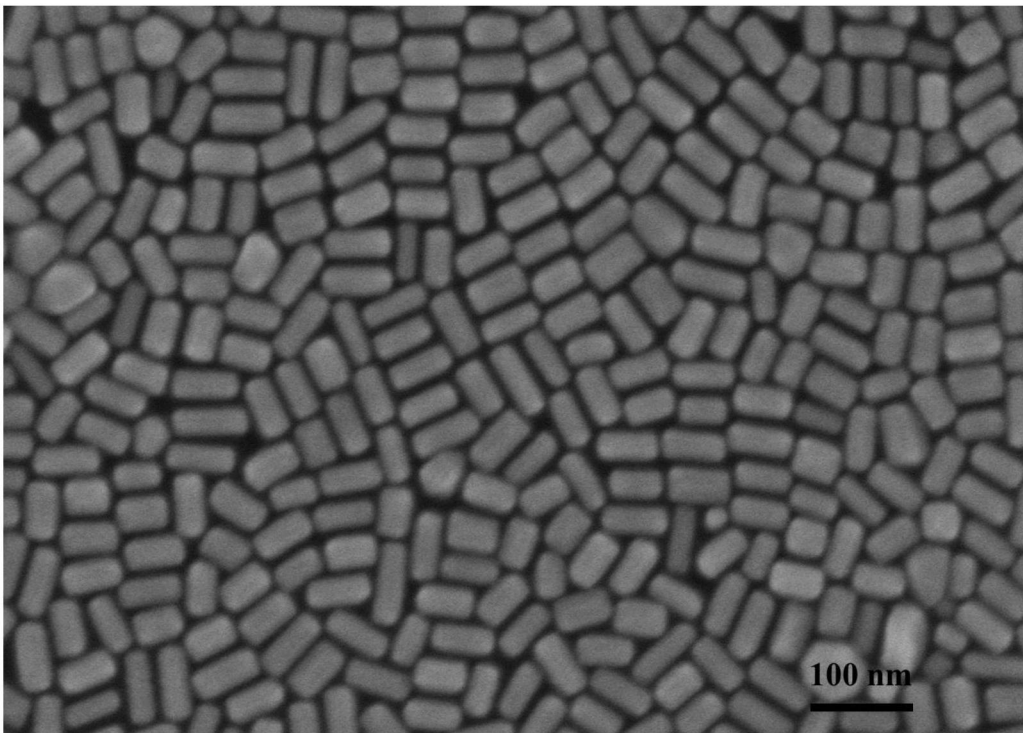


图4

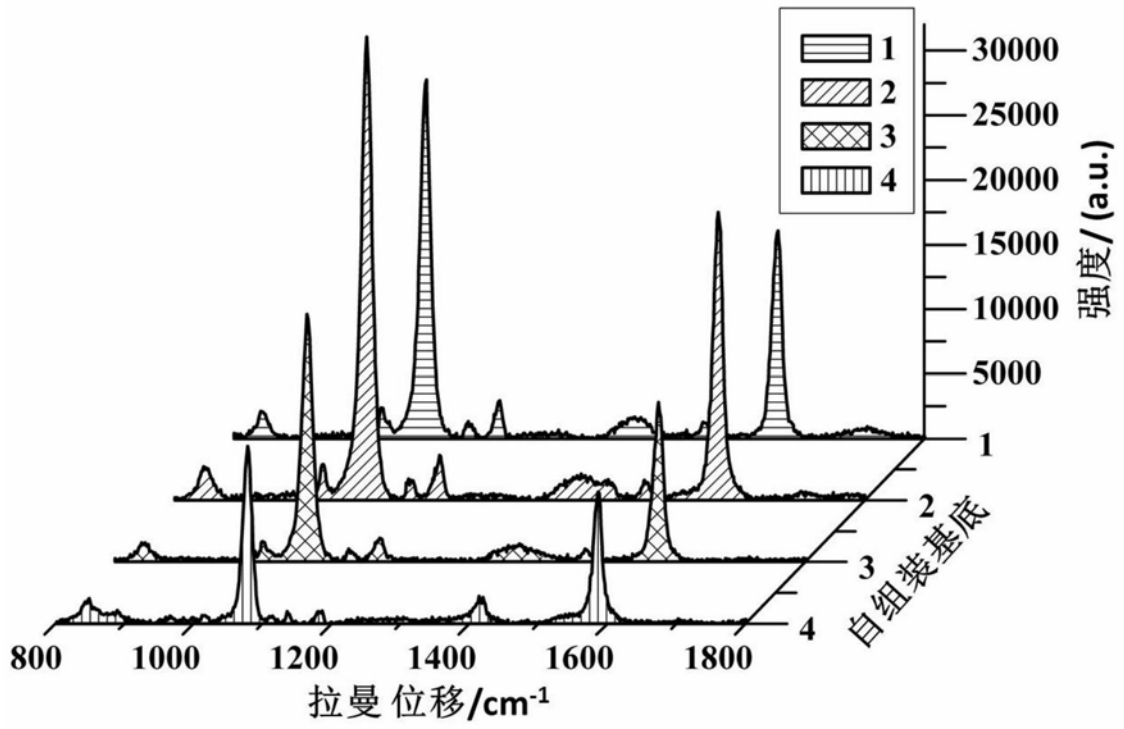


图5

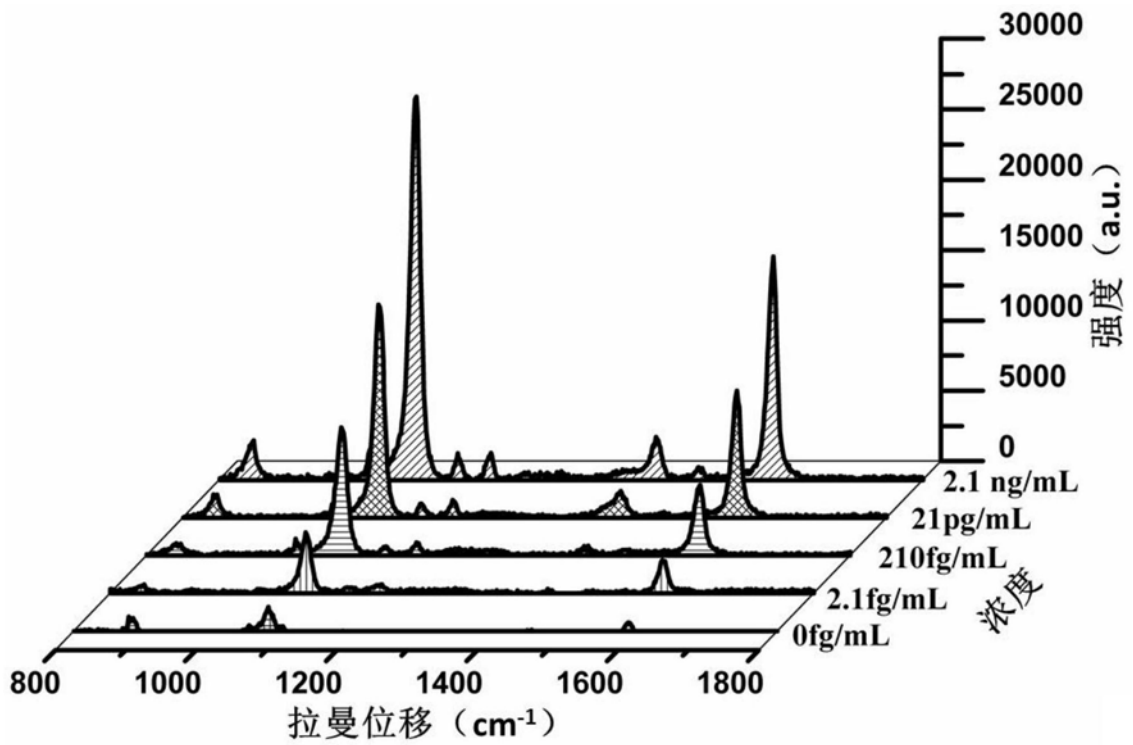


图6

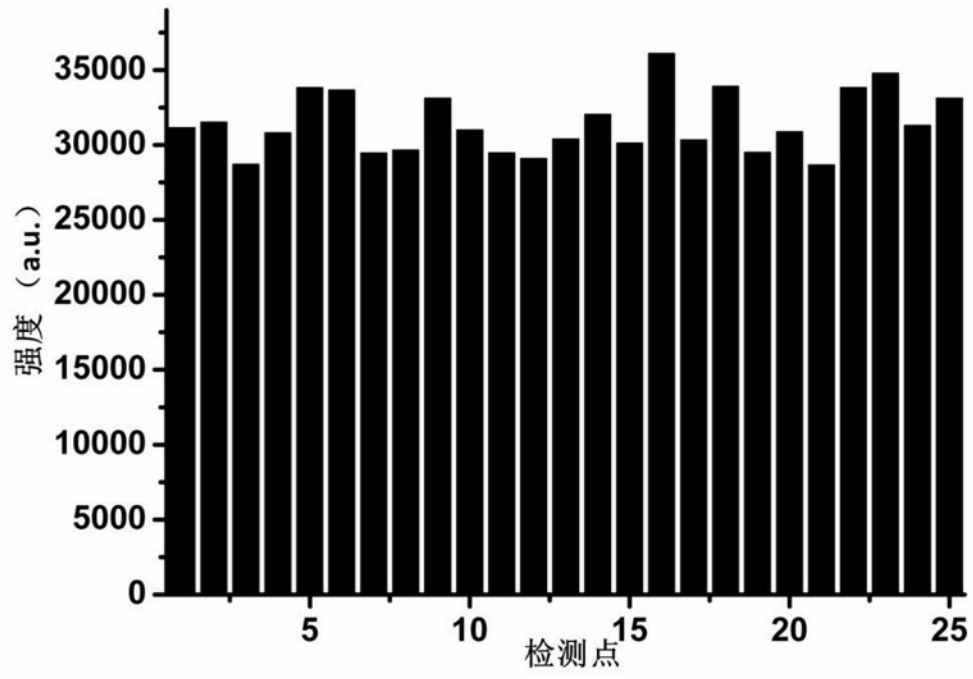


图7

专利名称(译)	一种自组装金纳米棒SERS免疫基底及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106940310B</a>	公开(公告)日	2019-08-23
申请号	CN201710128016.4	申请日	2017-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	宁波大学		
申请(专利权)人(译)	宁波大学		
当前申请(专利权)人(译)	宁波大学		
[标]发明人	曲兆珠 周骏 罗海清 吴冠毅 姜丹 吴莎		
发明人	曲兆珠 周骏 罗海清 吴冠毅 姜丹 吴莎		
IPC分类号	G01N21/65 G01N33/531		
审查员(译)	林琳		
其他公开文献	CN106940310A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种可控自组装金纳米棒SERS免疫基底的制备方法。所述的SERS免疫基底包括单面抛光的硅片、固定在所述硅片抛光面上的金纳米棒和链接在所述金纳米棒表面的抗体。本发明首先采用双表面活性剂法制备金纳米棒，并将所述的金纳米棒滴加到经亲水处理过的所述硅片的抛光面上，所述的金纳米棒在硅片的抛光面上排列成连续的自组装结构。在制备的过程中，保持硅片相对地面倾斜35~45°，以克服咖啡圈效应，使得自组装金纳米棒SERS免疫基底具有优良的SERS增强特性和可重复性，应用于高灵敏度的免疫检测。此外，所述自组装金纳米棒SERS免疫基底的制备工艺简单、成本低廉、耗时少、产率高，易于推广，便于应用。

