



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101231287 B

(45) 授权公告日 2011. 09. 14

(21) 申请号 200810020731. 7

(22) 申请日 2008. 02. 22

(73) 专利权人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市四牌楼 2 号

(72) 发明人 顾宁 黄岚

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

公司 32200

代理人 叶连生

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 27/327(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1563970 A, 2005. 01. 12, 全文.

US 6914279 B2, 2005. 07. 05, 全文.

CN 1621341 A, 2005. 06. 01, 全文.

CN 2715150 Y, 2005. 08. 03, 全文.

US 7301199 B2, 2007. 11. 27, 全文.

王丽江, 等. 纳米技术在生物传感器及检测中的应用. 《传感技术学报》. 2006, 第 19 卷 (第 3 期), 581-587.

Hayward RC, et al. Electrophoretic assembly of colloidal crystals with optically tunable micropatterns. 《Nature》. 2000, 第 404 卷 (第 6773 期), 56-59.

审查员 王晓媛

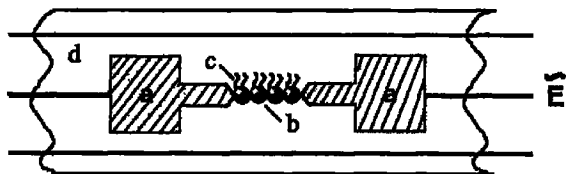
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法

(57) 摘要

外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法是在通过施加外场使纳米颗粒在电极对中形成有序排列, 并结合敏感分子, 发展一种可批量生产的、具有高灵敏度生物传感器, 该方法将外场诱导引入到以纳米颗粒 (b) 为基本元件的生物传感器中, 沿着电极对 (a) 的方向上施加一个外置分离的交变电场 ( $\vec{E}$ )、或静磁场 (B)、或交变磁场 ( $\vec{B}$ ), 诱导纳米颗粒 (b) 在电极对 (a) 中电场或磁场梯度最大的方向上有序排列, 连接对应电极对 (a), 形成该方向上的电路导通, 纳米颗粒 (b) 上修饰的敏感分子 (c) 与被测目标发生生物化学或电化学反应, 将生化反应信号转换为电信号, 通过对电信号进行放大和模数转换, 检测出待测分析物及其浓度。



1. 一种外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法,其特征在于将外场诱导引入到以纳米颗粒 (b) 为基本元件的生物传感器中,沿着电极对 (a) 的方向上施加一个外置分立的交变电场( $\vec{E}$ )、或静磁场 (B)、或交变磁场( $\vec{B}$ ),诱导纳米颗粒 (b) 在电极对 (a) 中电场或磁场梯度最大的方向上有序排列,连接对应电极对 (a),形成该方向上的电路导通,纳米颗粒 (b) 上修饰的敏感分子 (c) 与被测目标发生生物化学或电化学反应,将生化反应信号转换为电信号,通过对电信号进行放大和模数转换,检测出待测分析物及其浓度;其中的纳米颗粒为金属、半导体或磁性纳米颗粒。

2. 根据权利要求 1 所述的外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法,其特征在于所述的电极对 (a) 以硅基材料为基材 (d),用电子束光刻工艺加工出具有纳米级间隙的双电极结构,电极对 (a) 材料为金属材料或磁性材料。

3. 根据权利要求 1 所述的外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法,其特征在于纳米颗粒 (b) 上修饰的敏感分子 (c) 为可与被测目标通过共价键、络合物形成、疏水作用、离子相互作用或偶极相互作用结合的化学或生物分子。

4. 根据权利要求 1 所述的外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法,其特征在于敏感分子 (c) 包括蛋白、抗原、抗体、酶、核酸、小分子中的一种。

5. 根据权利要求 3 所述的外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法,其特征在于所述的结合包括特异性结合、或半特异性结合或非特异性结合。

6. 根据权利要求 1 所述的外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法,其特征在于施加的外场为外置分立的交变电场 ( $\vec{E}$ )、或静磁场 (B)、或交变磁场 ( $\vec{B}$ ),无需用过引线与电极表面有良好接触;外场方向与电极对方向平行;电压峰值范围  $10 \sim 2000\text{V/cm}$ ,频率范围  $10 \sim 10^6\text{Hz}$ ;静磁场的磁场强度范围为  $1 \times 10^{-3} \sim 3\text{T}$ ;交变磁场的磁场强度范围为  $1 \times 10^{-3} \sim 3\text{T}$ ,频率范围  $10 \sim 10^8\text{Hz}$ 。

7. 根据权利要求 1 所述的外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法,其特征在于所述待测分析物指源于生物体的细胞、组织、或源于生物样品的液体、以及水、环境物质。

## 外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于纳米器件和生物传感器领域,涉及高灵敏地定量样品中所含基质的生物传感器。

### 背景技术

[0002] 随着生命科学的发展进入分子水平,科学家预言 21 世纪将是生命科学的世纪,是检验医学即从分子水平对疾病进行诊断和治疗的世纪。这对临床生物化学检验提出了准确、快速、简便、标本微量化、方法标准化、且经济实用的要求。生物传感器横跨了生物、化学、物理、信息等领域,是发展生物技术必不可少的一种先进的检测方法和监控方法,也是物质分子水平的快速、微量分析方法。生物传感器一般由两部分组成:其一是分子识别元件(敏感元件),由具有分子识别能力的生物活性物质构成;二是信号转换器(换能器),主要是电化学或光学检测元件。具体而言,生物传感器利用生物物质作为识别元件,将被测物的浓度与可测量的电信号关联起来,并将生物体功能材料(酶、底物、抗原、抗体、动物细胞、微生物组织等)固定化处理,当待测物质(酶、辅酶、抗原、抗体、底物、维生素、抗菌素等)与分子识别感受器(即接收器)相互作用时,发生物理变化或化学变化,换能器将此信号转变为电信号或光信号,从而检测出待测物质。

[0003] 近年来,随着纳米技术的发展,利用纳米颗粒的比表面积大、表面反应活性高、表面活性中心多、催化效率高、吸附能力强等特性,把纳米颗粒引入到传感器研究中,集纳米技术、生物技术和自组装方法于一体,制备固定有能选择性结合靶分子的生物探针的生物传感器,可大幅度提高传感器的检测性能(包括电响应的增强,电响应达到稳态的时间的缩短,检测的线性范围的增大等)。

[0004] CN1385439 中描述了氨基化硅壳类纳米颗粒材料在核酸富集及传感中的应用。包括在氨基化硅壳类纳米颗粒材料的二氧化硅网状分子壳层内充实特殊生化、声、光、电、热、磁等性质的内核材料;利用纳米颗粒在中性环境里的正值动电位从生物样品中分离、富集、提取、转载核酸;使其表面的氨基直接或通过有机分子间接与生物大分子发生反应,使颗粒表面及生物大分子彼此进行修饰;利用经修饰的纳米颗粒作为传感器,对单细胞的物化指数进行测量。

[0005] O. D. Velev 和 E. W. Kaler 在 *Langmuir*, 1999, 15, 3693-3698 中描述了一种基于乳胶微球制备的生物传感器,可用于高灵敏检测蛋白、DNA 序列或其它生物分子。具体而言,采用接触式电场于微电极中组装乳胶微球,其表面的免疫活性位点(蛋白 A)可连接目标分子(IgG 分子),通过二次标定金纳米颗粒及银增强方法,即可观察到电导性质的变化。激发响应的 IgG 分子浓度低至  $10^{-18} \sim 10^{-19}$ M。

[0006] C. Y. Tsai 等在 *Jap. J. Appl. Phys.*, 2005, 44, 5711-5716 中描述了一种基于金电极间金纳米颗粒多层膜的检测蛋白的生物传感器。具体而言,在第一层金纳米颗粒表面修饰单克隆抗体,特异结合目标抗原后可吸附第二层修饰有多克隆抗体的金纳米颗粒。形成的这种金纳米颗粒多层膜会产生一个明显的电流响应,即通过单层和多层膜导致的 IV 曲线

的差异来判断目标抗体的存在。结果表明对 HCV 抗原的检测限可达 100ng/ $\mu$ L。

[0007] US7301199 描述了以纳米线为基础的生物传感器。所用纳米线可在不同区域以不同程度被选择性掺杂,例如半导体纳米线。此类传感器的基本原理与传统的场效应管类似,即电导随表面电场或电压的变化而变化。通过被检测的物质与纳米线的表面相互作用,导致整个纳米结构直径范围体积内载流子的耗损或积聚,从而有可能把灵敏度提高至探测单个分子的水平。

[0008] US6958216 描述了一种基于碳纳米管的生物传感器。其基本原理是在碳纳米管上化学修饰具有电子传导特性的核酸分子如 DNA 和 RNA,通过与目标分子结合后导致的电学性质的变化实现检测的目的。

[0009] US6914279 描述了基于氧化锌纳米材料的生物传感器。氧化锌纳米锥可固定 DNA 或蛋白分子。氧化锌纳米锥阵列可作为电导型传感器、场效应管型传感器,与声表面波传感器(或体声波传感)结合可得到高灵敏、多通道的新型声表面波生物传感器(或体声波生物传感)。

[0010] 尽管使用上述生物传感器得到的结果是鼓舞人心的,但其复杂的工艺仍需要改进,传感器的检测限也有待提高。将外场诱导纳米颗粒排列的方法引入到生物传感器的制备中,有望实现工艺的简化。在外场作用下,纳米颗粒会在电极对中沿着电场或磁场梯度最大的方向上有序排列为链状结构,连接对应电极对,形成该方向上的电路导通。通过结合敏感分子,这类纳米颗粒链对外界环境的变化会显示出高的灵敏度,其电学特性可随敏感分子结合的分析物的浓度变化发生灵敏的响应。

[0011] 已有报道显示交变电场/静磁场/交变磁场能为纳米颗粒的自组装提供定向力。K. D. Hermanson 等在 *Science*, 2001, 2, 1082-1086 中使用介电泳力自组装的方法,将胶原金属纳米颗粒放置在水中,通过交变电场来驱动纳米颗粒,实现悬浮纳米颗粒自生长成一维结构的纳米线、二维结构的光子晶片。Y. Lalatonne 等在 *Nature materials*, 2004, 3, 121-125 中描述了铁氧化物溶液在蒸发过程中加入外磁场后会产生链状排列的现象。S. Singamaneni 和 V. Bliznyuk 也在 *Appl. Phys. Lett.*, 2005, 87, 162511 中也报道了在外磁场作用下镍纳米颗粒产生链状排列的现象。

## 发明内容

[0012] 技术问题:本发明的目的是在于通过施加外场使纳米颗粒在电极对中形成有序排列,并结合敏感分子,发展一种可批量生产的、具有高灵敏度的外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法。

[0013] 技术方案:本发明的外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法将外场诱导引入到以纳米颗粒为基本元件的生物传感器中,沿着电极对的方向上施加一个外置分离的交变电场、或静磁场、或交变磁场,诱导纳米颗粒在电极对中电场或磁场梯度最大的方向上有序排列,连接对应电极对,形成该方向上的电路导通,纳米颗粒上修饰的敏感分子与被测目标发生生物化学或电化学反应,将生化反应信号转换为电信号,通过对电信号进行放大和模数转换,检测出待测分析物及其浓度。

[0014] 所述的电极对以硅基材料为基材,用电子束光刻工艺加工出具有纳米级间隙的双电极结构,电极对材料为金属材料或磁性材料。纳米颗粒表面的敏感分子为可与待测分析

物通过共价键、络合物形成、疏水作用、离子相互作用或偶极相互作用结合的化学或生物分子。敏感分子包括蛋白、抗原、抗体、酶、核酸、小分子中的一种。所述的结合包括特异性结合、或半特异性结合或非特异性结合。

[0015] 施加的外场为外置分立的交变电场或静磁场或交变磁场,无需用过引线与电极表面有良好接触;外场方向与电极对方向平行;电压峰值范围  $10 \sim 2000\text{V}/\text{cm}$ ,频率范围  $10 \sim 10^6\text{Hz}$ ;静磁场的磁场强度范围为  $1 \times 10^{-3} \sim 3\text{T}$ ;交变磁场的磁场强度范围为  $1 \times 10^{-3} \sim 3\text{T}$ ,频率范围  $10 \sim 10^8\text{Hz}$ 。

[0016] 所述待测分析物指源于生物体的细胞、组织、或源于生物样品的液体、以及水、环境物质、或其它类似的生物或非生物介质。

[0017] 将外场(交变电场、静磁场、交变磁场等)诱导引入到以纳米颗粒为基本元件的生物传感器中,沿着电极对的方向上施加一个外置分离的交变电场/静磁场/交变磁场,诱导纳米颗粒在电极对中电场或磁场梯度最大的方向上有序排列,连接对应电极对,形成该方向上的电路导通,纳米颗粒上修饰的敏感分子与被测目标发生生物化学或电化学反应,将生化反应信号转换为电信号,通过对电信号进行放大和模数转换,检测出待测分析物及其浓度。

[0018] 有益效果:

[0019] 1. 纳米间隙电极对中有序排列的修饰有敏感分子的颗粒链结构由于所含颗粒数少,对待测分析物可产生高灵敏的电学响应,从而提高传感器的灵敏度;

[0020] 2. 施加的外场与样品电极是分离的、非连接的,也就是说,无需在单个电子电极对上引线连接于所加外场,整个装置简单易控,在工艺上极易实现,并且具有批量加工潜力;

[0021] 3. 非常方便地选取多种不同敏感分子来实现检测不同待测分析物的目的。

#### 附图说明

[0022] 图 1 是交变电场诱导电极中排列金属或半导体纳米颗粒结合敏感分子制备的生物传感器的结构示意图。

[0023] 图 2 是静磁场诱导电极中排列磁性纳米颗粒结合敏感分子制备的生物传感器的结构示意图。

[0024] 图 3 是交变磁场诱导电极中排列磁性纳米颗粒结合敏感分子制备的生物传感器的结构示意图。

[0025] 其中有:电极对 a,纳米颗粒 b,敏感分子 c,基底 d,交变电场  $\vec{E}$ ,静磁场 B,交变磁场  $\vec{B}$ 。

#### 具体实施方式

[0026] 主要内容包括采用电子束光刻或现有技术(CN 1560904A)制备出具有纳米级间隙的金属/磁性电极;利用化学合成的方法制备出单分散的金属/半导体/磁性纳米颗粒;采用外加交变电场/静磁场/交变磁场结合分子组装等技术将纳米颗粒有序排列于电极中;在纳米颗粒上修饰敏感分子,通过测定加入待测分析物前后电学性质(如导电率、电容等)的变化,实现对待测分析物及其浓度的检测。

[0027] 将外场诱导引入到以纳米颗粒 b 为基本元件的生物传感器中,沿着电极对 a 的方

向上施加一个外置分离的交变电场 $\vec{E}$ 、或静磁场 $B$ 、或交变磁场 $\vec{B}$ ,诱导纳米颗粒 $b$ 在电极对 $a$ 中电场或磁场梯度最大的方向上有序排列,连接对应电极对 $a$ ,形成该方向上的电路导通,纳米颗粒 $b$ 上修饰的敏感分子 $c$ 与被测目标发生生物化学或电化学反应,将生化反应信号转换为电信号,通过对电信号进行放大和模数转换,检测出待测分析物及其浓度。

[0028] 其中,制备的电极以硅基材料为基材,用电子束光刻工艺或现有技术(CN1560904A)加工出具有纳米级间隙的双电极结构,电极材料为金属材料如金、银、铂、铜等,或磁性材料如镍、钴、钯等。

[0029] 在电极表面进行分子组装的双功能分子( $X-R-Y$ ),对于硅基材料没有反应活性。其中 $X$ 和 $Y$ 分别代表可与电极和纳米颗粒自发进行分子组装的官能团,如含有 $S$ 、 $N$ 、 $P$ 、 $O$ 等元素的一种或多种,如巯基、氨基、氰基、磷酸基、羧基等; $R$ 代表有机分子骨架,如碳链、芳环等, $R$ 中带有含 $S$ 、 $N$ 、 $P$ 、 $O$ 元素的活性基团及侧链。

[0030] 用于在交变电场下连接电极的纳米颗粒材料是金属材料,如金、银、铜、镍、钴、钯、铁及其合金材料等,或II-VI半导体材料。用于在静磁场/交变磁场下连接电极的纳米颗粒材料是具有导体或半导体性质的磁性物质,如镍、钴、钯、铁及其氧化物和衍生物等。上述材料可通过商业购买或湿法化学等方面获得。

[0031] 纳米颗粒表面的敏感分子为可与待测分析物通过共价键、络合物形成、疏水作用、离子相互作用或偶极相互作用等结合的化学或生物分子,包括蛋白、抗原、抗体、酶、核酸、小分子等。此处所指的结合包括特异性结合、半特异性结合和非特异性结合。特异性结合指在包含不同种类分子的混合物中敏感分子可决定其中的一种或几种物质的存在。例如,酶可特异结合于其底物,核酸可特异结合于其互补核酸序列,抗体可特异结合于其对应抗原。

[0032] 施加的外场为外置分立的交变电场或静磁场或交变磁场,无需用过引线电极表面有良好接触;外场方向与电极对方向平行;电压峰值范围 $10 \sim 2000V/cm$ ,频率范围 $10 \sim 10^6Hz$ ;静磁场的磁场强度范围为 $1 \times 10^{-3} \sim 3T$ ;交变磁场的磁场强度范围为 $1 \times 10^{-3} \sim 3T$ ,频率范围 $10 \sim 10^8Hz$ 。

[0033] 待测分析物指源于生物体的生物样品如细胞、组织、源于生物样品的液体等,或其它类似的生物或非生物介质如体液、环境物质、水等。

[0034] 实施例1:采用电子束光刻工艺或现有技术(CN 1560904A)在硅基材料上加工出具有纳米间隙的金属(金、银、铂、铜等)电极对。将该电极用有机溶剂(丙酮或乙醇)表面除油处理后,放入新鲜配置的piranha溶液(硫酸:双氧水=3:1,体积比)中处理15分钟,取出后用水漂洗干净,用氮气流吹干;然后将上述电极放入双功能分子巯基化合物 $X-R-Y$ (如巯基乙胺或1,6-己二硫醇等)的乙醇溶液中进行分子组装;将组装有双功能分子的金属电极放入金属纳米颗粒(金、银、铜等)或II-VI半导体纳米颗粒的溶液中,同时沿着电极对方向施加一个交变电场(交变电场的电压峰值为 $10 \sim 2000V/cm$ 、频率为 $10 \sim 10^6Hz$ ),诱导金属纳米颗粒在电极对的尖端部分有序排列为链状结构,连接对应电极对,形成该方向上的电路导通;再将该电极放入含有敏感分子的溶液中处理,取出后用水漂洗,氮气吹干,从而得到所需的生物传感器。将这种生物传感器暴露于待测物中,通过检测手段测量链状结构的电学性能(如导电率、电容等)的变化,实现对待测分析物检测的目的。

[0035] 实施例2:采用电子束光刻工艺或现有技术(CN 1560904A)在硅基材料上加工出具有纳米间隙的磁性(镍、钴、钯)电极对。将该电极用有机溶剂(丙酮或乙醇)清洁表

面后放入双功能分子巯基化合物 X-R-Y (如巯基乙胺或 1,6-己二硫醇等) 的乙醇溶液中进行分子组装;将组装有双功能分子的金属电极放入具有导体或半导体性质的磁性纳米颗粒(镍、钴、钨、铁及其氧化物和衍生物等)的溶液中,通过沿着电极对方向施加一个静磁场(磁场强度为  $1 \times 10^{-3} \sim 3T$ ),诱导磁性纳米颗粒在电极对的尖端处有序排列为链状结构,连接对应电极对,形成该方向上的电路导通;再将该电极放入含有敏感分子的溶液中处理,从而得到所需的生物传感器。将这种生物传感器暴露于待测物中,通过检测手段测量链状结构的电学性能(如导电率、电容等)的变化,实现对待测分析物检测的目的。

[0036] 实施例 3:采用电子束光刻工艺或现有技术(CN 1560904A)在硅基材料上加工出具有纳米间隙的磁性、(镍、钴、钨)电极对。将该电极用有机溶剂(丙酮或乙醇)清洁表面后放入双功能分子巯基化合物 X-R-Y (如巯基乙胺或 1,6-己二硫醇等)的乙醇溶液中进行分子组装;将组装有双功能分子的金属电极放入具有导体或半导体性质的磁性纳米颗粒(镍、钴、钨、铁及其氧化物和衍生物等)的溶液中,通过沿着电极对方向施加一个交变磁场(磁场强度范围为  $1 \times 10^{-3} \sim 3T$ 、频率范围为  $10 \sim 10^8 Hz$ ),诱导磁性纳米颗粒在电极对的尖端处有序排列为链状结构,连接对应电极对,形成该方向上的电路导通;再将该电极放入含有敏感分子的溶液中处理,从而得到所需的生物传感器。将这种生物传感器暴露于待测物中,通过检测手段测量链状结构的电学性能(如导电率、电容等)的变化,实现对待测分析物检测的目的。

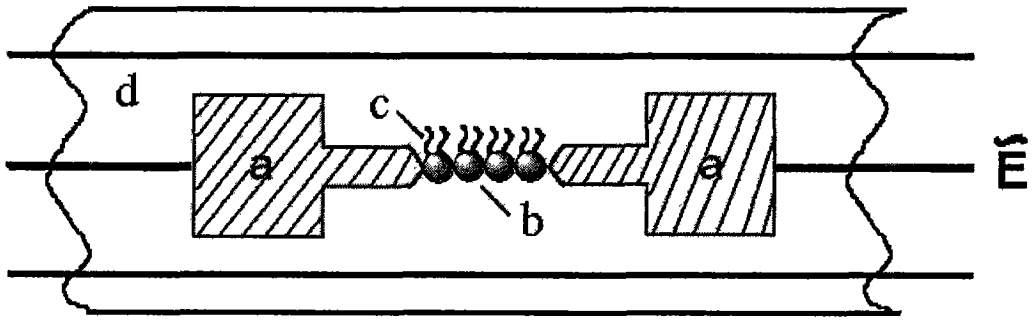


图 1

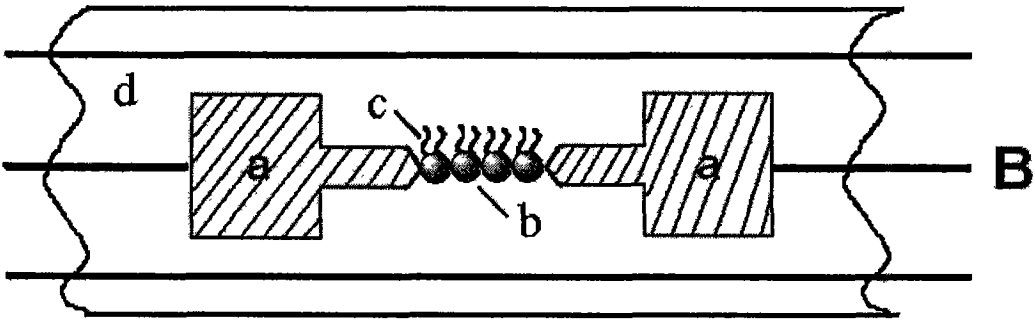


图 2

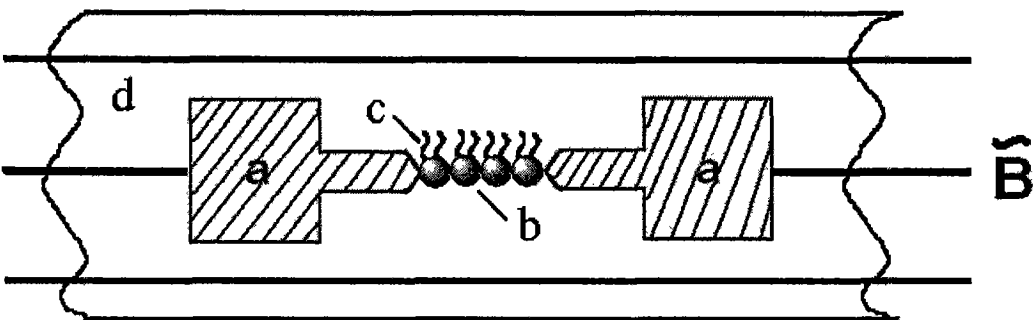


图 3

专利名称(译)	外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101231287B</a>	公开(公告)日	2011-09-14
申请号	CN200810020731.7	申请日	2008-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	顾宁 黄岚		
发明人	顾宁 黄岚		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/327		
CPC分类号	G01N27/3278		
代理人(译)	叶连生		
审查员(译)	王晓媛		
其他公开文献	CN101231287A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

外场诱导电极中排列纳米颗粒制备生物传感器的方法是在通过施加外场使纳米颗粒在电极对中形成有序排列，并结合敏感分子，发展一种可批量生产的、具有高灵敏度生物传感器，该方法将外场诱导引入到以纳米颗粒(b)为基本元件的生物传感器中，沿着电极对(a)的方向上施加一个外置分离的交变电场(E)、或静磁场(B)、或交变磁场(H)，诱导纳米颗粒(b)在电极对(a)中电场或磁场梯度最大的方向上有序排列，连接对应电极对(a)，形成该方向上的电路导通，纳米颗粒(b)上修饰的敏感分子(c)与被测目标发生生物化学或电化学反应，将生化反应信号转换为电信号，通过对电信号进行放大和模数转换，检测出待测分析物及其浓度。

