



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109987579 A

(43)申请公布日 2019.07.09

(21)申请号 201910283850.X

(22)申请日 2019.04.12

(71)申请人 东南大学

地址 215123 江苏省苏州市工业园区林泉街399号

(72)发明人 董健 潘晨嫣 李哲 周月

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 王艳

(51) Int. Cl.

B81C 1/00(2006.01)

A61B 5/145(2006.01)

B81B 1/00(2006.01)

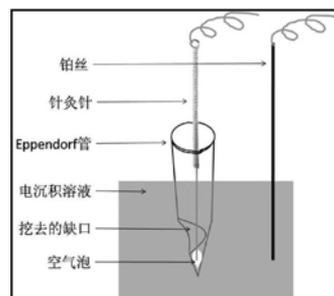
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

多参数高通量SERS活性微针的制备方法
及活性微针

(57)摘要

本发明属于生物传感技术领域,涉及一种多参数高通量SERS活性微针的制备方法及活性微针,该制备方法包括以下步骤:1)采用电化学刻蚀的方式在针灸针上刻蚀凹槽;2)在步骤1)所得凹槽内构建微纳金结构阵列;3)制作基于微纳金结构阵列的含多种不同响应分子的SERS微芯片。本发明制备的多参数检测的SERS活性微针可以微创进出生物体,实现多种生物指标的微创在体采样,体外拉曼快速检测,在检测中无须样品前处理、不消耗额外试剂,具有成本低、快速、简便等优点,适合新型生物医学问题的研究及医学、环境等大样本筛查等。



1. 一种多参数高通量SERS活性微针的制备方法,其特征在于:所述多参数高通量SERS活性微针的制备方法包括以下步骤:

- 1) 采用电化学刻蚀的方式在针灸针上刻蚀凹槽;
- 2) 在步骤1)所得凹槽内构建微纳金结构阵列;
- 3) 制作基于微纳金结构阵列的含多种不同响应分子的SERS微芯片。

2. 根据权利要求1所述的多参数高通量SERS活性微针的制备方法,其特征在于:所述步骤1)的具体实现方式是:

- 1.1) 将针灸针浸泡在绝缘高分子溶液中,在针灸针的针身上包被高分子绝缘层;
- 1.2) 距离针灸针针尖2-4mm处用刀片划破针灸针针身上的高分子绝缘层,作为刻蚀凹槽的刻蚀位点;
- 1.3) 在电流时间曲线模式下,在0.01-5mol/L的硫酸中进行电化学刻蚀5-60s,在针灸针针身上形成刻蚀凹槽。

3. 根据权利要求2所述的多参数高通量SERS活性微针的制备方法,其特征在于:所述绝缘高分子溶液是聚苯乙烯溶液、聚丙烯溶液、聚乳酸溶液或聚甲基丙烯酸酯甲酯溶液。

4. 根据权利要求3所述的多参数高通量SERS活性微针的制备方法,其特征在于:所述步骤2)的具体实现方式是:

- 2.1) 将刻蚀有刻蚀凹槽的针灸针用无水乙醇洗涤后,对其进行表面氨基化处理或巯基化处理经乙醇洗涤得凹槽氨基化或巯基化的针灸针;
- 2.2) 将步骤2.1)所得到的凹槽氨基化或巯基化的针灸针针身上包被的高分子绝缘层去除;
- 2.3) 在氨基化处理或巯基化处理后的刻蚀凹槽内覆盖光刻胶,激光光刻暴露 μm 级功能化区域阵列;
- 2.4) 浸泡在由氯金酸与盐酸羟胺所形成的混合溶液中进行原位还原金,在步骤2.3)所得到的 μm 级功能化区域阵列进行化学沉积形成微纳金结构阵列。

5. 根据权利要求4所述的多参数高通量SERS活性微针的制备方法,其特征在于:所述氨基化处理或巯基化处理时的采用的试剂为浓度是0.1-50%的3-氨基丙基三乙氧基硅烷、3-氨基丙基三甲氧基硅烷、3-巯基丙基三乙氧基硅烷或3-巯基丙基三甲氧基硅烷;所述氨基化处理或巯基化处理的时间是1-50小时;所述光刻胶是正性光刻胶;所述混合溶液中氯金酸与盐酸羟胺的体积比是10:0.1-1;所述混合溶液中氯金酸的浓度(m/v)是0.01-1%,盐酸羟胺的浓度(m/v)是0.1-5%。

6. 根据权利要求5所述的多参数高通量SERS活性微针的制备方法,其特征在于:所述步骤3)的具体实施方式是:

- 3.1) 制备巯基苯甲酸微胶囊;
- 3.2) 将不同响应分子分别负载到的巯基苯甲酸微胶囊中;所述巯基苯甲酸微胶囊直径是步骤2.3)制备得到的 μm 级功能化区域阵列中每个巯基化暴露区域尺寸的1.5-2倍;
- 3.3) 将含有不同响应分子的巯基苯甲酸微胶囊按同等比例混合,滴加到步骤2)制备得到的微纳金结构阵列上,用去离子水洗涤去除未结合的巯基苯甲酸微胶囊,结合的巯基苯甲酸微胶囊释放响应分子,实现一个微纳金结构阵列点功能化一种响应分子,得到基于微纳金结构阵列的含多种不同响应分子的SERS微芯片。

7. 根据权利要求6所述的多参数高通量SERS活性微针的制备方法,其特征在于:所述步骤3.1)的具体实施方式是:将0.1-1mg的4-巯基苯甲酸、0.1-1g的玉米醇溶蛋白和0.01-0.1g的甘油溶于50mL的乙醇中,超声助溶后快速加入950mL的水中,100-500rpm离心收集沉淀;沉淀重悬于1000mL的水中,重复离心后,最后沉淀重悬于1000mL水中备用,得到巯基苯甲酸微胶囊;所述巯基苯甲酸微胶囊是直径7.5-10 μ m的球形胶囊。

8. 根据权利要求7所述的多参数高通量SERS活性微针的制备方法,其特征在于:所述响应分子包括但不限于以巯基苯甲酸作为pH的响应分子、以2,5-二羟基苯硫酚作为ROS的响应分子、以3,4-二氨基苯硫酚作为NO的响应分子以及以4-(氨基磺酰基)苯甲酸 β -巯基乙胺酯作为H₂S的响应分子。

9. 根据权利要求1-8任一权利要求所述的多参数高通量SERS活性微针的制备方法,其特征在于:所述针灸针为临床上使用的常规针灸针。

10. 如权利要求1-9任一权利要求所述的多参数高通量SERS活性微针的制备方法制备得到的活性微针。

多参数高通量SERS活性微针的制备方法及其活性微针

技术领域

[0001] 本发明属于生物传感技术领域,涉及一种SERS活性微针的制备方法及其活性微针,尤其涉及一种多参数高通量SERS活性微针的制备方法及其活性微针。

背景技术

[0002] 2002年任等报道了基于针灸针构建钙离子传感针的电化学检测方法。2015年起,Zhang GJ等先后报道了基于针灸针构建多巴胺、5-羟色胺和NO等传感针的电化学检测方法。基于针灸针的检测技术的最大优点是可以微创进出生物体,实现在体检测或在体采样、离体检测。如能实现高通量检测,电化学检测方法将是一种理想的在体检测方法。微透析技术可以实现多种组分的采样,但采样滞后限制其对短半衰期分子的检测研究。

[0003] 基于微透析技术的概念和纳米材料的精巧设计,申请人于2011年起基于针灸针研制了微创在体采样、体外拉曼检测的系列表面增强拉曼散射(Surface-enhanced Raman scattering, SERS)活性微针。和微透析技术相比,除了实现微创采样外,SERS活性微针取出后即可直接用于拉曼检测,而且采样和信号读取时间也大大缩短。Liu Z等和Yang LB等分别在2016年和2017年也报道了基于针灸针的SERS检测技术。

[0004] 现有技术中的研究可实现单一分子(指标)的微创在体采样、体外拉曼检测,但还不能满足通过多靶点、多途径、多水平和多层次发生效应的针刺效应机制研究需求。

发明内容

[0005] 为了解决背景技术中存在的上述技术问题,本发明提供了一种便于制备以及可快速同时检测多个指标的多参数高通量SERS活性微针的制备方法及其活性微针。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一种多参数高通量SERS活性微针的制备方法,所述多参数高通量SERS活性微针的制备方法包括以下步骤:

[0008] 1) 采用电化学刻蚀的方式在针灸针上刻蚀凹槽;

[0009] 2) 在步骤1)所得凹槽内构建微纳金结构阵列;

[0010] 3) 制作基于微纳金结构阵列的含多种不同响应分子的SERS微芯片。

[0011] 作为优选,本发明所采用的步骤1)的具体实现方式是:

[0012] 1.1) 将针灸针浸泡在绝缘高分子溶液中,在针灸针的针身上包被高分子绝缘层;

[0013] 1.2) 距离针灸针针尖2-4mm处用刀片划破针灸针针身上的高分子绝缘层,作为刻蚀凹槽的刻蚀位点;

[0014] 1.3) 在电流时间曲线模式下(0.1-1.5伏电势),在0.01-5mol/L的硫酸中进行电化学刻蚀5-60s,在针灸针针身上形成刻蚀凹槽。

[0015] 作为优选,本发明所采用的绝缘高分子溶液是聚苯乙烯溶液、聚丙烯溶液、聚乳酸溶液或聚甲基丙烯酸甲酯溶液。

[0016] 作为优选,本发明所采用的步骤2)的具体实现方式是:

[0017] 2.1) 将刻蚀有刻蚀凹槽的针灸针用无水乙醇洗涤后,对其进行表面氨基化处理或巯基化处理后经乙醇洗涤得凹槽氨基化或巯基化的针灸针;

[0018] 2.2) 将步骤2.1) 所得到的凹槽氨基化或巯基化的针灸针针身上包被的高分子绝缘层去除;

[0019] 2.3) 在氨基化处理或巯基化处理后的刻蚀凹槽内覆盖光刻胶,激光光刻暴露 μm 级功能化区域阵列;

[0020] 2.4) 浸泡在由氯金酸与盐酸羟胺所形成的混合溶液中进行原位还原金,在步骤2.3) 所得到的 μm 级功能化区域阵列进行化学沉积形成微纳金结构阵列。

[0021] 作为优选,本发明所采用的氨基化处理或巯基化处理时的采用的试剂为浓度是0.1-50%的3-氨基丙基三乙氧基硅烷、3-氨基丙基三甲氧基硅烷、3-巯基丙基三乙氧基硅烷或3-巯基丙基三甲氧基硅烷;所述氨基化处理或巯基化处理的时间是1-50小时;所述光刻胶是正性光刻胶;所述混合溶液中氯金酸与盐酸羟胺的体积比是10:0.1-1;所述混合溶液中氯金酸的浓度(m/v)是0.01-1%,盐酸羟胺的浓度是0.1-5%。

[0022] 作为优选,本发明所采用的步骤3) 的具体实施方式是:

[0023] 3.1) 制备巯基苯甲酸微胶囊;

[0024] 3.2) 将不同响应分子分别负载到的巯基苯甲酸微胶囊中;所述巯基苯甲酸微胶囊直径是步骤2.3) 制备得到的 μm 级功能化区域阵列中每个巯基化暴露区域尺寸的1.5-2倍;

[0025] 3.3) 将含有不同响应分子的巯基苯甲酸微胶囊按同等比例混合,滴加到步骤2) 制备得到的微纳金结构阵列上,用去离子水洗涤去除未结合的巯基苯甲酸微胶囊,结合的巯基苯甲酸微胶囊释放响应分子,实现一个微纳金结构阵列点功能化一种响应分子,得到基于微纳金结构阵列的含多种不同响应分子的SERS微芯片。

[0026] 作为优选,本发明所采用的步骤3.1) 的具体实施方式是:将0.1-1mg的4-巯基苯甲酸、0.1-1g的玉米醇溶蛋白和0.01-0.1g的甘油溶于50mL的乙醇中,超声助溶后快速加入950mL的水中,100-500rpm离心收集沉淀;沉淀重悬于1000mL的水中,重复离心后,最后沉淀重悬于1000mL水中备用,得到巯基苯甲酸微胶囊;所述巯基苯甲酸微胶囊是直径7.5-10 μm 的球形胶囊。

[0027] 作为优选,本发明所采用的响应分子包括但不限于以巯基苯甲酸作为pH的响应分子、以2,5-二羟基苯硫酚作为ROS的响应分子、以3,4-二氨基苯硫酚作为NO的响应分子以及以4-(氨基磺酰基)苯甲酸 β -巯基乙胺酯作为 H_2S 的响应分子。

[0028] 作为优选,本发明所采用的针灸针为临床上使用的常规针灸针。

[0029] 如前所述的多参数高通量SERS活性微针的制备方法制备得到的活性微针。

[0030] 本发明的优点是:

[0031] 本发明提供了一种多参数高通量SERS活性微针的制备方法及活性微针,是为了更好地携带更多更大容量的SERS活性材料微创进出生物体,因此,在针灸针表面刻蚀凹槽,将SERS活性材料集成于凹槽内研发的SERS活性材料内置的SERS活性微针,即在针灸针的凹槽内集成SERS微芯片,研制高通量检测的SERS活性微针。与现有技术相比,本发明具有如下的特色及优点:1) 和电化学在体分析技术相比,本发明的技术不受生物体的生物组分的干扰,由于有多个不同的响应分子(如以巯基苯甲酸作为pH的响应分子、以2,5-二羟基苯硫酚作为ROS的响应分子、以3,4-二氨基苯硫酚作为NO的响应分子以及以4-(氨基磺酰基)苯甲酸

β -巯基乙胺酯作为 H_2S 的响应分子等),能够实现多个指标快速、直接检测。2)和以前的发明相比,本发明研发的SERS活性微针可以在微创进入生物体的情况下实现生物标志物的高通量检测,目前尚未有同类技术出现。本发明制备的多参数检测的SERS活性微针可以微创进入生物体,实现多种生物指标的微创在体采样,体外拉曼快速检测,在检测中无须样品前处理、不消耗额外试剂,具有成本低、快速、简便等优点,适合新型生物医学问题的研究及医学、环境等大样本筛查等。

附图说明

- [0032] 图1是本发明在针灸针上刻蚀凹槽时所采用的刻蚀装置示意简图;
[0033] 图2是本发明在针灸针上刻蚀的凹槽的实测图;
[0034] 图3是本发明所采用的微纳金结构阵列制备流程图;
[0035] 图4是本发明所采用的SERS微芯片制作流程图;
[0036] 图5是本发明SERS活性微针用于大鼠关节处一氧化氮(A)和pH检测(B)的光谱图。

具体实施方式

[0037] 本发明提供了一种多参数高通量SERS活性微针的制备方法,该制备方法包括以下步骤:

[0038] 1)采用电化学刻蚀的方式在针灸针上刻蚀凹槽,具体实现方式是:

[0039] 1.1)将针灸针浸泡在绝缘高分子溶液中,在针灸针的针身上包被高分子绝缘层,绝缘高分子溶液是聚苯乙烯溶液、聚丙烯溶液、聚乳酸溶液或聚甲基丙烯酸酯溶液;针灸针为临床上使用的常规针灸针;

[0040] 1.2)距离针灸针针尖2-4mm处用刀片划破针灸针针身上的高分子绝缘层,作为刻蚀凹槽的刻蚀位点;

[0041] 1.3)在电流时间曲线模式下(0.1-1.5伏电势),在0.01-5mol/L的硫酸中进行电化学刻蚀5-60s,在针灸针针身上形成刻蚀凹槽。

[0042] 2)在步骤1)所得凹槽内构建微纳金结构阵列,具体实现方式是:

[0043] 2.1)将刻蚀有刻蚀凹槽的针灸针用无水乙醇洗涤后,对其进行表面氨基化处理或巯基化处理后经乙醇洗涤得凹槽氨基化或巯基化的针灸针,氨基化处理或巯基化处理时的采用的试剂为浓度是0.1-50%的3-氨基丙基三乙氧基硅烷、3-氨基丙基三甲氧基硅烷、3-巯基丙基三乙氧基硅烷或3-巯基丙基三甲氧基硅烷;氨基化处理或巯基化处理的时间是1-50小时;

[0044] 2.2)将步骤2.1)所得到的凹槽氨基化或巯基化的针灸针针身上包被的高分子绝缘层去除;

[0045] 2.3)在氨基化处理或巯基化处理后的刻蚀凹槽内覆盖光刻胶,激光光刻暴露 μm 级功能化区域阵列,光刻胶是正性光刻胶;

[0046] 2.4)浸泡在由氯金酸与盐酸羟胺所形成的混合溶液中进行原位还原金,在步骤2.3)所得到的 μm 级功能化区域阵列进行化学沉积形成微纳金结构阵列,混合溶液中氯金酸与盐酸羟胺的体积比是10:0.1-1;混合溶液中氯金酸的浓度(m/v)是0.01-1%,盐酸羟胺的浓度(m/v)是0.1-5%。

[0047] 3) 制作基于微纳金结构阵列的含多种不同响应分子的SERS微芯片,具体实现方式是:

[0048] 3.1) 制备巯基苯甲酸微胶囊,具体是:

[0049] 将0.1-1mg的4-巯基苯甲酸、0.1-1g的玉米醇溶蛋白和0.01-0.1g的甘油溶于50mL的乙醇中,超声助溶后快速加入950mL的水中,100-500rpm离心收集沉淀;沉淀重悬于1000mL的水中,重复离心后,最后沉淀重悬于1000mL水中备用,得到巯基苯甲酸微胶囊;巯基苯甲酸微胶囊是直径7.5-10 μ m的球形胶囊。

[0050] 3.2) 将不同响应分子分别负载到的巯基苯甲酸微胶囊中;巯基苯甲酸微胶囊直径是步骤2.3) 制备得到的 μ m级功能化区域阵列中每个巯基化暴露区域尺寸的1.5-2倍,其中响应分子包括但不限于以巯基苯甲酸作为pH的响应分子、以2,5-二羟基苯硫酚作为ROS的响应分子、以3,4-二氨基苯硫酚作为NO的响应分子以及以4-(氨基磺酰基)苯甲酸 β -巯基乙胺酯作为H₂S的响应分子。

[0051] 3.3) 将含有不同响应分子的巯基苯甲酸微胶囊按同等比例混合,滴加到步骤2) 制备得到的微纳金结构阵列上,用去离子水洗涤去除未结合的巯基苯甲酸微胶囊,结合的巯基苯甲酸微胶囊释放响应分子,实现一个微纳金结构阵列点功能化一种响应分子,得到基于微纳金结构阵列的含多种不同响应分子的SERS微芯片。

[0052] 本发明在提供多参数高通量SERS活性微针的制备方法的同时,还提供了一种基于该方法制备得到的活性微针,该活性微针可以同时、快速检测多个不同响应分子。本发明制备的多参数检测的SERS活性微针可以微创进生物体,实现多种生物指标的微创在体采样,体外拉曼快速检测,在检测中无须样品前处理、不消耗额外试剂,具有成本低、快速、简便等优点,适合新型生物医学问题的研究及医学、环境等大样本筛查等。

[0053] 下面将结合附图以及具体实施例对本发明所提供的技术方案进行详细说明:

[0054] 实施例1针灸针上凹槽刻蚀

[0055] 针灸针浸泡在绝缘高分子如1%的聚苯乙烯甲苯溶液等中,在针灸针针身上包裹一层绝缘层,再在绝缘层上用刀片划破,作为凹槽的刻蚀位点,在电流时间曲线模式下(0.1-1.5伏电势),在0.5摩尔/升的硫酸中进行电化学刻蚀5-60秒,根据图1所示的刻蚀装置(该刻蚀装置属于现有技术),即可得到如图2为代表的凹槽。

[0056] 实施例2凹槽功能化

[0057] 将刻蚀有凹槽的针灸针乙醇洗涤后,浸泡于1%的3-巯基丙基三乙氧基硅烷、3-巯基丙基三甲氧基硅烷乙醇溶液中功能化2-48小时,乙醇洗涤即可得凹槽巯基化的针灸针。

[0058] 实施例3凹槽内构建微纳金结构阵列制备

[0059] 参见图3,将凹槽巯基化的针灸针浸泡于甲苯中,溶去高分子绝缘层。在巯基化的凹槽内覆盖正性光刻胶,激光曝光阵列点的大小设计为5 μ m \times 5 μ m,阵列点间距为设计为5 μ m,光刻暴露 μ m级巯基化区域阵列。浸泡在0.05%的氯金酸溶液中,加入0.1%的盐酸羟胺溶液(氯金酸溶液:盐酸羟胺溶液=10:1)原位还原金,在巯基化暴露区域化学沉积形成微纳金结构阵列;

[0060] 实施例4巯基苯甲酸微胶囊制备

[0061] 0.5mg4-巯基苯甲酸、0.5克玉米醇溶蛋白和0.05克甘油溶于50mL的乙醇中,充分超声助溶后快速加入950mL的水中,300rpm离心收集沉淀;沉淀重悬于1000mL的水中,

300rpm离心收集沉淀(重复5次);最后沉淀重悬于1000mL水中备用。

[0062] 实施例5微纳金结构阵列功能化——制作SERS微芯片

[0063] 参见图4,将不同的响应分子的微胶囊按同等比例混合,滴加到微纳金结构阵列上,洗涤去除未结合的微胶囊,结合的微胶囊释放响应分子,实现一个微纳金结构阵列点功能化一种响应分子。

[0064] 实施例6一氧化氮及pH检测的SERS活性微针的制备及关节炎模型大鼠关节处一氧化氮及pH检测

[0065] 以巯基苯甲酸作为pH的响应分子、以3,4-二氨基苯硫酚作为NO的响应分子分别制备微胶囊,制作SERS微芯片即为一氧化氮及pH检测的SERS活性微针。将制备的SERS活性微针刺入关节炎模型大鼠的关节处,留针10分钟,取出检测。即可得到关节处的一氧化氮及pH响应的光谱(参见图5)。可计算得到关节处的一氧化氮浓度及pH值。

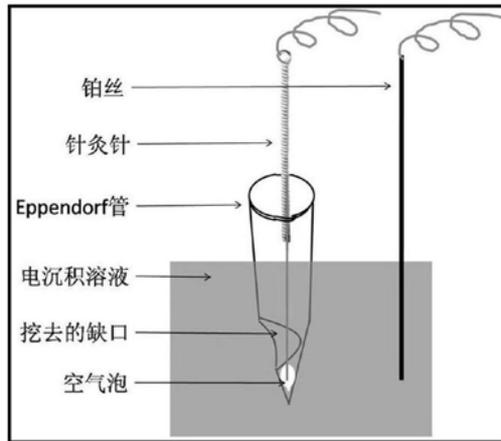


图1

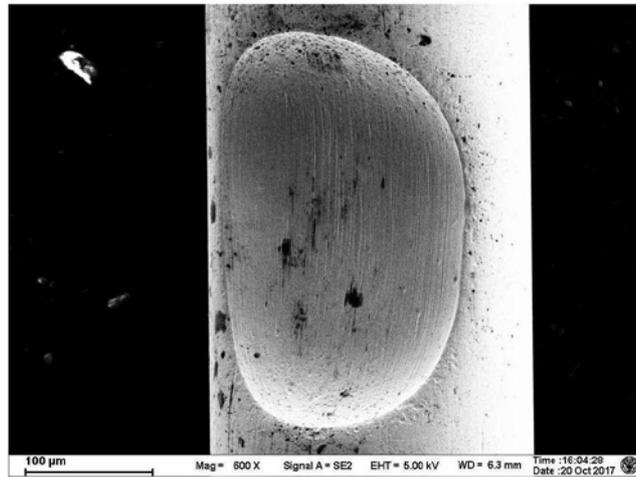


图2

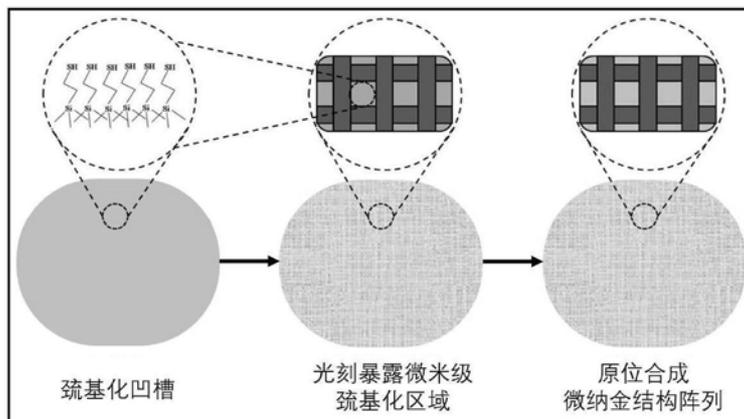


图3

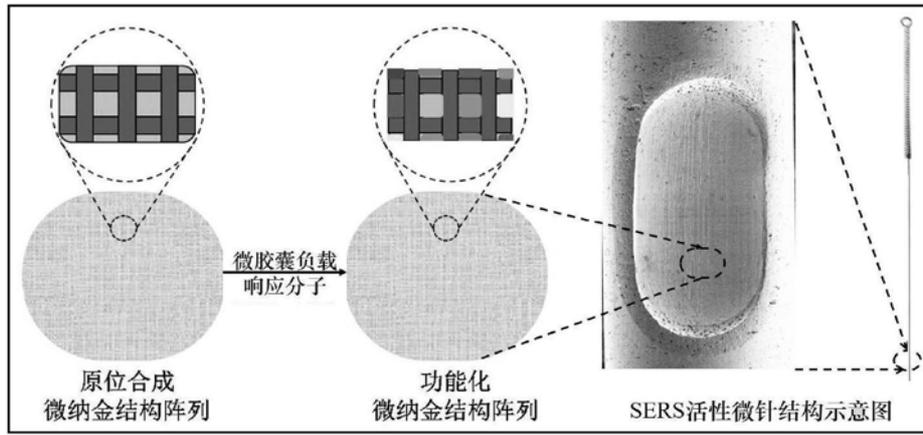


图4

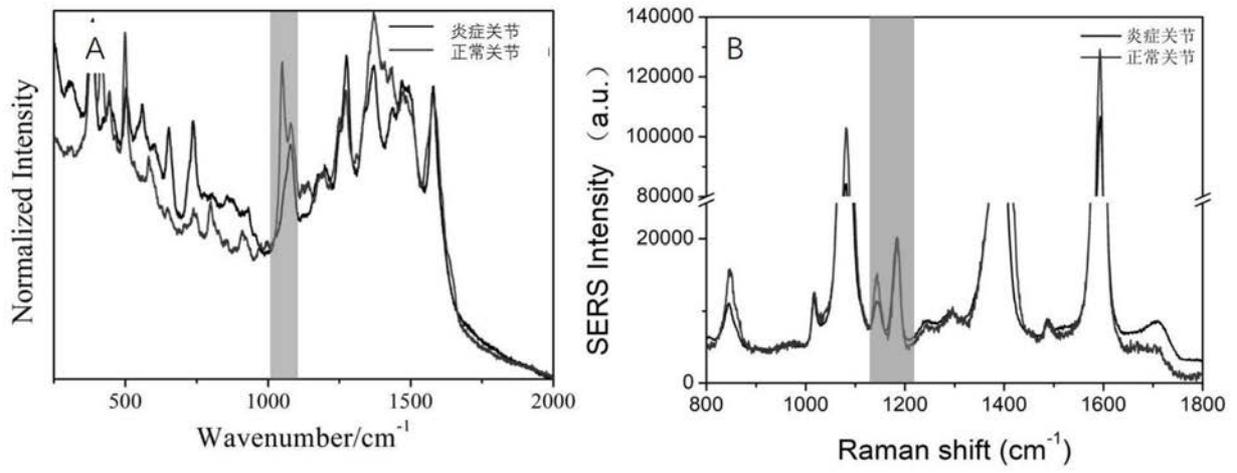


图5

专利名称(译)	多参数高通量SERS活性微针的制备方法及其活性微针		
公开(公告)号	CN109987579A	公开(公告)日	2019-07-09
申请号	CN201910283850.X	申请日	2019-04-12
[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	董健 李哲 周月		
发明人	董健 潘晨嫣 李哲 周月		
IPC分类号	B81C1/00 A61B5/145 B81B1/00		
CPC分类号	A61B5/14528 A61B5/14539 A61B5/14546 B81B1/008 B81C1/00111		
代理人(译)	王艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物传感技术领域，涉及一种多参数高通量SERS活性微针的制备方法及其活性微针，该制备方法包括以下步骤：1) 采用电化学刻蚀的方式在针灸针上刻蚀凹槽；2) 在步骤1) 所得凹槽内构建微纳金结构阵列；3) 制作基于微纳金结构阵列的含多种不同响应分子的SERS微芯片。本发明制备的多参数检测的SERS活性微针可以微创进出生物体，实现多种生物指标的微创在体采样，体外拉曼快速检测，在检测中无须样品前处理、不消耗额外试剂，具有成本低、快速、简便等优点，适合新型生物医学问题的研究及医学、环境等大样本筛查等。

