



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109490525 B

(45) 授权公告日 2021.09.07

(21) 申请号 201811327186.6

(22) 申请日 2018.11.08

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109490525 A

(43) 申请公布日 2019.03.19

(73) 专利权人 南京光声超构材料研究院有限公司

地址 210046 江苏省南京市栖霞区纬地路
南大科学园新兴产业孵化基地重点实验室3栋7楼

(72) 发明人 卢明辉 冯元会 颜学俊 周洁
张伟华 宁兴海 陈延峰

(74) 专利代理机构 江苏法德东恒律师事务所
32305

代理人 李媛媛

(51) Int.Cl.

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 21/65 (2006.01)

(56) 对比文件

KR 20110096739 A, 2011.08.31

CN 103116019 A, 2013.05.22

CN 107583654 A, 2018.01.16

CN 1444045 A, 2003.09.24

CN 102859359 A, 2013.01.02

Yongfeng Gao 等. Ultrasensitive SERS-Based Immunoassay of Tumor Marker in Serum Using Au-Ag Alloy Nanoparticles and Ag/AgBr Hybrid Nanostructure. 《NANO》. 《NANO》, 2018, 第13卷 (第01期), 第1850001-12页.

审查员 叶志东

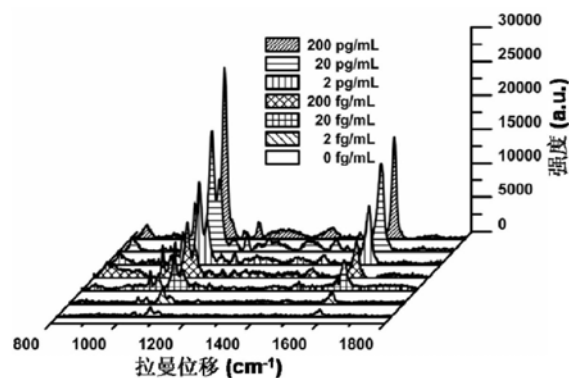
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种溴化银膜SERS免疫基底的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种溴化银膜SERS免疫基底的制备方法, 步骤如下: (1) 在衬底上溅射一层银膜; (2) 采用原位氧化银膜的方法, 将步骤(1)所得到的银膜浸在由九水硝酸铁、溴化钠和聚乙烯吡咯烷酮组成的混合溶液中反应; (3) 采用光致还原的方法, 将步骤(2)所得到的产物置于紫外光下光照, 生成Ag-AgBr/Ag混合结构; (4) 将抗体溶液滴加到Ag-AgBr/Ag混合结构表面, 静置一段时间后, 分别用TBS缓冲液、PBS缓冲液和去离子水清洗混合结构, 然后进行氩气干燥处理, 得到链接有抗体的Ag-AgBr/Ag的SERS免疫基底。本发明的SERS免疫基底可产生均匀、强度高和稳定性好的SERS信号。



1. 一种溴化银膜SERS免疫基底的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 制备银膜:采用磁控溅射的方法,在衬底上溅射一层银膜;

(2) 制备Ag-AgBr:采用原位氧化银膜的方法,将步骤(1)所得到的银膜浸在由30~40 mmol/L九水硝酸铁、20~30 mmol/L溴化钠和10~20 mmol/L聚乙烯吡咯烷酮组成的1 mL混合溶液中反应5h,所得产物即为Ag-AgBr;

(3) 制备Ag-AgBr/Ag:采用光致还原的方法,将步骤(2)所得到的Ag-AgBr置于紫外光下光照1 h,生成Ag-AgBr/Ag混合结构;

(4) 将抗体溶液滴加到所述步骤(3)得到的Ag-AgBr/Ag混合结构表面,静置一段时间后,分别用0.05% Tween20 的TBS 缓冲液、PBS 缓冲液和去离子水清洗混合结构,然后进行氩气干燥处理,得到链接有抗体的Ag-AgBr/Ag的SERS免疫基底。

2. 根据权利要求1所述的一种溴化银膜SERS免疫基底的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,衬底为单面抛光的硅片,硅片采用单晶硅硅片或多晶硅硅片。

3. 根据权利要求1所述的一种溴化银膜SERS免疫基底的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,银膜的厚度为200~800nm。

4. 根据权利要求1所述的一种溴化银膜SERS免疫基底的制备方法,其特征在于,步骤(4)中,滴加的抗体溶液的质量浓度为0.1~0.2 mg/mL;滴加到所述Ag-AgBr/Ag混合结构表面的单位面积的抗体溶液体积范围为10~13 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。

5. 根据权利要求1所述的一种溴化银膜SERS免疫基底的制备方法,其特征在于,步骤(4)之后,向得到的链接有抗体的Ag-AgBr/Ag基底上滴加牛血清白蛋白溶液,室温下静置3 h后,分别用0.05% Tween20 的TBS 缓冲液、PBS 缓冲液和去离子水清洗基底,对清洗后的基底进行氩气干燥处理。

6. 根据权利要求5所述的一种溴化银膜SERS免疫基底的制备方法,其特征在于,所述牛血清白蛋白溶液的质量浓度为2%~3%;滴加到所述Ag-AgBr/Ag基底上的单位面积的牛血清白蛋白溶液体积范围为5~10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。

一种溴化银膜SERS免疫基底的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于纳米材料的技术领域,具体涉及到一种溴化银膜SERS免疫基底的制备方法。

背景技术

[0002] 由于SERS能够极大地放大位于等离子金属纳米结构表面分析物的拉曼信号,且具有高灵敏度和无损检测的优势,因此SERS光谱技术得到了广泛的关注和快速发展。利用化学或者物理方法制备等离子金属纳米结构,并制备成具有SERS增强能力的活性基底,就可以利用SERS光谱技术对位于SERS活性基底表面的分析物进行高灵敏度检测。因此,制备高性能的SERS活性基底,应用于生物检测、疾病诊断、食品安全检测和医学成像等领域具有重要意义。

[0003] SERS基底多采用贵金属纳米粗糙表面或纳米结构,以增强拉曼散射信号的强度。利用贵金属纳米粒子制备SERS基底的常用方法包括溶胶颗粒法、物理刻蚀或电化学沉积等,这些技术在基底的均匀性、稳定性和重复性,以及工艺的复杂性和可控性等方面或多或少都存在问题。目前,金属氧化物,卤化银,半导体以及它们的混合结构吸引了广泛的研究,结果表明这些纳米结构基底具有优异的SERS活性和稳定性。

发明内容

[0004] 为此,本发明提供一种经溴化处理的银膜SERS免疫基底的制备方法,获得的基底具有较高的SERS性能。

[0005] 本发明采用的技术方案为:

[0006] 一种溴化银膜SERS免疫基底的制备方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 制备银膜:采用磁控溅射的方法,在衬底上溅射一层银膜;

[0008] (2) 制备Ag-AgBr:采用原位氧化银膜的方法,将步骤(1)所得到的银膜浸在由30~40mM/L九水硝酸铁、20~30mM/L溴化钠和10~20mM/L聚乙烯吡咯烷酮组成的1mL混合溶液中反应5h,所得产物即为Ag-AgBr;

[0009] (3) 制备Ag-AgBr/Ag:采用光致还原的方法,将步骤(2)所得到的Ag-AgBr置于紫外光下光照1h,生成Ag-AgBr/Ag混合结构;

[0010] (4) 将抗体溶液滴加到所述步骤(3)得到的Ag-AgBr/Ag混合结构表面,静置一段时间后,分别用0.05%Tween20的TBS缓冲液、PBS缓冲液和去离子水清洗混合结构,然后进行氩气干燥处理,得到链接有抗体的Ag-AgBr/Ag的SERS免疫基底。

[0011] 优选地,步骤(1)中,衬底为单面抛光的硅片,硅片采用单晶硅硅片或多晶硅硅片。

[0012] 优选地,步骤(1)中,银膜的厚度为200~800nm。

[0013] 优选地,步骤(4)中,滴加的抗体溶液的质量浓度为0.1~0.2mg/mL;滴加到所述Ag-AgBr/Ag混合结构表面的单位面积的抗体溶液体积范围为10~13 μ L/cm²。

[0014] 进一步地,步骤(4)之后,向得到的链接有抗体的Ag-AgBr/Ag基底上滴加牛血清白

蛋白溶液,室温下静置3h后,分别用0.05%Tween20的TBS缓冲液、PBS缓冲液和去离子水清洗基底,对清洗后的基底进行氩气干燥处理。

[0015] 优选地,所述牛血清白蛋白溶液的质量浓度为2%~3%;滴加到所述Ag-AgBr/Ag基底上的单位面积的牛血清白蛋白溶液体积范围为5~10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$

[0016] 本发明针对现有SERS基底不均匀、不稳定的特点,提供一种贵金属与半导体纳米混合结构Ag-AgBr/Ag的SERS免疫基底及其制备方法。由于银纳米粒子的等离子效应和优异的传导性,使得溴化银在光下能够稳定存在,同时银纳米粒子和溴化银的界面处有强烈的电荷转移和电磁场的产生,有利于基底产生均匀、强度高和稳定性好的SERS信号。

附图说明

[0017] 图1为实施例1得到的Ag-AgBr结构的扫描电子显微镜照片。

[0018] 图2为实施例1得到的Ag-AgBr/Ag结构的扫描电子显微镜照片。

[0019] 图3为实施例1中制备的Ag-AgBr/Ag结构上链接拉曼标记分子4MBA的多个样品的SERS光谱图。

[0020] 图4为实施例1中制备的Ag-AgBr/Ag结构上链接拉曼标记分子4MBA的在基底上不同检测点采集的1078 cm^{-1} 的SERS峰强度柱状图。

[0021] 图5为实施例3制备的免疫基底检测不同浓度的甲胎蛋白特异性抗原(AFP)对应的SERS光谱图。

[0022] 图6为实施例3制备的免疫基底检测固定浓度PSA抗原时对应的特异性SERS光谱图。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。

[0024] 实施例1

[0025] (1) 制备银膜:采用磁控溅射在单面抛光硅片的抛光面上上溅射一层800nm的银膜。

[0026] (2) 制备溴化银膜:将步骤(1)所得到的银膜浸在九水硝酸铁(40mM/L)、溴化钠(30mM/L)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP,10mM/L)的1mL混合溶液中反应5h,所得产物即为Ag-AgBr。

[0027] (3) 制备Ag-AgBr/Ag:采用光致还原的方法,将实施例1所得到的Ag-AgBr置于紫外光下光照1h,最终生成Ag-AgBr/Ag混合结构。

[0028] 实施例2

[0029] 本实施例给出将实施例1所制备的Ag-AgBr/Ag基底链接拉曼标记分子并检测其SERS光谱的实施过程。具体步骤如下:

[0030] (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。

[0031] (2) 将实施例1制备的Ag-AgBr/Ag基底浸在4MBA溶液中,置于室温3h,用去离子水清洗未链接到基底的4MBA标记分子,清洗2~3次后,置于室温自然干燥。

[0032] (3) 测量由步骤(2)制备的Ag-AgBr/Ag基底链接的4MBA标记分子的SERS光谱。拉曼光谱仪记录的4MBA标记分子的特征SERS光谱如图3、4所示。采集SERS光谱的积分时间为10s,照射激光的功率为26mw,激光波长为785nm。

[0033] 由图3可知,实施例2制备的基底具有优异的SERS特性,且重复性好。图4为在基底上25个不同检测点采集的拉曼标记分子 1078cm^{-1} 特征峰强度大小,从图中可以看出该基底稳定性较好。

[0034] 实施例3

[0035] 本实施例给出制备一种Ag-AgBr/Ag的SERS免疫基底的实施过程。具体步骤如下:

[0036] (1) 将抗体溶液滴加到实施例1得到的Ag-AgBr/Ag基底表面,在 4°C 的环境下静置12h,分别用0.05% Tween20的TBS缓冲液、PBS缓冲液和去离子水清洗基底,对清洗后的基底进行氩气干燥处理,得到链接有抗体的Ag-AgBr/Ag。

[0037] (2) 向步骤(1)得到的链接有抗体的Ag-AgBr/Ag基底上滴加牛血清白蛋白溶液,室温下静置3h后,分别用0.05% Tween20的TBS缓冲液、PBS缓冲液和去离子水清洗基底,对清洗后的基底进行氩气干燥处理,得到具有特异性选择功能的SERS免疫基底。

[0038] 实施例4

[0039] 本实施例给出制备一种Ag-AgBr/Ag的SERS免疫基底用于甲胎蛋白(AFP)的免疫检测实施过程。具体步骤如下:

[0040] (1) 从浓度为0fg/mL、2fg/mL、20fg/mL、200fg/mL、20pg/mL、200pg/mL和200pg/mL的待测AFP抗原溶液样品中分别取15 μL 滴加到由实施例3制备的7个SERS免疫基底上。在 37°C 的恒温条件下反应2h后,分别用0.05% Tween20的TBS缓冲液、PBS缓冲液和去离子水清洗基底,再对SERS免疫基底进行氩气干燥处理,得到7个对应不同AFP抗原浓度的SERS免疫基底。

[0041] (2) 按照现有技术,如2009年发表在Materials Chemistry and Physics杂志上的文章(113期276-282页)公开的金银合金纳米粒子的制备方法,制备直径大小为20nm的金银合金纳米粒子。在浓度为1mM的对巯基苯甲酸溶液(4MBA)溶液中取10 μL 滴加到1mL的所述的金银合金纳米粒子中,充分混合并静置12h后,进行离心处理,以8000rpm的转速离心20min,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。制备得到修饰有4MBA的20nm的金银合金纳米粒子探针溶液,在缓慢搅拌的情况下,向探针溶液中加入20 μL 且浓度为0.1mg/mL的anti-AFP抗体溶液,在 4°C 恒温下反应3h,再离心处理,以8000rpm的转速离心20min,以去除未吸附在金银合金纳米粒子表面的anti-AFP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。由此,制备得到金银合金纳米粒子免疫探针溶液。

[0042] (3) 从步骤(2)制备的免疫探针溶液中分别取15 μL 滴加到步骤(1)制备的链接有待测抗原的7个SERS免疫基底上,在温度为 4°C 的恒温条件下反应3h,使所滴加的待测AFP抗原溶液中的抗原与SERS免疫基底上的anti-AFP抗体以及免疫探针中的anti-AFP抗体发生免疫复合反应。之后,分别用0.05% Tween20的TBS缓冲液、PBS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免疫基底进行氩气干燥处理,即得到7个检测样品。

[0043] (4) 利用拉曼光谱仪对步骤(3)处理后得到的7个检测样品进行SERS光谱测量。由本实施例得到的7个样品的SERS光谱如图5所示。

[0044] 从图5中可以看出,在AFP抗原溶液浓度低至2fg/mL时,在拉曼位移 1078cm^{-1} 处仍然有明显的SERS信号。所以,由实施例4制备得到的SERS免疫基底进行AFP抗原浓度检测,具有高灵敏度。

[0045] (5) 为检测免疫基底的特异性,选取了PSA抗原,按照步骤(1)、(3)和(4)的流程进行SERS光谱测量。特异性SERS光谱如图6所示。

[0046] 由图6可知,实施例4制备的免疫基底只对特异性抗原AFP具有理想的检测结果,对非特异性抗原PSA无明显的SERS增强效果,表明实施例4制备得到的SERS免疫基底具有优异的特异性。

[0047] 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,凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何简单修改和修饰,均仍属于本发明技术方案保护的范围内。

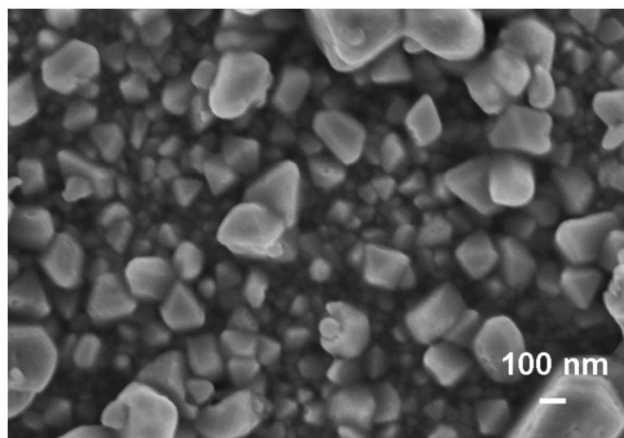


图1

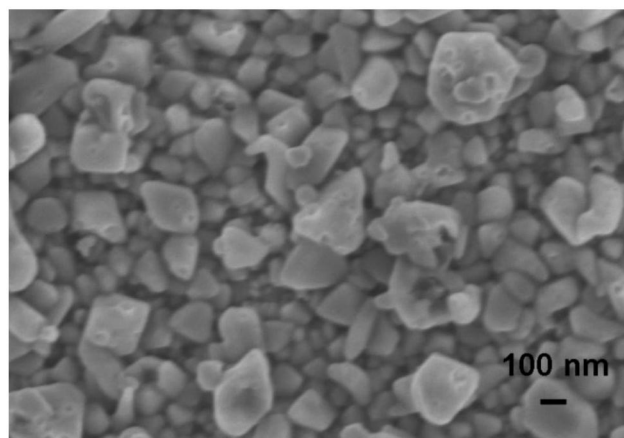


图2

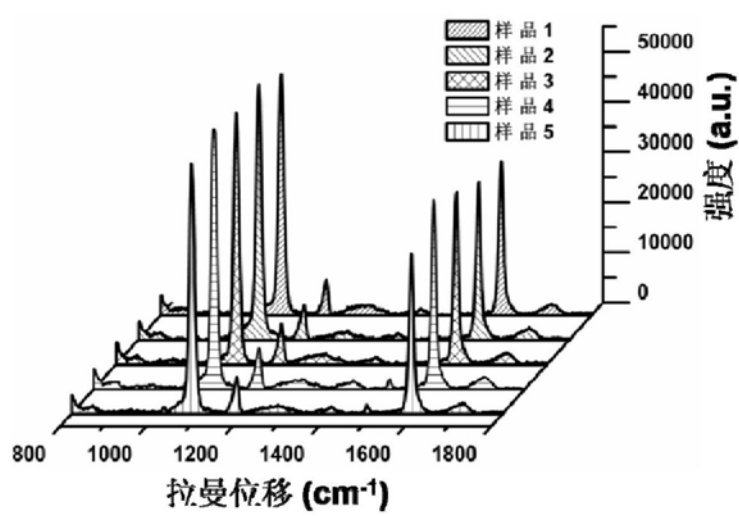


图3

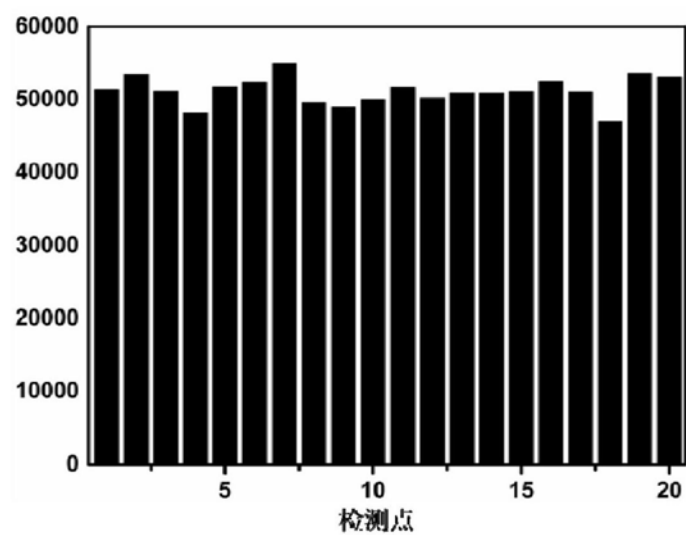


图4

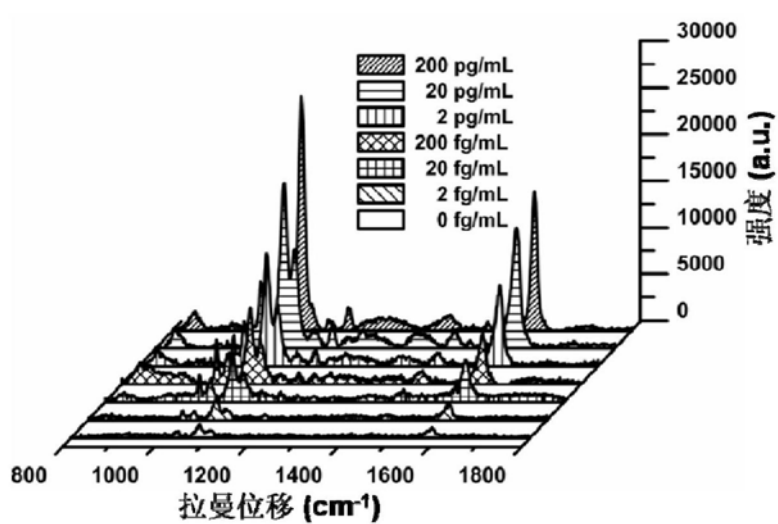


图5

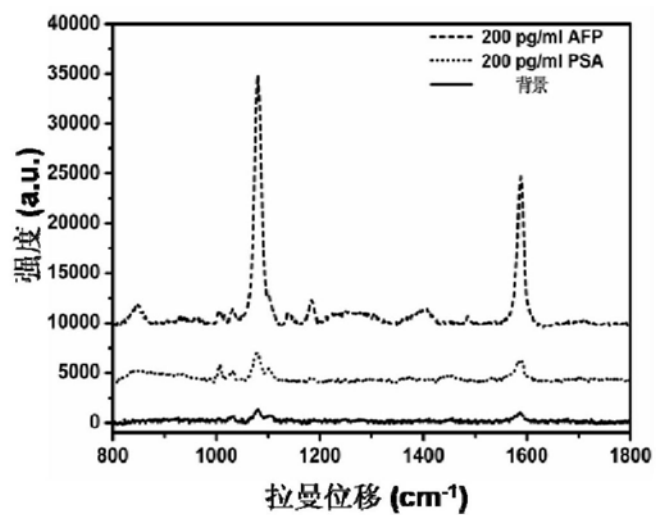


图6