



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104568898 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201410775894. 1

(22) 申请日 2014. 12. 17

(71) 申请人 浙江理工大学

地址 310018 浙江省杭州市杭州经济开发区  
白杨街道 2 号大街 928 号

(72) 发明人 刘爱萍 汤建 吉艺昕

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务有限公  
司 33200

代理人 邱启旺

(51) Int. Cl.

G01N 21/65(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页  
序列表1页 附图4页

### (54) 发明名称

一种空心金纳米粒子-DNA 复合基底及其制备方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种空心金纳米粒子层-DNA 层-空心金纳米粒子层复合基底及其制备方法。本发明复合基底由第一空心金纳米层、DNA 层、第二空心金纳米层组成。这样的结构不但在水平方向上存在金属纳米粒子之间的表面等离子激元的耦合效应,在垂直于基底的方向上也会促进表面等离子激元的耦合,形成更多的“热点”,而 DNA 链正处于两层空心金纳米粒子层之间产生的热点耦合区域,使得 DNA 的拉曼散射强度得到显著增强。该复合结构与传统的拉曼活性基底相比,本发明所制备的复合基底在增强拉曼散射强度上有更大的优势。

1. 一种空心金纳米粒子-DNA 复合基底,其特征在于:由第一空心金纳米层、第二空心金纳米层以及连接第一空心金纳米层和第二空心金纳米层的 DNA 层组成, DNA 层由 SEQ ID NO. 1 所述的 probeDNA 单链和 SEQ ID NO. 2 所述的 reporterDNA 单链组成。

2. 一种权利要求 1 所述空心金纳米粒子-DNA 复合基底的制备方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

(1)设计如 SEQ ID NO. 1 所示的 probeDNA 单链和如 SEQ ID NO. 2 所示的 reporterDNA 单链;

(2)在 Si 衬底组装第一空心金纳米粒子层;

(3)在步骤(2)制备的第一空心金纳米层上修饰步骤(1)设计的 probeDNA 单链,产物标记为 Si/HGN-probeDNA;

(4)将步骤(1)设计 reporterDNA 单链修饰到空心金纳米粒子上,得到 reporterDNA-HGN 溶液;

(5)将步骤(4)制备得到的 reporterDNA-HGN 溶液滴到 Si/HGN-probeDNA 表面,室温孵化 24h 后,用质量分数为 0.01% 的十二烷基硫酸钠水溶液和水清洗,在第一空心金纳米层上,通过两条互补的单链 DNA 组装第二空心金纳米层,得到空心金纳米粒子-DNA 复合基底。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述步骤 2 具体为:

(2.1)向 4mL 浓度为 1mmol/L 空心金纳米粒子水溶液中,逐滴加入 300  $\mu$  L 正丁醇,形成油水界面,油水界面处有一层空心金纳米粒子薄膜;

(2.2)油水界面处的金纳米粒子薄膜经老化 10 分钟后,用 Si 衬底将步骤 2.1 得到的空心金纳米粒子薄膜捞起,60 $^{\circ}$ C 烘干后用无水乙醇清洗掉表面的残留物,在 Si 衬底上得到第一空心金纳米粒子层。

4. 根据权利要求 2 所述空心金纳米粒子,其特征在于:所述空心金纳米粒子的外径为 30~40nm,空心金纳米粒子的壁厚为 6nm~10nm。

5. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述步骤 3 具体为:在 probeDNA 单链 5 端修饰  $-(CH_2)_6-SH$ , 得到 probeDNA- $(CH_2)_6-SH$ ;将足量的浓度为 1  $\mu$  mol/L 的 probeDNA- $(CH_2)_6-SH$  单链的水溶液 (PH=7.1) 滴加到步骤(2)制备的第一空心金纳米粒子层上,使得 probeDNA- $(CH_2)_6-SH$  浸润第一空心金纳米粒子层,室温下孵化 24h,再用质量分数为 0.01% 的十二烷基硫酸钠清洗掉多余的 probe DNA,60 $^{\circ}$ C 真空干燥备用。

6. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述步骤 4 具体为:在 reporterDNA 单链的 5 端修饰  $-(CH_2)_3-SH$ , 得到 reporterDNA- $(CH_2)_3-SH$ ;将 500  $\mu$  L PH=7.1 的 PBS 溶液、100  $\mu$  L 质量分数为 0.1% 的十二烷基硫酸钠、10  $\mu$  L 浓度为 1  $\mu$  mol/L reporterDNA- $(CH_2)_3-SH$  单链的水溶液 (PH=7.1) 和 400  $\mu$  L 浓度为 1mmol/L 的金空心球水溶胶混合均匀后,静置 6h, 然后进行盐化,盐化过程为:分 5 次添加等体积的浓度依次递增的 NaCl 溶液到混合溶液中, NaCl 溶液每次添加 100  $\mu$  L;首次滴加 NaCl 溶液的浓度为 2mol/L, NaCl 溶液的浓度梯度为 0.05mol/L;盐化后静置 24h,在 7000rpm/min 下离心 7min;去上清液后,加入 1mL 质量分数为 0.01% 十二烷基硫酸钠再次离心洗涤去上清液,沉淀用 1mL 的 PBS 缓冲液溶解,得到 reporterDNA-HGN 的 PBS 溶液。

## 一种空心金纳米粒子-DNA复合基底及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种空心金纳米粒子-DNA复合基底及其制备方法:采用界面自组装技术制备单层空心金纳米粒子薄膜,通过DNA单链之间的碱基互补配对将上下两层空心金纳米粒子层组装到一起,从而制备出了空心金纳米粒子层-DNA层-空心金纳米粒子层复合基底作为表面增强拉曼基底。

### 背景技术

[0002] 表面增强拉曼散射(SERS)光谱是一种非常有效的探测界面特性和分子间相互作用、表征表面分子吸附行为和分子结构的工具,基于其单分子水平的敏感性、分子特异性的特点,这项技术已成为灵敏度最高的研究界面效应的技术之一,最大范围地应用于研究吸附分子在表面的取向及吸附行为、吸附界面表面状态、生物大分子的界面取向及构型、构象和结构分析。SERS光谱作为一种高灵敏信号检测和具有单分子识别功能的光谱技术,在生命科学、分析化学、医学、食品安全、环境卫生等领域有着重要的应用。

[0003] SERS技术克服了传统检测技术检测信号微弱的特点,有效弥补了拉曼信号灵敏度低的弱点,可以获得常规拉曼光谱难以获得的信息。尤其是在表面和界面信息方面,金属的拉曼增长特性及应用功能非常突出,该技术已经广泛应用于表面和界面的物理化学研究。在生命科学领域,利用这种高灵敏度的吸附增强效应进行生物分子的检测,如DNA分子、抗体分子、蛋白质分子等,已成为近年来重点发展的方向之一。

[0004] SERS增强机理主要有电磁场增强和化学增强两种。电磁场增强机理与金属表面产生的表面等离激元有关,表面等离激元的共振依赖于纳米材料的形貌、结构、组分、耦合情况等,可使得吸附到粗糙金属表面的探针分子的拉曼信号增加 $10^3$ — $10^8$ 倍。随着纳米科技的发展,利用各种技术制备形貌各异的金属纳米材料并研究材料结构、等离激元特性与SERS活性的关系已成为研究的热点之一。通过化学合成法制备形态各异的金属纳米材料,通过控制纳米材料的尺寸、形貌、表面粗糙度、结晶度及粒子间隙等调节纳米粒子周围的局域电磁场强度,应用于SERS研究。但SERS技术还有许多限制因素,它要求试样与衬底相接触,失去了拉曼光谱技术非侵入和不接触的优点;它的衬底对不同痕量分子材料的吸附性能不同,使得定量分析受到限制。

[0005] 目前,国内外学者的研究大多集中在实心的金属纳米粒子的制备及SERS性能研究上。由于具有空心结构的金属等离激元能更好的通过表面等离子体共振激发与光子相互作用,将光陷定在空心结构中,从而提高对光的利用率。并且空心结构被激发后周围的电磁场强度更高,粗糙的表面可以产生更多的“热点”区域,其SERS活性更强,探针分子检测极限会大大提高。因此,研究空心结构的金属纳米材料在SERS性能研究领域很有必要。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种空心金纳米粒子-DNA复合基底及其制备方法。

[0007] 为实现以上目的,本发明所采用的技术方案为:一种空心金纳米粒子-DNA复合基

底,由第一空心金纳米层、DNA 层、第二空心金纳米层组成,所述 DNA 层位于第一空心金纳米层和第二空心金纳米层之间,DNA 层由 SEQ ID NO. 1 所述的 probeDNA 单链和 SEQ ID NO. 2 所述的 reporterDNA 单链组成。

[0008] 一种空心金纳米粒子-DNA 复合基底的制备方法,该方法包括以下步骤:

一种空心金纳米粒子-DNA 复合基底,由第一空心金纳米层、DNA 层、第二空心金纳米层组成,所述 DNA 层位于第一空心金纳米层和第二空心金纳米层之间,DNA 层由 SEQ ID NO. 1 所述的 probeDNA 单链和 SEQ ID NO. 2 所述的 reporterDNA 单链组成。

[0009] 2. 一种权利要求 1 所述的空心金纳米粒子-DNA 复合基底的制备方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

(1)设计如 SEQ ID NO. 1 所示的 probeDNA 单链和如 SEQ ID NO. 2 所示的 reporterDNA 单链;

(2)在 Si 衬底组装第一空心金纳米粒子层;

(3)在步骤(2)制备的第一空心金纳米层上修饰步骤(1)设计的 probeDNA 单链,产物标记为 Si/HGN-probeDNA;

(4)将步骤(1)设计 reporterDNA 单链修饰到空心金纳米粒子上,得到 reporterDNA-HGN 溶液;

(5)将步骤(4)制备得到的 reporterDNA-HGN 溶液滴到 Si/HGN-probeDNA 表面,室温孵化 24h 后,用质量分数为 0.01% 的十二烷基硫酸钠水溶液和水清洗,在第一空心金纳米层上,通过两条互补的单链 DNA 组装第二空心金纳米层,得到空心金纳米粒子-DNA 复合基底。

[0010] 进一步地,步骤 2 具体为:

(2.1)向 4mL 浓度为 1mmol/L 空心金纳米粒子水溶液中,逐滴加入 300  $\mu$  L 正丁醇,形成油水界面,油水界面处有一层空心金纳米粒子薄膜;

(2.2)油水界面处的金纳米粒子薄膜经老化 10 分钟后,用 Si 衬底将步骤 2.1 得到的空心金纳米粒子薄膜捞起,60 $^{\circ}$ C 烘干后用无水乙醇清洗掉表面的残留物,在 Si 衬底上得到第一空心金纳米粒子层。

[0011] 进一步地,空心金纳米粒子的外径为 30~40nm,空心金纳米粒子的壁厚为 6nm~10nm。

[0012] 进一步地,步骤 3 具体为:在 probeDNA 单链 5 端修饰  $-(CH_2)_6-SH$ ,得到 probeDNA- $(CH_2)_6-SH$ ;将足量(40  $\mu$  L)的浓度为 1  $\mu$  mol/L 的 probeDNA- $(CH_2)_6-SH$  单链的水溶液(PH=7.1)滴加到步骤(2)制备的第一空心金纳米粒子层上,使得 probeDNA- $(CH_2)_6-SH$  浸润第一空心金纳米粒子层,室温下孵化 24h,再用质量分数为 0.01% 的十二烷基硫酸钠清洗掉多余的 probe DNA,60 $^{\circ}$ C 真空干燥备用。

[0013] 进一步地,步骤 4 具体为:在 reporterDNA 单链的 5 端修饰  $-(CH_2)_3-SH$ ,得到 reporterDNA- $(CH_2)_3-SH$ ;将 500  $\mu$  L PH=7.1 的 PBS 溶液、100  $\mu$  L 质量分数为 0.1% 的十二烷基硫酸钠、10  $\mu$  L 浓度为 1  $\mu$  mol/L reporterDNA- $(CH_2)_3-SH$  单链的水溶液(PH=7.1)和 400  $\mu$  L 浓度为 1mmol/L 的金空心球水溶胶混合均匀后,静置 6h,然后进行盐化,盐化过程为:分 5 次添加等体积的浓度依次递增的 NaCl 溶液到混合溶液中,NaCl 溶液每次添加 100  $\mu$  L;首次滴加 NaCl 溶液的浓度为 2mol/L,NaCl 溶液的浓度梯度为 0.05mol/L;盐化后静置 24h,在 7000rpm/min 下离心 7min;去上清液后,加入 1mL 质量分数为 0.01% 十二烷

基硫酸钠再次离心洗涤去上清液,沉淀用 1mL 的 PBS 缓冲液溶解,得到 reporterDNA-HGN 的 PBS 溶液。

[0014] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

1. 在本发明中,由于采用空心金纳米粒子作为金纳米粒子层,从图 2TEM 图可以看到,空心球表面粗糙度很高,粗糙的表面更容易产生热点,因而,空心球周围激发的电场会更强,使得 DNA 的拉曼信号强度进一步提高。

[0015] 2. 本发明采用互补 DNA 单链来连接上下两层空心金纳米粒子,并以此结构来检测 DNA 的拉曼信号。这样的结构不但在水平方向上存在金属纳米粒子之间的表面等离子激元的耦合效应,在垂直于基底的方向上也会促进表面等离子激元的耦合,形成更多的“热点”,DNA 正处于金纳米粒子产生的热点耦合区域,使得 DNA 的拉曼散射强度显著增加。与传统的拉曼活性基底相比,本发明基底在增强拉曼散射强度上有更大的优势。

[0016] 3. 本发明采用化学合成法制备空心金纳米粒子,制备方法简单、容易操作,成本低。

[0017] 4. 本发明采用界面自组装的环境友好型制膜技术制备空心金纳米粒子薄膜,制备方法简单、效率高,成本低。

[0018] 5. 本发明基底的第一金纳米层和第二金纳米层均为空心金纳米层,其化学稳定性好,生物相容性佳,在 DNA 及其他分子的检测上存在着广泛的应用。

## 附图说明

[0019] 图 1-3 为制备的金纳米粒子的样品表征图片和 XRD 曲线,图 1 为空心金纳米粒子的透射电镜图,图 2 为空心金纳米粒子的高分辨透射电镜图,图 3 为空心金纳米粒子的 X 射线衍射曲线。

[0020] 图 4 为采用界面自组装的方法组装的空心金纳米粒子薄膜的 SEM 表征图。

[0021] 图 5 为单层金纳米粒子样品组装互补和非互补单链 DNA 的拉曼强度曲线,分别对应为 HGN-probeDNA-probeDNA (非互补)和 HGN-probeDNA-reporterDNA (互补)样品的拉曼强度曲线。

[0022] 图 6 为 Si/HGN-DNA-HGN 的 SEM 图。

[0023] 图 7 为单层金纳米粒子样品检测 DNA 拉曼强度和双层金纳米粒子样品检测 DNA 强度的拉曼曲线,分别对应为 HGN-DNA 和 HGN-DNA-HGN 样品的拉曼强度曲线。

## 具体实施方式

[0024] 一种空心金纳米粒子-DNA 复合基底,由第一空心金纳米层、DNA 层、第二空心金纳米层组成,所述 DNA 层位于第一空心金纳米层和第二空心金纳米层之间,DNA 层由 SEQ ID NO. 1 所述的 probeDNA 单链和 SEQ ID NO. 2 所述的 reporterDNA 单链组成。

[0025] 一种空心金纳米粒子-DNA 复合基底的制备方法,该方法包括以下步骤:

(1)设计如 SEQ ID NO. 1 所示的 probeDNA 单链和如 SEQ ID NO. 2 所示的 reporterDNA 单链。

[0026] probeDNA 为 5'-acatagcacattcgaggtag -3' ;

reporterDNA 为 5'-ctacctcgaatgtgctatgt -3' ;

(2) 在 Si 衬底组装一层排列均匀致密的单层的空心金纳米层；

首先制备金纳米空心球,可以通过 Kobayashi 等人提出的(Y. Kobayashi; M. Horie; M. Konno; B.R. Gonzalez; L. Marzan, J. Phys. Chem. B, 2003(107),7420.)方法,或者 L.J. Wan 等人提出的(H.P. Liang; L.J. Wan; C.L. Bai; L. Jiang; Gold Hollow Nanospheres: Tunable Surface Plasmon Resonance Controlled by Interior-Cavity Sizes. J. Phys. Chem. B 2005(109), 7795-7800)方法制备出不同尺寸和壁厚的空心金纳米粒子,而制备过程较为全面详细,并且相对简单的为 A.M. Schwartzberg 等人在 J. Phys. Chem. B 上公开的方法进行的(A.M. Schwartzberg; T.Y. Olson; C.E. Talley; J.Z. Zhang; Synthesis, Characterization, and Tunable Optical Properties of Hollow Gold Nanospheres. J. Phys. Chem. B, 2006(10), 19935-19944)。具体为:

(2.1)金纳米空心球是以钴纳米粒子为模板进行合成的,所以首先合成钴纳米粒子:合成钴纳米粒子温度要控制在 35℃,无氧条件下进行反应,并且要求反应容器必须干净,因而所有的玻璃仪器在实验前清洗干净,再经过王水浸泡 1h 去除器壁表面的吸附物质,随后用超纯水清洗干净烘干。将 600  $\mu$ L 0.1mol/L 柠檬酸三钠加入到盛有 75mL 超纯水的三口烧瓶中。反应严格控制在无氧条件下进行,首先在水中通氩气去氧 30min,将反应液中包含的氧气排干净,随后加入 100  $\mu$ L 的 0.4mol/LCoCl<sub>2</sub>溶液至三口烧瓶中,抽真空去氧循环三次,每次 3~5min,致使反应烧瓶上方的空间也处于完全无氧的状态下,并强烈搅拌溶液;随后将新鲜配置的 1mol/LNaBH<sub>4</sub>溶液抽取 100  $\mu$ L 加入到剧烈搅拌的混合溶液中,大约在 30s 后,无色透明溶液会变为灰褐色,此时表明钴纳米粒子已经形成。

[0027] (2.2)空心金纳米粒子的合成是以钴纳米粒子为牺牲模板,使用 HAuCl<sub>4</sub>进行置换反应得到空心金纳米粒子:将步骤(2.1)中制备得到的钴纳米粒子溶液,在氩气环境保护下,反应 1h 使得 NaBH<sub>4</sub>完全水解后,移取 30mL 灰褐色反应溶液迅速加入搅拌的 10mL0.6mmol/L 的 HAuCl<sub>4</sub>溶液中,溶液立即变成紫红色,即得到空心金纳米粒子水溶胶。然后将金纳米空心球水溶胶离心洗涤两次,离心转速 8500rpm/min,每次离心时间 15 分钟,最后将此产物浓缩至 4mL (浓度为 1mmol/L)。电镜表征结果如图 1 所示,所述的空心金纳米粒子外径为 30~40nm,空心金纳米粒子的壁厚为 6nm~10nm。高分辨图如图 2 所示,可以看到空心金纳米粒子的(111)、(200)晶面,产物的 XRD 曲线如图 3 所示,可以看到空心金纳米粒子的(111)、(200)、(220)、(311)、(222)晶面。

[0028] (2.3)硅衬底经过丙酮、无水乙醇、超纯水依次超声清洗,每种溶液各超声 5 分钟,烘干后待用。

[0029] (2.4)空心金纳米粒子在硅衬底上的组装,可以参考 P.V. Kamat 等人(N. Chandrasekharan; P.V. Kamat ;Assembling Gold Nanoparticles as Nanostructured Films Using an Electrophoretic Approach. NANO LETTERS. 2001(1).67-70)采用电泳组装金纳米粒子制备薄膜的方法;或者 Joaquín Klug 等人(J.Klug ; L.A. Pérez ;E.A. Coronado ;G.I. Lacconi ;Chemical and Electrochemical Oxidation of Silicon Surfaces Functionalized with APTES: The Role of Surface Roughness in the AuNPs Anchoring Kinetics. J. Phys. Chem. C. 2013(117), 11317 - 11327)采用静电吸附的方法组装金纳米粒子薄膜;以及 Y.K. Park 等人提出的(Y.K. Park; S. Park; Directing Close-Packing of Midnanosized Gold Nanoparticles at a Water/Hexane Interface)

在油水界面自组装金纳米粒子薄膜的方法等。而其中操作较为简单,对衬底的要求最小,快捷迅速的方法就是采用界面自组装的方法制备金纳米粒子薄膜,组装方法如下:向 4mL 浓度为 1mmol/L 空心金纳米粒子水溶液中,逐滴加入 300  $\mu$ L 正丁醇,在油水界面处就会形成一层空心金纳米粒子薄膜,金纳米粒子薄膜经老化 10 分钟后,用 Si 衬底将步骤 2.3 得到的空心金纳米粒子薄膜捞起,烘干后用无水乙醇清洗掉表面的残留物,在 Si 衬底上得到第一空心金纳米层。样品的 SEM 表征如图 4 所示,粒子致密排列,排列为单层结构。

[0030] (3) 采用 Kang, T 等人在 NANO LETTERS 上公开的方法,在 probeDNA 单链 5 端修饰  $-(CH_2)_6-SH$ , 得到 probeDNA- $(CH_2)_6-SH$ ; 然后将足量(40  $\mu$ L) 的浓度为 1  $\mu$ mol/L 的 probeDNA- $(CH_2)_6-SH$  单链的水溶液 (PH=7.1) 滴加到步骤(2) 制备的第一空心金纳米粒子层上,即在第一空心金纳米粒子层上修饰了 probeDNA,室温下孵化 24h,再用质量分数为 0.01% 的十二烷基硫酸钠 (SDS) 清洗掉多余的 probe DNA,在第一空心金纳米层上修饰了 probeDNA 单链,标记为 Si/HGN-probeDNA;

(4) 采用 Kang, T 等人在 NANO LETTERS 上公开的方法,在 reporterDNA 单链 5 端修饰  $-(CH_2)_3-SH$ , 得到 reporterDNA- $(CH_2)_3-SH$ ; 将 500  $\mu$ L PH=7.1 的 PBS 溶液、100  $\mu$ L 质量分数为 0.1% 的十二烷基硫酸钠、10  $\mu$ L 浓度为 1mmol/L reporterDNA- $(CH_2)_3-SH$  单链的水溶液 (PH=7.1) 和 400  $\mu$ L 金空心球水溶胶(浓度为 1mmol/L) 混合均匀后,静置 6h, 然后进行盐化,盐化过程为:分 5 次添加等体积的浓度依次递增的 NaCl 溶液到混合溶液中, NaCl 溶液每次添加 100  $\mu$ L;首次滴加 NaCl 溶液的浓度为 2mol/L, NaCl 溶液的浓度梯度为 0.05mol/L;盐化后静置 24h,在 7000rpm/min 下离心 7min;去上清液,添加 1mL 质量分数为 0.01% 十二烷基硫酸钠再次离心洗涤去上清液,沉淀用 1mL 的 PBS 缓冲液溶解,得到 reporterDNA-HGN 的 PBS 溶液;上述 Kang, T 等人在 NANO LETTERS 上公开的方法可参看文献 Kang, T; Yoo, SM; Yoon, I; Lee, SY; Kim, B. Patterned Multiplex Pathogen DNA Detection by Au Particle-on-Wire SERS Sensor. NANO LETTERS. 2010(10), 1189-1193。

[0031] (5)将步骤 4 制备得到的 reporterDNA-HGN 溶液(40  $\mu$ L)滴加到 Si/HGN-probeDNA 表面,使得 reporterDNA 和 probeDNA 发生互补配对。室温孵化 24h 后,用质量分数为 0.01% 的十二烷基硫酸钠水溶液和水清洗,在第一空心金纳米层上,通过两条互补的 DNA 单链进而组装了第二空心金纳米层,得到空心金纳米粒子-DNA 复合基底。

#### [0032] 实施例 1

本实施例制备单层空心金纳米粒子-DNA 层结构,即 Si/HGN-DNA 结构,并进行拉曼活性测试。

[0033] 设计样品 Si/HGN-probeDNA-probeDNA (非互补配对的 DNA 单链) 和 Si/HGN-probeDNA-reporterDNA (互补配对的 DNA 单链) 结构。

[0034] 单独盐化 probeDNA 和 reporterDNA 过程:将 900  $\mu$ L PH=7.1 的 PBS 溶液、100  $\mu$ L 0.1% 十二烷基硫酸钠和 10  $\mu$ L 1mmol/L probeDNA (或者 10  $\mu$ L 浓度为 1mmol/L 的 reporterDNA) 混合,将此混合溶液静置 6h 后进行盐化。盐化过程为:分 5 次添加等体积的浓度依次递增的 NaCl 溶液到混合溶液中, NaCl 溶液每次添加 100  $\mu$ L;首次滴加 NaCl 溶液的浓度为 2mol/L, NaCl 溶液的浓度梯度为 0.05mol/L;5 次添加 NaCl 溶液后,最终溶液中 NaCl 浓度为 0.7mol/L。混合液静置 24h 后离心,离心转速 7000rpm/min,离心时间为 7min;

将离心后的上清液吸除后,添加 1mL0.01% 十二烷基硫酸钠再次离心洗涤,最后将上清液去除之后的下层沉淀用 1mL 的 PBS 缓冲液溶解备用。

[0035] 完成非互补 DNA (probeDNA) 和互补(reporterDNA) DNA 在空心金纳米粒子薄膜上的组装过程:取 50  $\mu$  L 的盐化后的 probeDNA (或者 reporterDNA) 溶液滴加到 Si/HGN-probeDNA 表面,室温孵化 24h 后,用 0.01% 十二烷基硫酸钠和水清洗,真空干燥后,将样品标记为 Si/HGN-probe/probeDNA (或者 Si/HGN-probe/reporterDNA)。

[0036] 将制得的 Si/HGN-DNA 样品进行拉曼活性测试,测试后的结果如图 5 所示,结果显示:非互补配对的样品 Si/HGN-probe/probeDNA 的拉曼信号非常微弱,第一个信号峰是 Si 基底的特征峰;另外, DNA 互补配对的样品 Si/HGN-probe/reporterDNA 的拉曼信号要远大于 DNA 非互补配对的样品 Si/HGN-probe/probeDNA 的拉曼信号。

#### [0037] 实施例 2

本实施例制备双层空心金纳米粒子层,夹层为 DNA 层的复合材料,即 Si/HGN-DNA-HGN 结构,并进行拉曼活性测试:

将 reporterDNA 连接到水溶胶中的空心金纳米粒子上:将 500  $\mu$  LPH=7.1 的 PBS 溶液、100  $\mu$  L0.1% 十二烷基硫酸钠、10  $\mu$  L1mmol/LreporterDNA 和 400  $\mu$  L 金空心球水溶胶混合,将此混合溶液静置 6h 后进行盐化。盐化过程为:分 5 次添加等体积的浓度依次递增的 NaCl 溶液到混合溶液中,NaCl 溶液每次添加 100  $\mu$  L;首次滴加 NaCl 溶液的浓度为 2mol/L,NaCl 溶液的浓度梯度为 0.05mol/L;5 次添加 NaCl 溶液后,最终溶液中 NaCl 浓度为 0.7mol/L。混合液静置 24h 后离心,离心转速 7000rpm/min,离心时间为 7min;将离心后的上清液吸除后,添加 1mL0.01% 十二烷基硫酸钠再次离心洗涤,最后将上清液去除之后的下层沉淀用 1mL 的 PBS 缓冲液溶解备用,将之标记为 reporterDNA-HGN。

[0038] 完成 reporterDNA-HGN 在空心金纳米粒子薄膜上的组装过程:取 50  $\mu$  L 的盐化后的 reporterDNA-HGN 滴加到 Si/HGN-probeDNA 表面,室温孵化 24h 后,用 0.01% 十二烷基硫酸钠和水清洗,真空干燥后将样品标记为 Si/HGN-DNA-HGN。所制得 Si/HGN-DNA-HGN 样品的 SEM 表征如图 6 所示。

[0039] 将制得的 Si/HGN-DNA-HGN 样品进行拉曼活性测试,测试后的结果与 Si/HGN-DNA 样品的拉曼测试结果比较,如图 7 所示,结果显示:双层空心金纳米粒子薄膜样品 Si/HGN-DNA-HGN 的拉曼信号的强度是单层空心金纳米粒子薄膜的拉曼信号的强度的 6.5~8.4 倍。

[0040] 与同类工作相比(L. Fabris ;M. Dante ; G. Braun ;S. J. Lee ;N. O. Reich ;M. Moskovits ;T. Q. Nguyen ; G. C. Bazan ; A Heterogeneous PNA-Based SERS Method for DNA Detection. J. AM. CHEM. SOC. 2007(129), 6086-6087),单层空心金纳米粒子薄膜样品 Si/HGN-DNA(互补)的拉曼信号是其信号的 2 倍;双层空心金纳米粒子薄膜样品 Si/HGN-DNA-HGN 的拉曼信号的峰强是其信号强度的 9-10 倍。本研究可以为相关研究领域的工作提供了技术方案支持。

[0041] 上述实施例用来解释说明本发明,而不是对本发明进行限制,在本发明的精神和权利要求的保护范围内,对本发明作出的任何修改和改变,都落入本发明的保护范围。



## SEQUENCE LISTING

<110> 浙江理工大学

<120> 一种空心金纳米粒子 -DNA 复合基底及其制备方法

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

acatagcaca ttcgaggtag

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

ctacctgaa tgtgctatgt

20

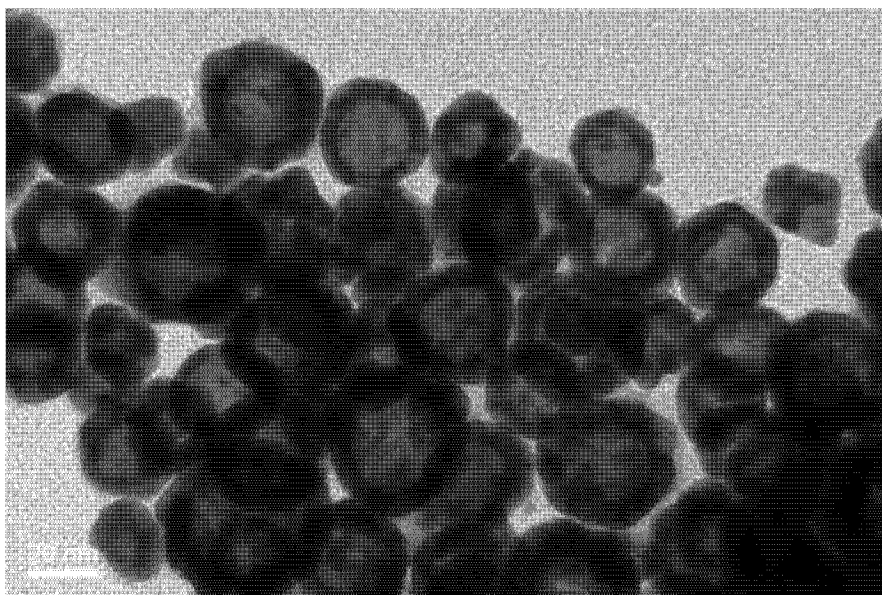


图 1

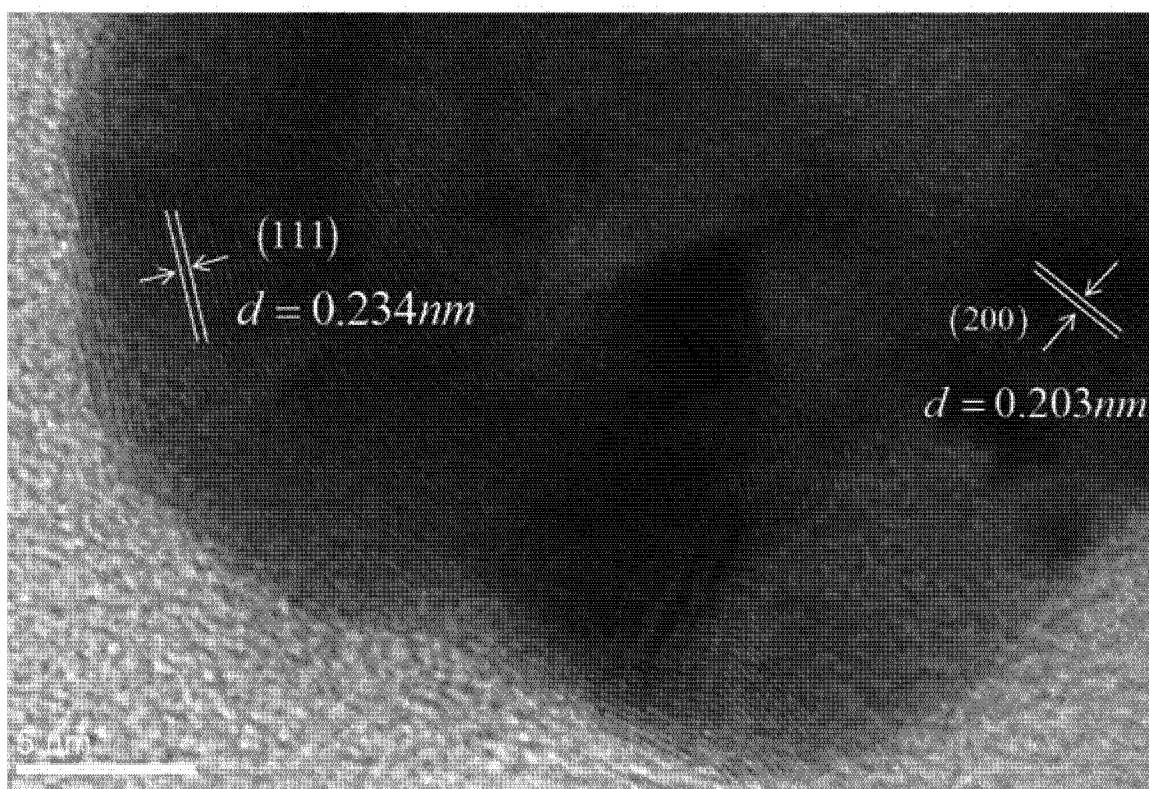


图 2

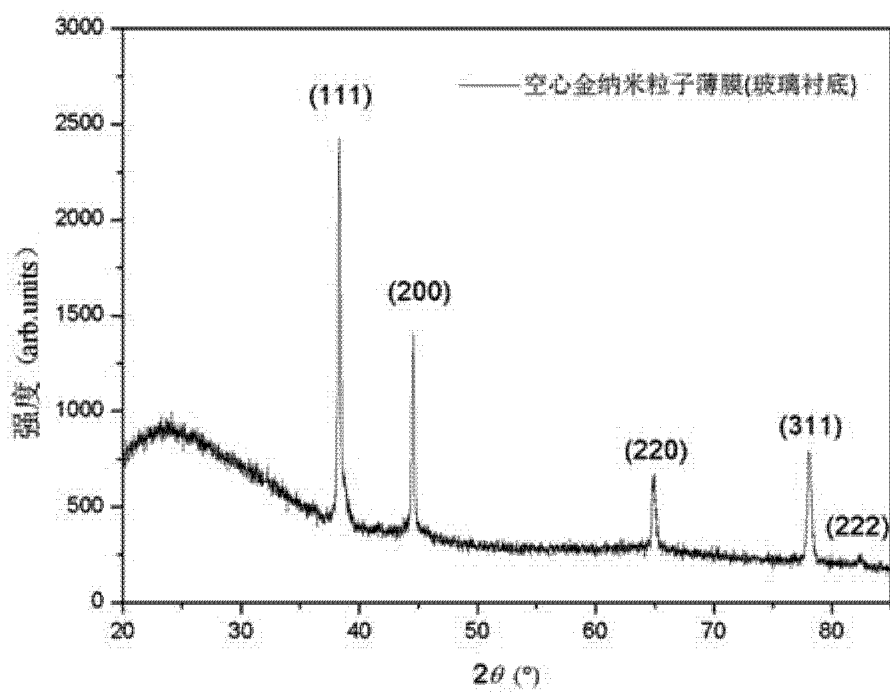


图 3

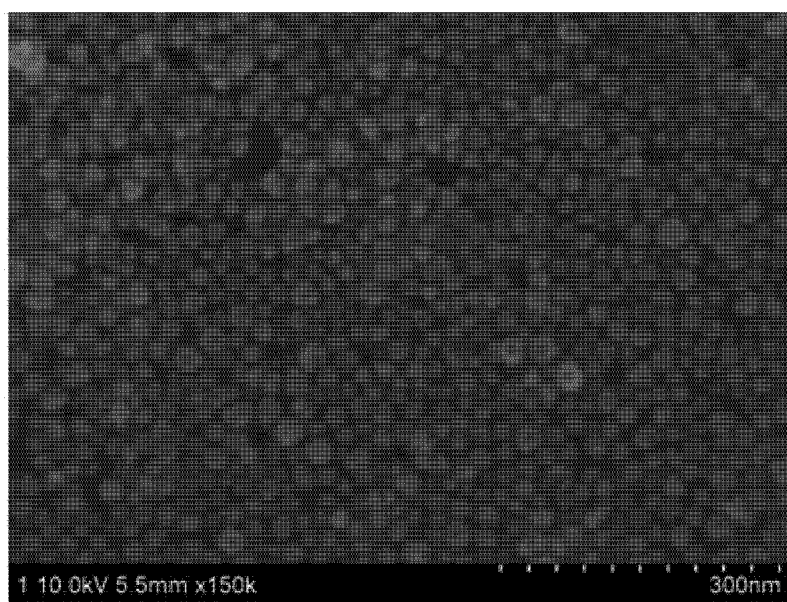


图 4

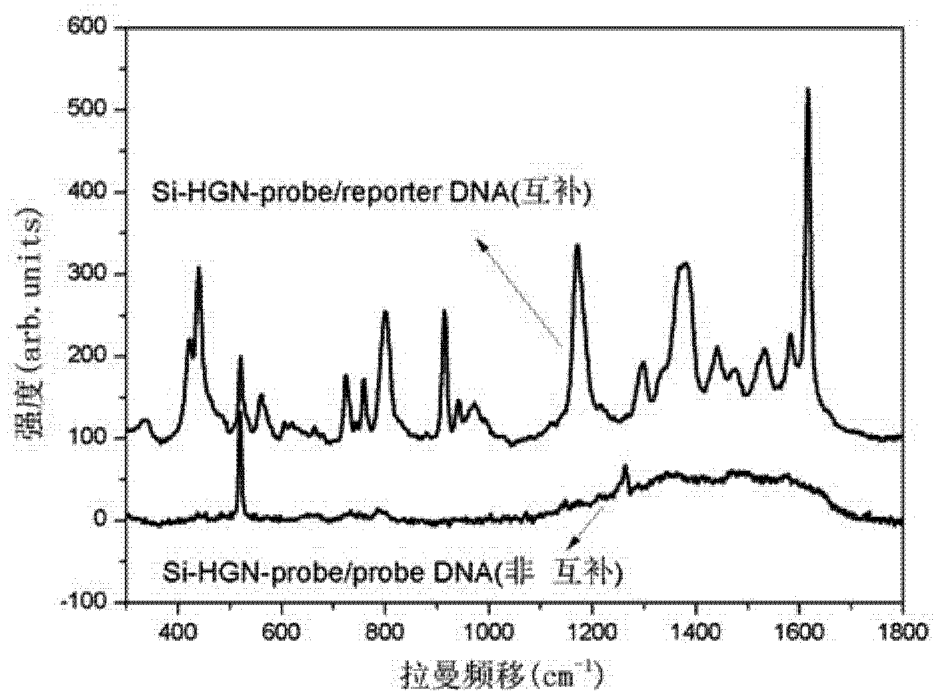


图 5

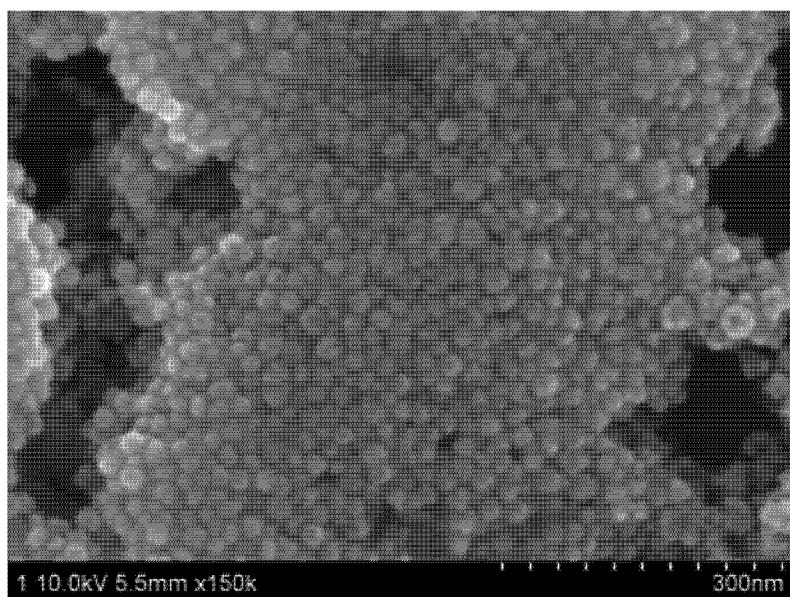


图 6

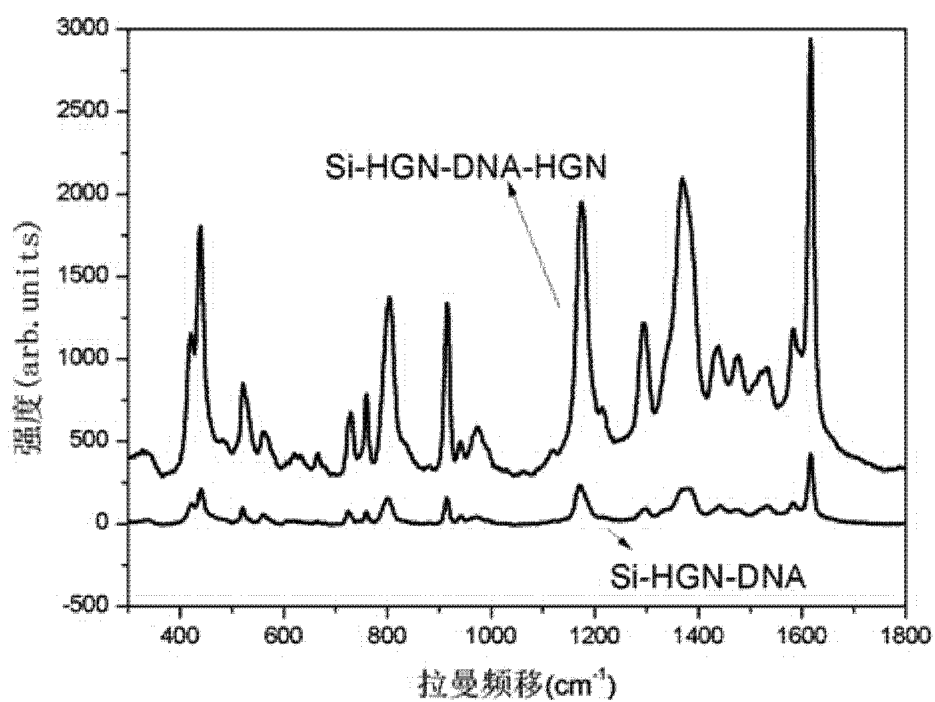


图 7