

# 基于纳米金/多孔硅基底的荧光标记法 对生物分子的检测\*

何蕾

(新疆大学 物理科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘要:** 为制做一种低成本、易标记、稳定性好、灵敏度高的生物传感器, 本文制备了一种具有较强荧光信号及生物兼容性的多孔硅生物传感器材料. 利用纳米金的等离子体效应增强多孔硅中荧光标记物的荧光信号, 在纳米金修饰的多孔硅中采用罗丹明6G荧光标记法对生物分子进行检测. 通过链接生物荧光探针后荧光信号强度的变化实现生物浓度检测, 其检测极限为121 nM, 对生物大分子成功实现了低成本、易标记、稳定性好、灵敏度高的检测.

**关键词:** 多孔硅; 折射率; 荧光; 生物传感器

**DOI:** 10.13568/j.cnki.651094.651316.2020.10.16.0002

**中图分类号:** Q63; O439 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-7675(2021)02-0159-04

**引文格式:** 何蕾. 基于纳米金/多孔硅基底的荧光标记法对生物分子的检测[J]. 新疆大学学报(自然科学版)(中英文), 2021, 38(2): 159-162+167.

**英文引文格式:** HE L. Detection of biological DNA by rhodamine fluorescent labeling based on gold nanoparticles/porous silicon substrate[J]. Journal of Xinjiang University(Natural Science Edition in Chinese and English), 2021, 38(2): 159-162+167.

## Detection of Biological DNA by Rhodamine Fluorescent Labeling Based on Gold Nanoparticles/Porous Silicon Substrate

HE Lei

(School of Physics Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi Xinjiang 830046, China)

**Abstract:** The purpose of this study is to prepare a low-cost, easy labeling, good stability and high sensitivity biosensor, a porous silicon biosensor material with strong fluorescence signal and biocompatibility was successfully prepared, the plasma effect of gold nanoparticles is used to enhance the fluorescence signal of fluorescent markers in porous silicon, Rhodamine 6G fluorescence labeling method was used to detect biomolecules in modified porous silicon by gold nanoparticles. Through the change of fluorescence signal intensity after linking the biological fluorescence probe, the biological concentration can be detected, the detection limit is 121 nM, it can detect biomacromolecules with low cost, easy labeling, good stability and high sensitivity.

**Key words:** porous silicon; refractive index; fluorescence; biosensor

## 0 引言

多孔硅是一种具有大的比表面积、良好的生物兼容性、易于功能化的新型纳米材料, 可根据实际应用需要制备成具有不同光子晶体结构的光学器件, 并作为良好的基底材料应用于生物传感器领域. 和以往其他荧光素类衍生物相比, 罗丹明类染料是生物技术中常用的蛋白质分析染料之一, 它价格低廉、易于标记、结构高度刚性、光稳定性强、波长范围较宽、荧光产率高、pH敏感性低, 做为荧光标记物可广泛应用于分子生物学、分子遗传学、医学等领域, 可用于制备高灵敏度的荧光生物传感器<sup>[1-5]</sup>. 纳米金因其具有表面等离子体共振效应, 可增强其表面及附近的荧光物质的荧光发射强度<sup>[6-10]</sup>, 这一特性被广泛应用于生物医学、光电器件等领域. 此外, 纳米金还具有易于链接生物的特性, 从而增强生物传感器的稳定性, 已被广泛应用于生物分子检测<sup>[11-14]</sup>. Zhang Miaorong等人利用纳米金的修饰增强了多孔硅的拉曼信号<sup>[15]</sup>, SHI Fugui等人利用纳米金增强了多孔硅中罗丹

\* 收稿日期: 2020-10-16

基金项目: 国家自然科学基金(61575168).

作者简介: 何蕾 (1983-), 女, 博士, 从事光电信息检测与传感器的研究, E-mail: hll@xju.edu.cn.

明的荧光信号<sup>[16]</sup>, LI Yanyu等人利用量子点标记生物探针的方法进行生物分子检测<sup>[17]</sup>,但目前尚未见在纳米金修饰的多孔硅中采用罗丹明6G荧光标记法检测生物分子的报道。

本实验成功制备了纳米金修饰的多孔硅基底材料,利用纳米金的等离子体效应增强了多孔硅中荧光标记物的荧光信号,以提高荧光生物传感器的灵敏度,通过链接生物荧光探针后荧光信号强度的变化实现生物浓度检测,可实现低成本、易标记、稳定性好、灵敏度高的生物大分子的检测,其检测极限为121 nM。

## 1 实验材料及方法

### 1.1 实验材料

罗丹明6G染料分子的尺寸直径分布在7.5~8.5 nm之间,颜色呈橘红色,其荧光峰位置位于582 nm左右,激发波长为500 nm,如图1。

### 1.2 多孔硅器件的制备

电化学腐蚀法所用的硅片电阻率为1~7  $\Omega \cdot \text{m}$ ,晶向为<100>,N型硅。腐蚀前先将硅片依次放入丙酮、酒精、去离子水中进行10 min超声清洗,以去除表面污染物,用40%HF和98%无水乙醇(体积比为3:1)的混合溶液作为腐蚀液,用计算机控制腐蚀的电流和时间。本实验采用的电流及时间参数分别为 $J=30 \text{ mA} \cdot \text{m}^{-2}$ , $t=10 \text{ min}$ ,如图2所示多孔硅样品的孔径分布在500 nm左右,孔径尺寸较大的优越条件为之后纳米金的沉积、荧光标记分子进入、生物分子的检测提供了有利条件,图3为多孔硅样品的截面形貌图。

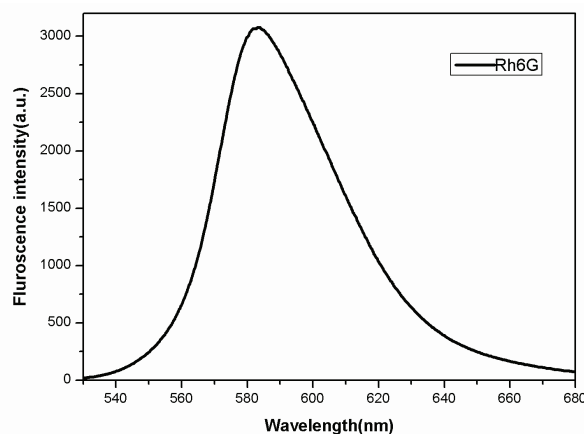


图1 激发光为500 nm的罗丹明6G的光致发光光谱  
Fig 1 Photoluminescence spectra of Rhodamine 6G at an excitation wavelength of 500 nm

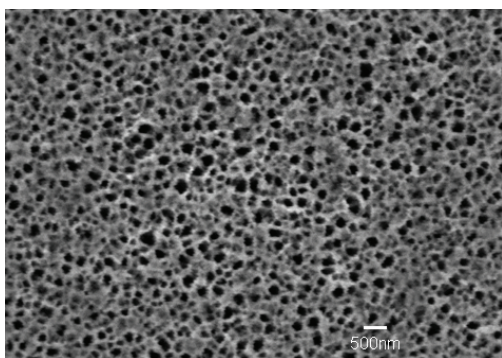


图2 多孔硅样品的表面形貌图

Fig 2 Surface morphology of porous silicon sample

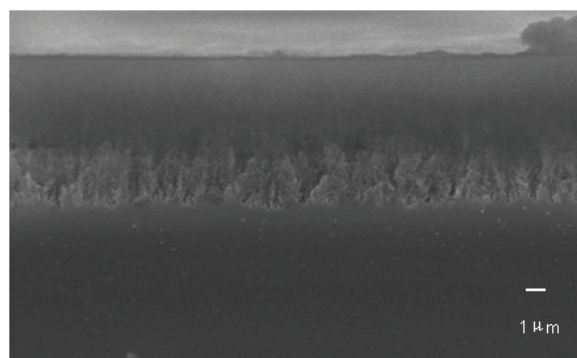


图3 多孔硅样品的截面形貌图

Fig 3 Cross-section morphology of porous silicon sample

腐蚀后样品在去离子水中清洗并在室温下干燥,放置在双氧水(30%)中80 °C条件下氧化3 h。最后将样品浸没在甲醇和去离子水稀释后的氨丙基三乙氧基硅烷(去离子水:甲醇:APTES=10:10:1体积比)溶液中室温下1 h,以完成氨基化,为纳米金颗粒的沉积及后期样品醛基化提供基础条件。氨基化后,将样品在甲苯中清洗以除去未链接上的多余的APTES,并在100 °C条件下烘烤10 min。

### 1.3 纳米金/多孔硅基底材料的制备

在多孔硅样品上沉积金纳米粒子的方法如下:在100 mL水中加入2 mL、0.1 mM的氯金酸溶液直至沸腾,之后快速加入4 mL (1.1 mM) 柠檬酸三钠溶液,20 min后,停止加热并将溶液静置2 h,之后再将氨基化后的多孔硅样品在纳米金胶溶液中浸泡8 h,浸泡后样品在去离子水中清洗并在空气中干燥。纳米金颗粒的尺寸约为10 nm左右,本实验中制备的多孔硅样品的孔径约为500 nm,其尺寸大小为Au颗粒、RB分子及生物分子的进入提供了足够的空间。沉积金纳米颗粒后,将样品放入2.5%的戊二醛溶液中浸泡1 h使多孔硅表面完全被醛基修饰,取出后用PBS (pH=7.4) 和去离子水反复冲洗,并干燥。

### 1.4 纳米金/多孔硅链接目标DNA

用PBS将目标DNA稀释为1.25  $\mu\text{M}$ 、2.5  $\mu\text{M}$ 、3.125  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 五个浓度,将以上不同浓度的目标DNA分别用移液器滴加在多孔硅样品上,放入37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中2 h,取出后用PBS冲洗,  $\text{N}_2$ 中干燥.再放入3 M的EA中浸泡,放置37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中1 h,取出后用HEPES (pH=9) 缓冲液彻底冲洗.

### 1.5 Rh6G对探针DNA的标记

20个碱基的DNA分子尺寸约6 nm,采用PBS缓冲液将生物探针DNA浓度调整为10 mg/mL,取5 mL生物探针分子溶液置于10 mL小烧杯内,将2 mL Rh6G溶液( $5 \times 10^{-4}$  M)立即缓慢滴加于生物探针分子溶液内,边加边轻搅,其后避光震荡室温下反应3 h.为检测DNA特异性反应,实验中分别标记互补DNA探针1和非互补DNA探针2.如图4所示, Rh6G荧光位于582 nm,在探针DNA和Rh6G偶联后, Rh6G-DNA溶液的荧光峰移动到587 nm,发光峰移动了5 nm,表示Rh6G成功标记了探针DNA分子,荧光强度的减弱可能是因为Rh6G标记后浓度减小,也可能是生物分子的猝灭作用,偶联后Rh6G-DNA发光光谱仍然较窄,说明偶联后的Rh6G-DNA分散性仍然较好.

### 1.6 目标DNA和探针Rh6G-DNA杂交反应

取50  $\mu\text{L}$  Rh6G-DNA溶液滴加到已经链接目标DNA分子的多孔硅表面,37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应2 h,使DNA充分杂交反应,然后取出用PBS和DI反复冲洗以去除未反应完全的DNA,  $\text{N}_2$ 中干燥.

## 2 样品的检测

荧光光谱采用紫外可见荧光分光光谱仪(Hitachi Model F-4600 FL Spectrophotometer)测量,设置电压为700 V,狭缝宽度2.5 nm,固定激发波长为500 nm,表面及截面形貌在ZEISS SUPRA55 VP扫描电镜仪上测量.

## 3 分析与讨论

### 3.1 Au纳米颗粒有效增加荧光染料分子荧光信号的分析

为分析Au纳米颗粒对荧光染料分子荧光信号的影响,将制备的硅片切分为两部分,一部分进行纳米金颗粒沉积,另一部分不沉积,之后将这两片硅片采用上述方法链接10  $\mu\text{M}$ 的互补目标生物分子,并滴加相同浓度的荧光探针,之后测量其荧光光谱图,其荧光光谱图如图5所示.由图5可看出, Rh6G标记的生物分子进入到多孔硅后,其荧光信号强度大大降低,而Au纳米颗粒可以有效增加荧光染料分子的荧光信号,从而为实现更高灵敏度的生物检测提供有利条件.

### 3.2 DNA的特异性反应及互补DNA浓度的检测

图6为Au/多孔硅上目标DNA和Rh6G-DNA杂交反应后的荧光光谱图.其中红色线为10  $\mu\text{M}$ 目标DNA与非互补的荧光标记生物探针反应后的荧光光谱图,可见非互补的荧光标记生物探针由于不能发生杂交反应,而未链接至多孔硅中,因此其无荧光峰.采用此方法可有效检测生物分子是否可发生特异性反应,图

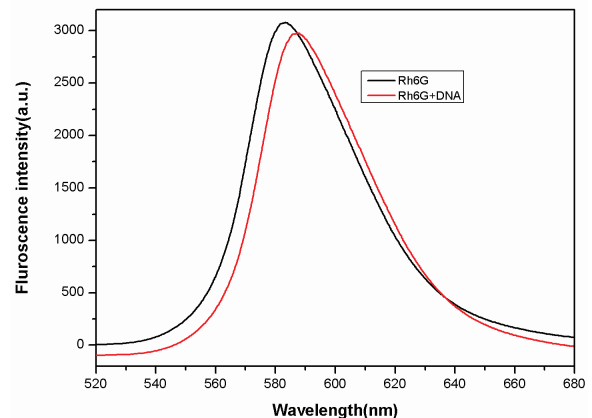


图 4 Rh6G与Rh6G+DNA荧光谱对比图  
Fig 4 The fluorescence spectra of Rh6G and Rh6G+DNA

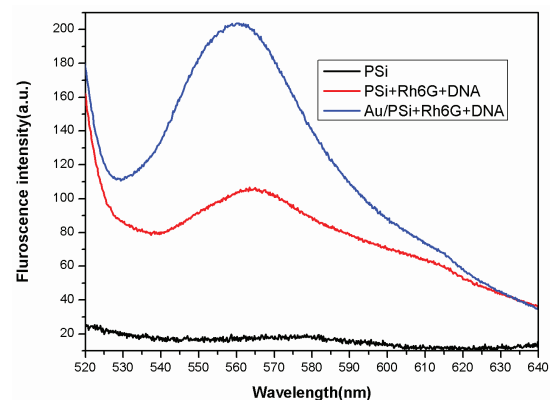


图 5 (1)多孔硅本身的荧光(黑色); (2)链接10  $\mu\text{M}$ 的生物分子的多孔硅样品链接生物探针后的荧光(红色); (3)链接10  $\mu\text{M}$ 的生物分子的Au/多孔硅链接生物探针后的荧光(蓝色)

Fig 5 (1) Fluorescence of porous silicon (black); (2) Fluorescence of porous silicon with biological probes(10  $\mu\text{M}$ ); (3) Fluorescence of Au/porous silicon with biological probes(10  $\mu\text{M}$ ) (blue)

中其余谱线分别为不同浓度的目标分子与互补荧光标记生物探针分子发生杂交反应的荧光谱图. 由图可见反应后荧光峰在565 nm附近, 这可能是因为加入的纳米Au的负介电常数性质使Rh6G原有的582 nm的峰位移至565 nm附近, 也可能是因为链接生物后Rh6G粒子间极偶相互作用受到影响, 从而使荧光峰蓝移. 图中565 nm位置对应的荧光谱峰的强度与加入的目标生物分子的浓度成正比, 因此, 荧光信号的强弱可直接反映出目标生物分子浓度大小, 即可成功实现对目标生物分子浓度的检测.

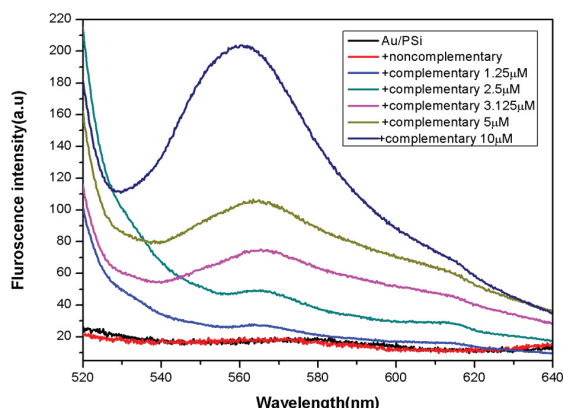


图 6 Au/多孔硅上不同浓度的目标DNA和Rh6G-DNA探针杂交反应后的荧光光谱图

Fig 6 Fluorescence spectra of Au/porous silicon at different concentrations Rh6G-DNA after hybridization

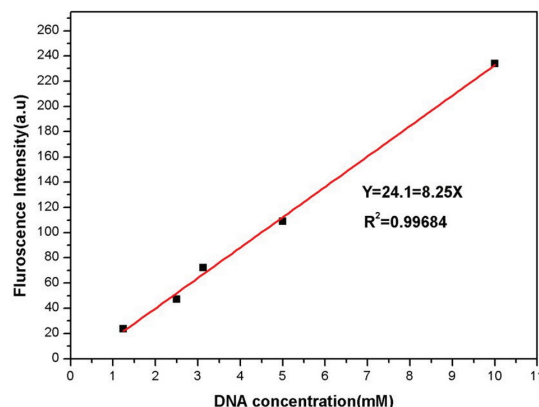


图 7 检测目标DNA浓度从1.25 μM到10 μM的线性拟合关系图

Fig 7 The linear fitting diagram of the detection target DNA concentration from 1.25 μM to 10 μM

图7为检测目标DNA浓度从1.25 μM到10 μM的线性拟合关系图, 线性回归方程是 $Y=24.1+8.25X$ , 其中 $Y$ 是荧光强度值,  $X$ 代表目标DNA生物分子浓度. 利用计算机软件Origin进行拟合, 拟合系数为0.996 84, 拟合度非常高. 荧光仪的分辨率为0.1, 因此该生物传感器的检测限为 $0.1/(8.25/\mu\text{M})=121\text{ nM}$ .

## 4 结论

本实验成功制备了纳米金修饰的多孔硅生物传感器基底材料, 将不同浓度的目标DNA链接至Au/多孔硅基底, 再链接罗丹明6G标记的生物探针分子, 利用纳米金的等离子体效应有效增强了链接到多孔硅中的荧光标记生物探针的荧光信号. 根据链接荧光探针后多孔硅荧光信号强度的变化, 实现对DNA分子特异性反应的检测. 通过分析目标DNA分子的浓度对荧光信号强度的影响, 可表征互补DNA生物分子的浓度, 其检测限为121 nM, 对生物大分子实现了低成本、易标记、稳定性好、灵敏度高的检测.

## 参考文献:

- [1] CHOUKET A, CHARRIER J, ELHOUCHEH H, et al. Optical study of planar waveguides based on oxidized porous silicon impregnated with laser dyes[J]. Journal of Luminescence, 2009, 129(5): 461-464.
- [2] 王佳佳, 李彦宇, 贾振红. 量子点/多孔硅光子晶体生物传感器用于检测链霉亲和素[J]. 新疆大学学报(自然科学版), 2019, 36(2): 132-137.  
WANG J J, LI Y Y, JIA Z H. CdSe/ZnS quantum dots labelled biotin for the detection of streptavidin on porous silicon photonic crystal[J]. Journal of Xinjiang University (Natural Science Edition), 2019, 36(2): 132-137.(in Chinese)
- [3] 陈位荣, 贾振红, 吕小毅, 等. 基于多孔硅微腔阵列的制备及检测[J]. 新疆大学学报(自然科学版), 2016, 33(3): 313-316.  
CHEN W R, JIA Z H, LYU X Y. Fabrication and detection based on porous silicon microcavity microarray[J]. Journal of Xinjiang University (Natural Science Edition), 2016, 33(3): 313-316.(in Chinese)
- [4] WANG J J, JIA Z H. Metal nanoparticles/porous silicon microcavity enhanced surface plasmon resonance fluorescence for the detection of DNA[J]. Sensors, 2018, 18(2): 661.
- [5] DEL M M B, BORNACELLI J, NAVA R, et al. Porous silicon photoluminescence modification by colloidal gold nanoparticles: Plasmonic, surface and porosity roles[J]. Journal of Luminescence, 2014, 146: 247-255.

(下转第 167 页)

- [5] WEI B X, QIN Q Y, BAI Y L, et al. Short-period corrosion of X80 pipeline steel induced by AC current in acidic red soil[J]. *Engineering Failure Analysis*, 2019, 105: 156-175.
- [6] WEI B X, QIN Q Y, FU Q, et al. X80 Steel corrosion induced by alternating current in water-saturated acidic soil[J]. *Corrosion*, 2020, 76(3): 248-267.
- [7] WANG S, LIU D, DU N, et al. Relationship between dissolved oxygen and corrosion characterization of X80 steel in acidic soil simulated solution[J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2015, 10(5): 393-404.
- [8] 张本朋, 商潇, 黄永娜, 等. 重催装置换热器管束失效分析[J]. *材料保护*, 2019, 52(4): 164-167.  
ZHANG B P, SHANG X, HUANG Y N, et al. Failure analysis of heat-exchanger tube of residue fluid catalytic cracking unit[J]. *Materials Protection*, 2019, 52(4): 164-167.(in Chinese)
- [9] 甄换成, 张亚新, 甄卫军. ESA-AA共聚物的合成、阻垢缓蚀性能及缓蚀机理研究[J]. *新疆大学学报(自然科学版)(中英文)*, 2020, 37(4): 371-382.  
ZHEN H C, ZHANG Y X, ZHEN W J. Synthesis, scale and corrosion inhibition performance and corrosion inhibition mechanism of ESA-AA copolymer[J]. *Journal of Xinjiang University (Natural Science Edition in Chinese and English)*, 2020, 37(4): 371-382.(in Chinese)
- [10] 王永利, 马利, 熊良银, 等. 夹杂对自来水环境下304不锈钢腐蚀及金属离子溶出的影响[J]. *中国腐蚀与防护学报*, 2016, 36 (4): 328-334.  
WANG Y L, MA L, XIONG L Y, et al. Effect of inclusions on corrosion and dissolution of metallic ions of stainless steel 304 in simulated tap water[J]. *Journal of Chinese Society for Corrosion and Protection*, 2016, 36(4): 328-334.(in Chinese)
- [11] KUANG D, CHENG Y F. Understand the AC induced pitting corrosion on pipelines in both high pH and neutral pH carbonate/bicarbonate solutions[J]. *Corrosion Science*, 2014, 85: 304-310.
- [12] ZHU M, DU C, LI X, et al. Effect of AC current density on stress corrosion cracking behavior of X80 pipeline steel in high pH carbonate/bicarbonate solution[J]. *Electrochimica Acta*, 2014, 117: 351-359.

责任编辑: 闫新云

(上接第 162 页)

- [6] JIAO Y, KOTYSH D S, PHAMBU N, et al. Dual-mode sensing platform based on colloidal gold functionalized porous silicon[J]. *Applied Physics Letters*, 2010, 97(15): 153125.
- [7] MA C W, LI P, JIA Z H, et al. A novel method for biological detection based on porous silicon multi-layers bragg mirror[J]. *Journal of Xinjiang University(Natural Science Edition)*, 2018, 35(2): 172-176.
- [8] KHAJEHPOUR K J, WILLIAMS T, BOURGEOIS L, et al. Gold nanothorns-macroporous silicon hybrid structure: a simple and ultrasensitive platform for SERS[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(43): 5349-5351.
- [9] WANG H, AN Z, REN Q, et al. Localized-surface-plasmon enhanced luminescence from porous silicon by gold nanoparticles[J]. *Journal of Nanoscience & Nanotechnology*, 2011, 11(12): 10886-10894.
- [10] MARQUES L, HERNANDEZ F U, KORPOSH S, et al. Sensitive protein detection using an optical fibre long period grating sensor anchored with silica core gold shell nanoparticles [J]. *International Society for Optics and Photonics*, 2014, 12(2): 165-175.
- [11] ZHANG H, JIA Z H, LV X Y. Surface layer reflective index changes of Au nanoparticle functionalized porous silicon microcavity for DNA detection[J]. *Current Applied Physics*, 2015, 15(8):870-876.
- [12] WU Q, CHEN L. Quantum dots decorated gold nanorod as fluorescent-plasmonic dual-modal contrasts agent for cancer imaging[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 74:16-23.
- [13] GIREL K, YANTCEVICH E, ARZUMANYAN G, et al. Detection of DNA molecules by SERS spectroscopy with silvered porous silicon as an active substrate[J]. *Physica Status Solidi (a)*, 2016,11(213): 2911-2915.
- [14] ZHANG M R, JIANG Q M, WANG Z G, et al. Three-dimensional gallium nitride nanoflowers supports decorated by gold or silver nanoparticles to fabricate surface-enhanced Raman scattering substrates[J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2017, 253: 652-659.
- [15] SHI F, JIA Z H, LV X Y, et al. Enhancement of the R6G fluorescence by gold nanoparticle depositions in porous silicon Bragg reflectors[J]. *Physica Status Solidi*, 2015, 212(3): 662-665.
- [16] LI Y, JIA Z H, LV G, et al. Detection of Echinococcus granulosus antigen by a quantum dot/porous silicon optical biosensor[J]. *Biomedical Optics Express*. 2017, 8(7): 3458-3469.
- [17] QU Y, LIAO L, LI Y, et al. Electrically conductive and optically active porous silicon nanowires[J]. *Nano Letters*, 2009, 9(12): 4539.

责任编辑: 闫新云