

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102525421 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201110438268. X

G01N 21/65 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 12. 24

G01N 21/64 (2006. 01)

(66) 本国优先权数据

A61K 49/00 (2006. 01)

201110130832. 1 2011. 05. 18 CN

(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 陶琴 许蓓蓓 唐栋梁

郭明德 袁倩倩

(74) 专利代理机构 南京天翼专利代理有限责任

公司 32112

代理人 汤志武

(51) Int. Cl.

A61B 5/00 (2006. 01)

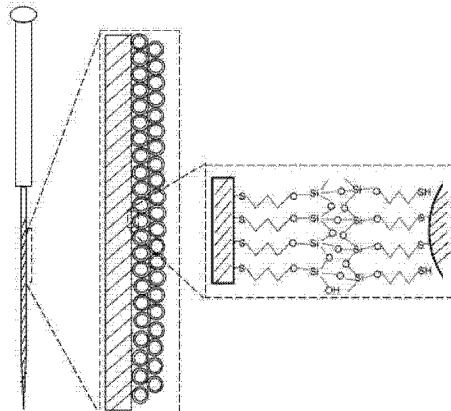
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 6 页

(54) 发明名称

一种具有增强拉曼和荧光信号的检测微针及  
其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种具有增强拉曼和荧光信号的检测微针及其制备方法，其特征在于将医用针灸针作为制备基础，在微针的针身和针尖部分的表面覆盖有具有增强拉曼和荧光信号的金属纳米材料层以及高分子材料层。检测微针的结构包括：表面巯基和氨基化的微针、金属纳米粒子层、高分子材料层。直径为 20–1000nm 的金属纳米粒子通过共价键或静电吸附作用包覆在针灸针表面。高分子层覆盖在最外层保护金属纳米粒子。利用检测微针的特点可以进行体外样品的拉曼和荧光检测，也可以进行生物体内的微创取样及拉曼和荧光检测。本发明可以为体内和体外的实验研究、临床诊断及大样本筛查提供快速超灵敏检测新方法。



1. 一种具有增强拉曼和荧光信号的检测微针,包括:依次连接的针柄(13)、针身(12)及针尖(11),其特征在于,在针身(12)及针尖(11)的表面上覆盖有金属纳米材料层(2),在金属纳米材料层(2)上包覆有高分子材料层(3),所述的金属纳米材料粒径为20-1000 nm。

2. 根据权利要求1所述的具有增强拉曼和荧光信号的检测微针,其特征在于,金属纳米材料层为金纳米粒子层、银纳米粒子层、铜纳米粒子层或铂纳米粒子层。

3. 根据权利要求1所述的具有增强拉曼和荧光信号的检测微针,其特征在于,金属纳米材料层为球形复合纳米粒子层,所述的球形复合纳米粒子层为金、银、铜和铂的两种或两种以上的金属复合纳米粒子层。

4. 根据权利要求1所述的具有增强拉曼和荧光信号的检测微针,其特征在于,金属纳米材料层为球形的核壳结构的复合纳米粒子层,所述的球形的核壳结构的复合纳米粒子层包括银核金壳复合纳米粒子层、铜核金银复合壳纳米粒子层、铜核金银双层壳纳米粒子层。

5. 根据权利要求1所述的具有增强拉曼和荧光信号的检测微针,其特征在于,金属纳米材料层为非金属的SiO<sub>2</sub>核金壳、银壳、铜壳、铂壳或复合壳纳米粒子层,所述的复合壳纳米粒子为金、银、铜和铂中的两种或两种以上金属复合的壳纳米粒子。

6. 根据权利要求1所述的具有增强拉曼和荧光信号的检测微针,其特征在于,高分子材料层为聚苯乙烯层、聚乳酸层、聚氨酯层或聚乙烯丙纶层中的一种。

7. 一种权利要求1所述具有增强拉曼和荧光信号的检测微针的制备方法,其特征在于,步骤如下:

步骤1)在微针的针身和针尖表面至少修饰氨基、醛基、羧基和羟基中的一种基团;

步骤2)将步骤1的针身和针尖插入浓度为10<sup>8</sup>-10<sup>18</sup>个粒子/升的金属纳米粒子悬浮液中静置12-48小时后,取出微针即可;

步骤3)将步骤2处理后的针身和针尖插入高分子溶液中的高分子质量与溶液体积比为0.1-10%的高分子溶液中静置1-60秒后,取出即得检测微针。

## 一种具有增强拉曼和荧光信号的检测微针及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种功能型检测微针技术领域,更具体地,具有增强拉曼和荧光信号的检测微针及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 监测内源或外源分子在靶器官中的分布比测定他们在血液中的浓度更有意义,包括理解生理机制如神经信号传导和评价药物生物利用度如癌症化疗等领域。传统的原位分析方法由于其侵入性或复杂的样品制备,不能完全满足这种监测要求。拉曼光谱技术可以提供基于分子振动的化学和物理信息,因为拉曼检测时不需考虑样品的状态,温度,形态和大小等物理状态,所以该技术是理想的实时原位监测生物样品的技术。通过对纳米材料进行设计和制造可以使纳米材料具有表面增强拉曼散射(SERS)效应,在样品浓度较低时仍能得到强度较高的增强拉曼信号,因此这些纳米材料常被作为定性或半定量的超灵敏检测分析工具。

[0003] 目前科学家就使用拉曼光谱检测体内的目标分子已进行许多尝试,但如何获得活体样本相关的表面增强拉曼光谱数据仍然是一个很大的挑战。例如,如何在不损坏机体和材料的情况下,植入并取出具有增强拉曼信号的材料,如何避免机体对具有增强拉曼信号的材料产生的免疫反应,以及如何在活体中收集可分辨的增强拉曼信号。另外在一般情况下,红外激光器往往作为激发源,它可以几乎无衰减的穿透一些生物组织,但相应的拉曼信号却很难穿透这些组织。因此如何得到一定深度的皮下组织的增强拉曼信号也是一个不容忽视的问题。

[0004] 在中医中通过将针灸针插入人体来进行治疗的方法已使用了几千年,它的主要特点是治疗过程中的微创性,所以针灸针是一种出入人体的理想微创的工具。在这里,针灸针被用作载体荷载具有增强拉曼和荧光信号的活性纳米材料形成出入人体的检测微针。当微针进入体内或组织时,组织液会扩散到金纳米壳之间的间隙内,当微针被拔出时可以将组织液中的待测分子携带出来。体外的表面增强拉曼光谱检测可避免增强拉曼信号在组织中的衰减,同时根据检测微针刺入的深度可以得到一定深度的皮下组织的增强拉曼信号。

### 发明内容

[0005] 本发明将医用针灸针作为检测微针的制备主体,利用检测探针针身覆盖的金属纳米材料的增强拉曼和荧光信号的作用测定探针表面生物分子的拉曼和荧光信号,发明一种可用于体外和体内的快速微创的检测方法。

[0006] 技术问题:本发明的目的是提供一种具有增强拉曼和荧光信号的检测探针及其制备方法,具有用于体内或体外分子拉曼和荧光检测的特点。

[0007] 技术方案:本发明采用如下技术方案:

本发明所述的具有增强拉曼和荧光信号的检测微针,其针身和针尖部分的表面覆盖有金属纳米材料层,金属纳米颗粒直径为20-1000 nm,金属纳米材料层表面又覆盖有高分子

材料层。

[0008] 本发明所述的具有增强拉曼和荧光信号的检测微针制备方法：

步骤 1) 在微针的针身和针尖表面至少修饰氨基、醛基、羧基和羟基中的一种基团得到功能化的微针, 所用方法在本领域是已知的。

[0009] 所述的微针为临床所用各种类型的针灸针。

[0010] 步骤 2) 将步骤 1 的针身和针尖插入浓度为  $10^8\text{--}10^{18}$  个粒子 / 升的金属纳米粒子悬浮液中静置 12-48 小时后, 取出微针即可;

所述的金属纳米粒子层为球形的纳米粒子层, 可以是单一的金属纳米粒子层包括金纳米粒子层、银纳米粒子层、铜纳米粒子层、铂纳米粒子层; 可以是球形的复合纳米粒子层包括金银复合纳米粒子层及金、铜和铂复合纳米粒子层; 可以是球形的核壳结构的复合纳米粒子层包括银核金壳复合纳米粒子层、铜核金银复合壳纳米粒子层、铜核金银双层壳纳米粒子层; 可以是非金属的  $\text{SiO}_2$  核金壳、银壳、铜壳、铂壳或复合壳纳米粒子层, 所述的复合壳纳米粒子为金、银、铜和铂中的两种或两种以上金属复合的壳纳米粒子。

[0011] 步骤 3) 将步骤 2 处理后的针身和针尖插入高分子溶液中的高分子质量与溶液体积比为 0.1-10% 的高分子溶液中静置 1-60 秒后, 取出即得检测微针。

[0012] 所述的高分子溶液可以是聚苯乙烯溶液; 可以是聚乳酸溶液; 可以是聚氨酯溶液; 可以是聚乙烯丙纶溶液。

[0013] 将上述制备的微针表面修饰特定的基团后, 可以用于特定分子的体外检测, 所述的特定分子可以是核酸, 可是蛋白质。将上述制备的微针直接插入施针的部位, 滞留一定时间后取出并作拉曼或荧光检测, 可以检测施针部位组织液成分的改变。将上述制备的微针插入注射药物的部位, 并对针身和针尖的不同部位作拉曼或荧光检测, 可以测定分子药物在组织中的扩散和分布情况, 得到一定深度的皮下组织的拉曼信号。

[0014] 有益效果: 与现有技术相比, 本发明具有如下优点:

(1) 本项目利用结构均一的纳米粒子构建增强拉曼和荧光信号的纳米结构, 有利于获得增强因子一致的纳米结构, 最大程度上提高检测信号; 通过在纳米粒子表面修饰不同的功能分子可进行特异性检测, 也可以用于体内不同分子的特异性微创检测。

[0015] (2) 基于纳米聚集体的拉曼增强效应, 建立快速超灵敏的检测方法, 不需对样品进行浓缩等前处理直接进行分析, 可以降低试剂的消耗和缩短检测的时间。

[0016] (3) 利用检测微针的特性在活体微创检测时可以提供目标分子的在皮下组织的深度分布信息, 这是其他活体分析技术所难以具备的。

## 附图说明

[0017] 图 1 是一种具有增强拉曼和荧光信号的检测微针结构示意图。

[0018] 图 2 是一种具有增强拉曼和荧光信号的检测微针制备示意图。

[0019] 图 3 是一种具有增强拉曼和荧光信号的检测微针针身 A-A 横截面示意图。

[0020] 图 4 是检测微针表面吸附了金属纳米材料层的电镜图。

[0021] 图 5 是检测微针表面的金属纳米材料的电镜图。

[0022] 图 6 是用检测微针检测尼罗蓝 A 的拉曼光谱图。

## 具体实施方式

### [0023] 实施例 1

一种具有增强拉曼和荧光信号的检测微针，如图 1 所示，检测微针包括：依次连接的针柄 13、针身 12 及针尖 11。如图 3 所示，在针身 12 及针尖 11 的表面上覆盖有金属纳米材料层 2，在金属纳米材料层 2 上包覆有高分子材料层 3。所述的金属纳米材料粒径为 20-1000 nm，参见图 5，针身和针尖表面覆盖有 1-2 层金纳米粒子层，金纳米粒子直径为 180nm。在本实施例中，

所述高分子材料层为聚苯乙烯层、聚乳酸层、聚氨酯层或聚乙烯丙纶层中的一种。

### [0024] 所述金属纳米材料层可以是下列之一：

1) 金属纳米材料层为金纳米粒子层、银纳米粒子层、铜纳米粒子层或铂纳米粒子层；

2) 金属纳米材料层为球形复合纳米粒子层，所述的球形复合纳米粒子层为金、银、铜和铂的两种或两种以上的金属复合纳米粒子层。

[0025] 3) 金属纳米材料层为球形的核壳结构的复合纳米粒子层，所述的球形的核壳结构的复合纳米粒子层包括银核金壳复合纳米粒子层、铜核金银复合壳纳米粒子层、铜核金银双层壳纳米粒子层。

[0026] 4) 金属纳米材料层为非金属的  $\text{SiO}_2$  核金壳、银壳、铜壳、铂壳或复合壳纳米粒子层，所述的复合壳纳米粒子为金、银、铜和铂中的两种或两种以上金属复合的壳纳米粒子。

### [0027] 实施例 2

一种具有增强拉曼和荧光信号的检测微针的制备方法，步骤如下：

步骤 1) 在微针的针身和针尖表面至少修饰氨基、醛基、羧基和羟基中的一种基团；

步骤 2) 将步骤 1 的针身和针尖插入浓度为  $10^8\text{-}10^{18}$  个粒子 / 升的金属纳米粒子悬浮液中静置 12-48 小时后，取出微针即可；

步骤 3) 将步骤 2 处理后的针身和针尖插入高分子溶液中的高分子质量与溶液体积比为 0.1-10% 的高分子溶液中静置 1-60 秒后，取出即得检测微针。

### [0028] 实施例 3 一种具有增强拉曼和荧光信号的检测微针的制备

在检测微针的针身和针尖表面修饰巯基得功能化的微针(修饰巯基的方法在本领域是已知的)，调节金纳米粒子悬浮液使其浓度为  $1\times 10^{8-18}$  个 / 升。再将功能化的微针在金纳米粒子悬浮液中静置 12-48 小时后取出。由于微针表面的巯基和金纳米粒子的化学键作用，金纳米粒子会吸附在针灸针表面，如图 5 所示，形成 1-2 层结构均一的、有增强拉曼和荧光信号的纳米结构。参见图 2，金属纳米粒子层通过巯基或羟基等基团能够与针身和针尖表面相连接。再将微针的覆盖有金纳米粒子的部分插入质量与体积比 0.1-10% 的聚苯乙烯溶液中静置 1-60 秒后，取出室温放置即可。形成的聚苯乙烯层可以在插入和取出针的过程中保护金纳米粒子不被摩擦掉。

### [0029] 实施例 4 具有增强拉曼和荧光信号的检测微针在体外检测中的应用——表面增强拉曼信号

将表面未经过任何处理的微针和上述制备的微针同时浸泡在浓度为 1 微摩尔 / 升的尼罗蓝 A 溶液中，浸泡 30 分钟后取出，洗涤，拉曼光谱仪测定两根微针表面的拉曼信号。所用方法在本领域是已知的，并且可以加以利用。参考图 6，曲线 1 为表面未经任何处理的微针表面的尼罗蓝 A 分子的拉曼信号，曲线 2 表示上述制备的微针表面的尼罗蓝 A 分子的拉曼

信号,可以看出微针未经处理时不具备放大拉曼信号的功能,而表面吸附有金属纳米粒子层的微针可以增强分子的拉曼信号。

[0030] 实施例 5 具有增强拉曼和荧光信号的检测微针在体外检测中的应用——核酸检测(拉曼信号)

将上述制备的微针浸泡在 10 微升巯基化核酸探针分子(10 纳摩尔 / 升),4℃过夜,洗去未反应的核酸探针分子。再将该微针插入待测溶液中,72℃杂交 5 分钟,再热循环处理 3 次(60℃ / 4℃)。37℃再加入核酸内切酶处理 5 分钟,洗涤,拉曼光谱仪测定核酸特征信号。所用方法在本领域是已知的,并且可以加以利用。

[0031] 实施例 6 具有增强拉曼和荧光信号的微针在体外检测中的应用——蛋白检测(拉曼信号)

将上述制备的微针浸泡在 10 微升巯基化叶酸分子(1 纳摩尔 / 升)中,4℃过夜,洗去未反应的叶酸分子。再将该微针浸泡在细胞膜蛋白提取液中,37℃温育 30 分钟,洗涤,拉曼光谱仪测定叶酸受体蛋白分子的特征信号。所用方法在本领域是已知的,并且可以加以利用。

[0032] 实施例 7 具有增强拉曼和荧光信号的检测微针在体外检测中的应用——核酸检测(荧光信号)

将上述制备的微针浸泡 10 微升标记荧光信号分子的巯基化核酸探针分子(10 纳摩尔 / 升),4℃过夜,洗去未反应的核酸分子,测定荧光的信号强度。再将该微针插入待测溶液中,72℃杂交 5 分钟,再热循环处理 3 次(60℃ / 4℃)。37℃再加入单链核酸水解酶处理 5 分钟,洗涤,再次测定荧光的信号强度,计算荧光信号的衰减,得到结合核酸的量。所用方法在本领域是已知的,并且可以加以利用。

[0033] 实施例 8 具有增强拉曼和荧光信号的检测微针在体内检测中的应用——组织液成分检测

将上述制备的微针直接插入需要检测的组织中,并插到需要检测的深度。滞留 5-30 分钟,取出微针直接用拉曼光谱仪检测微针表面的组织液的拉曼图谱,然后和正常组织液的拉曼图谱比较,分析施针前后组织液中分子的种类和数量的变化。所用方法在本领域是已知的,并且可以加以利用。

[0034] 实施例 9 具有增强拉曼和荧光信号的检测微针在体内检测中的应用——组织液葡萄糖检测

将上述制备的微针浸泡 5 毫克 / 毫升的 3- 巍基苯硼酸溶液 4℃过夜,洗去未反应的 3- 巍基苯硼酸后保存于生理盐水中。直接插入需要检测的组织中,并插到需要检测的深度。滞留 5-30 分钟,取出直接用拉曼光谱仪检测,测定的 3- 巍基苯硼酸结合的葡萄糖拉曼图谱,由强度计算葡萄糖含量。按同样的原理,在制备的微针上功能化其他特异性分子可以进行其他的特异性检测。所用方法在本领域是已知的,并且可以加以利用。

[0035] 实施例 10 具有增强拉曼和荧光信号的微针在体内检测中的应用——深度可分辨检测

用剂量为 50 mg/kg 的戊巴比妥钠对新西兰雄性兔子进行腹腔给药进行麻醉,在麻醉药起作用后,将股外侧肌腱上的毛发用剪刀剪去。将 200 μl, 2×10<sup>-4</sup> M 的 NBA 溶液注入股外侧肌腱中。5-10 分钟后,将上述制备的微针直接插入肌腱组织中,深度必须足够深。滞留 5-30 分钟后,取出微针直接用拉曼光谱对针尖、针体的不同部位检测,并将光谱进

行比较,可以分析药物在组织中扩散的程度。所用方法在本领域是已知的,并且可以加以利用。

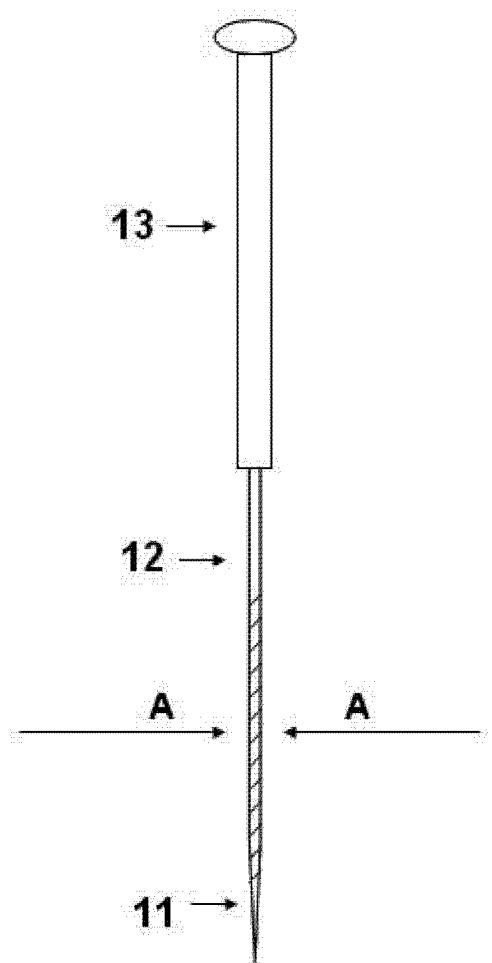


图 1

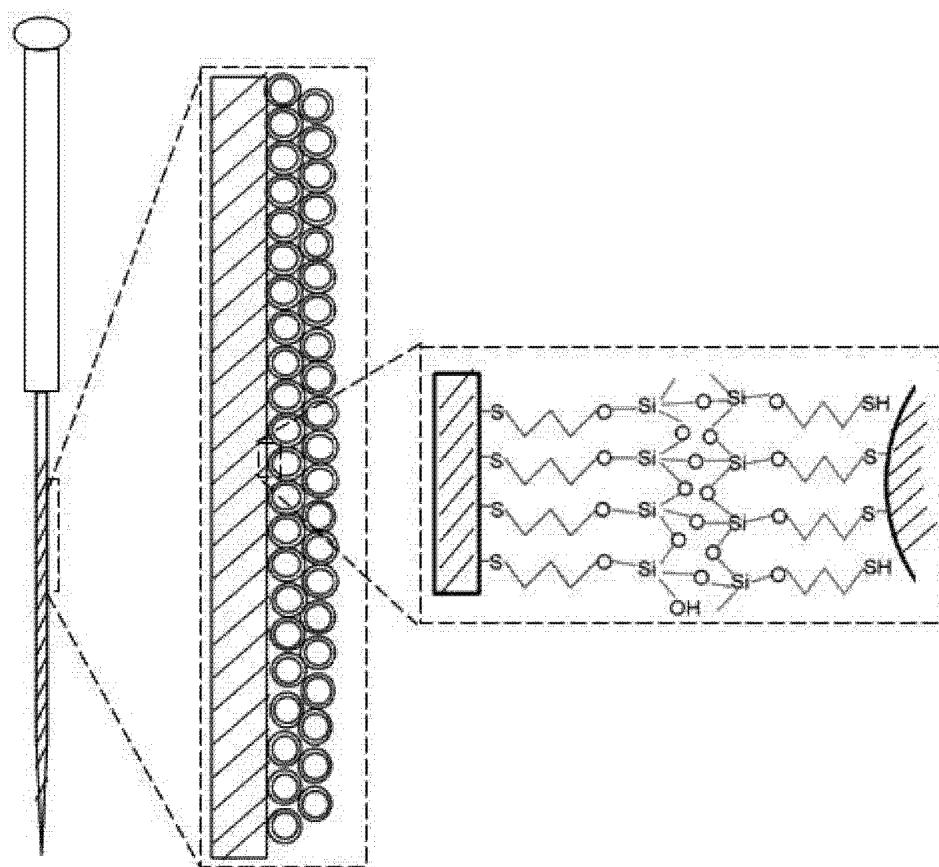


图 2

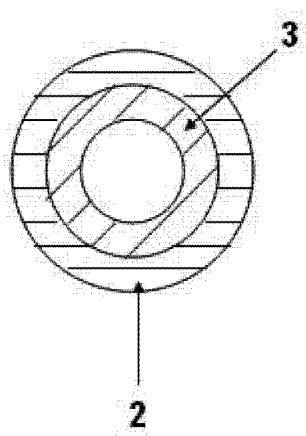


图 3

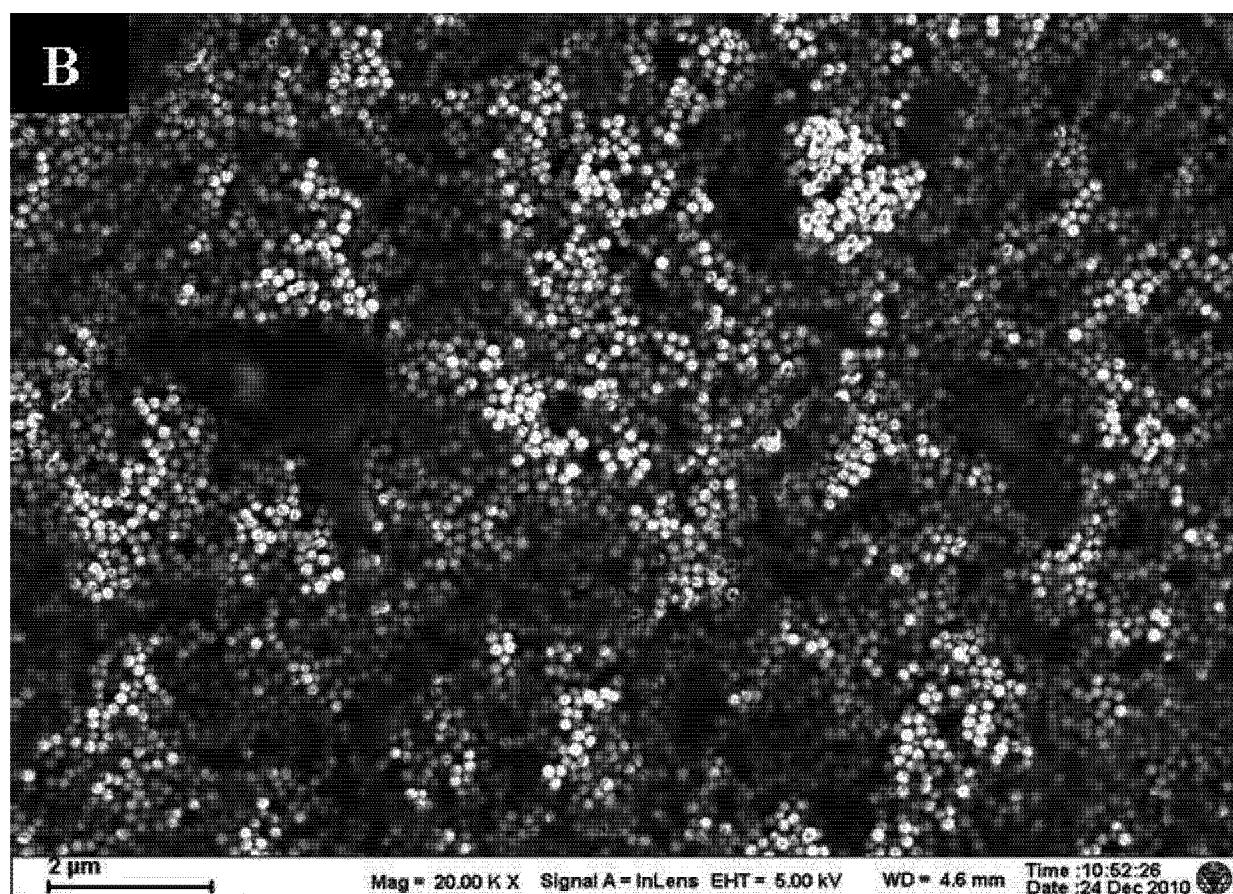


图 4

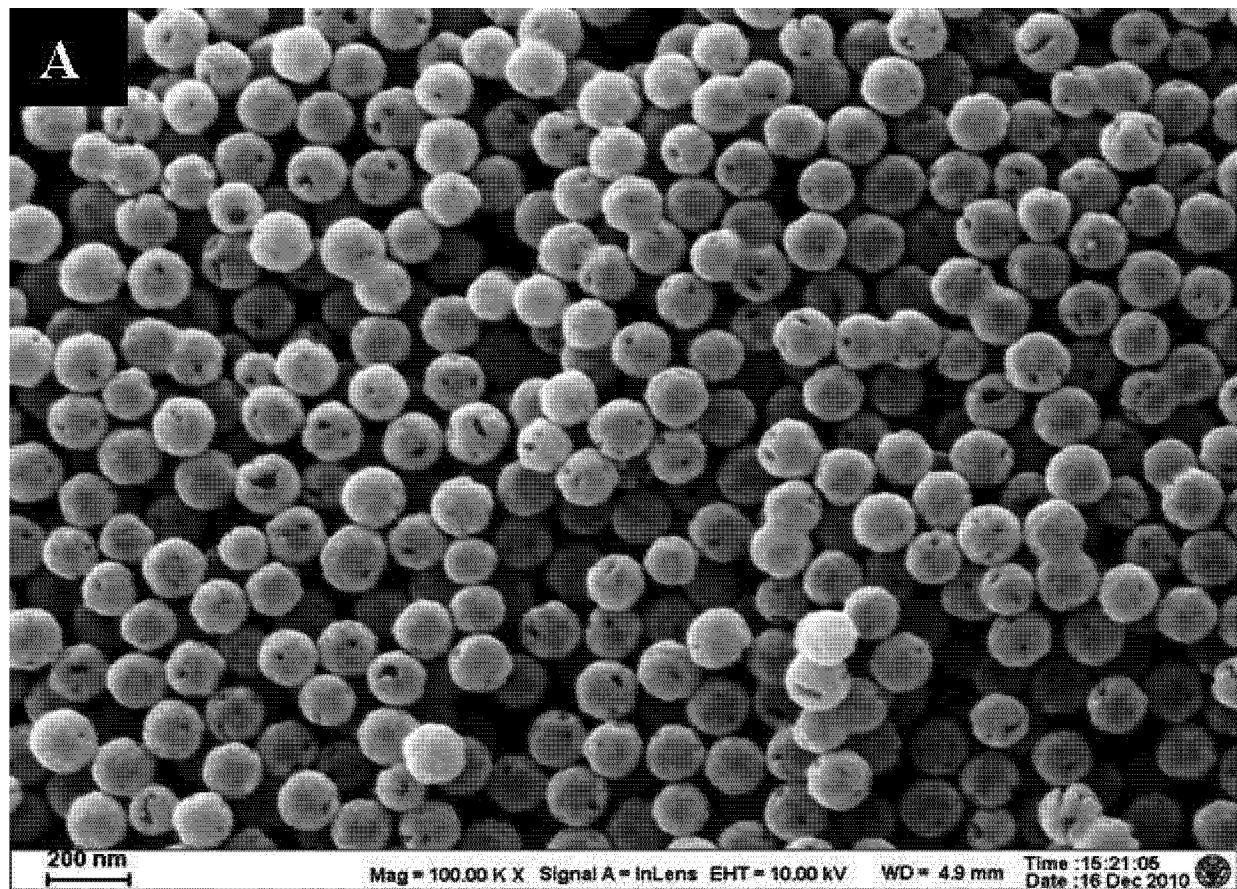


图 5

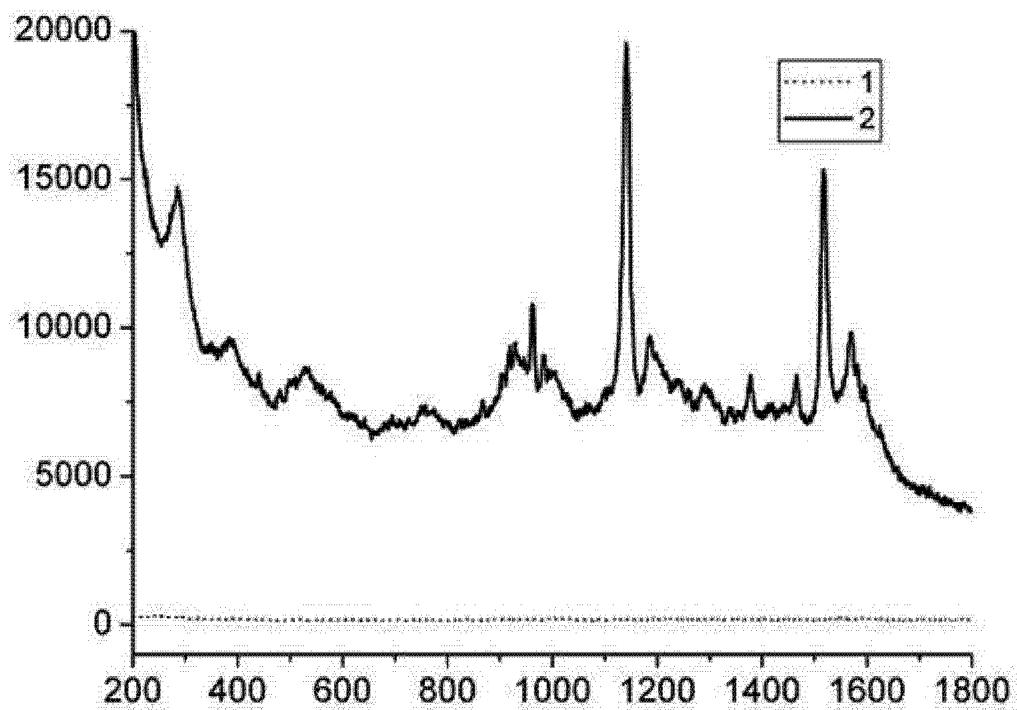


图 6