

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102011193 A

(43) 申请公布日 2011.04.13

---

(21) 申请号 201010290192.6

(22) 申请日 2010.09.21

(71) 申请人 南京航空航天大学

地址 210016 江苏省南京市御道街 29 号

(72) 发明人 郭东杰 陈亚清 张昊 谭华

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 黄嘉栋

(51) Int. Cl.

C30B 29/40(2006.01)

C30B 33/00(2006.01)

G01N 27/64(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

G01N 21/35(2006.01)

B82Y 15/00(2011.01)

B82Y 40/00(2011.01)

---

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 7 页

(54) 发明名称

蛋白质修饰的GaN纳米线阵列及其制法和用途

(57) 摘要

一种蛋白质修饰的GaN纳米线阵列，它是以直立的GaN纳米线阵列作为基片，纳米线表面经化学氧化或等离子氧化产生Ga-OH官能团；或者经化学气相沉积法在纳米线表面沉积SiO<sub>2</sub>、TiO<sub>2</sub>或Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>，经水解在在纳米线表面产生-OH官能团，GaN纳米线表面的-OH官能团与SiCl<sub>4</sub>反应形成-O-Si-Cl键，最后通过聚乙二醇分子与蛋白质分子相连接形成蛋白质修饰的GaN纳米线阵列。它可以应用于蛋白质分离提纯、识别或检测。本发明公开了其制法。

1. 一种蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列，其特征是：它是以直立的 GaN 纳米线阵列作为基片，纳米线表面经化学氧化或等离子氧化产生 Ga-OH 官能团；或者经化学气相沉积法在纳米线表面沉积  $\text{SiO}_2$ 、 $\text{TiO}_2$  或  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ，经水解在表面产生 -OH 官能团，GaN 纳米线表面的 -OH 官能团与  $\text{SiCl}_4$  反应形成 -O-Si-Cl 键，最后通过聚乙二醇分子与蛋白质分子相连接形成蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列。

2. 根据权利要求 1 所述的蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列，其特征是：所述的蛋白质分子是任何蛋白质分子。

3. 根据权利要求 1 所述的蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列，其特征是：所述的蛋白质分子是亲和素、小鼠单克隆抗体或脑利尿钠肽的单克隆抗体。

4. 根据权利要求 1 所述的蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列，其特征是：所述的聚乙二醇是数均分子量为 600–3000 的聚乙二醇。

5. 一种制备权利要求 1 所述的蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列的方法，其特征是它包括下列步骤：

步骤 1. 将直立的 GaN 纳米线阵列用化学氧化法氧化或等离子辐射氧化，使纳米线表面产生 -OH 官能团；

步骤 2. 将步骤 1 得到的表面具有 -OH 官能团的 GaN 纳米线阵列在室温下浸泡在纯  $\text{SiCl}_4$  液体中 0.5–2 小时，使纳米线表面的 -OH 基转化为 -O-SiCl<sub>3</sub>；

步骤 3. 将步骤 2 得到的表面具有 -O-SiCl<sub>3</sub> 的 GaN 纳米线阵列置于 0.1mol/L 的一端带有 NHS (N-OH 琥珀酰亚胺) 的聚乙二醇的氯仿溶液中，在黑暗中放置 0.5 小时，取出 GaN 纳米线阵列，清洗，干燥，得到 NHS 活化的 GaN 纳米线；

步骤 4. 将步骤 3 得到的 NHS 活化的 GaN 纳米线置于蛋白质的水或 PBS (磷酸缓冲溶液，pH = 7 ~ 10) 溶液 (10–50nmol/L) 中放置 0.5 ~ 1 小时，取出 GaN 纳米线阵列，清洗，干燥，得到蛋白质修饰的 GaN 纳米线。

6. 根据权利要求 5 所述的制备蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列的方法，其特征是：步骤 1 所述的化学氧化法氧化是将 GaN 纳米线阵列置于硫酸和双氧水混合溶液或硫酸与硝酸混合溶液中，在 80°C 下加热 4 ~ 10 小时，取出清洗，吹干。

7. 根据权利要求 5 所述的制备蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列的方法，其特征是所述的步骤 1 用如下方法替代：

步骤 1' 将直立的 GaN 纳米线阵列用化学气相沉积法在纳米线表面沉积  $\text{SiO}_2$ 、 $\text{TiO}_2$  或  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ，经水解在外表面产生 -OH 官能团。

8. 根据权利要求 5 所述的制备蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列的方法，其特征是所述的步骤 3 和 4 可以用如下两个步骤替代：

步骤 3' 将步骤 2 得到的表面具有 -O-SiCl<sub>3</sub> 的 GaN 纳米线阵列置于 0.1mol/L 的一端带有生物素的聚乙二醇 DMF 溶液中，加入少许三乙胺，放置 0.5 小时，清洗，干燥，得到生物素修饰的 GaN 纳米线。

步骤 4' 将步骤 3' 得到的生物素修饰的 GaN 纳米线置于浓度为 10–50nmol/mL 的亲和素水或 PBS 溶液中，放置 0.5 小时，清洗，干燥，得到亲和素修饰的 GaN 纳米线。

9. 根据权利要求 5–8 所述的任一制备蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列的方法，所述的蛋白质是任何蛋白质分子。

10. 权利要求 1 所述的蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列在蛋白质分离提纯、识别或检测中的应用。

## 蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列及其制法和用途

### 技术领域：

[0001] 本发明涉及 GaN 纳米线阵列，具体地说，是蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列及其制法和用途。

### 背景技术

[0002] 氮化镓 (GaN) 纳米线同氧化锌 (ZnO)、硅纳米线 (Si)、碳纳米管 (CNT) 一样，是一种重要的一维半导体材料。在氮化镓晶体中，镓元素与氮元素之间形成强共价键，使其表现出可以与碳纳米管相媲美的机械性能。GaN 纳米线具有相对稳定的物理化学性质，它可以承受酸、碱、有机溶剂的侵蚀，有高度的热稳定性，可以承受 900℃ 的高温。现有的技术已经可以熟练制备直径 5 ~ 500nm，毫米级长度的纳米线。

[0003] GaN 纳米线具有高度的生物兼容性能，可以在生物体内使用。作为一种一维纳米材料，它具有高的面积 / 体积比。未经处理的 GaN 纳米线表面没有官能团，不能用来嫁接有机单分子膜。GaN 纳米线表面可以通过化学氧化例如硫酸 / 双氧水处理产生活性 -OH 官能团，但该技术所产生的 -OH 数量相对有限，因此寻找生成大量 -OH 的制备方法十分有意义。原子层沉积技术 (ALD) 属于真空化学气相沉积技术 (CVD)，该项技术在产生致密氧化层的同时，能在其表面产生大量的 -OH 官能团，这部分的 -OH 就可以用来修饰有机单分子膜，进而嫁接生物分子。

[0004] 生物分子表面含有众多的官能团，可以与有机分子上的活性官能团发生欧联反应，从而将生物分子嫁接在 GaN 纳米线表面上。直径处于 100 ~ 500nm 之间、间距处于 200nm ~ 20 μm 之间的直立 GaN 纳米线阵列对于生物分子的进出十分有利，从而提高嫁接或分离效率。聚乙二醇 (PEG) 具有高度的非特异性排斥生物分子能力，在 PEG 的末端固定生物分子，可避免生物分子的物理性吸附，从而大大提高生物分子的选择性。同时，相对于多孔的硅、铝等基生物传感器来说，由于 GaN 纳米线阵列直立，溶液在其表面的流动性更高，便于嫁接、分离生物分子。

[0005] GaN 纳米线可以允许红外光谱穿过，其表面的官能团及有机修饰物包括生物分子可以吸收红外光，故利用红外光谱可监控 GaN 纳米线表面的化学反应。ALD 沉积层的厚度通常在 2 ~ 10 纳米，微米级波长的红外光可以穿过 ALD 沉积层，故 ALD 沉积的 GaN 纳米线也可以用红外表征。

[0006] 生物体内的某些痕量存在蛋白对生理功能起着极其重要的作用，提纯、识别、克隆它们具有重要的意义。由于 GaN 纳米线具有高比表面积，可作为嫁接高密度的生物分子的载体。当生物分子嫁接之后，就可以与与之相应的生物分子（例如抗体 - 抗原、受体 - 给体、酶 - 底物等）发生相互识别，然后通过一些检测手段，把这些生物分子的信息采集出来。由于生物分子的识别属可逆、可控的，该阵列可重复多次使用。通过生物分子的识别，可以将溶液中少量存在的生物分子捕获出来，实现浓缩分离目标生物分子的目的，避免了生化分离的高代价投入。

[0007] 通常 GaN 纳米线阵列是一种垂直直立的纳米线，激光在其表面很容易发生干

涉。当生物分子识别前后，其干涉条纹就会发生明显变化，采集其干涉数据，计算其光学厚度，可定量得到嫁接在其表面生物分子的嫁接密度。另外，若采用荧光标记的生物分子嫁接在纳米线的表面，其荧光强度就可以通过荧光扫描获得。利用荧光分析法，可定量得到荧光分子的数量，即可推导出生物分子的嫁接密度。

[0008] 目前，有关GaN纳米线的专利主要集中在发光二极管和激光器方面。美国多项专利如6818061、7335262涉及GaN纳米线的制备。美国专利7421274, 7420147, 6949773, 欧洲专利EP1145282A2, 中国台湾专利TW569474涉及GaN纳米线在发光二极管方面的应用。中国专利200510048111涉及GaN纳米线的制备。中国专利200780016946涉及GaN纳米线的制备和在发光二极管和激光器方面的应用。

### 发明内容：

[0009] 本发明的目的是提供一种蛋白质修饰的GaN纳米线阵列及其制法，以及将之用于蛋白质分子的分离、识别或检测。

[0010] 本发明的技术方案如下：

[0011] 一种蛋白质修饰的GaN纳米线阵列，它是以直立的GaN纳米线阵列作为基片，纳米线表面经化学氧化或等离子氧化产生Ga-OH官能团；或者经原子层沉积法在纳米线表面沉积SiO<sub>2</sub>、TiO<sub>2</sub>或Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>膜，其表面经水解具有-OH官能团，GaN纳米线表面的-OH官能团与SiCl<sub>4</sub>反应形成-O-Si-Cl键，最后通过聚乙二醇分子与蛋白质分子连接形成蛋白质修饰的GaN纳米线阵列。

[0012] 上述的蛋白质修饰的GaN纳米线阵列，所述的蛋白质分子可以是任何蛋白质分子，例如：亲和素、小鼠单克隆抗体或脑利尿钠肽的单克隆抗体。

[0013] 上述的蛋白质修饰的GaN纳米线阵列，所述的聚乙二醇是数均分子量为600-3000的聚乙二醇。

[0014] 一种制备上述的蛋白质修饰的GaN纳米线阵列的方法，它包括下列步骤：

[0015] 步骤1. 将直立的GaN纳米线阵列用化学氧化法氧化或等离子辐射氧化，使纳米线表面产生-OH官能团；

[0016] 步骤2. 将步骤1得到的表面具有-OH官能团的GaN纳米线阵列在室温浸泡在纯SiCl<sub>4</sub>液体中0.5-2小时，使纳米线表面的-OH基转化为-O-SiCl<sub>3</sub>；

[0017] 步骤3. 将步骤2得到的表面具有-O-SiCl<sub>3</sub>的GaN纳米线阵列置于0.1mol/L的一端带有NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)的聚乙二醇的氯仿溶液中，在黑暗中放置0.5小时，取出GaN纳米线阵列，清洗，干燥，得到NHS活化的GaN纳米线；

[0018] 步骤4. 将步骤3得到的NHS活化的GaN纳米线置于蛋白质的水或PBS(磷酸缓冲溶液，pH=7~10)溶液(10-50nmol/L)中放置0.5~1小时，取出GaN纳米线阵列，清洗，干燥，得到蛋白质修饰的GaN纳米线。

[0019] 上述的制备蛋白质修饰的GaN纳米线阵列的方法，步骤1所述的化学氧化法是将GaN纳米线阵列置于硫酸和双氧水混合溶液(硫酸：双氧水=3:1v/v)或硫酸与硝酸混合溶液(硫酸：硝酸=1:1v/v)中，在80℃下加热4~10小时，取出清洗，吹干。

[0020] 上述的制备蛋白质修饰的GaN纳米线阵列的方法，所述的步骤1可以用如下方法替代：

[0021] 步骤 1' 将直立的 GaN 纳米线阵列用原子层沉积法在纳米线表面沉积 SiO<sub>2</sub>、TiO<sub>2</sub> 或 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 膜，其表面经水解产生 -OH 官能团。

[0022] 上述的制备蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列的方法，所述的步骤 3、4 可以用如下两个步骤替代：

[0023] 步骤 3' 将步骤 2 得到的表面具有 -O-SiCl<sub>3</sub> 的 GaN 纳米线阵列置于 0.1mol/L 的一端带有生物素的聚乙二醇 DMF(二甲基甲酰胺) 溶液中，加入少许三乙胺，放置 0.5~1 小时，清洗，干燥，得到生物素修饰的 GaN 纳米线。

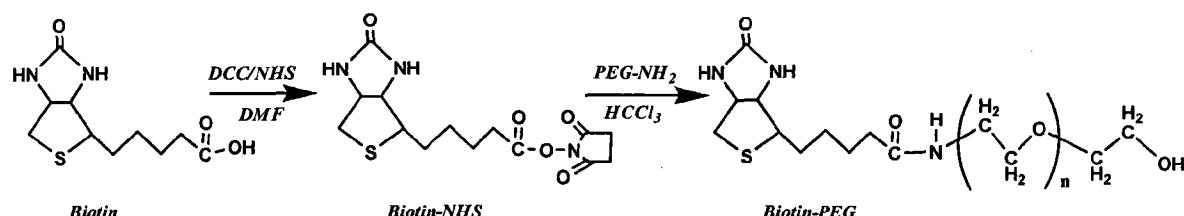
[0024] 步骤 4' 将步骤 3' 得到的生物素修饰的 GaN 纳米线置于浓度为 10~50nmol/mL 的亲和素水或 PBS 溶液中，放置 0.5 小时，清洗，干燥，得到亲和素修饰的 GaN 纳米线。

[0025] 上述的制备蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列的方法，所述的蛋白质是任何蛋白质分子，它们可以是亲和素、小鼠单克隆抗体或脑利尿钠肽的单克隆抗体。

[0026] 本发明中用来嫁接有机分子膜的有机分子含有双官能团，一端可以与 GaN 表面 -OH 反应的官能团（如 Si-Cl），另外一端与含有 -NH<sub>2</sub> 官能团发生交联的官能团（如 NHS 酯）。这里先将 GaN 阵列室温置于纯的 SiCl<sub>4</sub> 溶液 0.5~2 小时，GaN 纳米线表面的 -OH 就与 SiCl<sub>4</sub> 反应，产物是 -O-Si-Cl<sub>3</sub>，多余的 Si-Cl 可以与 PEG 一端的 -OH 反应，从而将 PEG 嫁接在 GaN 纳米线上，在 PEG 的另外一段通过酰胺键 (-CONH-) 与生物素或亲和素分子相连接，从而将它们固定在 GaN 的表面。这里，依据生物素和亲和素的官能团不同分别采用两种修饰路线。一种先固定生物素，然后识别亲和素；另一种先固定亲和素，然后识别生物素。

[0027] 本发明可以首先合成 PEG-Biotin，利用生物素分子一端的羧基活化成 NHS 酯，然后与 PEG-NH<sub>2</sub> 上的 -NH<sub>2</sub> 反应，从而合成 PEG-Biotin：

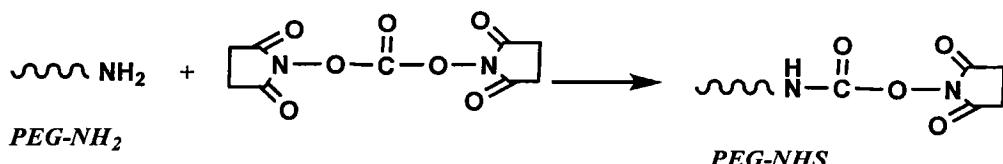
[0028]



[0029] 将 GaN 纳米线表面的 Si-Cl 与 PEG-Biotin 另外一端的 OH 反应，从而将生物素通过酰胺键嫁接在 GaN 表面。在水相中，亲和素分子很容易与生物素分子发生识别，从而将亲和素固定在 GaN 纳米线表面。生物素与亲和素分子间的作用力为氢键、范德华力、静电力。其反应过程如图 1 所示。

[0030] 本发明也可以首先合成 GaN-PEG-NHS 酯，将 PEG-NH<sub>2</sub> 上的 -NH<sub>2</sub> 与双琥珀酰亚胺 (SC, bis(N-succinimidyl) carbonate) 反应，生成活性的 PEG-NHS 酯：

[0031]



[0032] 该 NHS 酯可与亲和素分子上的另一 -NH<sub>2</sub> 发生交联反应。水相下，嫁接亲和素的 GaN 可以与生物素发生识别，从而将生物素转移到 GaN 纳米线表面。其反应过程如图

2 所示。

[0033] 鉴于蛋白质（如小鼠单克隆抗体、脑利尿钠肽的单克隆抗体等）的表面均含有大量的活性  $-NH_2$ ，故均可以用上述方法嫁接这些蛋白质分子。当这些抗体分子嫁接后，纳米线就可以对应的抗原分子（如山羊鼠抗免疫蛋白（IgG）、脑利尿钠肽（BNP））发生识别，从而将抗原分子从液相转移到 GaN 纳米线表面。反之，先固定抗原，然后与它们的抗体发生识别，从而将抗体分子转移到 GaN 纳米线表面。显然，这种方法也可以嫁接未知的蛋白质分子，所嫁接的生物分子与有机分子之间通过共价的酰胺键相连。

[0034] 本发明的蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列，可以应用于 4 个方面的生物分子检测。包括蛋白质的分子识别、及识别前后的激光干涉光谱、蛋白质分子的荧光检测、蛋白质分子的基质辅助激光解离飞行时间质谱检测。

[0035] 本发明的蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列，可用于蛋白质的亲和分离。将生物素固定的 GaN 纳米线阵列置于含有亲和素的混合溶液中，依靠生物素和亲和素的特殊识别，溶液中的亲和素与生物素发生作用而被固定在 GaN 纳米线上，将该芯片取出，置于去离子水中，微微加热（50℃）半小时，亲和素从芯片上生物素的束缚中脱离，进入溶液中。将溶液低温干燥，就可得到高纯度的活性亲和素。反之，PEG-NHS 酯活化的样品也可以先固定亲和素，从而提纯生物素。同理，将 NHS 酯活化的 GaN 芯片分别置于抗体（如脑利尿钠肽（BNP）的抗体、小鼠单克隆抗体）的 PBS 缓冲溶液中孵育一小时，取出后用 PBS 缓冲和去离子水清洗，干燥，这两种抗体上的  $-NH_2$  与 NHS 作用，从而将它们固定到 GaN 芯片上。将芯片置于含有对应抗原（如脑利尿钠肽（BNP）、山羊鼠抗免疫蛋白（IgG））的 PBS 缓冲溶液中，依靠抗体 - 抗原相互作用，BNP 和 IgG 抗原分子就被固定在 GaN 芯片上，置于一定 pH 值的 PBS 溶液中，洗脱所固定的抗原 BNP 和 IgG 分子。冷冻、干燥即可得到高纯度的抗原 BNP 和 IgG。反之，先固定抗原，后识别抗体分子，就可以分离抗体分子。

[0036] 本发明的蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列，可用于激光干涉传感器。本发明使用的均匀分布的规则的直立六方棱柱型 GaN 纳米线（纳米线形貌见图 3），入射激光在纳米线的表面发生反射，多束反射激光发生干涉，利用检测器把干涉条纹采集，利用公式  $nd = (\Delta k \lambda_1 \lambda_2) / 2(\lambda_1 - \lambda_2)$ ，n 是 GaN 的平均折射率，d 是膜的厚度， $\lambda_1$  和  $\lambda_2$  分别是相邻的两个波峰或波谷的波长值，而对于相邻的两个波峰或波谷来说，式中  $\Delta k = 1.0$ ，可得干涉层的相对厚度。当生物分子嫁接或识别之后，由于生物分子自身的尺寸（蛋白质的约 10nm），干涉层厚度发生变化，其变化量来自于固定的生物分子。分别采集嫁接前后的干涉光谱，将数据代入公式，分别计算了光学厚度的变化量，依此衡量所嫁接蛋白质分子的嫁接密度，也即得到目标生物分子的浓度。

[0037] 本发明的蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列可用于荧光检测。将生物分子进行荧光标记，利用荧光扫描可获得荧光图片。依据现有的荧光分析技术，一定浓度下荧光强度与荧光分子数呈线性对应关系，而荧光分子数与生物分子数具有固定的比例，这样借助荧光测量，可以定性、定量获得 GaN 纳米线所固定的生物分子数量。

[0038] 本发明的蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列可用于基质辅助激光解离飞行时间（MALDI-ToF-MS）质谱检测。在 NHS 酯活化的 GaN 芯片上，首先固定亲和素、脑利尿钠肽（BNP）或小鼠单克隆抗体，然后亲和浓缩固定生物素、脑利尿钠肽（BNP）、山羊鼠

抗免疫蛋白 (IGg)。将干燥的样品置于 MALDI-ToF-MS 检测，就可以得到生物素、脑利尿钠肽、山羊鼠抗免疫蛋白的质谱图片。相对于普通的不锈钢衬底，蛋白质修饰的 GaN 纳米线陈列具有高得多的比表面积，PEG 聚合物链可以排斥非目标蛋白质分子在纳米线表面的非特异性吸附，通过抗体 - 抗原相互作用可筛选高度浓缩的目标生物分子，从而获得更好的检测限。

[0039] 本发明的 NHS 酯活化的 GaN 芯片还可以检测未知的蛋白质分子。将 NHS 酯活化的 GaN 芯片置于牛血清蛋白或肽 (Fmoc-EAALKLAR) 的溶液中，牛血清蛋白或肽 (Fmoc-EAALKLAR) 就被固定在 GaN 的表面，测试 MALDI-ToF-MS，牛血清蛋白或肽 (Fmoc-EAALKLAR) 的质谱就会被采集。利用国际上已经建立了的蛋白质序列数据库比较，利用软件，可以分析出蛋白质的序列。同样，由于未知蛋白分子表面也含有 -NH<sub>2</sub>，它们也可以被固定在 GaN 纳米线上，通过 MALDI-ToF-MS 检测得到其序列，从而揭示未知蛋白。

#### 附图说明：

- [0040] 图 1、生物素 / 亲和素分子固定路线。
- [0041] 图 2、亲和素 / 生物素分子固定路线。
- [0042] 图 3、垂直生长 GaN 纳米线的平面和剖面 SEM 图片，a 为平面图；b 为剖面图。
- [0043] 图 4、PEG-Biotin 合成红外图
- [0044] 图 5、硫酸 / 双氧水处理的，和气相沉积后 SiO<sub>2</sub>、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、TiO<sub>2</sub> 覆盖的 GaN 纳米线的 IR 光谱，a 为硫酸 / 双氧水处理；b 为覆盖的 TiO<sub>2</sub>；c 为 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 覆盖的；d 为 SiO<sub>2</sub> 覆盖的。
- [0045] 图 6、图 5 中四样品的 OH 含量对比图。
- [0046] 图 7、在 SiO<sub>2</sub> 覆盖 GaN 纳米线表面嫁接 PEG-Biotin 和 Streptavidin 的红外光谱。
- [0047] 图 8、图 5 中四样品的 TEM 图片。
- [0048] 图 9、图 5 中四样品表面嫁接亲和素后的 TEM 图片。
- [0049] 图 10、图 9 样品嫁接亲和素前后的激光干涉曲线。A 为亲和素修饰前的 GaN 纳米线阵列的激光干涉曲线；B 为亲和素修饰后的 GaN 纳米线阵列的激光干涉曲线。
- [0050] 图 11、图 5 中四样品表面嫁接荧光标记亲和素的荧光扫描图。
- [0051] 图 12、纳米线阵列表面分离的荧光标记亲和素的荧光图像。
- [0052] 图 13、牛血清蛋白 BSA 的 MALDI-Tof-MS 测试。
- [0053] 图 14、Fmoc-EAALKLAR 的 MALDI-Tof-MS 测试。
- [0054] 图 15、脑利尿钠肽的的 MALDI-Tof-MS 测试对比。

#### 具体实施方式：

- [0055] 实施例 1. 在 GaN 纳米线表面产生 Ga-OH 官能团
- [0056] 图 3 显示 GaN 纳米线阵列 (USA, NIST) 的平面和剖面 SEM 图片。从图中可见：单根 GaN 纳米线的直径处于 50 ~ 500nm 之间、高度处于 9 ~ 10 μ m 之间，纳米线阵列的间距处于 200nm ~ 20 μ m 之间，所有 GaN 纳米线均显示了平整的表面，处于与支持片基直立的位置。

[0057] 将GaN纳米线阵列置于80℃的硫酸：双氧水(3:1)的溶液中(5mL)，处理4小时，利用超声将GaN纳米线从生长片基上剥离，将剥离的GaN纳米线分散在 $\text{CCl}_2\text{H}_2$ 溶液中，用移液器将溶液分散在干燥的KBr晶体片上，将样品置于80℃烤箱中干燥4小时，样品做红外光谱分析。红外光谱如图5a，在3400、1600 $\text{cm}^{-1}$ 区域出现了-OH的红外吸收。其中3168 $\text{cm}^{-1}$ 吸收峰对应OH，该OH可以用来嫁接有机分子膜。

[0058] 将GaN纳米线阵列等离子处理2分钟(Harrick等离子体清洗机(PDC-002)，30W功率，10sccm空气)，利用超声将GaN纳米线从生长片基上剥离，将剥离的GaN纳米线分散在 $\text{CCl}_2\text{H}_2$ 溶液中，用移液器将溶液分散在干燥的KBr晶体片上，将样品置于80℃烤箱中干燥4小时，样品做红外光谱分析。在3400、1600 $\text{cm}^{-1}$ 区域出现了-OH的红外吸收。其中3168 $\text{cm}^{-1}$ 吸收峰对应OH，该OH可以用来嫁接有机分子膜。

[0059] 将GaN纳米线阵列表面分别各沉积 $\text{TiO}_2$ ， $\text{Al}_2\text{O}_3$ ， $\text{SiO}_2$ 沉积ALD膜。高度真空中，先通入前体 $\text{Al}(\text{OR})_3$ 和高纯水蒸汽，在GaN纳米线表面形成一层 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 膜，其表面具有OH，然后分别通入 $\text{TiCl}_4$ ， $\text{SiCl}_4$ 和高纯水蒸汽，分别形成 $\text{TiO}_2$ ， $\text{SiO}_2$ 膜，其表面具有OH。这样，氧化层就生长在GaN纳米线的表面，氧化层的厚度与通入气体的循环次数有关。利用超声将GaN纳米线从生长片基上剥离，将剥离的GaN纳米线分散在 $\text{CCl}_2\text{H}_2$ 溶液中，用移液器将溶液分散在干燥的KBr晶体片上，将样品置于80℃烤箱中干燥4小时，样品做红外光谱分析。三种ALD沉积GaN纳米线的红外光谱分别对应图5b-5d，在3400、1600 $\text{cm}^{-1}$ 区域出现了-OH的红外吸收。其中3168 $\text{cm}^{-1}$ 吸收峰对应OH，该OH可以用来嫁接有机分子膜。

[0060] 将图5a-d的红外光谱曲线进行拟合，得OH相对含量(O-H面积/Ga-N面积)分别为6.70%，47.32%，69.86%，和90.32%。其结果列于图6，相比，ALD沉积层使-OH含量增加了6.06，9.43，12.48倍。

[0061] 将上述4种产生-OH的GaN纳米线从片基上剥离，分散在甲醇中，然后滴在TEM铜网上，做高分辨TEM图片，见图8，a为硫酸/双氧水处理的，b、c、d分别为 $\text{SiO}_2$ 、 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{TiO}_2$ 覆盖GaN纳米线。从图上可得，三种ALD涂层覆盖厚度分别为4~5nm，5~6nm，10~12nm。

#### [0062] 实施例2. 合成Biotin-NHS酯

[0063] 取0.5g生物素溶解于50mL干燥的DMF(二甲基甲酰胺)溶液，放入0.51g DCC(N,N-二环己基碳二亚胺)和0.26g NHS，50℃下搅拌16小时，将不溶解沉淀过滤除去，加入过量的干燥乙醚，使之产生白色沉淀，抽滤、得白色的Biotin-NHS产品。药品做红外光谱，见图4b，出现了3228，3108，3063，2939，2915，2875，2846，1818，1787，1745，1729，1696 $\text{cm}^{-1}$ 的吸收峰。

#### [0064] 实施例3. 合成PEG-Biotin

[0065] 取0.225g biotin-NHS加入50mL干燥的氯仿溶液中，加入1.0g PEG-NH<sub>2</sub>(M=3000)(Sigma-Adrich购得)和少量的三乙胺，搅拌6小时，过滤不溶物，加入过量的干燥乙醚，使之产生白色沉淀。药品做红外光谱，见图4d，出现了3340，2978，2945，2883，2857，2806，2739，1702，1698，1667 $\text{cm}^{-1}$ 的吸收峰。表明合成了PEG-Biotin。

[0066] 取0.225g biotin-NHS加入50mL干燥的氯仿溶液中，加入0.2g PEG-NH<sub>2</sub>(M=600)(Sigma-Adrich购得)和少量的三乙胺，搅拌1小时，过滤不溶物，加入过量的干燥

乙醚，使之产生白色沉淀。药品做红外光谱，出现了 3340, 2978, 2945, 2883, 2857, 2806, 2739, 1702, 1698, 1667cm<sup>-1</sup> 的吸收峰。表明合成了 PEG-Biotin。

[0067] 取 0.225g biotin-NHS 加入 50mL 干燥的氯仿溶液中，加入 0.33g PEG-NH<sub>2</sub>(M = 1000) (Sigma-Adrich 购得) 和少量的三乙胺，搅拌 2 小时，过滤不溶物，加入过量的干燥乙醚，使之产生白色沉淀。药品做红外光谱，出现了 3340, 2978, 2945, 2883, 2857, 2806, 2739, 1702, 1698, 1667cm<sup>-1</sup> 的吸收峰。表明合成了 PEG-Biotin。

[0068] 实施例 4. 生物素修饰的 GaN 纳米线阵列的制备

[0069] 将 SiO<sub>2</sub> 功能化的 GaN 纳米线阵列（样品对应图 5d）置于纯 SiCl<sub>4</sub> 溶液中放置 1 小时，样品洗涤干燥后置于 0.1Mol/L 的 PEG(M = 3000)-Biotin(生物素) 的 DMF 溶液，于黑暗处放置 0.5 小时，取出 GaN 纳米线阵列，清洗，干燥，从阵列片基上剥离，做红外光谱分析，红外光谱图见图 7h。出现了 PEG(2887, 2860cm<sup>-1</sup>) 和 Biotin(1665, 1652cm<sup>-1</sup>) 的特征吸收峰。表明 PEG-Biotin 已经被嫁接在 GaN 纳米线的表面。同样制备 PEGM = 1000，和 PEG M = 600 对应的生物素修饰的 GaN 纳米线阵列，进行红外光谱分析，均出现了 PEG-Biotin 的特征吸收峰。

[0070] 实施例 5. 用生物素修饰的 GaN 纳米线阵列分离亲和素

[0071] 将上述实施例 4 中所得的样品置于 Streptavidin(亲和素)(10nMol/mL) 的水溶液中，孵育半小时，取出样品，洗净，吹干，从片基上剥离纳米线，做红外分析（见图 7i）。红外中出现了亲和素的酰胺吸收峰。1652cm<sup>-1</sup> 对应来自亲和素的 C = O 峰，1543cm<sup>-1</sup> 对应自亲和素的 N-H 峰。表明亲和素已经被固定在纳米线的表面。亲和素与生物素之间的作用力来源于氢键、范德华力、静电力。同样用 PEG M = 1000，和 PEG M = 600 对应的生物素修饰的 GaN 纳米线阵列，进行相同的实验，均出现了亲和素的酰胺吸收峰。

[0072] 实施例 6. 用生物素修饰的 GaN 纳米线阵列分离亲和素

[0073] 将硫酸-双氧水处理的 GaN 纳米线阵列和覆盖 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 TiO<sub>2</sub> 的 GaN 纳米线阵列分别进行实施例 4 和 5 的实验，样品做红外分析，均出现了 PEG，生物素和亲和素的特征吸收峰，它们的红外光谱中分别出现了 PEG(2887, 2860cm<sup>-1</sup>)，Biotin(1665, 1652cm<sup>-1</sup>)，亲和素(1543, 1652cm<sup>-1</sup>) 的特征吸收峰。

[0074] 实施例 7. 合成 PEG-NHS

[0075] 取 3g PEG-NH<sub>2</sub>(M = 1500) 置于干燥的乙腈中，加入 0.52g SC(双琥珀酰亚胺) 和少许的三乙胺，室温下搅拌 0.5 小时，减压蒸干，乙腈重结晶所得的 PEG-NHS。样品做红外光谱，出现了 2939, 2915, 2875, 2846, 1818, 1775, 1735, 1729cm<sup>-1</sup> 的吸收峰。表明生成 PEG 的 NHS 酯。

[0076] 取 2g PEG-NH<sub>2</sub>(M = 2000) 置于干燥的乙腈中，加入 0.44g SC 和少许的三乙胺，室温下搅拌 2 小时，减压蒸干，乙腈重结晶所得的 PEG-NHS。样品做红外光谱，在 1775, 1735cm<sup>-1</sup> 处出现了 NHS 的特征吸收峰。表明生成 PEG 的 NHS 酯。

[0077] 实施例 8.PEG-NHS 修饰的 GaN 纳米线阵列的制备

[0078] 将实施例 1 中用硫酸-双氧水处理的产生-OH 的 GaN 纳米线阵列置于纯 SiCl<sub>4</sub> 溶液中放置 1 小时，取出样品，洗净，吹干，得 Si-Cl 功能化样品。将该样品放入 0.1Mol/L 的 PEG-NHS(M = 2000) 的氯仿溶液中，加入少许三乙胺，反应半小时，取出样品，洗

涤干燥的 PEG-NHS 修饰的 GaN 纳米线。利用超声将 GaN 纳米线从生长片基上剥离，将剥离的 GaN 纳米线分散在  $\text{CCl}_2\text{H}_2$  溶液中，用移液器将溶液分散在干燥的 KBr 晶体片上，将样品置于 80℃ 烤箱中干燥 4 小时，样品做红外光谱分析。红外光谱中出现 2939, 2915, 2875, 2846, 1818, 1775, 1735, 1729,  $534\text{cm}^{-1}$  的吸收峰。表明 PEG-NHS 被固定在 GaN 纳米线上。

[0079] 实施例 9. 蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列的制备

[0080] 取实施例 8 制备的 PEG-NHS 修饰的 GaN 纳米线阵列分别置于亲和素 (10nMol/mL)、牛血清蛋白 (20nMol/mL)、肽 (Fmoc-EAALKLAR) (50nMol/mL)、脑利尿钠肽单克隆抗体 (10nMol/mL)、老鼠单克隆抗体 (50nMol/mL) 的溶液中处理半小时，取出，清洁，干燥，剥离 GaN 纳米线做红分析。它们的红外光谱中均出现了酰胺 I ( $\sim 1560\text{cm}^{-1}$ ) 和 II ( $\sim 1650\text{cm}^{-1}$ ) 的红外吸收峰。表明这些生物分子已经被嫁接在纳米线的表面。

[0081] 实施例 10. 用蛋白质修饰的 GaN 纳米线阵列分离相对应的蛋白质

[0082] 室温下，将上述实施例 9 中脑利尿钠肽的单克隆抗体、老鼠单克隆抗体修饰的 GaN 纳米线阵列分别置于脑利尿钠肽 (1nMol/mL)、山羊鼠抗免疫蛋白 (5nMol/mL) 的溶液中，10 分钟取出，清洁，干燥，剥离 GaN 纳米线做红分析。它们的红外光谱中出现了加强的酰胺 I ( $\sim 1560\text{cm}^{-1}$ ) 和 II ( $\sim 1650\text{cm}^{-1}$ ) 的红外吸收峰。表明这两种抗原已经被嫁接在纳米线的表面。

[0083] 实施例 11.

[0084] 将上述实施例 5 和实施例 6 中固定有亲和素的生物素修饰的 GaN 纳米线阵列用醋酸双氧铀染色，取出，清洁，干燥，剥离 GaN 纳米线后，做 TEM 分析，样品出现了亲和素分子的形貌 (见图 9)。图 5a-d (硫酸 / 双氧水处理的， $\text{SiO}_2$ 、 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{TiO}_2$  覆盖 GaN 纳米线) 样品对于固定有亲和素的生物素修饰的 GaN 纳米线阵列的 TEM 图为图 9i-l。由于蛋白质分子的覆盖，N 元素含量明显增加。

[0085] 实施例 12.

[0086] 用荧光标记的亲和素 (1nMol/mL) 代替没有荧光标记的亲和素，重复上述实施例 5 和 6 中的实验。将得到固定荧光亲和素的 GaN 纳米线阵列清洁，干燥，剥离开 GaN 纳米线，做荧光扫描，得到荧光图片列于图 11，上述图 5a-d 中 4 个样品 (硫酸 / 双氧水处理的， $\text{SiO}_2$ 、 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{TiO}_2$  覆盖 GaN 纳米线) 的荧光图像分别对应图 11i-l。其平均荧光强度分别为 17.02, 133.52, 108.75, 167.02。

[0087] 实施例 13.

[0088] 将上述实施例 5 和 6 所得的样品分别作激光干涉光谱，得到图 10。利用前面所述公式计算亲和素分子嫁接前后的光学厚度分别为 4800 和 5500nm，即亲和素分子嫁接之后，光学厚度增加值  $((nd_2 - nd_1)/nd_1 * 100\%)$  为 14.5%。

[0089] 实施例 14

[0090] 将上述实施例 9 得到的亲和素、肽、和牛血清修饰的的 GaN 纳米线阵列样品做激光干涉光谱。利用公式，计算亲和素、肽、和牛血清嫁接后光学厚度分别增加 22.5%、11.3%、和 14.2%。

[0091] 实施例 15

[0092] 将上述实施例 9 得到的牛血清蛋白和肽 (Fmoc-EAALKLAR) 修饰的的 GaN 纳米

线阵列做 MALDI-ToF-MS 测试。谱图如图 13-14。谱图中出现了牛血清蛋白和肽分子质谱峰，表明 GaN 纳米线表面固定的牛血清蛋白、肽分子可以通过 MALDI-ToF-MS 检测。其中，图 14b 经国际蛋白质库解析，该肽的部分氨基酸序列经解析为 EAALKLAR。同理，未知蛋白也可以固定在 GaN 纳米线上，其氨基酸序列也可以 MALDI-ToF-MS 解析而得。

[0093] 实施例 16.

[0094] 将上述实施例 9 得到的脑利尿钠肽单克隆抗体修饰的样品 ( $1 \times 1\text{cm}^2$ ) 用去离子水浸润，取  $10 \mu\text{L}$  脑利尿钠肽抗原溶液 ( $1\text{nMol/mL}$ ) 滴在其上，封闭孵育  $10\text{min}$ ，取出 GaN 纳米线阵列样品，清洗，干燥，做 MALDI-ToF-MS 测试。谱图见图 15a，谱图中出现了强的脑利尿钠肽质谱峰。取  $10 \mu\text{L}$  脑利尿钠肽抗原溶液 ( $1\text{nMol/mL}$ ) 滴在不锈钢的衬底上，氮气吹干，做 MALDI-ToF-MS 测试。谱图列于图 15b，对比两条曲线，图 15b 显示了高度的噪声干扰，显然在 GaN 纳米线阵列所得到的谱图具有高度的信噪比。

[0095] 实施例 17.

[0096] 将上述实施例 12 得到的纳米线样品（图 11i 和 11l）分别置于  $5\text{mL}$   $50^\circ\text{C}$  的去离子水中，孵育 1 小时后，分别取  $10 \mu\text{L}$  两种溶液滴在 2 个清洁的硅片上，干燥气体吹干，做荧光扫描，图片见图 12。显然，两个表面均呈现了不同荧光强度的荧光图像，表明亲和素从 GaN 纳米线阵列分离出来。其中，图 11l 对应的样品含有更多的亲和素分子，这和图 12l 样品中还有较多荧光标记的亲和素一致。将这两个溶液冷冻干燥，即可得到高纯度的亲和素。反之，先固定亲和素分子，后识别生物素分子，就可得到高纯度的生物素。同理，高纯度的抗体（如脑利尿钠肽单克隆抗体、老鼠单克隆抗体）和抗原（如脑利尿钠肽、山羊鼠抗免疫蛋白）也可以用同种方法提纯。

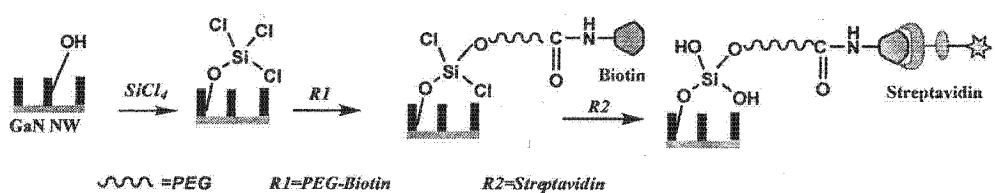


图 1

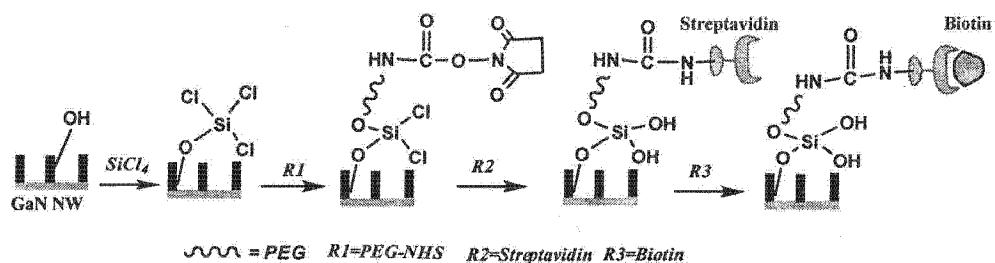


图 2

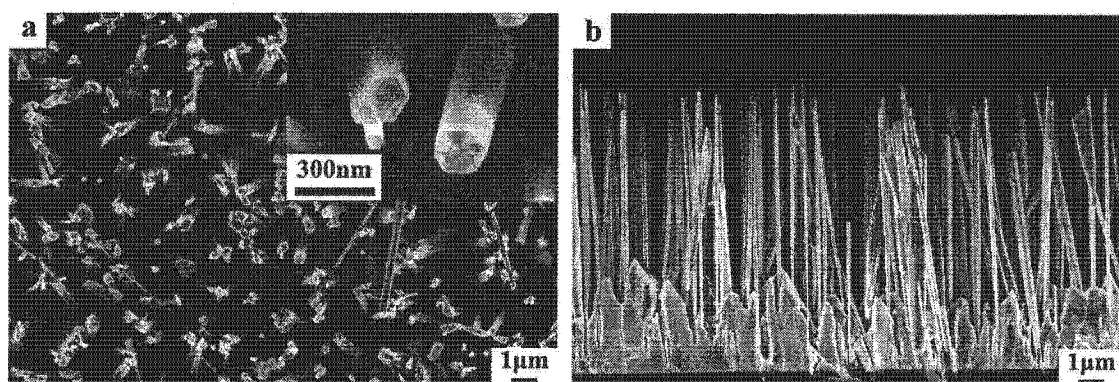


图 3

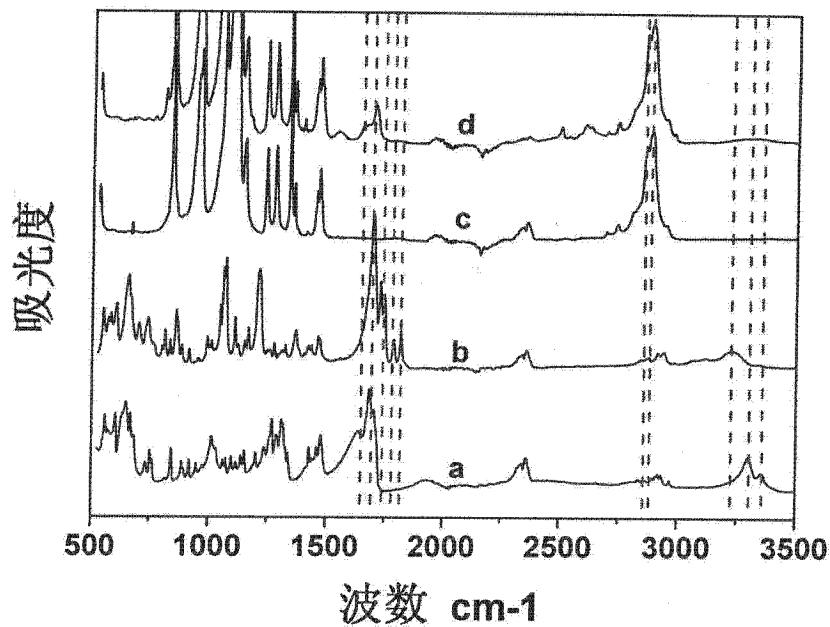


图 4

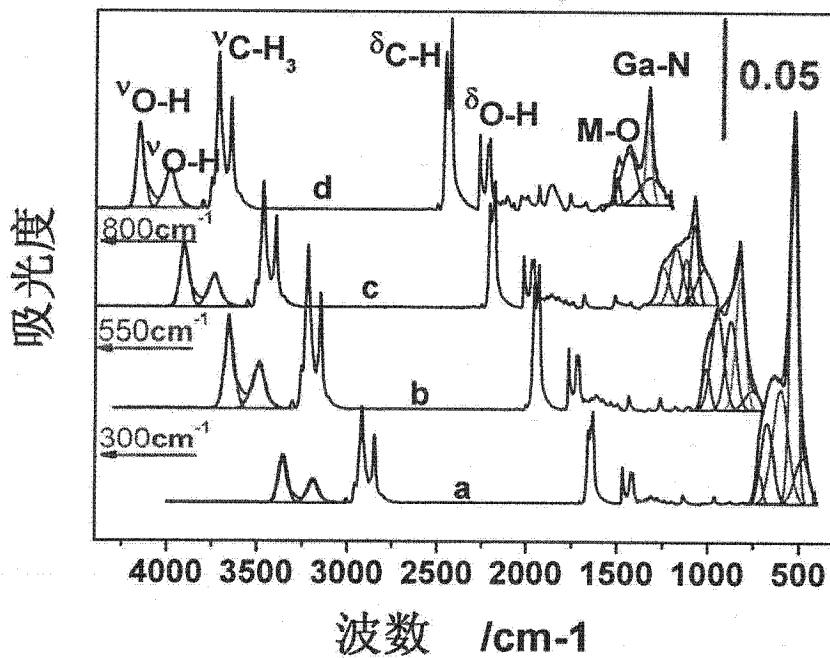


图 5

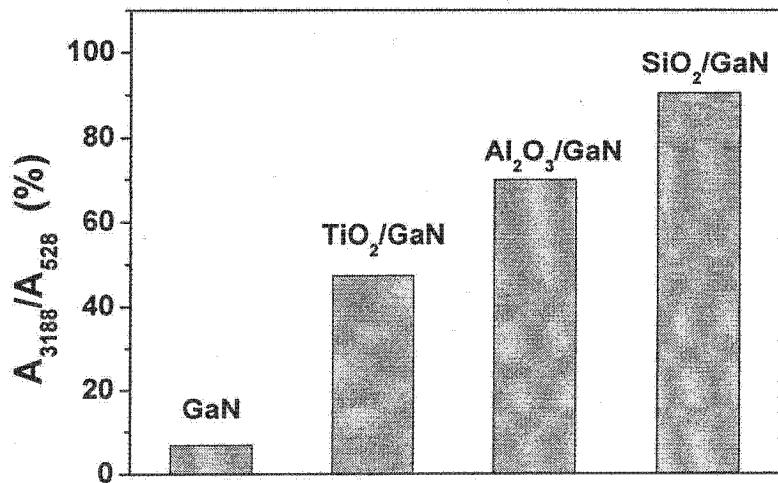


图 6

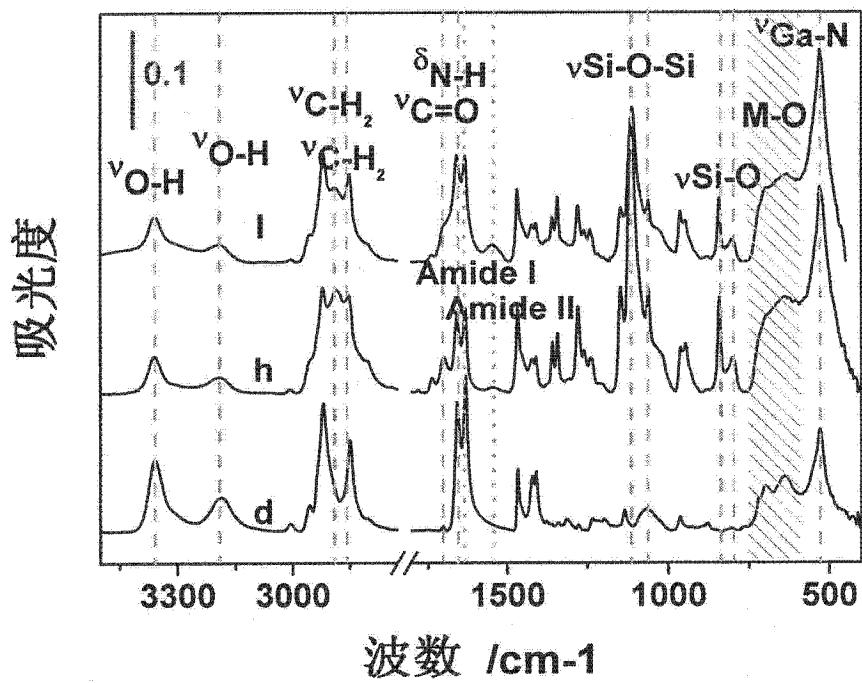


图 7

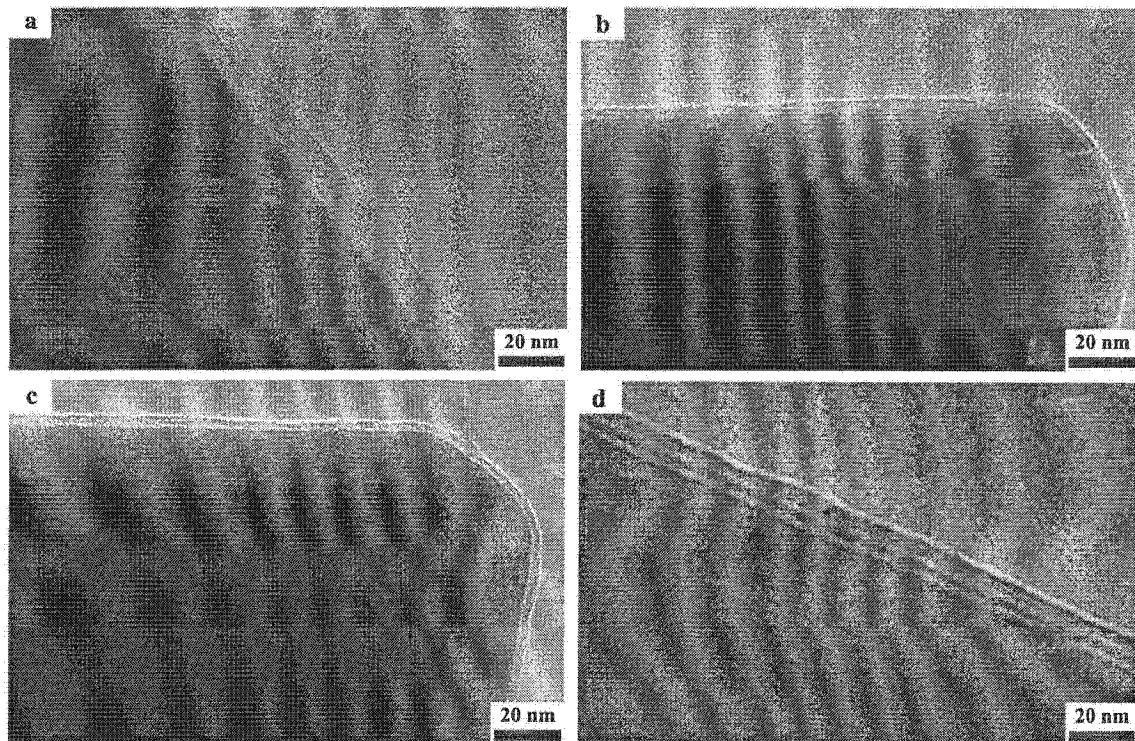


图 8

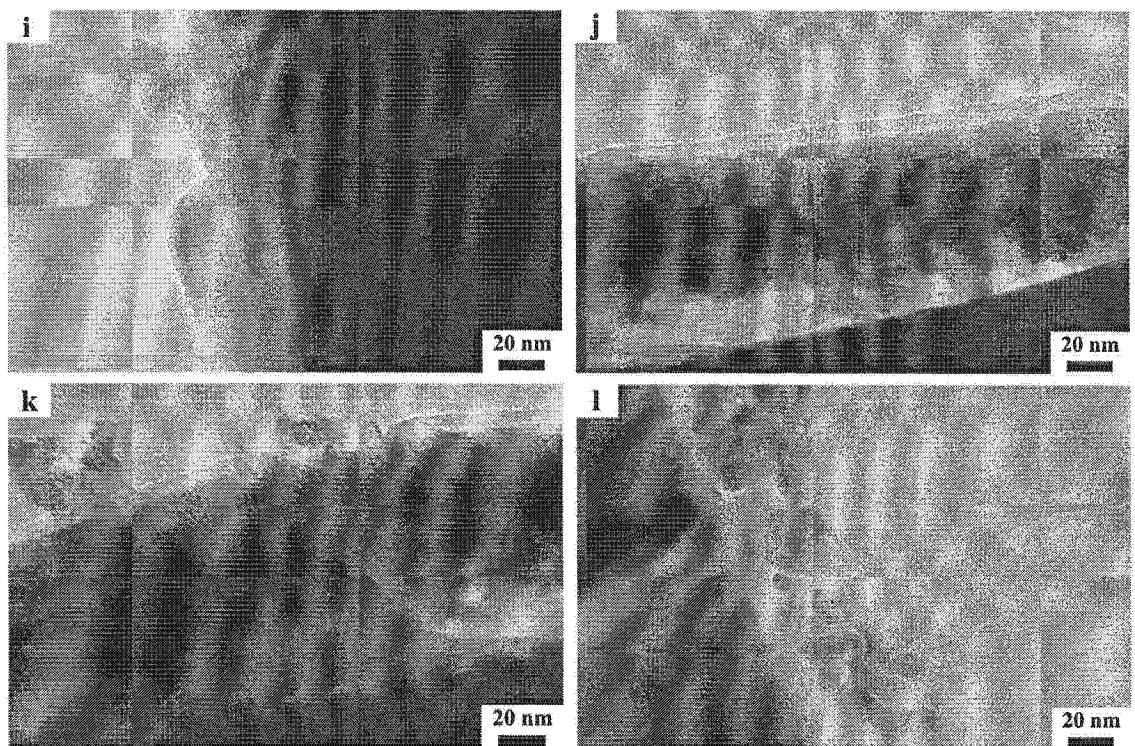


图 9

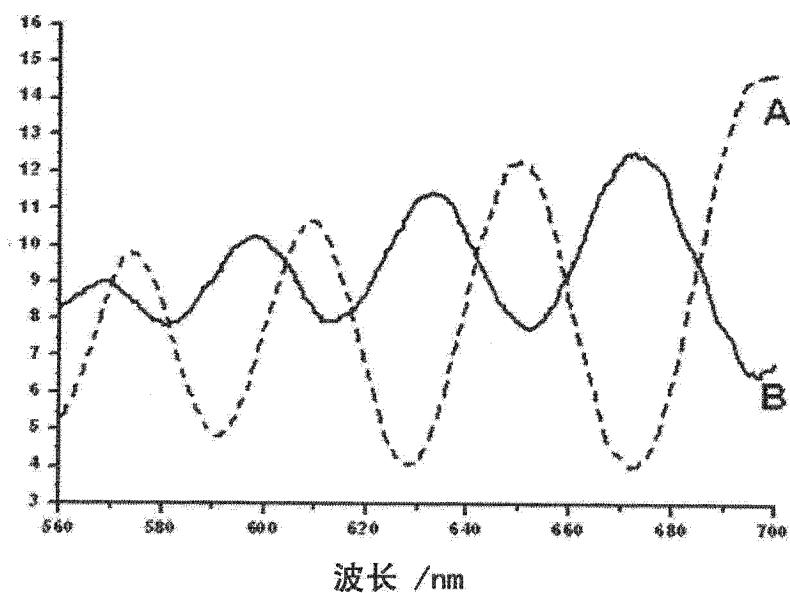


图 10

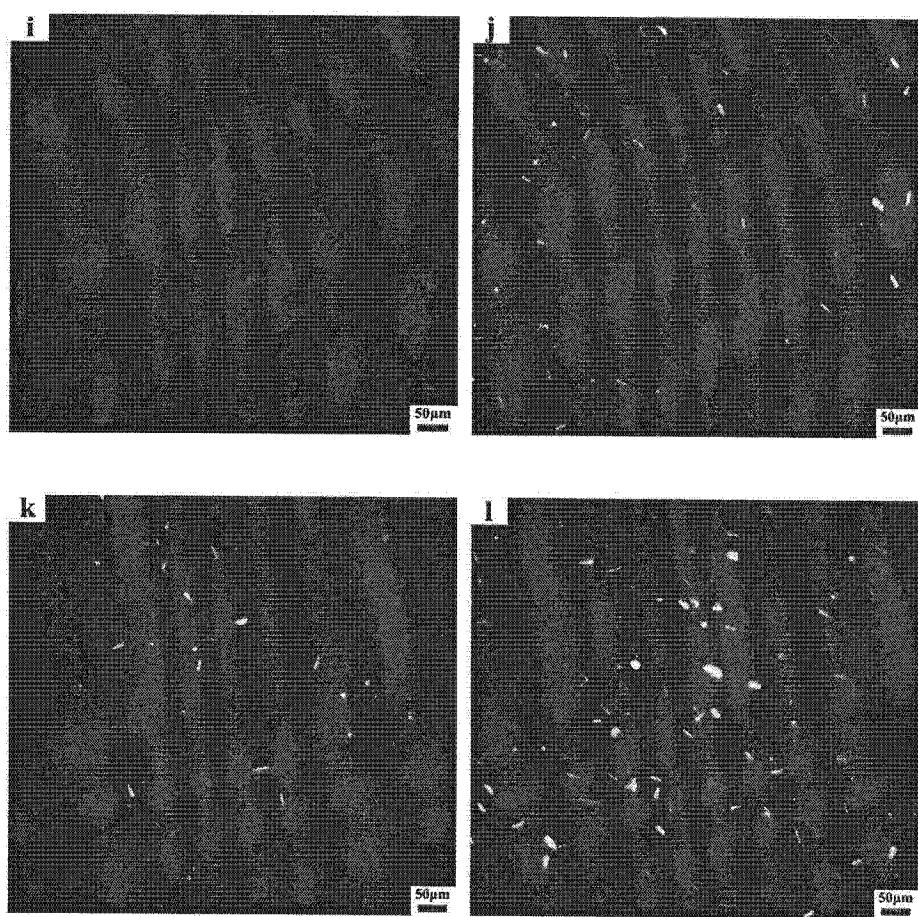


图 11

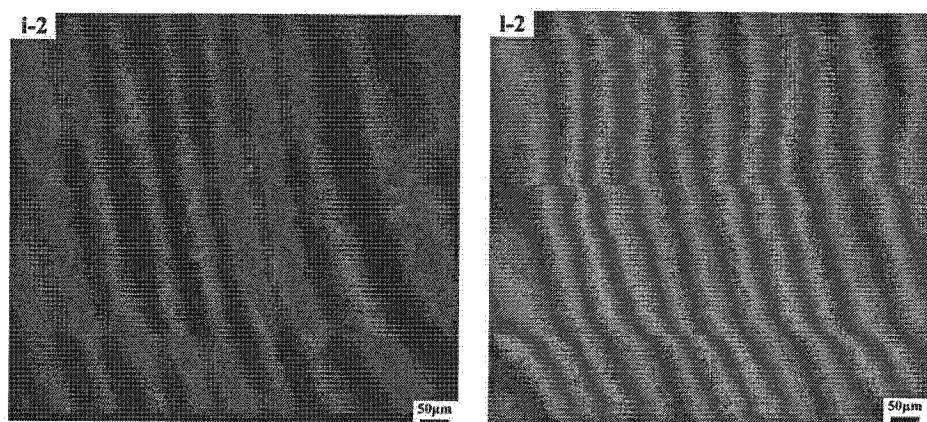


图 12

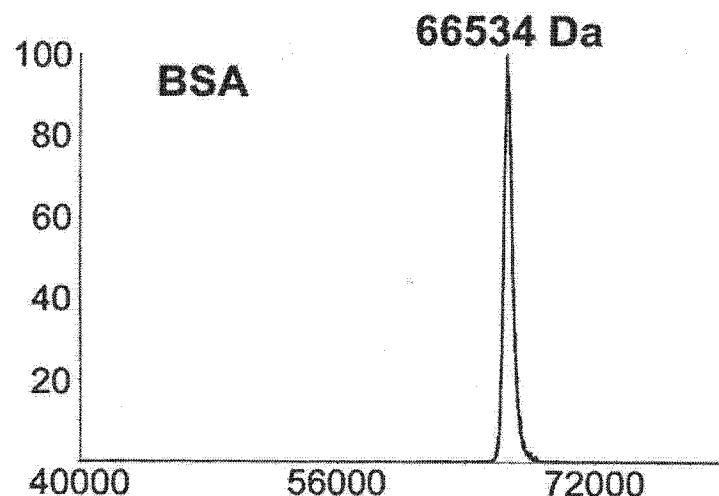


图 13

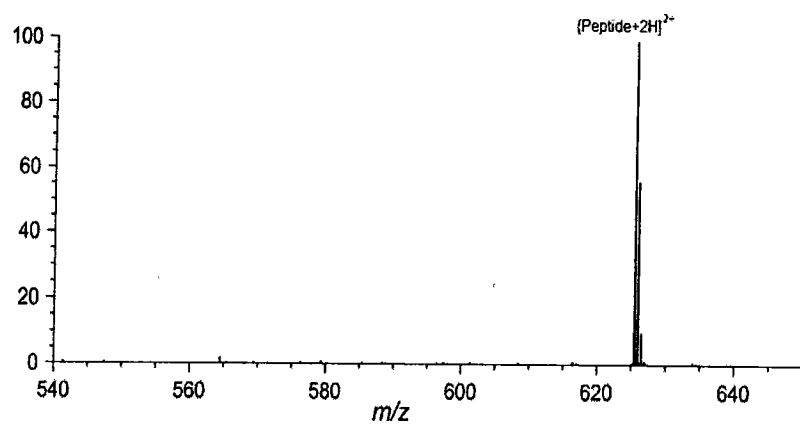


图 14a

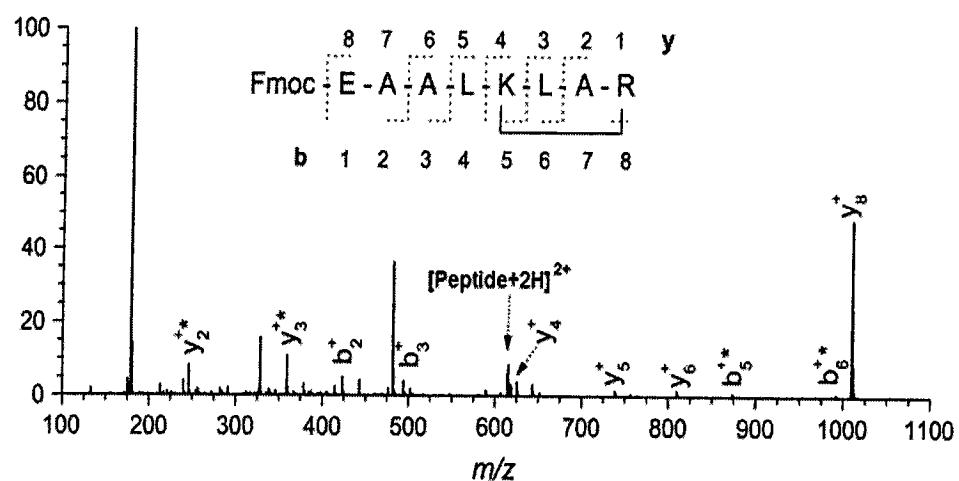


图 14b

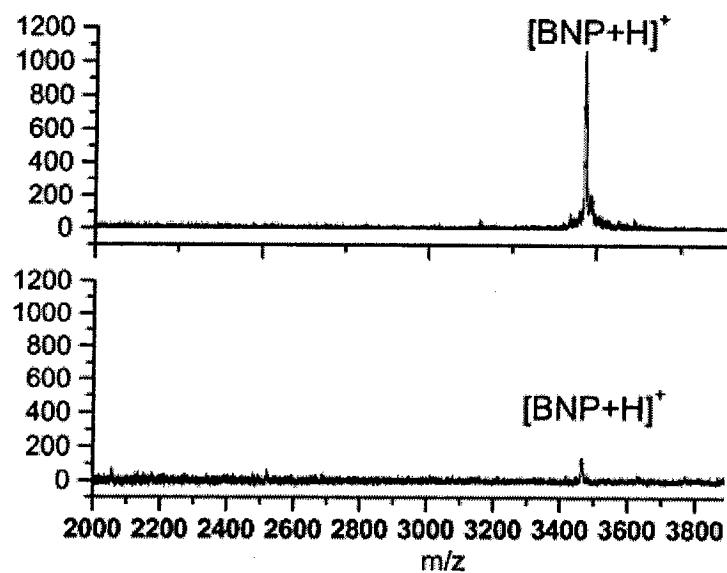


图 15