

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 1 月 26 日 (26.01.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/011940 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 21/35 (2014.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/084344
- (22) 国际申请日: 2015 年 7 月 17 日 (17.07.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (72) 发明人: 应义斌 (YING, Yibin); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。 徐文道 (XU, Wendao); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。 谢丽娟 (XIE, Lijuan); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (74) 代理人: 杭州求是专利事务所有限公司 (HANGZHOU QIUSHI PATENT OFFICE CO.,LTD.); 中国浙江省杭州市西湖区玉古路 147 号黄鸿年科技综合大楼 215 室/林超, Zhejiang 310013 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: METHOD FOR AMPLIFYING BIOLOGICAL SAMPLE SIGNALS USING COMBINATION OF TERAHERTZ METAMATERIAL AND NANOGOLD PARTICLES

(54) 发明名称: 太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法

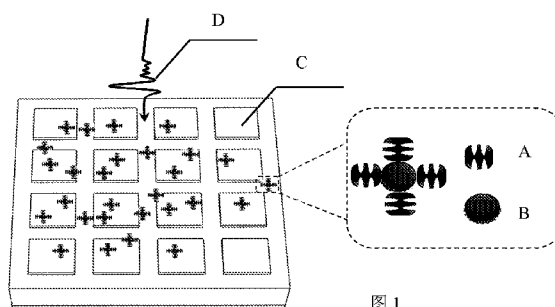


图 1

(57) Abstract: Disclosed is a method for amplifying biological sample signals using the combination of terahertz metamaterial and nanogold particles. A plurality of biological sample solutions and gold-labelled avidin solutions which have different concentrations are formulated; the surface of the metamaterial is dried at room temperature after the biological sample solutions are added dropwise; and the surface of the metamaterial is dried at room temperature after the gold-labelled avidin solution is added dropwise; the terahertz time domain signals of all the sample spots to be detected on the surface of the metamaterial and reference sample spots are collected; the transmissions or reflectivities of all the sample spots to be detected and reference sample spots are calculated through the terahertz time domain signals; and the frequency shift of the transmission peak or the reflection peak is obtained through calculation according to the frequency value corresponding to the lowest point of the transmissions or reflectivities. The terahertz metamaterial and nanogold particle modification are combined; the sample signals are amplified using the localization enhancement phenomenon of the electric field of the metamaterial; and the distribution of an electric field is changed using nanogold, and the sample signals are further amplified through nanogold modification. The detection sensitivity is high and the operation is simple and quick, and can satisfy the ever-increasing need for fast detection.

(57) 摘要:

[见续页]

WO 2017/011940 A1

公开了一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法。配置不同浓度的多个生物样品溶液和金标亲和素溶液，在超材料表面滴加生物样品溶液后常温下晾干，在超材料表面滴加金标亲和素溶液后常温下晾干，采集超材料表面所有待测样品点与参考样品点的太赫兹时域信号，由太赫兹时域信号计算所有待测样品点与参考样品点的透射率或反射率，并根据透射率或反射率最低点对应的频率值计算得到透射峰或反射峰的频移。联用太赫兹超材料与纳米金颗粒修饰，利用超材料电场局域增强效应放大样品信号；并利用纳米金改变电场分布效应，通过纳米金修饰进一步放大样品信号，检测灵敏度高，操作简便快速，能满足日益增长快速检测需求。

说明书

太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法

技术领域

本发明涉及一种生物样品的太赫兹信号放大方法，尤其涉及一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法。

背景技术

随着检测技术的发展，波谱检测技术由于其检测快速简便而逐渐引起了国内外学者的广泛关注。太赫兹波谱技术作为一种新兴的波谱技术已经逐渐引起人们的注意。由于许多大分子的振动、转动能级都落在太赫兹波段，太赫兹波被认为是一种对生物样品检测非常具有潜力的波段。对于太赫兹波谱技术具有较大应用前景的领域，如安全、生物、医药、农业和材料表征等应用方面，存在微量甚至是超微量的无损检测需求。然而，由于太赫兹波源能量低和直接检测灵敏度有限的劣势，导致该技术很难用于微量样品的快速检测。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是克服上述背景技术的不足，提供一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法，该方法应具有灵敏度性高、检测快速方便的特点。

本发明采用的技术方案包括如下步骤：

- 1) 配置不同浓度的多个生物样品溶液和不同浓度的多个金标亲和素溶液；
- 2) 超材料表面滴加生物样品溶液；

将生物样品溶液滴加在一清洗过的超材料表面，每个浓度滴加至少三次，每次滴加量相同，并任意设置三个参考样品点，如图 2 所示，参考样品点均与待测样品点位置不同，滴加后常温下晾干；

- 3) 超材料表面滴加金标亲和素溶液；

将金标亲和素溶液滴加在另一清洗过的超材料表面，每个浓度滴加至少三次，每次滴加量相同，并任意设置三个参考样品点，如图 2 所示，参考样品点均与待测样品点位置不同，滴加后常温下晾干；

- 4) 采集超材料表面所有待测样品点与参考样品点的太赫兹时域信号；在充氮气氛下，将生物样品放在待测样品点上，在太赫兹时域波谱系统的波谱频宽为 0.1-3.5 THz 区间分别采集同一超材料上待测样品点与参考样品点的太赫兹

时域信号；

5) 由太赫兹时域信号得到透射峰或反射峰的频移，计算所有待测样品点与参考样品点的透射率或反射率，并根据透射率或反射率最低点对应的频率值计算得到透射峰或反射峰的频移：利用快速傅里叶变换将生物样品的太赫兹波谱时域信号转换到频域信号，由频域信号计算得到待测样品点的透射率或者反射率，将待测样品点与参考样品点的透射率或者反射率最低点对应的频率值相减得到的绝对值作为透射峰或反射峰的频移，实现对亲和素信号的放大。

所述步骤 2) 和 3) 中超材料采用以下方式清洗：取一块完整的太赫兹超材料，先后用去离子水、磷酸盐缓冲液清洗后，再用去离子水清洗，并用氮气吹干。

所述步骤 1) 中金标亲和素溶液采用以下方式配置：

1.1) 原料混合保存；

取普通亲和素和纳米金颗粒进行混合，普通亲和素和纳米金颗粒混合的物质的量之比为 10:1~2500:1，如图 1 所示，常温条件下在摇床上进行振荡，并在 0~4℃ 温度下中进行保存；其形成的纳米金溶液为酒红色；

1.2) 金标亲和素提取；

将金标亲和素取出，放入离心管，经离心机离心后，去除离心管上清液中多余的普通亲和素，并用去离子水反复清洗沉淀，最后再加入去离子水并充分振荡得到金标亲和素溶液。

所述步骤 1.2) 中离心机的离心转速为 5000~10000rpm，离心时间为 10~20 分钟。

所述步骤 4) 中采集太赫兹时域信号时，待测样品点的检测面积大于 1mm^2 。

所述的生物样品采用普通亲和素、DNA 或者大肠杆菌。

所述步骤 1) 配置得到的金标亲和素溶液和生物样品溶液的浓度范围均在 $2 \times 10^{-10} \sim 10 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 之间。

所述步骤 3) 中生物样品溶液或者步骤 4) 中金标亲和素溶液的每次滴加量为 5~100ul。

所述的生物样品采用 DNA 或者大肠杆菌，不同浓度的多个金标亲和素溶液为金标亲和素与生物素标记后生物样品复合物溶液。

复合方式和过程是：金标亲和素与生物素标记后生物样品中的生物素特异性结合，形成金标亲和素与生物素标记后生物样品复合物溶液，金标亲和素与生物素或者生物样品之间的浓度比例关系为大于等于 1:1，优选的比例为 1:1-4:1。

所述步骤 1.1) 中普通亲和素的 pH 为 5~9, 纳米金颗粒的 pH 为 8~12。

所述步骤 4) 中本发明的太赫兹时域光谱系统采集太赫兹时域信号时测量环境的湿度为<0.2%。

优选的本发明普通亲和素具体实施中可选用 Sigma 公司生产的货号为 A9275 的亲和素, 但不限于此。

所述的纳米金颗粒粒径为 8-90 nm。

本发明金标亲和素可以用于与生物素的结合反应, 因此该信号放大方法能在 DNA 杂交、抗体特异性结合方面有广泛应用。

本发明的纳米金颗粒能够在不激发其表面等离子体的情况下, 直接对样品信号进行放大, 并且效果显著。

本发明的纳米金可以替换为其他金属纳米粒子, 包括纳米银颗粒, 纳米金棒, 纳米银包金颗粒, 纳米金包银颗粒等。

具体是实施中优选的本发明的太赫兹时域波谱系统推荐采用 z-omega 公司生产的型号为 z3 的太赫兹时域波谱系统。

本发明采用太赫兹时域波谱技术 (Terahertz time-domain spectroscopy, THz-TDS), 其是国际上近年来发展起来的一项新的研究与检测技术。至今, 太赫兹时域波谱技术已经在国防、医药、化学、食品、材料等方面有着许多的应用。太赫兹波是一种波长介于微波与红外辐射之间的电磁波, 其频率为 0.1-10 THz。尽管太赫兹辐射的能量很低, 但是大量的分子, 尤其是许多有机大分子 (DNA、蛋白质等) 在这一频段内, 表现出强烈的吸收和色散。

本发明的超材料是一种人工制作的周期性结构材料, 具有许多自然界材料无法表现出的性质。近年来, 太赫兹波段下超材料的研究逐渐引起广大学者的关注, 目前已经在通讯、吸收器等方面有一定应用。近年来, 超材料已经逐渐在太赫兹波段检测应用中发挥优势作用。

由此本发明利用太赫兹超材料技术, 其具有的有益效果是:

本发明联用太赫兹超材料技术与纳米金颗粒修饰技术, 利用超材料的电场局域增强效应放大样品信号。

本发明同时利用纳米金能改变表面电场分布的效应, 通过纳米金修饰的方法进一步放大样品信号, 因此该方法检测灵敏度高。

与传统的压片技术相比, 本发明方法能大大提高检测灵敏度; 并且本方法操作简便快速, 能满足日益增长快速检测需求。

附图说明

图 1 为本发明超材料检测金标亲和素原理图。

图 2 为本发明实施例 1 的超材料表面待测样品点和参考样品点分布图。

图 3 为本发明实施例 1 普通亲和素与金标亲和素样品引起的太赫兹超材料谐振峰频移图。

图 4 为本发明实施例 3 中纳米金样品引起的太赫兹超材料谐振峰频移图。

其中，A 为普通亲和素，B 为纳米金，C 为超材料，D 为太赫兹波，E 为待测样品点，F 为参考样品点。

具体实施方式

下面结合实施实例对本发明作进一步说明，但本发明并不限于以下实施实例。

本发明的实施实例如下：

实施实例 1

(1) 超材料清洗；

用镊子夹取一块完整的超材料，先后用去离子水，磷酸盐缓冲液（Sigma 公司），去离子水清洗 3 次，并用氮气吹干；

(2) 金标亲和素配置；

换上干净手套，用移液枪移取浓度为 1 mg/mL 的普通亲和素（pH 约为 7）300 μ L 于一支干净的离心管中，再用移液枪移取浓度为 20 nmol/L 的纳米金溶液（pH 约为 10）0.5 mL，将两者进行混合（普通亲和素与纳米金的物质的量之比约 2500:1），常温条件下在摇床上振荡 15 分钟，并在冰箱中进行保存，保存温度为 4 $^{\circ}$ C，保存时间大于等于 0.5 小时；

(3) 金标亲和素提取；

将装有金标亲和素的离心管从冰箱中取出，另取一支同型号的离心管注入等量去离子水，配平后经离心机离心，转速为 10000 rpm，离心时间为 15 分钟。离心后多余的普通亲和素悬浮在上层，金标亲和素则在离心管下层，去除离心管中上清液，并用去离子水反复清洗沉淀，清洗并取走多余的普通亲和素；

(4) 获得金标亲和素溶液；

清洗金标亲和素后，往离心管中加入 500 μ L 去离子水，通过振荡将金标亲和素溶于去离子水中；

(5) 超材料表面滴加普通亲和素溶液；

分别配置五个浓度梯度的普通亲和素溶液（本实施实例中为 2×10^{-10} mol/L，

$4 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$, $6 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$, $8 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ 和 $10 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$), 取 $10 \mu\text{L}$ 溶液, 滴加在清洗过的超材料表面, 每个浓度滴加三次, 并设置三个参考样品点 (没有任何样品), 常温下晾干 (相应的普通亲和素的物质的量为 2 fmol , 4 fmol , 6 fmol , 8 fmol , 10 fmol), 待测样品点的检测面积约为 4 mm^2 ;

(6) 超材料表面滴加金标亲和素溶液;

分别配置五个浓度梯度的金标亲和素溶液 (本实施实例中为 $2 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$, $4 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$, $6 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$, $8 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ 和 $10 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$), 取 $10 \mu\text{L}$ 溶液, 滴加在清洗过的超材料表面, 每个浓度滴加三次, 并设置三个参考样品点 (没有任何样品), 常温下晾干 (相应的金标亲和素的物质的量为 2 fmol , 4 fmol , 6 fmol , 8 fmol , 10 fmol), 待测样品点的检测面积约为 4 mm^2 ;

(7) 采集超材料表面所有待测样品点与参考样品点的太赫兹时域波谱;

打开激光, 电脑, 控制器以及氮气阀门, 此时太赫兹时域波谱系统内开始充进氮气, 湿度下降, 激光预热半小时后方可进行测量; 打开太赫兹时域波谱系统测量用的盖子, 并将超材料放进检测光路中, 用夹具固定; 在充氮气的情况下, 在太赫兹时域波谱系统的波谱频宽为 $0.1\text{-}3.5 \text{ THz}$ 区间分别采集同一超材料上待测样品点与参考样品点的太赫兹时域波谱。其中测量环境湿度要求 $<0.2\%$, 温度为常温; 用以上方法逐个测量样本的太赫兹时域波谱并保存, 获得所有待测样品点与参考样品点的太赫兹时域波谱数据组。

(8) 计算所有待测样品点的透射率或反射率, 并寻找透射率或反射率最低点对应的频率值; 利用快速傅里叶变换将样品的太赫兹波谱时域信号转换到频域信号, 利用频域信号得到待测样品点的透射率或者反射率。

其中, 透射率或反射率可以由以下公式得到:

$$T = (E_{(\text{sample-T})} / E_{(\text{reference-T})})^2$$

$$R = (E_{(\text{sample-R})} / E_{(\text{reference-R})})^2$$

上述公式中, T 表示透射率, $E_{(\text{sample-T})}$ 表示透射模式下待测样品点的电场强度, $E_{(\text{reference-T})}$ 表示透射模式下参考样品点的电场强度, R 表示反射率, $E_{(\text{sample-R})}$ 表示反射模式下待测样品点的电场强度, $E_{(\text{reference-R})}$ 表示反射模式下参考样品点的电场强度。

寻找透射率或者反射率最低点对应的频率值, 并将待测样品点的该频率值与参考样品点的该频率值相减, 得到透射峰或反射峰的频移, 如图 3 所示。

实施例 2

(1) 超材料清洗;

用镊子夹取一块完整的超材料, 先后用去离子水, 磷酸盐缓冲液 (Sigma

公司)，去离子水清洗 3 次，并用氮气吹干；

(2) 金标亲和素配置；

换上干净手套，用移液枪移取浓度为 0.8 mg/mL 的普通亲和素 (pH 约为 5) 300 μ L 于一支干净的离心管中，再用移液枪移取浓度为 20 nmol/L 的纳米金溶液 (pH 约为 9) 0.5 mL，将两者进行混合 (普通亲和素与纳米金的物质的量之比约 2000:1)，常温条件下在摇床上振荡 15 分钟，并在冰箱中进行保存，保存温度为 0 $^{\circ}$ C，保存时间大于等于 0.5 小时；

(3) 金标亲和素提取；

将金标亲和素从冰箱中取出，另取一支同型号的离心管注入等量去离子水，配平后经离心机离心，转速为 15000 rpm，离心时间为 10 分钟。离心后多余的普通亲和素悬浮在上层，金标亲和素则在离心管下层，去除离心管中上清液，并用去离子水反复清洗沉淀，清洗并取走多余的普通亲和素；

(4) 获得金标亲和素溶液；

清洗金标亲和素后，往离心管中加入 500 μ L 去离子水，通过振荡将金标亲和素溶于去离子水中；

(5) 金标亲和素与生物素 (biotin) 标记的目标 DNA 结合；

取一支装有 DNA 的离心管，加入 PBS 缓冲液配置成 6 μ mol/L 的 DNA 溶液。本实施实例中生物素标记的目标 DNA 序列为：

5'-TATCCTGAGACCGCGTTTTTTTTTTT-C6-Biotin-3'。可以通过生工公司合成。移取 500 μ L DNA 溶液，加入到金标亲和素中，充分反应 3 小时，另取一支同型号的离心管注入等量去离子水，配平后经离心机离心，转速为 5000 rpm，离心时间为 20 分钟。离心后多余的生物素标记的目标 DNA 悬浮在上层，生物素标记的目标 DNA-金标亲和素复合物则在离心管下层，去除离心管中上清液，并用去离子水反复清洗沉淀，清洗并取走多余的生物素标记的目标 DNA，加入 0.5 mL 去离子水，振荡溶解得到生物素标记的目标 DNA-金标亲和素复合物；

本实施实例中生物素标记的目标 DNA 序列为：

5'-TATCCTGAGACCGCGTTTTTTTTTTT-C6-Biotin-3'，实际操作中生物素标记的目标 DNA 序列不限于此。

(6) 超材料表面滴加目标 DNA 溶液；

本实施实例目标 DNA 为：5'-TATCCTGAGACCGCGTTTTTTTTTTT-C6-3'。

分别配置一定浓度梯度的目标 DNA 溶液 (本实施实例中为 2×10^{-10} mol/L, 4×10^{-10} mol/L, 6×10^{-10} mol/L, 8×10^{-10} mol/L 和 10×10^{-10} mol/L)，取 5 μ L 溶液，滴加在清洗过的超材料表面，每个浓度滴加三次，并设置三个参考样品点 (没有

任何样品)，常温下晾干，待测样品点的检测面积约为 1 mm^2 ；

(7) 超材料表面滴加金标亲和素与生物素标记的目标 DNA 复合物；

分别配置五个浓度梯度的金标亲和素与生物素标记的目标 DNA 复合物（本实施例实例中为 $2 \times 10^{-10}\text{ mol/L}$ ， $4 \times 10^{-10}\text{ mol/L}$ ， $6 \times 10^{-10}\text{ mol/L}$ ， $8 \times 10^{-10}\text{ mol/L}$ 和 $10 \times 10^{-10}\text{ mol/L}$ ），取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 溶液，滴加在清洗过的超材料表面，每个浓度滴加三次，并设置三个参考样品点（没有任何样品），常温下晾干，待测样品点的检测面积约为 1 mm^2 ；

(8) 采集超材料表面所有待测样品点与参考样品点的太赫兹时域波谱；

打开激光，电脑，控制器以及氮气阀门，此时太赫兹时域波谱系统内开始充进氮气，湿度下降，激光预热半小时后方可进行测量；打开太赫兹时域波谱系统测量用的盖子，并将超材料放进检测光路中，用夹具固定；在充氮气的情况下，在太赫兹时域波谱系统的波谱频宽为 $0.1\text{--}3.5\text{ THz}$ 区间分别采集同一超材料上待测样品点与参考样品点的太赫兹时域波谱。其中测量环境湿度要求 $<0.2\%$ ，温度为常温；用以上方法逐个测量样本的太赫兹时域波谱并保存，获得所有待测样品点与参考样品点的太赫兹时域波谱数据组。

(9) 计算所有待测样品点的透射率或反射率，并寻找透射率或反射率最低点对应的频率值；

利用快速傅里叶变换将样品的太赫兹波谱时域信号转换到频域信号，利用频域信号得到待测样品点的透射率或者反射率。寻找透射率或者反射率最低点对应的频率值，并将待测样品点的该频率值与参考样品点的该频率值相减，得到透射峰或反射峰的频移。

实施例 3

(1) 超材料清洗；

用镊子夹取一块完整的超材料，先后用去离子水，磷酸盐缓冲液（Sigma 公司），去离子水清洗 3 次，并用氮气吹干；

(2) 大肠杆菌抗体偶联纳米金；

换上干净手套，用移液枪移取浓度为 1 mg/mL 的大肠杆菌抗体（pH 约为 9） $2\text{ }\mu\text{L}$ 于一支干净的离心管中，再用移液枪移取浓度为 20 nmol/L 的纳米金溶液（pH 约为 8） 0.5 mL ，将两者进行混合（大肠杆菌抗体与纳米金的物质的量之比约 10:1），常温条件下在摇床上振荡 15 分钟；

(3) 大肠杆菌抗体偶联纳米金的提取；

将大肠杆菌抗体偶联纳米金从冰箱中取出，另取一支同型号的离心管注入等量去离子水，配平后经离心机离心，转速为 5000 rpm ，离心时间为 20 分钟。

去除离心管中上清液，并用去离子水反复清洗沉淀；

(4) 获得大肠杆菌抗体偶联纳米金溶液；

清洗大肠杆菌抗体偶联纳米金后，往离心管中加入 500 μL 去离子水，通过振荡将大肠杆菌抗体偶联纳米金溶于去离子水中；

(5) 大肠杆菌抗体偶联纳米金捕获大肠杆菌；

取浓度为 10^8 CFU/mL 的大肠杆菌溶液 0.1 mL，加入到上述的大肠杆菌抗体偶联纳米金溶液，静置反应 2 小时，得到大肠杆菌抗体偶联纳米金与大肠杆菌的复合物；

(6) 超材料表面滴加目标大肠杆菌溶液；

分别配置五个浓度梯度的目标大肠杆菌溶液（本实施实例中为 2×10^6 4*CFU/mL， 6×10^6 CFU/mL， 8×10^6 CFU/mL 和 10^7 CFU/mL），取 100 μL 溶液，滴加在清洗过的超材料表面，每个浓度滴加三次，并设置三个参考样品点（没有任何样品），常温下晾干，待测样品点的检测面积大于 10 mm^2 ；

(7) 超材料表面滴加步骤 (5) 中得到的大肠杆菌抗体偶联纳米金与大肠杆菌的复合物；

分别配置五个浓度梯度的大肠杆菌抗体偶联纳米金与大肠杆菌的复合物（本实施实例中为 2×10^6 4*CFU/mL， 6×10^6 CFU/mL， 8×10^6 CFU/mL 和 10^7 CFU/mL），取 100 μL 溶液，滴加在清洗过的超材料表面，每个浓度滴加三次，并设置三个参考样品点（没有任何样品），常温下晾干，待测样品点的检测面积大于 10 mm^2 ；

需要保证此处大肠杆菌抗体偶联纳米金与大肠杆菌的复合物中纳米金的浓度至少在 10^{-10} mol/L 的量级。

(8) 采集超材料表面所有待测样品点与参考样品点的太赫兹时域波谱；

打开激光，电脑，控制器以及氮气阀门，此时太赫兹时域波谱系统内开始充进氮气，湿度下降，激光预热半小时后方可进行测量；打开太赫兹时域波谱系统测量用的盖子，并将超材料放进检测光路中，用夹具固定；在充氮气的情况下，在太赫兹时域波谱系统的波谱频宽为 0.1-3.5 THz 区间分别采集同一超材料上待测样品点与参考样品点的太赫兹时域波谱。其中测量环境湿度要求 $<0.2\%$ ，温度为常温；用以上方法逐个测量样本的太赫兹时域波谱并保存，获得所有待测样品点与参考样品点的太赫兹时域波谱数据组。

(9) 计算所有待测样品点的透射率或反射率，并寻找透射率或反射率最低点对应的频率值；

利用快速傅里叶变换将样品的太赫兹波谱时域信号转换到频域信号，利用

频域信号得到待测样品点的透射率或者反射率。寻找透射率或者反射率最低点对应的频率值，并将待测样品点的该频率值与参考样品点的该频率值相减，得到透射峰或反射峰的频移。

如附图 4 所示，物质的量在 fmol 量级的纳米金颗粒能使得太赫兹超材料出现明显的峰的偏移。因此，将纳米金与亲和素、DNA 或者大肠杆菌相连，只要纳米金颗粒的物质的量在 fmol 量级，亲和素、DNA 或者大肠杆菌就能被检测到。

上述具体实施方式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，对本发明做出的任何修改和改变，都落入本发明的保护范围。

权利要求书

1. 一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法，其特征在于包括如下步骤：

1) 配置不同浓度的多个生物样品溶液和不同浓度的多个金标亲和素溶液；

2) 超材料表面滴加生物样品溶液：将生物样品溶液滴加在一清洗过的超材料表面，每个浓度滴加至少三次，每次滴加量相同，并任意设置三个参考样品点，参考样品点均与待测样品点位置不同，滴加后常温下晾干；

3) 超材料表面滴加金标亲和素溶液：将金标亲和素溶液滴加在另一清洗过的超材料表面，每个浓度滴加至少三次，每次滴加量相同，并任意设置三个参考样品点，参考样品点均与待测样品点位置不同，滴加后常温下晾干；

4) 采集超材料表面所有待测样品点与参考样品点的太赫兹时域信号：在充氮气氛下，将生物样品放在待测样品点上，在波谱频宽为 0.1-3.5THz 区间分别采集同一超材料上待测样品点与参考样品点的太赫兹时域信号；

5) 由太赫兹时域信号得到透射峰或反射峰的频移：利用快速傅里叶变换将生物样品的太赫兹波谱时域信号转换到频域信号，由频域信号计算得到待测样品点的透射率或者反射率，将待测样品点与参考样品点的透射率或者反射率最低点对应的频率值相减得到的绝对值作为透射峰或反射峰的频移，实现对亲和素信号的放大。

2. 根据权利要求 1 所述的一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法，其特征在于：所述步骤 2) 和 3) 中超材料采用以下方式清洗：取一块完整的太赫兹超材料，先后用去离子水、磷酸盐缓冲液清洗后，再用去离子水清洗，并用氮气吹干。

3. 根据权利要求 1 所述的一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法，其特征在于：所述步骤 1) 中金标亲和素溶液采用以下方式配置：

1.1) 原料混合保存；

取普通亲和素和纳米金颗粒进行混合，常温条件下在摇床上进行振荡，并在 0~4 °C 温度下中进行保存；

1.2) 金标亲和素提取；

将金标亲和素取出，放入离心管，经离心机离心后，去除离心管上清液中多余的普通亲和素，并用去离子水反复清洗沉淀，最后再加入去离子水并充分振荡得到金标亲和素溶液。

4. 根据权利要求 3 所述的一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法, 其特征在于: 所述的普通亲和素和纳米金颗粒混合的物质的量之比为 10:1~2500:1。

5. 根据权利要求 1 所述的一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法, 其特征在于: 所述步骤 1.2) 中离心机的离心转速为 5000~15000 rpm, 离心时间为 10~20 分钟。

6. 根据权利要求 1 所述的一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法, 其特征在于: 所述步骤 4) 中采集太赫兹时域信号时, 待测样品点的检测面积大于 1mm^2 。

7. 根据权利要求 1 所述的一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法, 其特征在于: 所述的生物样品采用普通亲和素、DNA 或者大肠杆菌。

8. 根据权利要求 1 所述的一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法, 其特征在于: 所述步骤 1) 配置得到的金标亲和素溶液的浓度范围在 $2 \times 10^{-10} \sim 10 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 之间。

9. 根据权利要求 1 所述的一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法, 其特征在于: 所述步骤 1) 配置得到的生物样品溶液的浓度范围在 $2 \times 10^{-10} \sim 10 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 之间。

10. 根据权利要求 1 所述的一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法, 其特征在于: 所述步骤 3) 中生物样品溶液或者步骤 4) 中金标亲和素溶液的每次滴加量为 5~100 μL 。

11. 根据权利要求 3 所述的一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法, 其特征在于: 所述步骤 1.1) 中普通亲和素的 pH 为 5~9, 纳米金颗粒的 pH 为 8~10。

12. 根据权利要求 1 所述的一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法, 其特征在于: 所述步骤 4) 中采集太赫兹时域信号时测量环境的湿度为 $<0.2\%$ 。

13. 根据权利要求 1 所述的一种太赫兹超材料与纳米金颗粒联用的生物样品信号放大方法, 其特征在于: 所述的生物样品采用 DNA 或者大肠杆菌, 不同浓度的多个金标亲和素溶液为金标亲和素与生物素标记后生物样品复合物溶液。

说明书附图

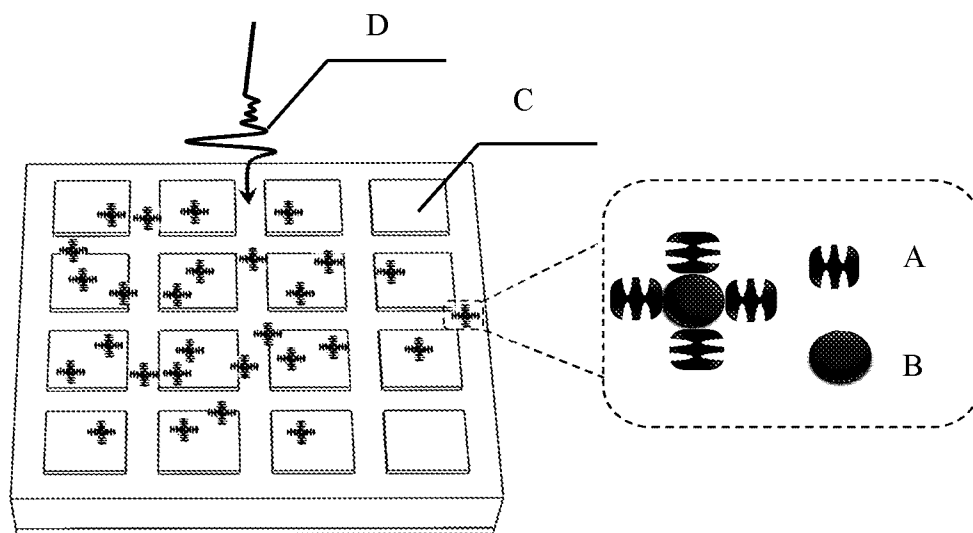


图 1

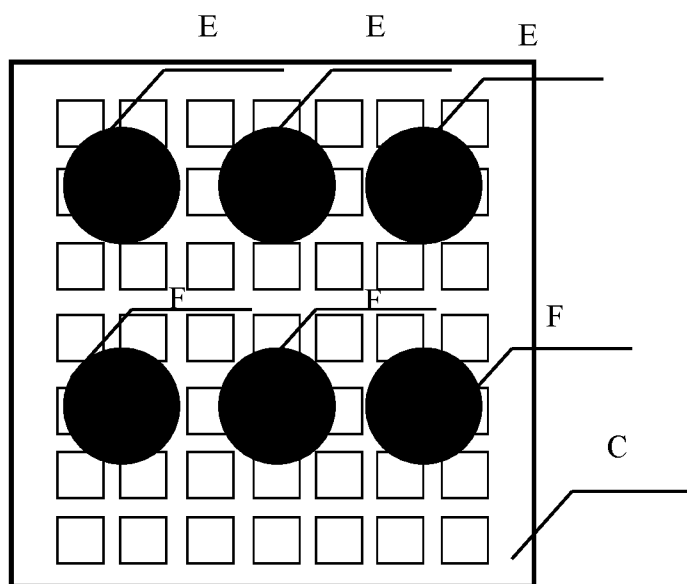


图 2

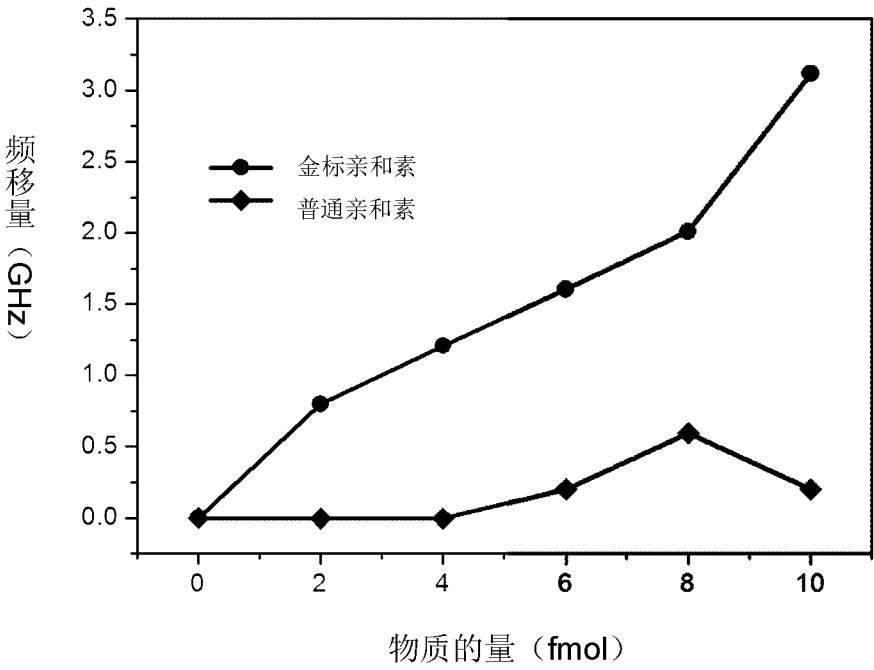


图 3

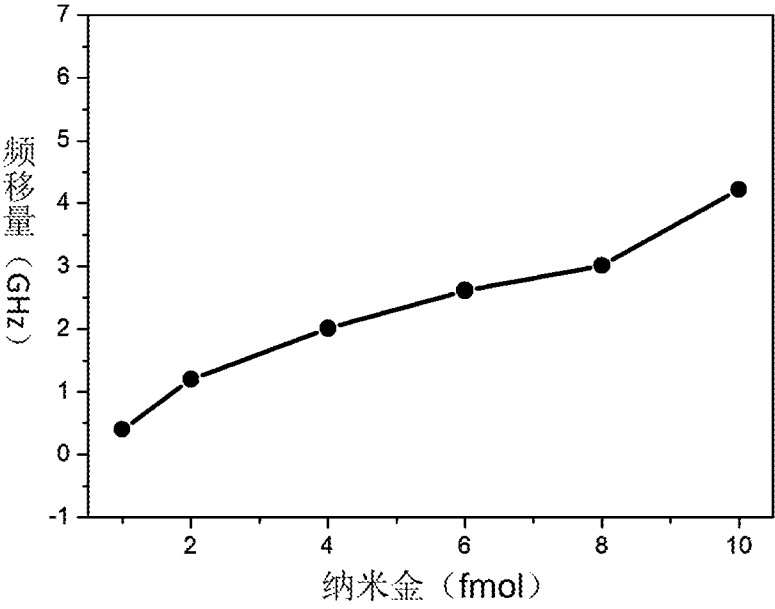


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/084344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 21/35 (2014.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 21/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNXTX; CNABS; VEN: CNABS: THz, DNA, nanogold, terahertz, signal, bio+, metamaterial?, E. coli, escherichia coli

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	CN 104977272 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 14 October 2015 (14.10.2015) description, paragraphs [0004]-[0032]	1-13
A	US 2014061469 A1 (HWANG, HAROLD Y.et al.) 06 March 2014 (06.03.2014) description, paragraphs [0010]-[0012]	1-13
A	CN 104143580 A (UNIVERSITY OF ELECTRONIC SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 12 November 2014 (12.11.2014) description, paragraphs [0007]-[0018]	1-13
A	US 2014246764 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOI) 04 September 2014 (04.09.2014) description, paragraphs [0006]-[0008]	1-13
A	NL 2005856 C (STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITY) 12 June 2012 (12.06.2012) description, page 1, line 19 to page 3, line 6	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 February 2016

Date of mailing of the international search report
04 March 2016

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer
ZHANG, Pan
Telephone No. (86-10) 62414370

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/084344

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104977272 A	14 October 2015	None	
US 2014061469 A1	06 March 2014	WO 2014062254 A3	31 July 2014
		WO 2014062254 A2	24 April 2014
		US 9000376 B2	07 April 2015
		US 2015285687 A1	08 October 2015
CN 104143580 A	12 November 2014	None	
US 2014246764 A1	04 September 2014	US 9018050 B2	28 April 2015
		US 9224532 B2	29 December 2015
		US 8941460 B2	27 January 2015
		US 2015137930 A1	21 May 2015
		US 2014103486 A1	17 April 2014
		US 2014104030 A1	17 April 2014
NL 2005856 C	12 June 2012	US 2013256535 A1	03 October 2013
		WO 2012078043 A1	14 June 2012
		EP 2649636 A1	16 October 2013

A. 主题的分类 G01N 21/35 (2014.01) i 按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类																				
B. 检索领域 检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号) G01N 21/- 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用)) CNTXT;CNABS;VEN:CNABS: 纳米金, THz, 信号, DNA, 太赫兹, 生物, 超材料, 大肠杆菌, nanogold, terahertz, signal, bio+, metamaterial?, E. coli, escherichia coli																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E</td> <td>CN 104977272 A (浙江大学) 2015年 10月 14日 (2015 - 10 - 14) 说明书第[0004]-[0032]段</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2014061469 A1 (HWANG, HAROLD Y. 等) 2014年 3月 6日 (2014 - 03 - 06) 说明书第[0010]-[0012]段</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104143580 A (电子科技大学) 2014年 11月 12日 (2014 - 11 - 12) 说明书第[0007]-[0018]段</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2014246764 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOI) 2014年 9月 4日 (2014 - 09 - 04) 说明书第[0006]-[0008]段</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>NL 2005856 C (STICHTING KATHOLIEKE UNIV.) 2012年 6月 12日 (2012 - 06 - 12) 说明书第1页第19行-第3页第6行</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	E	CN 104977272 A (浙江大学) 2015年 10月 14日 (2015 - 10 - 14) 说明书第[0004]-[0032]段	1-13	A	US 2014061469 A1 (HWANG, HAROLD Y. 等) 2014年 3月 6日 (2014 - 03 - 06) 说明书第[0010]-[0012]段	1-13	A	CN 104143580 A (电子科技大学) 2014年 11月 12日 (2014 - 11 - 12) 说明书第[0007]-[0018]段	1-13	A	US 2014246764 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOI) 2014年 9月 4日 (2014 - 09 - 04) 说明书第[0006]-[0008]段	1-13	A	NL 2005856 C (STICHTING KATHOLIEKE UNIV.) 2012年 6月 12日 (2012 - 06 - 12) 说明书第1页第19行-第3页第6行	1-13
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
E	CN 104977272 A (浙江大学) 2015年 10月 14日 (2015 - 10 - 14) 说明书第[0004]-[0032]段	1-13																		
A	US 2014061469 A1 (HWANG, HAROLD Y. 等) 2014年 3月 6日 (2014 - 03 - 06) 说明书第[0010]-[0012]段	1-13																		
A	CN 104143580 A (电子科技大学) 2014年 11月 12日 (2014 - 11 - 12) 说明书第[0007]-[0018]段	1-13																		
A	US 2014246764 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOI) 2014年 9月 4日 (2014 - 09 - 04) 说明书第[0006]-[0008]段	1-13																		
A	NL 2005856 C (STICHTING KATHOLIEKE UNIV.) 2012年 6月 12日 (2012 - 06 - 12) 说明书第1页第19行-第3页第6行	1-13																		
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																				
国际检索实际完成的日期 2016年 2月 15日		国际检索报告邮寄日期 2016年 3月 4日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10) 62019451		授权官员 张攀 电话号码 (86-10) 010-62414370																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/084344

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104977272	A	2015年 10月 14日	无			
US	2014061469	A1	2014年 3月 6日	WO	2014062254	A3	2014年 7月 31日
				WO	2014062254	A2	2014年 4月 24日
				US	9000376	B2	2015年 4月 7日
				US	2015285687	A1	2015年 10月 8日
CN	104143580	A	2014年 11月 12日	无			
US	2014246764	A1	2014年 9月 4日	US	9018050	B2	2015年 4月 28日
				US	9224532	B2	2015年 12月 29日
				US	8941460	B2	2015年 1月 27日
				US	2015137930	A1	2015年 5月 21日
				US	2014103486	A1	2014年 4月 17日
				US	2014104030	A1	2014年 4月 17日
NL	2005856	C	2012年 6月 12日	US	2013256535	A1	2013年 10月 3日
				WO	2012078043	A1	2012年 6月 14日
				EP	2649636	A1	2013年 10月 16日