

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510025356.1

[51] Int. Cl.

G01N 13/00 (2006.01)

G01N 1/36 (2006.01)

G02B 21/34 (2006.01)

[43] 公开日 2006年2月15日

[11] 公开号 CN 1734251A

[22] 申请日 2005.4.22

[21] 申请号 200510025356.1

[71] 申请人 中国科学院上海应用物理研究所  
地址 201800 上海市嘉定区嘉罗公路 2019 号

[72] 发明人 李 宾 张 益 胡 钧 李民乾

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司  
代理人 薛 琦

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种修饰的云母衬底及其修饰方法和应用

[57] 摘要

本发明公开了一种修饰的云母衬底，其特点为该云母衬底每  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  面积内固定有 10 ~ 50 个纳米金颗粒。本发明还公开了该云母衬底的修饰方法。本发明修饰的云母衬底赋予 DNA 等生物大分子更大的活动自由度，提高了生物大分子在衬底上的反应速率，可为显微镜下研究其物理性质和某些生化反应提供良好的界面。

1、一种修饰的云母衬底，其特征在于该云母衬底每  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  面积内固定有 10~50 个纳米金颗粒。

2、如权利要求 1 所述的云母衬底，其特征在于该云母衬底每  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  面积内固定有 30 个纳米金颗粒。

3、如权利要求 1 或 2 所述的云母衬底的修饰方法，其包括下列步骤：

1) 将新解理的云母放置在 1~10nM 的纳米金颗粒溶液 1~5 分钟；

2) 用水冲洗步骤 1) 制得的云母，以去除游离的纳米金颗粒，并干燥。

4、如权利要求 1 所述的云母衬底在生物大分子显微镜成像和操纵中的应用。

5、如权利要求 4 所述的应用，其特征在于该生物大分子为 DNA。

## 一种修饰的云母衬底及其修饰方法和应用

### 技术领域

本发明涉及一种修饰的云母衬底及其修饰方法和应用。

### 背景技术

在单分子水平上对生物大分子的研究是目前生命科学研究的热点问题之一。其中的显微镜技术是研究蛋白质，DNA 等生物大分子的最有效的工具之一。然而，如何实现将生物大分子均匀分散和固定在合适的衬底表面上是研究单个生物分子形态，大小，性质和行为所面临的首要问题。

通常，用于 DNA 研究的衬底修饰方法有两种：其一，对衬底如玻璃，硅，云母等用硅烷化试剂进行处理，如专利号为 ZL 00 1 16715.4 的中国专利所述，使衬底表面上含有氨基基团，通过它与 DNA 链骨架上的磷酸基团反应使之固定在衬底的表面上。此方法的特点是衬底处理起来相对较复杂，所需时间也较长。这种固定方法往往造成衬底表面粗糙度增加，不利于对 DNA 分子进行高清晰度的研究。如在用 AFM 测量 DNA 高度时，往往会造成一定的误差，影响数据的准确性。其二，对衬底如云母用金属离子进行修饰，使衬底表面带正电，以便于对 DNA 分子的固定。但此方法较难实现操纵 DNA 成有序的排列方向或构形，并使其固定在衬底表面上。

酶与 DNA 等生物大分子的反应常常伴有 DNA 构形的变化，如果整条 DNA 分子都固定在衬底上或 DNA 在衬底表面固定的太牢固就可能会影响它们之间的反应效率，甚至阻止它们间的反应。所以，赋予 DNA 等生物大分子更大的活动自由度是更好的研究 DNA 与其他分子相互作用的前提条件。表面带正电荷的纳米金颗粒（或称为金纳米球、纳米金球；英文名为 Au

naoparticle 或 nanogold) 修饰衬底的方法也许可为其提供有效的解决途径。

### 发明内容

本发明要解决的技术问题即是上述课题, 目的之一是提供一种赋予生物大分子更大活动自由度的修饰的云母衬底。

上述目的通过下列技术方案来实现: 一种修饰的云母衬底, 其特点为该云母衬底每  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  面积内固定有约 10~50 个纳米金颗粒。

较佳地, 该云母衬底每  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  面积内固定有约 30 个纳米金颗粒。

本发明目的之二是提供上述云母衬底的修饰方法。

本发明云母衬底的修饰方法包括下列步骤:

- 1) 将新解理的云母放置在浓度为 1~10nM 的纳米金颗粒溶液 1~5 分钟;
- 2) 用水冲洗步骤 1) 制得的云母, 以去除游离的纳米金颗粒, 并干燥。

本发明还提供上述修饰的云母衬底在生物大分子显微镜成像和操纵中的应用。

本发明中的纳米金颗粒, 或称为金纳米颗粒、金纳米球、纳米金球, 是指由金原子组成的、粒径在 1~100 纳米尺寸内的小颗粒。

本发明中的生物大分子是指核酸(DNA、RNA)、蛋白质、蛋白质与 DNA 的复合物或其他复合物和聚集物。

本发明选择金纳米球来修饰衬底。其中, 纳米金颗粒是表面带正电荷修饰的, 衬底为云母。因为 DNA 等生物大分子骨架上和云母表面都有负电荷的存在, 生物大分子不容易固定在云母表面上。而带正电荷的纳米金颗粒可以很容易地修饰在云母表面上, 使云母表面部分带正电荷; 这时带负电的生物大分子就很容易地固定在云母的表面上了。在本发明中, 带正电荷的金纳米球起了一个中间媒介的作用将带负电荷的云母和生物大分子连接在一起。其最大的一个特点就是: 生物大分子只是部分地与衬底表面连接在一起, 而大部分生物大分子链可以是游离的, 活动范围较在前面提到的两种衬底要大

的多。这样的修饰衬底对研究生物大分子的生物学功能，如与酶分子的反应有很大的好处。另外，此种修饰衬底对操纵其表面上的生物大分子提供了良好的界面，由于大部分生物大分子只是被轻轻地放在了云母的表面，可使操纵生物大分子变得更为容易，如将 DNA 切断、移动甚至从云母表面拾起来。同时，此种修饰衬底为研究生物大分子物理性质也将提供很好的界面，如研究 DNA 分子的弹性，测量 DNA 在云母表面上的高度等。在实验中，本发明人发现在 AFM 扫描图像中，在纳米金颗粒修饰的云母表面上的 DNA 要比其他方法修饰的 DNA 清晰的多；且也易于用分子梳的方法将 DNA 分子拉直成线状的形状。

由于本发明修饰的云母衬底赋予 DNA 等生物大分子更大的活动自由度，故而明显提高了生物大分子在衬底上的反应效率，进而为显微镜下研究其物理性质和某些生化反应，以及操纵其提供了更好的界面。

#### 附图说明

图 1 为本发明纳米金颗粒修饰的云母衬底一较佳实施例的图像，扫描范围为  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ 。

图 2 为图 1 的放大图像，扫描范围为  $500\text{nm} \times 500\text{nm}^2$ 。

图 3 为 DNA 拉直固定在本发明纳米金颗粒修饰的云母衬底表面上的示意图。

图 4 为 DNA 在本发明纳米金颗粒修饰的云母衬底上的表面形貌 AFM 图像，呈自然舒展状态，扫描范围为  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ 。

图 5 为 DNA 在本发明纳米金颗粒修饰的云母衬底上的表面形貌 AFM 图像，呈拉直状态，扫描范围为  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ 。

图 6 为 DNA 在本发明纳米金颗粒修饰的云母衬底上的表面形貌 AFM 图像，呈二维形态，扫描范围为  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ 。

## 具体实施方式

下面以实施例来进一步说明本发明，但本发明并不仅限于此。

### 实施例 1

将新解理的云母放置在 1 nM 的纳米金颗粒溶液中 1 分钟；用水冲洗云母，将游离的纳米金颗粒冲洗掉，吹干备用。所制得的云母衬底每  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  面积内固定有约 10 个纳米金颗粒。

### 实施例 2

将新解理的云母放置在 10 nM 的纳米金颗粒溶液中 3 分钟；用水冲洗云母，将游离的纳米金颗粒冲洗掉，吹干备用。所制得的云母衬底每  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  面积内固定有约 50 个纳米金颗粒。

### 实施例 3

将新解理的云母放置在 1 nM 的纳米金颗粒溶液中 5 分钟；用水冲洗云母，将游离的纳米金颗粒冲洗掉，吹干备用。所制得的云母衬底每  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  面积内固定有约 30 个纳米金颗粒，如图 1、2 所示（白点为纳米金颗粒）。

### 实施例 4

将新解理的云母放置在 5 nM 的纳米金颗粒溶液中 1 分钟；用水冲洗云母，将游离的纳米金颗粒冲洗掉，吹干备用。所制得的云母衬底每  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  面积内固定有约 20 个纳米金颗粒。

### 实施例 5

将新解理的云母放置在 5 nM 的纳米金颗粒溶液中 5 分钟；用水冲洗云母，将游离的纳米金颗粒冲洗掉，吹干备用。所制得的云母衬底每  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  面积内固定有约 50 个纳米金颗粒。

进一步用应用实施例来说明本发明衬底的应用及效果。

### 应用实施例 1

将本发明实施例的衬底用于 DNA 显微镜成像，例如象图 3 那样将 DNA 分子 1 拉直固定在本发明金纳米球 2 修饰的云母 3 衬底上。从图 4~6 中可

以看出，在本发明金纳米球修饰的云母衬底上，DNA 既可以呈现自然舒展的状态；也可以成一维的排列和两维的排列。

#### 应用实施例 2

脱氧核糖核酸酶 I 对 DNA 链有切断作用但对 DNA 无序列的要求，也就是说，它可对 DNA 任意的序列进行切割。在本发明金纳米球修饰云母衬底上的 DNA 与脱氧核糖核酸酶 I 作用 5min 后就可观察到 DNA 的断裂；而在用硅烷化试剂（APS）处理后云母衬底表面上的 DNA 与脱氧核糖核酸酶 I 的反应在 0.5 小时后可观测到（具体步骤参见专利号为 ZL 00 1 16715.4 的中国专利）。蛋白质与 DNA 分子的相互作用结果表明，在本发明纳米金颗粒修饰的云母衬底表面上的 DNA 更加容易与蛋白质起作用，反应效率大大提高。

其中，上述实施例或应用实施例中的 DNA 分子可为线状也可为环状；云母购自四川美丰云母工业有限责任公司；纳米金颗粒（或称为金纳米球）购自美国纳米探针有限公司，其直径为 1~5 nm。

DNA 成像可用 AFM 或荧光显微镜进行检测。本实验所得到的结果是在 NANOScope IIIa 系统（Digital Instrument, 美国）上完成的。扫描头为 J 型。AFM 的探针为（MikroMasch 公司）NSC 11 (弹性系数  $45 \text{ Nm}^{-1}$ ) 非接触硅针尖。成像温度控制在  $25^\circ\text{C}$  左右，湿度在 40-50 % 左右。



图 1

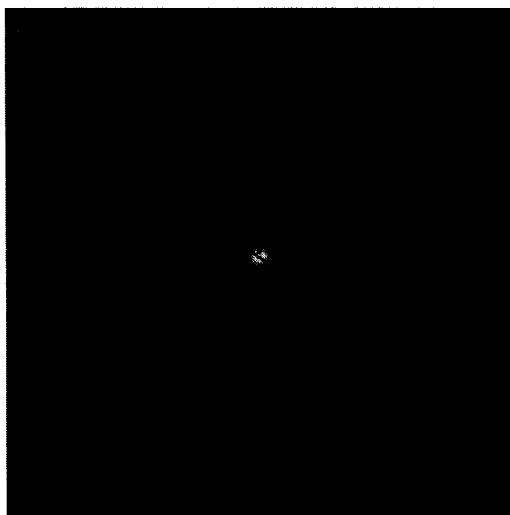


图 2



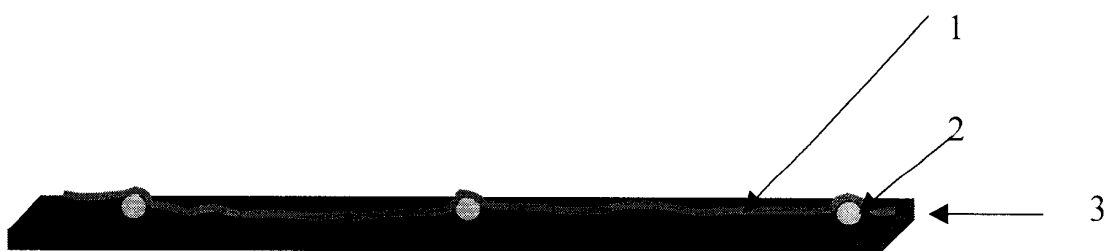


图 3

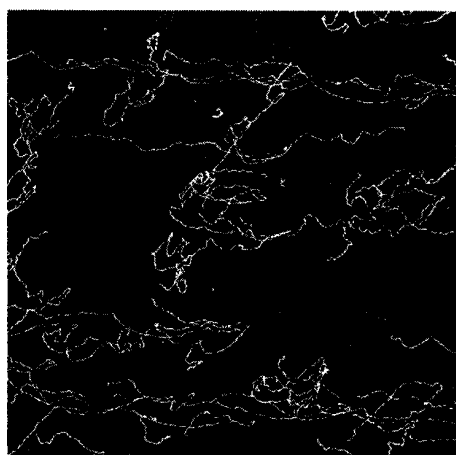


图 4

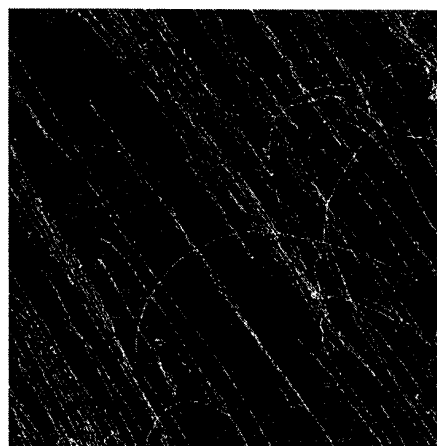


图 5

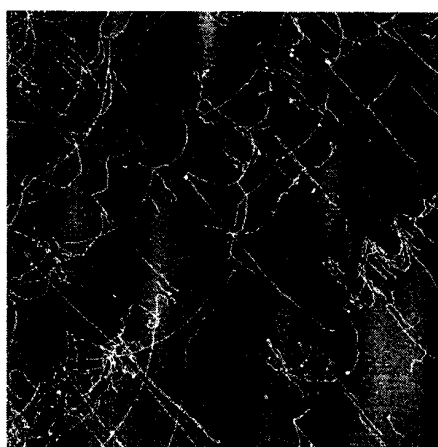


图 6