



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117347341 B

(45) 授权公告日 2024.03.19

(21) 申请号 202311649561.X

(22) 申请日 2023.12.05

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 117347341 A

(43) 申请公布日 2024.01.05

(73) 专利权人 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所

地址 215163 江苏省苏州市高新区科灵路88号

(72) 发明人 周连群 高庆学 郭振 李传宇
张威 李金泽 李超 张月业
黄润虎 姚佳

(74) 专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理有限公司 11250

专利代理师 刘贺秋

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

(56) 对比文件

CN 101199241 A, 2008.06.11

CN 102227659 A, 2011.10.26

CN 114280023 A, 2022.04.05

CN 116626011 A, 2023.08.22

CN 220063838 U, 2023.11.21

Qingxue Gao等.Revealing the Binding Events of Single Proteins on Exosomes Using Nanocavity Antennas beyond Zero-Mode Waveguides.ACS Appl. Mater. Interfaces.2023,第15卷第49511-49526页.

马迪等.随机光学重构显微镜在外泌体观察中的应用.分子影像学杂志.第41卷(第2期),第224-228页.

审查员 顾竹君

权利要求书4页 说明书12页 附图6页

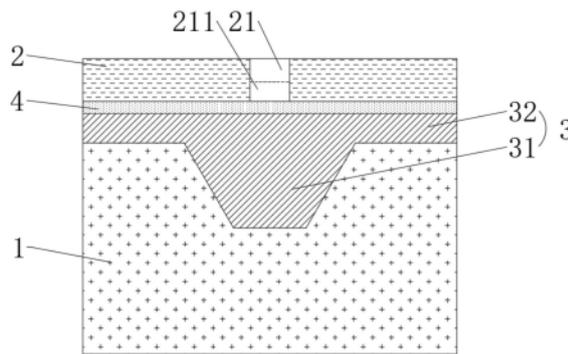
(54) 发明名称

荧光检测器件及制备方法、荧光检测系统和荧光检测方法

(57) 摘要

本发明涉及荧光检测技术领域,公开了荧光检测器件及制备方法、荧光检测系统和荧光检测方法,荧光检测器件包括基层层、阵列孔膜层和透镜结构层,基层层上开设有多个凹槽,阵列孔膜层上设置有多个纳米孔,纳米孔的直径小于激发光的波长,以使来自基层层一侧的激发光限于纳米孔内靠近基层层一端的底部激发区内;激发区内适于设置捕获单元以将待测荧光样品固定于激发区内;透镜结构层为设置在基层层和阵列孔膜层之间的富碳非晶硅,包括多个透镜体,透镜体设置于凹槽内且与纳米孔一一对应,适于会聚来自纳米孔内待测荧光样品发出的荧光发射光。保证成像面上并行检测通量,同时增强了荧

光信号的强度,保证单分子荧光大规模并行检测的准确性。



1. 一种荧光检测器件,其特征在于,包括:

基底层(1),所述基底层(1)上开设有多个凹槽(11);

阵列孔膜层(2),所述阵列孔膜层(2)上设置有多个纳米孔(21),所述纳米孔(21)的直径小于激发光的波长,所述纳米孔(21)呈现为亚波长结构,以使来自所述基底层(1)一侧的激发光限于所述纳米孔(21)内靠近所述基底层(1)一端的底部激发区(211)内;所述激发区(211)内适于设置捕获单元(200),以将待测荧光样品固定于所述激发区(211)内;所述捕获单元(200)包括第一抗体蛋白(203);所述待测荧光样品包括:外泌体单元(300)和第二抗体蛋白(400),所述外泌体单元(300)包括第一跨膜蛋白(301)和第二跨膜蛋白(302),所述第一跨膜蛋白(301)适于与所述第一抗体蛋白(203)相连接,以将所述外泌体单元(300)固定在所述激发区(211)内,所述第二抗体蛋白(400)具有荧光标记且适于与所述第二跨膜蛋白(302)相连接,以使所述第二抗体蛋白(400)固定在所述外泌体单元(300)上;

透镜结构层(3),设置在所述基底层(1)和所述阵列孔膜层(2)之间,所述透镜结构层(3)为富碳非晶硅,包括多个透镜体(31),所述透镜体(31)设置于所述凹槽(11)内且与所述纳米孔(21)一一对应,所述透镜体(31)的数值孔径范围为2.3-3,所述透镜体(31)适于会聚来自所述纳米孔(21)内待测荧光样品发出的荧光发射光;所述透镜体(31)在轴线方向上的截面形状为抛物线形或抛物线形的拟合图形,在所述透镜体(31)相对远离所述基底层(1)的方向上,所述纳米孔(21)靠近所述基底层(1)的一端的中心点与抛物线形或抛物线形的拟合图形的焦点之间的距离为 $0.5\mu\text{m}$;

所述待测荧光样品的激发光波段范围为360nm-500nm,发射光波段范围为550nm-800nm。

2. 根据权利要求1所述的荧光检测器件,其特征在于,所述透镜体(31)为回转体或棱台结构,且沿所述透镜体(31)的轴线方向,所述透镜体(31)自远离所述基底层(1)一侧向靠近所述基底层(1)一侧的截面尺寸逐渐减小;

所述透镜体(31)在轴线方向上的截面形状为抛物线形,所述截面形状的轮廓包括曲线部分和直线部分,所述曲线部分上的点的坐标满足抛物线公式: $x^2 = 4py$,焦点为(0,p)。

3. 根据权利要求1所述的荧光检测器件,其特征在于,所述透镜体(31)为回转体或棱台结构,且沿所述透镜体(31)的轴线方向,所述透镜体(31)远离所述基底层(1)一侧的截面尺寸大于靠近所述基底层(1)一侧的截面尺寸;

所述透镜体(31)在轴线方向上的截面形状为抛物线形的拟合图形,所述截面形状为梯形、或多级台阶形、或圆弧形、或双曲线型。

4. 根据权利要求2或3所述的荧光检测器件,其特征在于,所述透镜结构层(3)还包括:由所述透镜体(31)靠近所述阵列孔膜层(2)的一端向外延伸成型的延伸层(32),所述延伸层(32)贴覆于所述基底层(1)表面。

5. 根据权利要求1所述的一种荧光检测器件,其特征在于,作为所述透镜结构层(3)的富碳非晶硅光学各向同性,所述透镜结构层(3)的折射率范围为2.3-3.1;所述基底层(1)为光学各向同性的石英材料。

6. 根据权利要求1所述的一种荧光检测器件,其特征在于,
所述纳米孔(21)的直径尺寸范围为:50nm-500nm;

所述纳米孔(21)的激发区(211)的高度范围为20nm-30nm。

7. 根据权利要求1所述的荧光检测器件,其特征在于,所述纳米孔(21)的数量范围为 $10^3\sim 8\times 10^7$ 。

8. 根据权利要求1所述的荧光检测器件,其特征在于,还包括:

光学隔垫层(4),设置在所述阵列孔膜层(2)和所述透镜结构层(3)之间,所述光学隔垫层(4)被配置为调节所述阵列孔膜层(2)与所述透镜结构层(3)之间的距离,以调整所述纳米孔(21)靠近所述基底层(1)一端的中心点的位置。

9. 根据权利要求8所述的荧光检测器件,其特征在于,

所述阵列孔膜层(2)的厚度范围为50nm-200nm;

所述光学隔垫层(4)的厚度范围为10nm-500nm;

所述透镜结构层(3)的厚度范围为 $1\mu\text{m}-5\mu\text{m}$ 。

10. 根据权利要求5-9任一项所述的荧光检测器件,其特征在于,所述阵列孔膜层(2)还包括:

抗非特异性吸附层(22),设置在所述阵列孔膜层(2)远离所述基底层(1)一侧的表面上以及所述纳米孔(21)的侧壁面,所述抗非特异性吸附层(22)适于限位所述待测荧光样品固定于所述激发区(211)内。

11. 根据权利要求10所述的荧光检测器件,其特征在于,

所述阵列孔膜层(2)为金且所述抗非特异性吸附层(22)为巯基-聚乙二醇;或者,

所述阵列孔膜层(2)为铝或氧化铝且所述抗非特异性吸附层(22)为聚乙烯膦酸。

12. 一种荧光检测器件的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

提供基底层(1),在所述基底层(1)上形成多个凹槽(11);

在所述基底层(1)形成所述凹槽(11)的一侧制备透镜结构层(3),并在所述凹槽(11)内形成透镜体(31),所述透镜结构层(3)为富碳非晶硅,所述透镜体(31)的数值孔径范围为2.3-3;

在所述透镜结构层(3)上制备阵列孔膜层(2),并在所述阵列孔膜层(2)上刻蚀纳米孔(21),所述纳米孔(21)与所述透镜体(31)一一对应;所述纳米孔(21)的直径小于激发光的波长,所述纳米孔(21)呈现为亚波长结构,以使来自所述基底层(1)一侧的激发光限于所述纳米孔(21)内靠近所述基底层(1)一端的底部激发区(211)内;在所述激发区(211)内设置捕获单元(200)以将待测荧光样品固定于所述激发区(211)内;所述透镜体(31)在轴线方向上的截面形状为抛物线形或抛物线形的拟合图形,在所述透镜体(31)相对远离所述基底层(1)的方向上,所述纳米孔(21)靠近所述基底层(1)的一端的中心点与抛物线形或抛物线形的拟合图形的焦点之间的距离为 $0.5\mu\text{m}$;所述捕获单元(200)包括第一抗体蛋白(203);所述待测荧光样品包括:外泌体单元(300)和第二抗体蛋白(400),所述外泌体单元(300)包括第一跨膜蛋白(301)和第二跨膜蛋白(302),所述第一跨膜蛋白(301)适于与所述第一抗体蛋白(203)相连接,以将所述外泌体单元(300)固定在所述激发区(211)内,所述第二抗体蛋白(400)具有荧光标记且适于与所述第二跨膜蛋白(302)相连接,以使所述第二抗体蛋白(400)固定在所述外泌体单元(300)上;所述待测荧光样品的激发光波段范围为360nm-500nm,发射光波段范围为550nm-800nm。

13. 根据权利要求12所述的荧光检测器件的制备方法,其特征在于,

在所述透镜结构层(3)上制备阵列孔膜层(2)之前,还包括:在所述透镜结构层(3)上制备光学隔垫层(4),所述光学隔垫层(4)被配置为调节所述阵列孔膜层(2)与所述透镜结构层(3)之间的距离,以调整所述纳米孔(21)靠近所述基层(1)一端的中心点的位置;所述光学隔垫层(4)的厚度范围为 $0.01\mu\text{m}$ - $0.5\mu\text{m}$ 。

14.根据权利要求12所述的荧光检测器件的制备方法,其特征在于,

在所述透镜结构层(3)上制备阵列孔膜层(2)之后,还包括:在所述阵列孔膜层(2)远离所述基层(1)一侧的表面上以及所述纳米孔(21)的侧壁面上形成抗非特异性吸附层(22),以限位所述待测荧光样品固定于所述激发区(211)内。

15.一种荧光检测系统,其特征在于,包括:

权利要求1-11中任一项所述的荧光检测器件(100);以及

显微物镜,设置在所述基层(1)远离所述透镜结构层(3)的一侧,所述纳米孔(21)内待测荧光样品发出的荧光发射光适于穿过所述显微物镜到达成像面;所述显微物镜的数值孔径范围为 0.1 - 0.8 ,放大倍数为4倍、或5倍、或10倍、或20倍;

激发光源,设置在所述荧光检测器件(100)的基层(1)远离所述透镜结构层(3)的一侧,所述激发光源适于朝向所述基层(1)一侧发出激发光。

16.一种荧光检测方法,应用于权利要求1-11中任一项所述的荧光检测器件(100),其特征在于,包括如下步骤:

在荧光检测器件(100)纳米孔(21)内的激发区(211)设置捕获单元(200),所述捕获单元(200)包括第一抗体蛋白(203);

向所述荧光检测器件(100)设置所述纳米孔(21)的一侧表面添加待测荧光样品,所述捕获单元(200)捕获待测荧光样品至所述激发区(211)内;所述待测荧光样品包括:外泌体单元(300)和第二抗体蛋白(400),所述外泌体单元(300)包括第一跨膜蛋白(301)和第二跨膜蛋白(302),所述第一跨膜蛋白(301)适于与所述第一抗体蛋白(203)相连接,以将所述外泌体单元(300)固定在所述激发区(211)内,所述第二抗体蛋白(400)具有荧光标记且适于与所述第二跨膜蛋白(302)相连接,以使所述第二抗体蛋白(400)固定在所述外泌体单元(300)上;

向所述纳米孔(21)发射激发光,以使所述激发区(211)内的所述待测荧光样品发出荧光发射光,所述荧光发射光穿过所述透镜体(31)从所述基层(1)出射到达成像面;所述待测荧光样品的激发光波段范围为 360nm - 500nm ,发射光波段范围为 550nm - 800nm 。

17.根据权利要求16所述的荧光检测方法,其特征在于,通过离子刻蚀的方式在所述基层(1)上形成多个凹槽(11);

离子刻蚀的过程中,通过调节反应气体组分的压强、垂直方向和水平方向的刻蚀速率,以控制形成凹槽(11)时的刻蚀角度、深度和粗糙度参数;

离子刻蚀的工作气压范围为: 0.3Pa - 10Pa 。

18.根据权利要求16或17所述的荧光检测方法,其特征在于,所述捕获单元(200)还包括:

捕获位点数量控制层(201),设置在所述纳米孔(21)的所述激发区(211)内;

捕获单元本体(202),所述捕获单元本体(202)的第一端与所述捕获位点数量控制层(201)相连接,另一端与所述第一抗体蛋白(203)相连接。

19. 根据权利要求18所述的荧光检测方法,其特征在于,向所述荧光检测器件(100)设置所述纳米孔(21)的一侧表面添加待测荧光样品的步骤包括:对外泌体单元(300)的捕获和对第二抗体蛋白(400)的捕获;对外泌体单元(300)的捕获包括:

将含有待检测外泌体单元(300)的悬浮溶液滴加到具有所述捕获单元(200)的所述荧光检测器件(100)上;

在温度24℃~26℃、常压环境下,蒸发部分所述悬浮溶液以使所述外泌体单元(300)进入所述纳米孔(21)内;

所述外泌体单元(300)的所述第一跨膜蛋白(301)与所述第一抗体蛋白(203)相结合,以使所述外泌体单元(300)被捕获到所述纳米孔(21)底部;

对第二抗体蛋白(400)的捕获包括:将含有待检测第二抗体蛋白(400)的溶液滴加到具有所述外泌体单元(300)的所述荧光检测器件(100)上,所述第二抗体蛋白(400)与所述外泌体单元(300)的所述第二跨膜蛋白(302)相结合。

20. 根据权利要求19所述的荧光检测方法,其特征在于,所述第一抗体蛋白(203)与所述第二抗体蛋白(400)相同,包括:抗CD9蛋白、抗CD63蛋白、抗CD81蛋白中的一种或多种。

21. 根据权利要求19所述的荧光检测方法,其特征在于,所述第一抗体蛋白(203)与所述第二抗体蛋白(400)不相同;

所述第一抗体蛋白(203)包括:抗CD9蛋白、抗CD63蛋白、抗CD81蛋白中的一种或多种;

所述第二抗体蛋白(400)包括:抗CD9蛋白、抗CD63蛋白、抗CD81蛋白中的一种或多种。

荧光检测器件及制备方法、荧光检测系统和荧光检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光检测技术领域,具体涉及一种荧光检测器件及制备方法、荧光检测系统和荧光检测方法。

背景技术

[0002] 不同于传统的基于分子群体的荧光团发光强度平均值的生化检测方法,单分子荧光检测技术由于其能够反映单个分子的动态特性而成为当前的研究热点。

[0003] 生化检测过程中,由于生化检测的耦合影响因素多且复杂,检测结果存在极大的偶然性,进而导致准确性降低。一般来说,样本量越大,越可以有效削弱偶然性因素造成的不利影响,所以,高通量对提高生化检测分析结果的准确性至关重要。

[0004] 现有的提升生化检测分析通量的方法为在同一检测样品的同一次检测中尽可能多地设置检测单元。例如,在DNA测序和膜表面受体抗体药物筛选中,通常设置数万至数百万的检测位点单元,再通过使用小数值孔径的物镜观测较大成像范围内样品的荧光结果,进而提升生化反应的有效性和分析结果的准确性。

[0005] 然而,在上述基于显微成像系统的单分子荧光检测技术中,单分子荧光本身发射的光子数量极少,且在全空间发生散射,使得小数值孔径的成像系统采集到的信号中的高频信息极易丢失,进而造成成像不完整甚至根本无法成像。但若要保证成像范围内荧光信号的强度,则需要采用高数值孔径的物镜,但这又导致相应的成像视野变小,导致同时并行检测的单分子位点的数目受到限制,影响到检测通量的提升。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明提供了一种荧光检测器件及制备方法、荧光检测系统和荧光检测方法,以解决现有的单分子荧光并行检测器件无法兼顾成像质量与检测高通量,导致无法保证单分子荧光大规模并行检测准确性的问题。

[0007] 第一方面,本发明提供了一种荧光检测器件,包括:

[0008] 基底层,所述基底层上开设有多个凹槽;

[0009] 阵列孔膜层,所述阵列孔膜层上设置有多个纳米孔,所述纳米孔的直径小于激发光的波长,以使来自所述基底层一侧的激发光限于所述纳米孔内靠近所述基底层一端的底部激发区内;所述激发区内适于设置捕获单元,以将待测荧光样品固定于所述激发区内;

[0010] 透镜结构层,设置在所述基底层和所述阵列孔膜层之间,所述透镜结构层为富碳非晶硅,包括多个透镜体,所述透镜体设置于所述凹槽内且与所述纳米孔一一对应,所述透镜体适于会聚来自所述纳米孔内待测荧光样品发出的荧光发射光。

[0011] 有益效果:亚波长结构的纳米孔使得激发光无法到达纳米孔激发区域以外,因而位于激发区域以外的荧光样品不能被激发发出荧光,降低了背景噪声,增强了荧光信号强度;此外,高折射率的富碳非晶硅透镜体能够会聚引导荧光发射光,增强对荧光信号的采集效率,大大提高了单分子荧光检测的信噪比,保证较高的成像质量。因此,亚波长的纳米孔

结构搭配具有会聚引导荧光发射光作用的透镜体,既能够保证成像面上并行检测样品数量,实现高检测通量,同时也增强了每一待检测样品的荧光信号的强度,提高单分子并行检测的成像质量,进而保证单分子荧光大规模并行检测的准确性。

[0012] 在一种可选的实施方式中,所述透镜体为回转体或棱台结构,且沿所述透镜体的轴线方向,所述透镜体自远离所述基底层一侧向靠近所述基底层一侧的截面尺寸逐渐减小;

[0013] 所述透镜体在轴线方向上的截面形状为抛物线形,所述截面形状的轮廓包括曲线部分和直线部分,所述曲线部分上的点的坐标满足抛物线公式: $x^2 = 4py$,焦点为(0,p);在所述透镜体相对远离所述基底层的方向上,所述纳米孔靠近所述基底层一端的中心点与抛物线形的焦点之间的距离为 $0.5\mu\text{m}$ 。

[0014] 透镜体以回转体或者棱台结构成型于基底层的凹槽内,透镜体的竖直截面形状为开口向上的抛物线形,下方曲面部分的外周尺寸变化平缓,结构稳定;透镜体的竖直尺寸需要保证成型在其上方的纳米孔的底端中心点位于曲线部分焦点向上偏移 $0.5\mu\text{m}$ 处,该偏移能够避免在纳米孔底部的中心点位于焦点时,待测荧光样品所产生的荧光发射光在透镜体内部发生全反射谐振干涉的现象,保证荧光发射光的发射强度,提高成像质量。

[0015] 在一种可选的实施方式中,所述透镜体为回转体或棱台结构,且沿所述透镜体的轴线方向,所述透镜体远离所述基底层一侧的截面尺寸大于靠近所述基底层一侧的截面尺寸;

[0016] 所述透镜体在轴线方向上的截面形状为抛物线形的拟合图形,所述截面形状为梯形、或多级台阶形、或圆弧形、或双曲线型;在所述透镜体相对远离所述基底层的方向上,所述纳米孔靠近所述基底层一端的中心点与抛物线形的拟合图形的焦点之间的距离为 $0.5\mu\text{m}$ 。

[0017] 透镜体能够设置为多种形状,只要能够保证在透镜体相对远离基底层的方向上,纳米孔靠近基底层一端的中心点与曲线部分焦点之间的距离为 $0.5\mu\text{m}$ 即可,避免待测荧光样品所产生的荧光发射光在透镜体内部发生全反射谐振干涉,保证荧光发射光的发射强度,提高成像质量。

[0018] 在一种可选的实施方式中,所述透镜结构层还包括:由所述透镜体靠近所述阵列孔膜层的一端向外延伸成型的延伸层,所述延伸层贴覆于所述基底层表面。

[0019] 水平一体设置的延伸层有助于保证透镜结构层上表面的平整性,便于上方其他结构层的沉积,同时不同厚度的延伸层也能够便于调节纳米孔底部与透镜体截面形状焦点之间 $0.5\mu\text{m}$ 的距离。

[0020] 在一种可选的实施方式中,所述透镜结构层为光学各向同性的富碳非晶硅材料;所述透镜结构层的折射率范围为2.3-3.1;所述基底层为光学各向同性的石英材料。

[0021] 透镜体材料的介电常数和磁导率决定了荧光与其之间相互作用,由于透镜体的介电常数和磁导率与其他光学层不相同,荧光发射光在透镜体的光速与其他光学层不同、走的光程也不同,所以能够引导荧光发射光的传播方向。富碳非晶硅材料的透镜体和石英材料的基底层能够保证荧光信号采集的保真度。

[0022] 在一种可选的实施方式中,所述待测荧光样品的激发光波段范围为360nm-500nm,发射光波段范围为550nm-800nm。

[0023] 荧光样品中的激发光的波段范围应当与透镜体材料的透射光谱相匹配,保证透镜体能够对发射光实现良好的会聚引导作用,保证发射光强度以到达成像面成像。

[0024] 在一种可选的实施方式中,所述纳米孔的直径尺寸范围为:50nm-500nm;所述纳米孔的激发区的高度范围为20nm-30nm。

[0025] 纳米孔的直径尺寸范围设置为:50nm-500nm,其径向尺寸接近或小于激发光的波长,保证纳米孔形成亚波长结构,激发光在纳米孔内不存在完整波长的传输,使得到达纳米孔的激发光不能完全穿过纳米孔,而是沿着纳米孔的轴线激发光的光强呈指数衰减,并在纳米孔的底部形成适合单分子激发的高度范围为20nm-30nm的有效激发区,便于集中激发荧光待测样品,降低背景噪声,大大提高了单分子荧光检测的信噪比。

[0026] 在一种可选的实施方式中,所述纳米孔的数量范围为 $10^3 \sim 8 \times 10^7$ 。

[0027] 单独对应的纳米孔和透镜体彼此之间功能相互独立,作为单独的检测位点;多个检测位点共同实现对纳米孔内待测荧光样品的单分子荧光并行检测,检测效率高,准确度高。

[0028] 在一种可选的实施方式中,还包括:光学隔垫层,设置在所述阵列孔膜层和所述透镜结构层之间,所述光学隔垫层被配置为调节所述阵列孔膜层与所述透镜结构层之间的距离,以调整所述纳米孔靠近所述基底层一端的中心点的位置。

[0029] 设置光学隔垫层调整纳米孔底部中心的位置更加便捷,制备难度也更低。

[0030] 在一种可选的实施方式中,所述阵列孔膜层的厚度范围为50nm-200nm;所述光学隔垫层的厚度范围为10nm-500nm;所述透镜结构层的厚度范围为 $1\mu\text{m} - 5\mu\text{m}$ 。

[0031] 在一种可选的实施方式中,所述阵列孔膜层还包括:抗非特异性吸附层,设置在所述阵列孔膜层远离所述基底层一侧的表面上以及所述纳米孔的侧壁面,所述抗非特异性吸附层适于限位所述待测荧光样品固定于所述激发区内。

[0032] 抗非特异性吸附层能够防止待检测的荧光样品,比如蛋白质、荧光团等与阵列孔膜层之间发生特异性吸附,达到减少背景噪声强度的目的,进而提高荧光信噪比。

[0033] 在一种可选的实施方式中,所述阵列孔膜层为金且所述抗非特异性吸附层为巯基-聚乙二醇;或者,所述阵列孔膜层为铝或氧化铝且所述抗非特异性吸附层为聚乙烯膦酸。

[0034] 第二方面,本发明提供了一种荧光检测器件的制备方法,包括以下步骤:

[0035] 提供基底层,在所述基底层上形成多个凹槽;

[0036] 在所述基底层形成所述凹槽的一侧制备透镜结构层,并在所述凹槽内形成透镜体,透镜结构层为富碳非晶硅;

[0037] 在所述透镜结构层上制备阵列孔膜层,并在所述阵列孔膜层上刻蚀纳米孔,所述纳米孔与所述透镜体一一对应;所述纳米孔的直径小于激发光的波长,以使来自所述基底层一侧的激发光限于所述纳米孔内靠近所述基底层一端的底部激发区内;在所述激发区内设置捕获单元以将待测荧光样品固定于所述激发区内。

[0038] 有益效果:上述的制备方法实现了亚波长纳米孔和富碳非晶硅透镜体的加工成型,荧光检测器件化学表面平坦,为后面电子束光刻工艺的实现提供了可能,解决了此类立体结构、纳米-微米嵌套结构的跨尺度工艺性兼容性的问题,具备批量制备条件,有助于实现大量单分子荧光并行检测,保证检测准确性。

[0039] 在一种可选的实施方式中,在所述透镜结构层上制备阵列孔膜层之前,还包括:在所述透镜结构层上制备光学隔垫层,所述光学隔垫层被配置为调节所述阵列孔膜层与所述透镜结构层之间的距离,以调整所述纳米孔靠近所述基底层一端的中心点的位置;所述光学隔垫层的厚度范围为 $0.01\mu\text{m}$ - $0.5\mu\text{m}$ 。

[0040] 在一种可选的实施方式中,在所述透镜结构层上制备阵列孔膜层之后,还包括:在所述阵列孔膜层远离所述基底层一侧的表面上以及所述纳米孔的侧壁面上形成抗非特异性吸附层,以限位所述待测荧光样品固定于所述激发区内。

[0041] 第三方面,本发明提供了一种荧光检测系统,包括:上述的荧光检测器件;以及

[0042] 显微物镜,设置在所述基底层远离所述透镜结构层的一侧,所述纳米孔内待测荧光样品发出的荧光发射光适于穿过所述显微物镜到达成像面;所述显微物镜的数值孔径范围为 0.1 - 0.8 ,放大倍数为4倍、或5倍、或10倍、或20倍;

[0043] 激发光源,设置在所述荧光检测器件的基底层远离所述透镜结构层的一侧,所述激发光源适于朝向所述基底层一侧发出激发光。

[0044] 有益效果:相较现有的采用高数值孔径物镜配合荧光检测器件进行成像观测的情况,本发明优化了荧光信号采集系统,荧光检测器件可适配的显微物镜的物镜数值孔径相比传统光学器件有所减小,为在低数值孔径物镜中采集荧光信号提供可能,使得适用成像视野更大的显微物镜,提高了并行检测的位点数目,有助于降低检测设备要求,提高经济效益。

[0045] 第四方面,本发明提供了一种荧光检测方法,应用于上述的荧光检测器件,包括如下步骤:

[0046] 在荧光检测器件纳米孔内的激发区设置捕获单元;

[0047] 向所述荧光检测器件设置所述纳米孔的一侧表面添加待测荧光样品,所述捕获单元捕获待测荧光样品至所述激发区内;

[0048] 向所述纳米孔发射激发光,以使所述激发区内的所述待测荧光样品发出荧光发射光,所述荧光发射光穿过所述透镜体从所述基底层出射到达成像面。

[0049] 有益效果:上述的荧光检测方法中,采用具有亚波长结构的纳米孔和透镜体,结合低数值孔径的显微物镜从基底层一侧,对荧光检测器件上面的具有阵列布置纳米孔的阵列孔膜层进行单分子荧光实时观察和成像,实现对外泌体单元表面跨膜蛋白与其抗体蛋白的相互作用过程的大规模并行检测。

[0050] 在一种可选的实施方式中,通过离子刻蚀的方式在所述基底层上形成多个凹槽;离子刻蚀的过程中,通过调节反应气体组分的压强、垂直方向和水平方向的刻蚀速率,以控制形成凹槽时的刻蚀角度、深度和粗糙度参数;离子刻蚀的工作气压范围为: 0.3Pa - 10Pa 。

[0051] 在一种可选的实施方式中,所述捕获单元包括:

[0052] 捕获位点数量控制层,设置在所述纳米孔的所述激发区内;

[0053] 捕获单元本体和第一抗体蛋白,所述捕获单元本体的第一端与所述捕获位点数量控制层相连接,另一端与所述第一抗体蛋白相连接。

[0054] 在一种可选的实施方式中,所述待测荧光样品包括:

[0055] 外泌体单元,所述外泌体单元包括第一跨膜蛋白和第二跨膜蛋白,所述第一跨膜蛋白适于与所述第一抗体蛋白相连接,以将所述外泌体单元固定在所述激发区内;

[0056] 第二抗体蛋白,所述第二抗体蛋白具有荧光标记且适于与所述第二跨膜蛋白相连接,以使所述第二抗体蛋白固定在所述外泌体单元上。

[0057] 在一种可选的实施方式中,向所述荧光检测器件设置所述纳米孔的一侧表面添加待测荧光样品的步骤包括:对外泌体单元的捕获和对第二抗体蛋白的捕获;对外泌体单元的捕获包括:

[0058] 将含有待检测外泌体单元的悬浮溶液滴加到具有所述捕获单元的所述荧光检测器件上;

[0059] 在温度24℃~26℃、常压环境下,蒸发部分所述悬浮溶液以使所述外泌体单元进入所述纳米孔内;

[0060] 所述外泌体单元的所述第一跨膜蛋白与所述第一抗体蛋白相结合,以使所述外泌体单元被捕获到所述纳米孔底部;

[0061] 对第二抗体蛋白的捕获包括:将含有待检测第二抗体蛋白的溶液滴加到具有所述外泌体单元的所述荧光检测器件上,所述第二抗体蛋白与所述外泌体单元的所述第二跨膜蛋白相结合。

[0062] 在一种可选的实施方式中,所述第一抗体蛋白与所述第二抗体蛋白相同,包括:抗CD9蛋白、抗CD63蛋白、抗CD81蛋白中的一种或多种。

[0063] 在一种可选的实施方式中,所述第一抗体蛋白与所述第二抗体蛋白不相同;

[0064] 所述第一抗体蛋白包括:抗CD9蛋白、抗CD63蛋白、抗CD81蛋白中的一种或多种;

[0065] 所述第二抗体蛋白包括:抗CD9蛋白、抗CD63蛋白、抗CD81蛋白中的一种或多种。

附图说明

[0066] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0067] 图1是本发明实施例的荧光检测器件的结构示意图;

[0068] 图2是本发明实施例的荧光检测器件的剖面示意图;

[0069] 图3是本发明实施例中富碳非晶硅材料的折射光谱图;

[0070] 图4是本发明实施例中富碳非晶硅透镜结构层的仿真计算示意图;

[0071] 图5是本发明实施例中荧光检测器件制备中衬底层的结构示意图;

[0072] 图6是本发明实施例中荧光检测器件制备中衬底层和透镜结构层的结构示意图;

[0073] 图7是本发明实施例中荧光检测器件制备中衬底层、透镜结构层和光学隔垫层的结构示意图;

[0074] 图8是本发明实施例中荧光检测器件制备中衬底层、透镜结构层、光学隔垫层和阵列孔膜层的结构示意图;

[0075] 图9是本发明实施例的纳米孔处捕获单元的示意图;

[0076] 图10是本发明实施例的纳米孔处捕获单元与外泌体单元结合的示意图;

[0077] 图11是本发明实施例的荧光样品未完全固定在纳米孔处时的示意图;

[0078] 图12是本发明实施例的荧光样品完全固定在纳米孔处的示意图;

[0079] 附图标记说明:

[0080] 1、基底层;11、凹槽;

[0081] 2、阵列孔膜层;21、纳米孔;211、激发区;22、抗非特异性吸附层;

[0082] 3、透镜结构层;31、透镜体;32、延伸层;

[0083] 4、光学隔垫层;

[0084] 100、荧光检测器件;200、捕获单元;201、捕获位点数量控制层;202、捕获单元本体;203、第一抗体蛋白;300、外泌体单元;301、第一跨膜蛋白;302、第二跨膜蛋白;400、第二抗体蛋白。

具体实施方式

[0085] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步的详细说明。可理解的是,此处所描述的具体实施例仅仅用于解释本发明,而非对本发明的限定。另外还需要说明的是,为了便于描述,附图中仅示出了与本发明相关的部分而非全部结构。在以下说明中,省略了对公知结构和技术的描述,以避免不必要地混淆本发明的概念。在附图中示出了根据本发明实施例的各种结构示意图。这些图并非是按比例绘制的,其中为了清楚表达的目的,放大了某些细节,并且可能省略了某些细节。图中所示出的各种区域、层的形状以及它们之间的相对大小、位置关系仅是示例性的,实际中可能由于制造公差或技术限制而有所偏差,并且本领域技术人员根据实际所需可以另外设计具有不同形状、大小、相对位置的区域/层。在本发明的上下文中,当将一层/元件称作位于另一层/元件“上”时,该层/元件可以直接位于该另一层/元件上,或者它们之间可以存在居中层/元件。另外,如果在一种朝向中一层/元件位于另一层/元件“上”,那么当调转朝向时,该层/元件可以位于该另一层/元件“下”。

[0086] 荧光检测相关的技术中,单分子荧光检测技术由于其能够反映单个分子的动态特性而成为当前的研究热点。但是在基于显微成像系统的单分子荧光检测中,单分子荧光本身发射的光子数量极少,且在全空间发生散射,使得低数值孔径的成像系统采集到的信号中的高频信息极易丢失,进而造成成像不完整甚至根本无法成像。但若要保证成像范围内荧光信号的强度,则需要采用高数值孔径的物镜,但这又导致相应的成像视野变小,导致同时并行检测的单分子位点的数目受到限制,影响到检测通量的提升,进而影响检测的准确性。

[0087] 因此,本发明实施例提供了一种荧光检测器件100,通过阵列孔膜层2上亚波长结构的纳米孔21和富碳非晶硅材料制成的透镜结构层3的透镜体31相结合,以达到极具有高通量又兼具高成像质量的检测效果,提高检测准确性。

[0088] 本发明实施例提供的一种荧光检测器件100,如图1和图2所示,包括:

[0089] 基底层1、阵列孔膜层2和透镜结构层3,其中,基底层1上开设有多个凹槽11,阵列孔膜层2上设置有多个纳米孔21,纳米孔21的直径小于激发光的波长,以使来自基底层1一侧的激发光限于纳米孔21内靠近基底层1一端的底部激发区211内;激发区211内适于设置捕获单元200,以将待测荧光样品固定于激发区211内;透镜结构层3设置在基底层1和阵列孔膜层2之间,透镜结构层3为富碳非晶硅,包括多个透镜体31,透镜体31设置于凹槽11内且与纳米孔21一一对应,透镜体31适于会聚来自纳米孔21内待测荧光样品发出的荧光发射光。

[0090] 具体地,如图2所示,来自基底层1一侧的激发光自下而上依次穿过基底层1、透镜结构层3到达阵列孔膜层2的纳米孔21内,由于纳米孔21的直径小于激发光的波长,呈现为亚波长结构,激发光在纳米孔21内不存在完整波长的传输,使得到达纳米孔21的激发光不能完全穿过纳米孔21;沿着纳米孔21的轴线,激发光的光强呈指数衰减,并在纳米孔21的底部形成适合单分子激发的有效激发区211。激发区211内的单分子待测荧光样品被激发后发出荧光发射光,荧光发射光经过透镜结构层3透镜体31的会聚引导后穿过基底层1,在外部的成像面上形成单分子的荧光图像。

[0091] 亚波长结构的纳米孔21使得激发光无法到达纳米孔21激发区211域以外,因而位于激发区211域以外的荧光样品不能被激发发出荧光,降低了背景噪声,增强了荧光信号强度;此外,透镜结构层3由高折射率的富碳非晶硅材料制成,透镜体31能够会聚引导荧光发射光,大大增强对荧光信号的采集效率,提高了单分子荧光检测的信噪比,保证较高的成像质量。因此,亚波长的纳米孔21搭配具有会聚引导荧光发射光作用的高折射率的透镜体31,既能够保证成像面上并行检测样品的数量,实现高检测通量,同时也增强了每一待检测样品的荧光信号的强度,提高单分子并行检测的成像质量,进而保证单分子荧光大规模并行检测的准确性。

[0092] 上述的荧光检测器件100中,基底层1上的多个凹槽11呈阵列式布置,凹槽11的数量根据荧光并行检测规模的需求来确定;相对应地,透镜结构层3的多个透镜体31成型在凹槽11中,阵列孔膜层2上的多个纳米孔21与透镜体31一一对应地开设,以使得激发光能够最大程度地到达纳米孔21的激发区211,保证激发区211内由捕获单元200固定的待测荧光样品被充分激发发出荧光发射光,实现对待测荧光样品的单分子荧光大规模并行检测。

[0093] 在本实施例中,作为一种可选的实施方式,上述的透镜体31可以为回转体或棱台结构,且沿透镜体31的轴线方向即在竖直方向上,透镜体31自远离基底层1一侧向靠近基底层1一侧的截面尺寸逐渐减小;透镜体31在轴线方向上的截面形状可以为抛物线形,抛物线的开口向上,截面形状的轮廓包括曲线部分和直线部分,曲线部分上的点的坐标满足抛物线公式: $x^2 = 4py$,焦点为(0,p);在透镜体31相对远离基底层1的方向上,纳米孔21靠近基底层1的一端的中心点与曲线部分焦点之间的距离为 $0.5\mu\text{m}$ 。

[0094] 具体而言,透镜体31以回转体或者棱台结构成型于基底层1的凹槽11内,透镜体31的竖直截面形状如图2所示,截面形状为开口向上的抛物线形,由下方的曲线部分和上方的直线部分组成,下方曲面部分的外周尺寸变化平缓,结构稳定;透镜体31的竖直尺寸需要保证成型在其上方的纳米孔21的底端中心点位于曲线部分焦点向上偏移 $0.5\mu\text{m}$ 处,该偏移能够避免在纳米孔21底部的中心点位于焦点时,待测荧光样品所产生的荧光发射光在透镜体31内部发生全反射谐振干涉的现象,保证荧光发射光的发射强度,提高成像质量。

[0095] 当然,作为另外可选的实施方式,透镜体31可以设置为回转体或棱台结构,且沿透镜体31的轴线方向,透镜体31远离基底层1一侧的截面尺寸大于靠近基底层1一侧的截面尺寸;即透镜体31在轴线方向上的截面形状可以设置为抛物线形的拟合图形,诸如梯形、多级台阶形、圆弧形或者双曲线型等,只要能够保证在透镜体31相对远离基底层1的方向上,纳米孔21靠近基底层1的一端的中心点与曲线部分焦点之间的距离为 $0.5\mu\text{m}$ 即可,避免待测荧光样品所产生的荧光发射光在透镜体31内部发生全反射谐振干涉,保证荧光发射光的发光强度,提高成像质量。

[0096] 在一个实施例中,透镜结构层3还可以包括:由透镜体31靠近阵列孔膜层2的一端向外延伸成型的延伸层32,延伸层32连接多个透镜体31并贴覆于基底层1表面,与基底层1表面的大小相等,水平一体设置的延伸层32有助于保证透镜结构层3上表面的平整性,便于上方其他结构层的沉积,同时不同厚度的延伸层32也能够便于调节纳米孔21底部与透镜体31截面形状焦点之间 $0.5\mu\text{m}$ 的距离。

[0097] 当然,透镜结构层3也可以只包括设置在基底层1凹槽11内的多个透镜体31,不包括连通多个透镜体31贴覆于基底层1上表面的延伸层32。

[0098] 透镜体31材料的介电常数和磁导率决定了荧光与其之间相互作用,由于透镜体31的介电常数和磁导率与其他光学层不相同,荧光发射光在透镜体31的光速与其他光学层不同、走的光程也不同,所以能够引导荧光发射光的传播方向。

[0099] 本实施例中,为保证荧光信号采集的保真度,上述的透镜结构层3选用光学各向同性的富碳非晶硅材料,折射率范围为2.3-3.1;基底层1为光学各向同性的石英材料。光学各向同性是指材料的密度、折射率、消光系数、透射率在各个方向上均相等,材料的各区域之间也均相等。

[0100] 具体地,透镜体31的数值孔径计算公式为 $NA = n\sin\theta$,其中NA是数值孔径,n是透镜体31所采用材料的折射率, θ 是孔径角的一半大小。本实施例中采用的富碳非晶硅具有高折射率,实际制备的富碳非晶硅的可见光波段的折射率光谱如图3所示;透镜体31的焦点位置决定了孔径角。上述富碳非晶硅材料制成的透镜体31的折射率和孔径角决定了透镜体31的数值孔径。因此,本实施例中的荧光检测器件100可以实现的最大孔径角,即光束与纳米孔21轴线方向的夹角的锐角为 80° ,计算可得透镜体31的数值孔径范围为2.3-3。如图4所示的透镜体31的仿真计算显示,荧光发射光穿过透镜体31之后,荧光发射光的发散角较小,极大地提高了对纳米孔21底部荧光发射光的收集效率,相较现有的采用高数值孔径物镜进行成像观测的情况,本实施例优化了荧光信号采集系统,透镜体31的设置为在低数值孔径物镜中采集荧光信号提供可能,有助于降低检测设备要求,提高经济效益。

[0101] 可以知道的是,待测荧光样品的激发光波段范围应当与透镜体31的透射光谱相匹配。本实施例中,透镜体31为富碳非晶硅材料时,待测荧光样品的激发光波段范围为360nm-500nm,发射光波段范围为550nm-800nm,以保证透镜体31能够对荧光发射光实现良好的会聚引导作用,保证足够光强的荧光发射光到达成像面成像。

[0102] 本实施例中,纳米孔21的直径尺寸范围设置为:50nm-500nm,其径向尺寸接近或小于激发光的波长,使得纳米孔21形成为亚波长结构,激发光在纳米孔21内不存在完整波长的传输,使得到达纳米孔21的激发光不能完全穿过纳米孔21;沿着纳米孔21的轴线,激发光的光强呈指数衰减,并在纳米孔21的底部形成适合单分子激发的高度范围为20nm-30nm的有效激发区211,便于集中激发待测荧光样品,降低背景噪声,大大提高了单分子荧光检测的信噪比。

[0103] 具体地,纳米孔21和透镜体31一一对应,单个荧光检测器件100上纳米孔21和透镜体31在本实施例中的数量范围为 $10^3 \sim 8 \times 10^7$,比如1000、10000、150000、1000000、8000000等,这些单独对应的纳米孔21和透镜体31彼此之间功能相互独立,作为单独的检测位点;多个检测位点共同实现对待测荧光样品的单分子荧光并行检测,检测效率高,准确度高。

[0104] 在一个实施例中,荧光检测器件100在阵列孔膜层2与透镜结构层3之间还可以设置光学隔垫层4,用以调控纳米孔21靠近基底层一端的中心点,即纳米孔21底部中心与透镜体31焦点之间的相互位置关系,使纳米孔21底部中心的坐标位于 $(0, p+500)$ 。本实施例中,光学隔垫层4选用二氧化硅,材料性质稳定易获得,相较于制备阵列孔膜层2时精准控制纳米孔21底部的位置,设置光学隔垫层4调整纳米孔21底部中心的位置更加便捷,制备难度也更低。

[0105] 本实施例中,上述的阵列孔膜层2的厚度范围为50nm-200nm;光学隔垫层4的厚度范围为10nm-500nm;透镜结构层3的厚度范围为 $1\mu\text{m}$ - $5\mu\text{m}$ 。当然,需保证纳米孔21底部中心与透镜体31焦点之间的距离为 $0.5\mu\text{m}$ 。

[0106] 在一个实施例中,如图9至图12所示,阵列孔膜层2还可以包括抗非特异性吸附层22,设置在阵列孔膜层2远离基底层1一侧的表面上以及纳米孔21的侧壁面,抗非特异性吸附层22适于限位待测荧光样品固定于激发区211内。抗非特异性吸附层22能够防止待检测的荧光样品,比如蛋白质、荧光团等与阵列孔膜层2之间发生特异性吸附,达到减少背景噪声强度的目的,进而提高荧光信噪比。

[0107] 本实施例中,阵列孔膜层2设置为金属膜层,当阵列孔膜层2为金时,则抗非特异性吸附层22选用巯基-聚乙二醇(HS-PEG);或者,当阵列孔膜层2为铝或氧化铝时,则抗非特异性吸附层22为聚乙烯磷酸(PVPA),保证抗非特异性吸附性能。

[0108] 本实施例还提供了一种荧光检测器件的制备方法,用于制备上述的荧光检测器件100,包括如下步骤:

[0109] S101,如图5所示,提供基底层1,在基底层1上形成多个凹槽11。

[0110] 基底层1选用光学上各向同性、光学特性呈线性的石英材料,材料简单易获得,性质稳定。

[0111] 清洗基底层1,并在基底层1上表面旋涂紫外光刻胶,进行烘干,随后通过紫外光刻在紫外光刻胶上形成制备凹槽11的图案,进行后续烘干。之后,以具有凹槽11的图案的光刻胶层作为掩模,通过离子刻蚀的方式在基底层1上加工成型阵列排布的多个凹槽11;刻蚀完成后采用氧气等离子体去除紫外光刻胶,并进行清洗。

[0112] S102,如图6所示,在基底层1形成凹槽11的一侧制备透镜结构层3,并在凹槽11内形成透镜体31,透镜结构层3为富碳非晶硅。使用等离子体化学气相沉积,在基底层1上沉积富碳非晶硅材料的薄膜作为透镜结构层3,并在凹槽11内形成透镜体31,实现光学各向同性并且高折射率的富碳非晶硅的透镜结构层3的制备。透镜结构层3包括:透镜体31和由透镜体31靠近阵列孔膜层2的一端向外延伸成型的延伸层32,延伸层32连接多个透镜体31并贴覆于基底层1表面,与基底层1表面的大小相等,水平一体设置的延伸层32有助于保证透镜结构层3上表面的平整性,便于上方其他结构层的沉积,同时不同厚度的延伸层32也能够便于调节纳米孔21底部与透镜体31截面图形焦点之间 $0.5\mu\text{m}$ 的距离。

[0113] 此外,进一步使用化学机械抛光,去除富碳非晶硅薄膜中高出目标厚度的起伏部分,保证基底层1设置透镜结构层3一侧表面的平坦,便于进行后续工艺,减小材料表面粗糙度,进而减小了其造成的器件光损耗。

[0114] S103,如图8所示,在透镜结构层3上制备阵列孔膜层2,并在阵列孔膜层2上刻蚀纳米孔21,纳米孔21与所述透镜体31一一对应;纳米孔21的直径小于激发光的波长,以使来自

基底层1一侧的激发光限于纳米孔21内靠近基底层1一端的底部激发区211内;在激发区211内设置捕获单元200以将荧光样品固定于激发区211内。

[0115] 使用电子束蒸镀沉积金属薄膜构成的阵列孔膜层2,金属薄膜的厚度范围50nm-200nm,并通过刻蚀在与透镜体31相对应的位置上形成贯穿阵列孔膜层2、直径在50nm-500nm之间的多个纳米孔21,纳米孔21的直径应当接近或小于激发光的波长。

[0116] 上述的制备方法实现了亚波长纳米孔21和富碳非晶硅透镜体31的加工成型,荧光检测器件100化学表面平坦,为后面电子束光刻工艺的实现提供了可能,解决了此类立体结构、纳米-微米嵌套结构的跨尺度工艺性兼容性的问题,具备批量制备条件,有助于实现大量单分子荧光并行检测,保证检测准确性。

[0117] 具体地,采用离子刻蚀的方式实现在基底层1上形成多个凹槽11;离子刻蚀的过程中,通过调节反应气体组分的压强、垂直方向和水平方向的刻蚀速率,以控制凹槽11的刻蚀角度、深度、粗糙度参数。低气压下,离子的作用以物理溅射轰击基底层1为主,横向刻蚀降低,使刻蚀的各向异性度增强;高压下,化学反应刻蚀占主导地位,刻蚀趋于各向同性,横向刻蚀增强。而凹槽11的倾斜角度刻蚀,需要平衡各向异性度和各向同性度,因此需要最佳工作气压范围为0.3Pa-10Pa,该气压条件下,既可以实现倾斜角度刻蚀,又能获得理想的刻蚀深度和表面粗糙度。

[0118] 在一个实施例中,如图7所示,在透镜结构层3上制备阵列孔膜层2之前,还包括:在透镜结构层3上制备光学隔垫层4,通过设置不同厚度的光学隔垫层4来调节阵列孔膜层2与透镜结构层3之间的距离,进而调整纳米孔21靠近基底层1一端的中心点的位置;光学隔垫层4的厚度范围为0.01 μ m-0.5 μ m。

[0119] 使用等离子体化学气相沉积二氧化硅薄膜作为光学隔垫层4,用以调控纳米孔21底部中心与透镜体31焦点之间的相互位置关系,使纳米孔21底部中心的坐标位于(0, p+500)。二氧化硅材料性质稳定易获得,相较于制备阵列孔膜层2时精准控制纳米孔21底部的位置,设置光学隔垫层4调整纳米孔21底部中心的位置更加便捷,制备难度也更低。

[0120] 在一个实施例中,在透镜结构层3上制备阵列孔膜层2之后,还包括:在阵列孔膜层2远离基底层1一侧的表面上以及纳米孔21的侧壁面上形成抗非特异性吸附层22,以限位待测荧光样品固定于激发区211内。抗非特异性吸附层22能够防止待测荧光样品,比如蛋白质、荧光团等与阵列孔膜层2之间发生特异性吸附,达到减少背景噪声强度的目的,进而提高荧光信噪比。

[0121] 当阵列孔膜层2为金时,则抗非特异性吸附层22选用巯基-聚乙二醇(HS-PEG);或者,当阵列孔膜层2为铝或氧化铝时,则抗非特异性吸附层22为聚乙烯膦酸(PVPA),保证抗非特异性吸附性能。

[0122] 本发明的实施例还提供一种荧光检测系统,包括上述的荧光检测器件100,以及显微物镜和激发光源,显微物镜设置在基底层1远离透镜结构层3的一侧,纳米孔21内待测荧光样品发出的荧光发射光适于穿过显微物镜到达成像面;上述的荧光检测器件100为在低数值孔径物镜中采集荧光信号提供可能,即显微物镜可以选择数值孔径范围在0.1-0.8之间,放大倍数为4倍、或5倍、或10倍、或20倍的;激发光源设置在荧光检测器件100的基底层1远离透镜结构层3的一侧,激发光源适于朝向基底层1一侧发出激发光,激发光穿过基底层1、透镜结构层3到达纳米孔21的激发区211内,以激发待测荧光样品使其发出荧光发射光。

[0123] 相较现有的采用高数值孔径物镜配合荧光检测器件100进行成像观测的情况,本实施例优化了荧光信号采集系统,荧光检测器件100可适配的显微物镜的物镜数值孔径相比传统光学器件有所减小,为在低数值孔径物镜中采集荧光信号提供可能,使得适用成像视野更大的显微物镜,提高了并行检测的位点数目,有助于降低检测设备要求,提高经济效益。

[0124] 本发明的实施例还提供一种荧光检测方法,如图9至图12所示,采用上述的荧光检测器件100或包括荧光检测器件100的荧光检测系统,包括如下步骤:

[0125] S201,在荧光检测器件100的纳米孔21内的激发区211设置捕获单元200。

[0126] S202,向荧光检测器件100设置纳米孔21的一侧表面添加待测荧光样品,捕获单元200捕获待测荧光样品至激发区211内。

[0127] 所述荧光检测器件100的阵列孔膜层2上表面和纳米孔21侧壁面上设置有抗非特异性吸附层22,纳米孔21底部的激发区211内设置有捕获单元200,捕获单元200能够将待测荧光样品捕获固定在纳米孔21的激发区211内。

[0128] S203,向纳米孔21发射激发光,以使激发区211内的荧光样品发出荧光发射光,荧光发射光穿过透镜体31从基底层1出射到达成像面。

[0129] 多个纳米孔21均受到激发光照射,由于纳米孔21为亚波长结构,激发光只能到达纳米孔21底部的激发区211内,使得激发区211内被捕获单元200捕获到的待测荧光样品受到激发光的激发,而发出荧光发射光,荧光发射光进而向下经过透镜体31的会聚引导到达基底层1下方的成像面上,工作人员对成像面上的荧光图像进行观测,实现对单分子荧光大规模的并行检测。

[0130] 具体本实施例中,捕获单元200包括:捕获位点数量控制层201、捕获单元本体202和第一抗体蛋白203,捕获位点数量控制层201设置在纳米孔21的激发区211内;捕获单元本体202的第一端与捕获位点数量控制层201相连接,另一端与第一抗体蛋白203相连接。

[0131] 捕获位点数量控制层201的材料为聚乙二醇衍生物(mPEG);捕获单元本体202的材料为硅烷-聚乙二醇-羟基丁二酰亚胺(Silane-PEG-NHS),捕获单元本体202通过硅烷-聚乙二醇-羟基丁二酰亚胺分子的硅烷基团固定在纳米孔21底部的捕获位点数量控制层201上。捕获单元本体202上面的羟基丁二酰亚胺的伯胺基团与第一抗体蛋白203上面的氨基发生反应结合,进而将第一抗体蛋白203固定在纳米孔21内。

[0132] 进一步地,本实施例中待测荧光样品包括:外泌体单元300和第二抗体蛋白400,外泌体单元300包括第一跨膜蛋白301和第二跨膜蛋白302,第一跨膜蛋白301适于与第一抗体蛋白203相连接,以将外泌体单元300固定在激发区211内;第二抗体蛋白400具有荧光标记且适于与第二跨膜蛋白302相连接,以使第二抗体蛋白400固定在外泌体单元300上。

[0133] 具体地,向荧光检测器件100设置纳米孔21的一侧表面添加待测荧光样品的步骤,即对待测荧光样品的捕获包括对外泌体单元的捕获和对第二抗体蛋白的捕获。

[0134] 将外泌体单元300捕获到纳米孔21底部激发区211的步骤为:首先,将含有待检测外泌体单元300的悬浮溶液滴加到上述处理好的荧光检测器件100的纳米孔21区域表面上。在温度24℃~26℃即25℃±1℃的室温、常压环境下,自然蒸发掉一部分溶液,溶液中的外泌体单元300在水动力的作用下进入纳米孔21,使荧光检测器件100纳米孔21区域表面上仅剩一层溶液薄膜,实现对外泌体单元300悬浮液的富集,提高外泌体单元300进入纳米孔21的

比例;如图10所示,进入纳米孔21内的外泌体单元300,通过其表面的第一跨膜蛋白301与纳米孔21底部事先设置的捕获单元200的第一抗体蛋白203特异性结合,而被捕获到纳米孔21底部的激发区211内。

[0135] 在完成对外泌体单元300的捕获处理之后,对第二抗体蛋白400的捕获包括:如图11所示,加入含有带有荧光标记的第二抗体蛋白400的溶液;如图12所示,加入到溶液中的带有荧光标记的第二抗体蛋白400,与已经捕获到纳米孔21底部的外泌体单元300表面的第二跨膜蛋白302发生相互作用。

[0136] 使用低数值孔径的显微物镜从基底层1一侧对荧光检测器件100上面的具有阵列布置纳米孔21的阵列孔膜层2进行单分子荧光实时成像和观察,实现对外泌体单元300表面跨膜蛋白与其抗体蛋白的相互作用过程的大规模并行检测。

[0137] 一种发光波段的荧光染料分子只标记一种抗体蛋白,这样,能够实现多种抗体蛋白的组合同时与外泌体单元300表面多种跨膜蛋白相互作用的并行检测。用于荧光标记的荧光染料的激发发射特性与透镜体31的材料透射光谱相匹配。透镜体31的材料为富碳非晶硅时,荧光染料的激发光波段范围为360nm-500nm,发射光波段范围为550nm-800nm。

[0138] 本实施例中,第一抗体蛋白203包括:抗CD9蛋白、抗CD63蛋白、抗CD81蛋白中的一种或多种。

[0139] 加入的标记有荧光分子的第二抗体蛋白400包括:抗CD9蛋白、抗CD63蛋白、抗CD81蛋白中的一种或多种。需要说明的是,第二抗体蛋白400可以与或者不与第一抗体蛋白203相同。

[0140] 在以上的描述中,对于各层的构图、刻蚀等技术细节并没有做出详细的说明。但是本领域技术人员应当理解,可以通过各种技术手段,来形成所需形状的层、区域等。另外,为了形成同一结构,本领域技术人员还可以设计出与以上描述的方法并不完全相同的方法。另外,尽管在以上分别描述了各实施例,但是这并不意味着各个实施例中的措施不能有利地结合使用。

[0141] 虽然结合附图描述了本发明的实施例,但是本领域技术人员可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下做出各种修改和变型,这样的修改和变型均落入由所附权利要求所限定的范围之内。

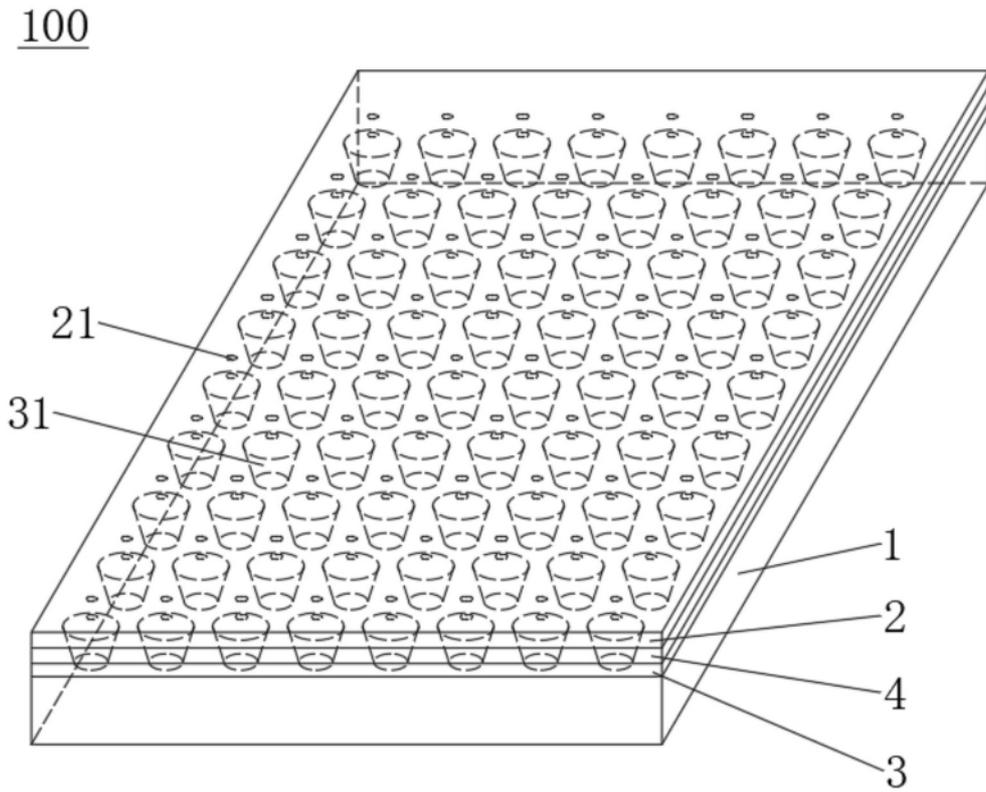


图1

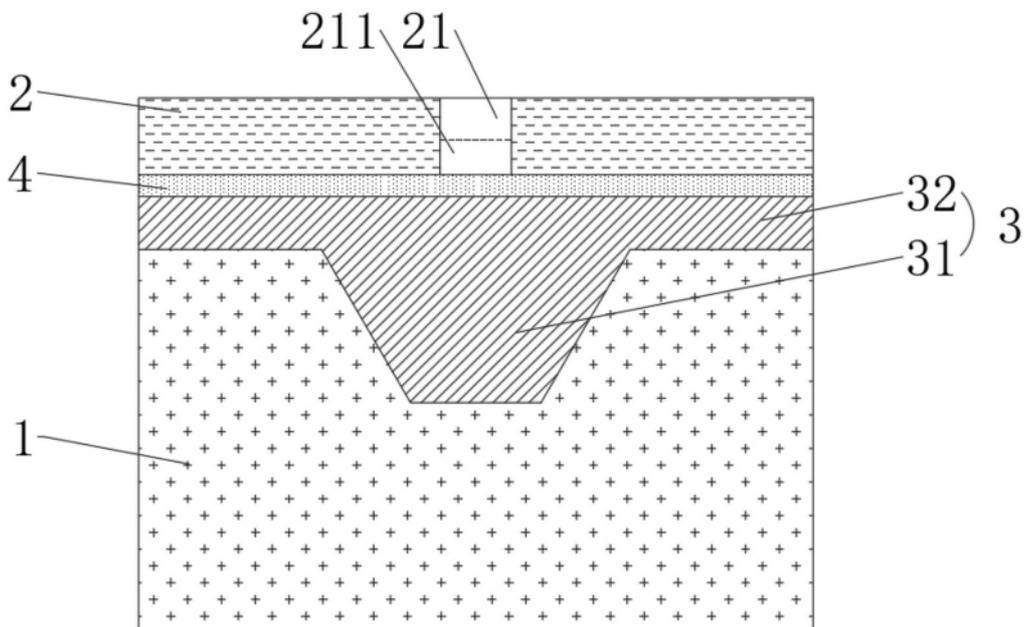


图2

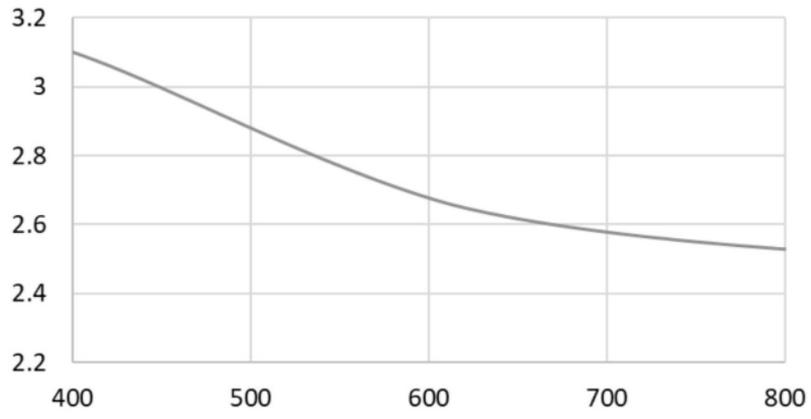


图3



图4

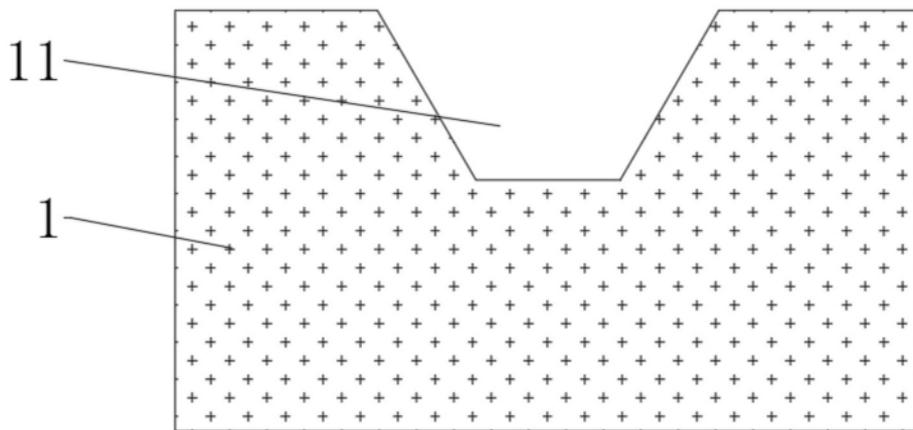


图5

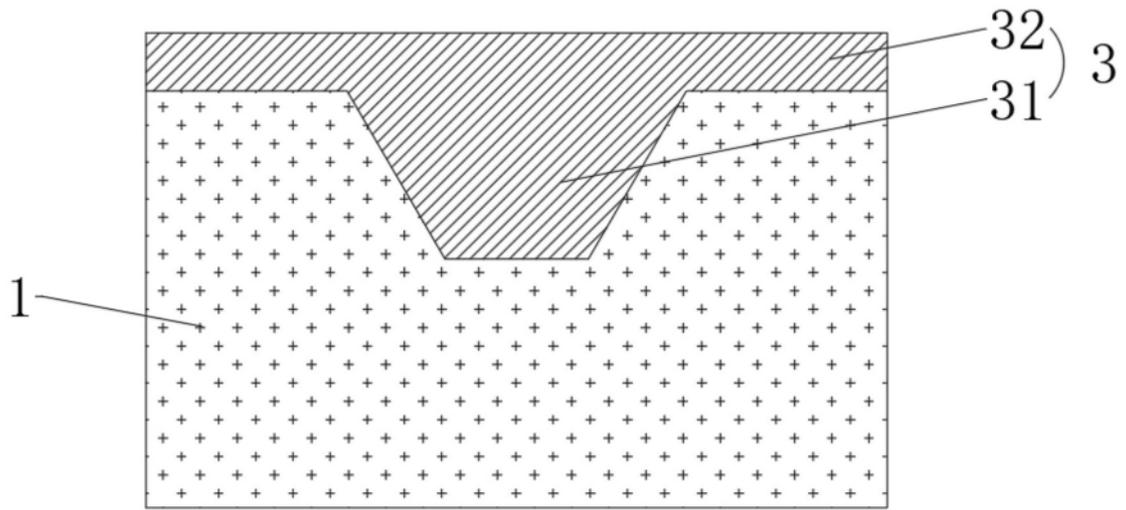


图6

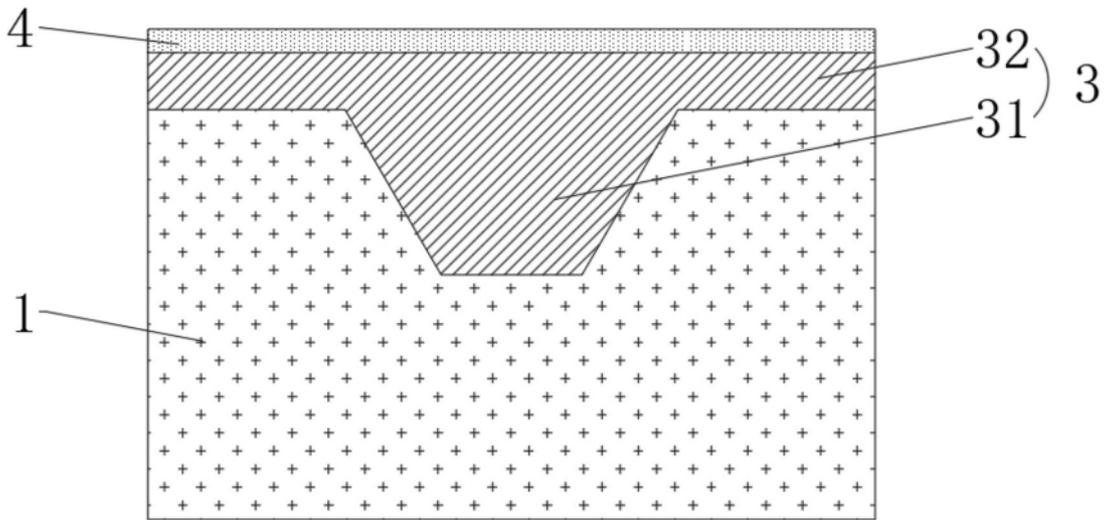


图7

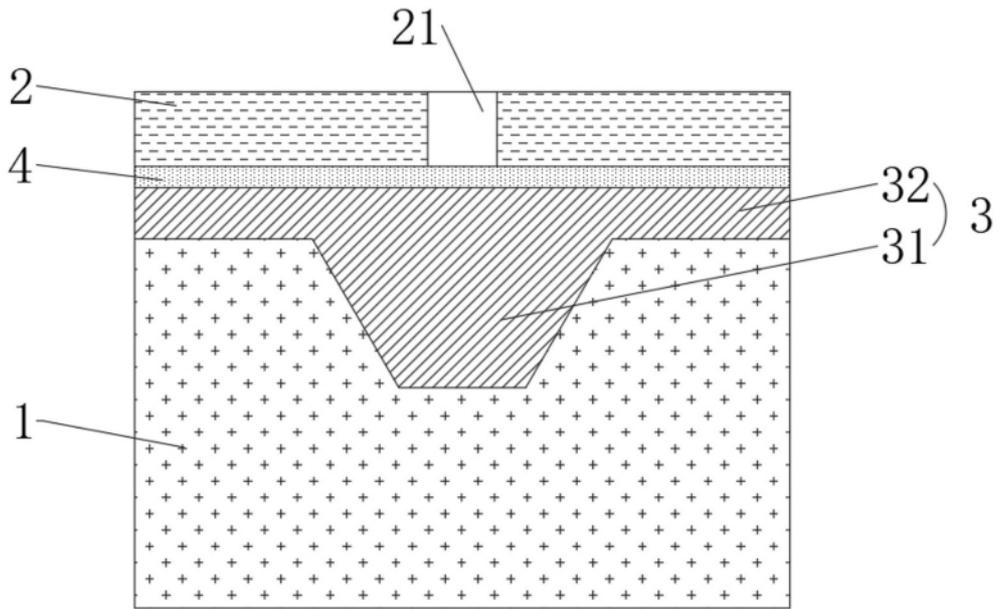


图8

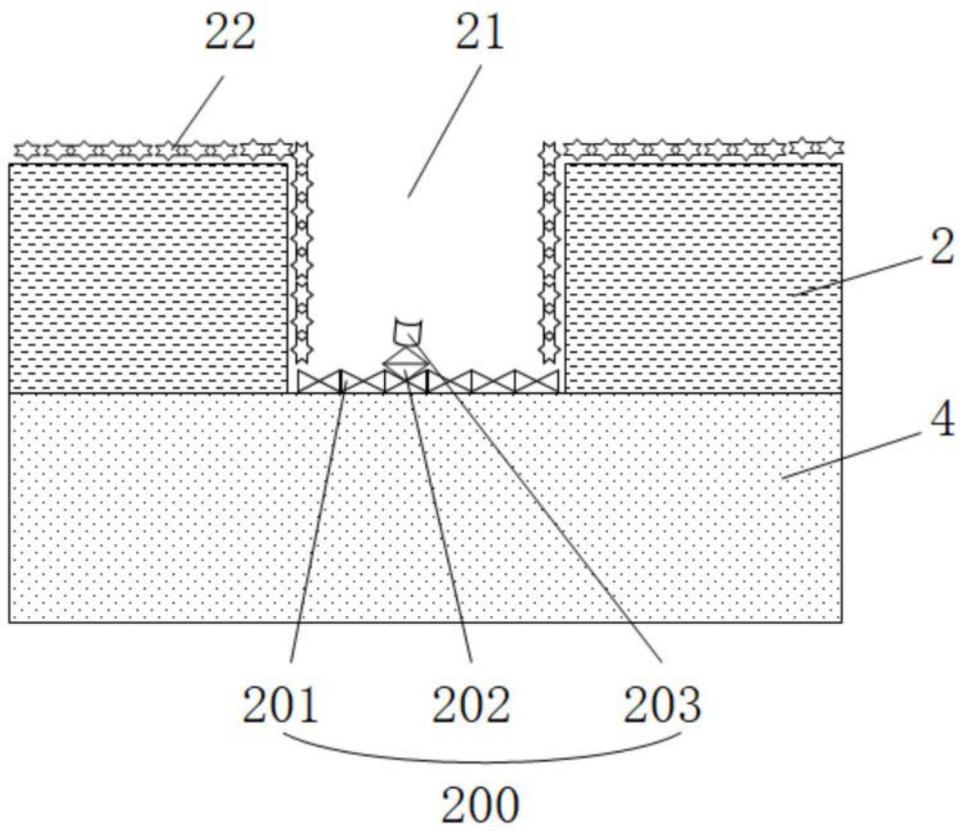


图9

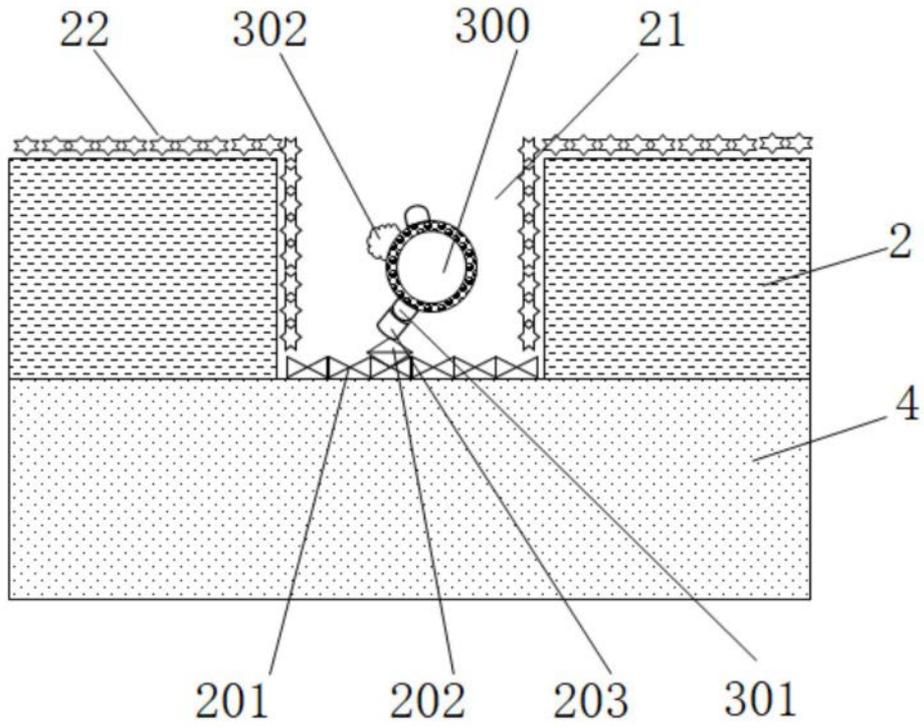


图10

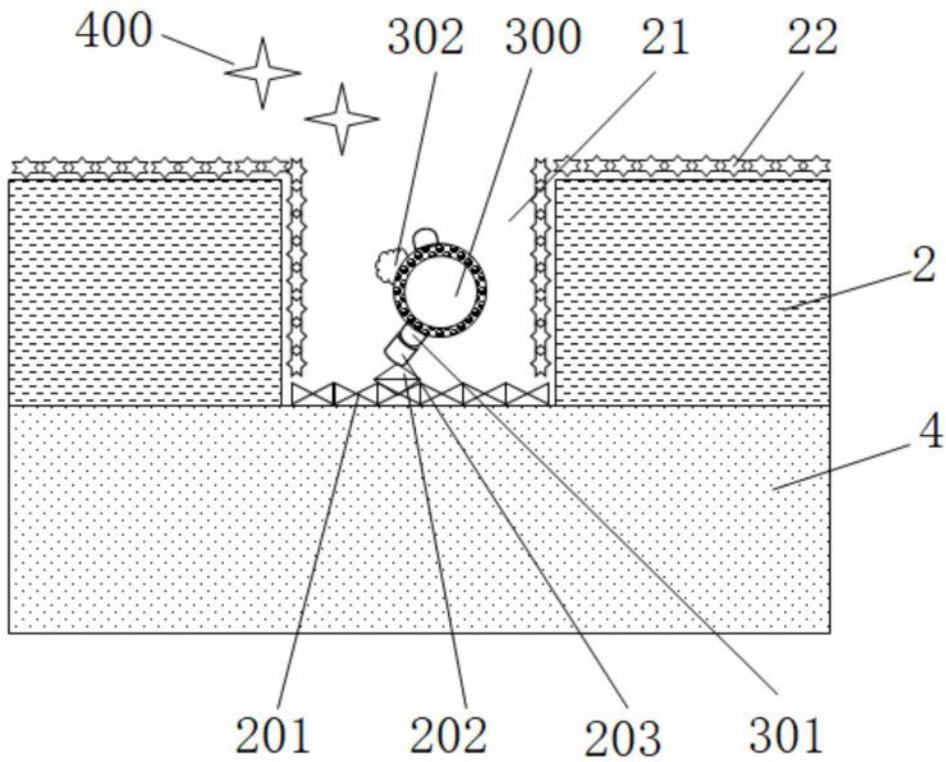


图11

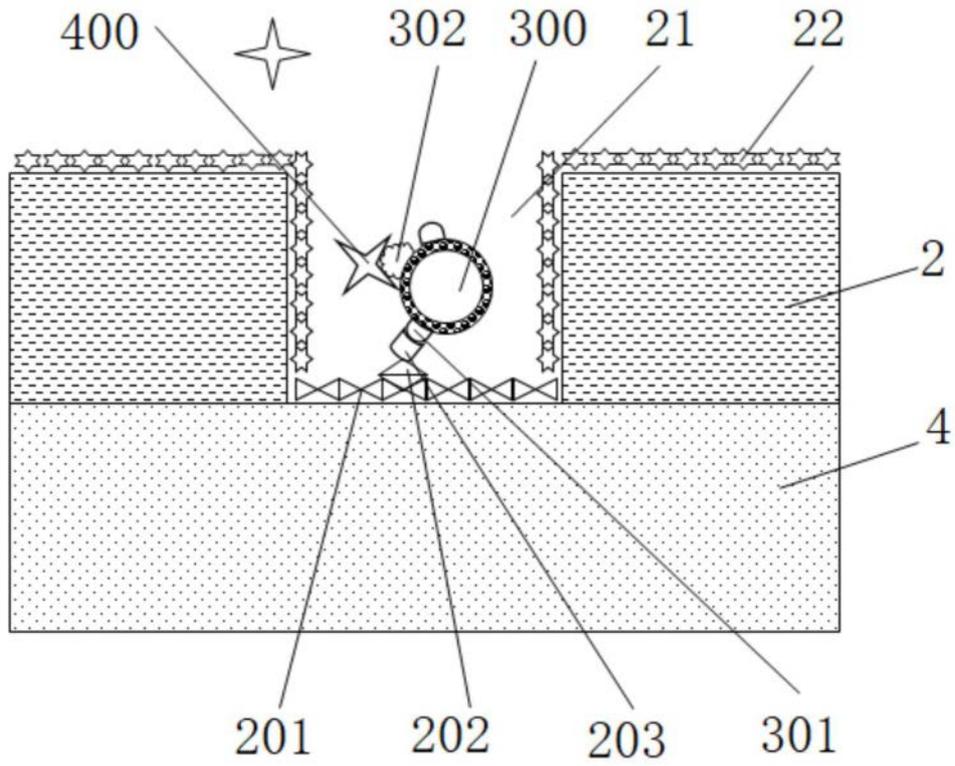


图12