

文章编号: 0258-7025(2004)06-0718-05

# 多探头光纤倏逝波生物传感器 及其性能研究

黄惠杰<sup>1</sup>, 翟俊辉<sup>2</sup>, 赵永凯<sup>1</sup>, 杨瑞馥<sup>2</sup>, 任冰强<sup>1</sup>, 程兆谷<sup>1</sup>, 杜龙龙<sup>1</sup>, 路敦武<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院上海光学精密机械研究所, 上海 201800; <sup>2</sup> 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

**摘要** 利用光纤倏逝波原理,以输出波长为 635 nm 的半导体激光器为光源,研制成功一台具有 5 个探头的光纤生物传感器。该传感器 5 个光纤探头对纯净 Cy5 荧光染料溶液的检测灵敏度均达 0.01 nmol/L,在同一浓度下信噪比的相对标准偏差小于 10%,5 个探头的信噪比曲线几乎重合,且与商品化生物芯片扫描仪同时检测得到的结果一致;检测到了抗原抗体特异性反应的动态过程。本传感器具有较高的检测灵敏度、良好的响应一致性和生物特异性,可用于多重生物物质的检测。

**关键词** 传感器技术;光学计量;生物传感器;倏逝波;蛋白质;实时荧光检测

**中图分类号** TP 212.14 **文献标识码** A

## Multi-Probe Fiber-Optic Evanescent Wave Biosensor and Its Characterization

HUANG Hui-jie<sup>1</sup>, ZHAI Jun-hui<sup>2</sup>, ZHAO Yong-kai<sup>1</sup>, YANG Rui-fu<sup>2</sup>  
REN Bing-qiang<sup>1</sup>, CHENG Zhao-gu<sup>1</sup>, DU Long-long<sup>1</sup>, LU Dun-wu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)  
(<sup>2</sup> Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

**Abstract** A multi-probe fiber-optic evanescent wave biosensor has been developed based on the principle of evanescent wave while light propagates along optical fiber. A laser diode at 635 nm wavelength is used as the light source. The biosensor can interrogate five individual fibers at one time. Thus assays for five separate analytes can be conducted on the same sample. For all the five fibers, sensitivity limit of 0.01 nmol/L is obtained from the detection of Cy5 serial solutions with various concentrations. The response curves of five fibers have good consistency, the relative standard deviation is less than 10%. All the results are comparable with those that are obtained by a commercial biochip scanner. Real-time fluorescence of human IgG binding to goat anti-body IgG antibody immobilized on fiber core has been successfully detected.

**Key words** sensor technology; optical metrology; biosensor; evanescent wave; protein; real-time fluorescence detection

## 1 引 言

光纤倏逝波生物传感器以光纤和光电转换器件为主要转换元件,采用光波在光纤内以全反射方式传输时产生的倏逝波激发光纤纤芯表面标记在待测生物分子上的荧光染料,从而检测通过特异性反应而附着于纤芯表面倏逝波场范围内的生物物质的属

性及其含量<sup>[1,2]</sup>。

通常倏逝波场的穿透深度只有波长量级<sup>[3]</sup>,所以光纤倏逝波生物传感器只能探测到结合于倏逝波场范围内的荧光染料发出的荧光,而溶液中游离的荧光染料对测量结果无贡献。因此,与其他生物检测手段相比,光纤倏逝波生物传感器具有如下优点: 1) 灵敏度高,生物特异性强; 2) 操作简单,测量速

收稿日期:2003-02-19; 收到修改稿日期:2003-12-01

作者简介:黄惠杰(1966—),男,中国科学院上海光学精密机械研究所研究员,硕士,主要从事光学仪器与设备的研究与开发。E-mail:ldwsiofm@mail.shenc.ac.cn

度快;3)可以对生物反应的动态过程进行监测,即在特异性生物反应过程中进行荧光检测;4)整机可以小型化。光纤倏逝波生物传感器的这些特点使其在生物医学研究、食品检验、环境监测、生物战剂探测等需要迅速得出结果并及时采取应对措施领域得到广泛应用<sup>[4~6]</sup>。

作者曾研制成功了单探头光纤倏逝波生物传感器,该传感器具有较高的检测灵敏度、线性响应特性和生物特异性<sup>[7,8]</sup>。但由于该传感器只有1个光纤探头,一次只能检测样品中的一种生物物质。而一个样品中可能含有多种生物物质,如人体血液中可能含有多种病原体,环境中存在多种污染物,战场上同时施放了几种生物武器。如果要探测样品中的多种生物物质,单探头光纤倏逝波生物传感器必须更换光纤,致使操作繁琐,检测效率较低。而多探头光纤倏逝波生物传感器一次可以检测一个样品中的多种生物物质,检测效率高,所需样品量少,可满足某些特殊场合快速检测多种生物物质的需要。

## 2 传感器工作原理与结构

### 2.1 原理

如图1所示,本传感器中所用的光纤分为两段:敏感段和传输段。敏感段无包层,只有纤芯,纤芯与待测样品溶液构成全反射界面。测量时,纤芯表面固定生物识别分子。传输段保留包层,其作用是传递光信号,便于光纤夹持。当标记了荧光染料的待测生物分子与生物识别分子发生特异性反应时,荧

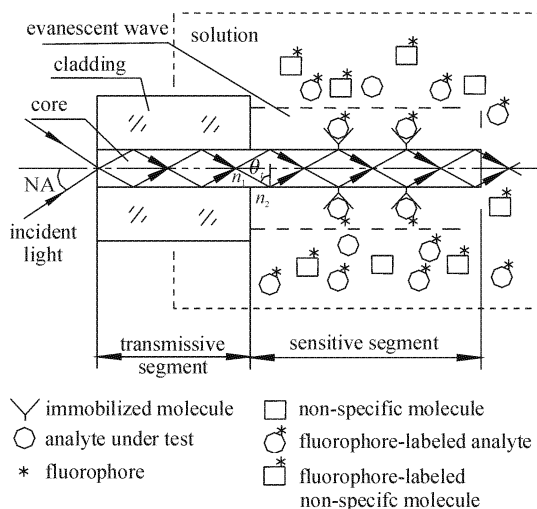


图1 光纤倏逝波生物传感器原理图  
Fig.1 Principle illustration of the fiber-optic evanescent wave biosensor

光染料就随之固定于纤芯表面,所以能否激发出荧光信号及激发出的荧光信号的强度就代表了待测生物量的有无及含量。而溶液中与固定在纤芯表面的生物识别分子无特异性反应的生物物质,不会结合到纤芯表面,因此即使这些非特异性生物物质标记了荧光染料,也不会对测量结果有影响。

多探头光纤倏逝波生物传感器中每个光纤探头的敏感段表面固定不同的生物识别分子,并置于同一个样品溶液中,所以可同时检测样品溶液中的多种生物物质。

倏逝波场的穿透深度  $z_0$  由下式计算<sup>[3]</sup>

$$z_0 = \frac{n}{k_2 \sqrt{\sin^2 \theta_1 - n^2}} \quad (1)$$

式中  $n = n_2/n_1$ ,  $n_1$  和  $n_2$  分别为纤芯和样品溶液的折射率;  $k_2 = 2\pi/\lambda_2 = 2n_2\pi/\lambda$ ,  $\lambda$  为激光波长;  $\theta_1$  为光线从纤芯射向样品溶液的入射角,它对  $z_0$  影响极大。 $\theta_1$  越接近全反射临界角,则  $z_0$  越大。随着  $\theta_1$  的取值不同,  $z_0$  的数值在一个  $\lambda$  附近变化。 $\theta_1$  与激发激光入射到光纤端面的数值孔径(NA)的关系为

$$\sin^2 \theta_1 = 1 - (\text{NA}/n_1)^2 \quad (2)$$

所以式(1)可变换为

$$z_0 = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{1}{\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}} \quad (3)$$

根据下面的设计参数,即  $\lambda = 638.2 \text{ nm}$ ,  $n_1 = 1.456$ ,  $n_2 = 1.333$ ,  $\text{NA} = 0.23$ ,由式(2)和(3)计算得样品溶液中倏逝波场的穿透深度  $z_0 = 0.30\lambda = 0.20 \mu\text{m}$ 。

### 2.2 结构

本传感器的结构如图2所示,它主要由光学系

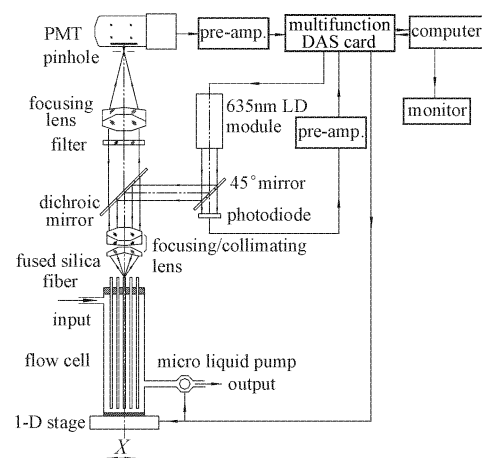


图2 多探头光纤倏逝波生物传感器的构成  
Fig.2 Instrumental setup of the multi-probe fiber-optic evanescent wave biosensor

统、光电转换与信号放大系统、样品流路、一维扫描平台、数据采集与控制系统组成。本传感器适用的荧光染料为 Cy5,其吸收峰为 649 nm,荧光峰值波长为 670 nm<sup>[9]</sup>。

光学系统以功率为 10 mW,中心波长为 638.2 nm 的半导体激光器作光源,以分色镜(反射激光、透射荧光,其反射面与光轴夹角为 45°)将激光与荧光分离。所用光纤是纤芯直径为  $\phi 1$  mm 的石英光纤。光电转换与信号放大系统以光电倍增管(PMT)作为光电转换器件,采用高性能前置放大器将光电倍增管输出的光电流转换成电压,并将该电压信号滤除噪声、放大到一定的幅度后输入数据采集与控制系统。样品流路主要由样品池、微型液泵和一组微型电磁阀组成,用于吸入液体样品、排出废液、对样品池进行清洗。样品溶液内 5 根光纤一维等间距排列,置于样品池内,各光纤输入端面的中心点位于一条直线上。每根光纤的敏感段表面固定不同的生物识别分子,所以可同时探测样品中的 5 种生物物质。样品池是光纤表面的生物识别分子与样品溶液内待测生物分子进行特异性生物反应的场所。样品池置于一维扫描平台上,可沿光纤排列方向作一维扫描运动,连续将 5 根光纤的输入端面定位于光学系统的耦合镜焦点处,进行荧光信号的检测。一维扫描平台的移动分辨率为 2.5  $\mu\text{m}$ 。数据采集与控制系统主要由多功能数据采集/控制卡和计算机组成,用于控制激光器的开关、光电倍增管增益、一维扫描平台的运动、微型液泵的运行,通过控制微型电磁阀的开闭以选择进入样品池的液体类型或排出废液,采集荧光信号、激光功率、一维扫描平台位置坐标。

本传感器所用光纤总长为 61 mm,其中敏感段长度为 42 mm,置于待测样品溶液时的 NA 为 0.58。光纤传输段的包层材料为有机硅,NA 为 0.36。激发激光的入射 NA 为 0.23。

### 2.3 检测过程与数据处理

首先将磷酸钾缓冲液(PBS)吸入样品池,测量 5

根光纤的本底噪声;然后排出磷酸钾缓冲液,吸入待测样品,检测 5 根光纤的荧光信号。检测时,在计算机控制下一维扫描平台驱动样品池作一维扫描运动的同时,多功能数据采集/控制卡从三个通道同时采集荧光信号、激光功率信号、一维扫描平台位置坐标,并将三组数据一一对应地保存于计算机内存。数据采样间隔为 10  $\mu\text{m}$ ,所以在每根光纤上将采集到 100 个信号值。

为了保证测量精度,用光电二极管监测激光功率,在采集荧光信号的同时采集激光功率,在信号处理时把激光功率作为参考信号以校正激光功率波动对荧光信号的影响。

信号采集完成后,计算出每根光纤上荧光信号最大值及其位置坐标、该位置处对应的激光功率,然后以激光功率为参考值,将荧光信号最大值换算成与激光功率无关的相对值,此数据即为该光纤的荧光信号值。

若要监测生物反应的动态过程,只需每隔一定时间重复上述测量过程和数据处理步骤即可。

## 3 测量结果与讨论

### 3.1 灵敏度检测

Cy5 荧光染料为英国 Amersham Pharmacia Biotech 公司生产的 FluoroLink™ Cy5-dCTP。将 0.5  $\mu\text{mol/L}$  纯净的 Cy5 母液用 pH7.0 的磷酸钾缓冲液稀释成 0.01,0.1,1.0,10,100(nmol/L)5 种浓度。取 5 根表面清洗干净的光纤置于样品池内。依次将磷酸钾缓冲液和 5 种浓度的 Cy5 染料溶液吸入样品池,分别测量各光纤的荧光信号值。为了保证上次测量过的溶液对本次测量结果无影响,在排出上次被测溶液后吸入本次被测溶液前,先吸入磷酸钾缓冲液对样品池和光纤进行清洗,再用本次被测溶液对样品池和光纤作预浸润,最后排出样品池内溶液,再吸入本次被测溶液。

表 1 列出 5 根光纤在磷酸钾缓冲液和 5 种浓度

表 1 多探头光纤倏逝波生物传感器测量结果

Table 1 Measurement results of multi-probe fiber-optic biosensor

Fiber No.	Cy5 concentration / (nmol/L)					
	0(PBS)	0.01	0.1	1.0	10	100
1	0.11675	0.13056	0.18334	0.65344	6.78393	93.2840
2	0.11338	0.13050	0.17034	0.63965	6.73047	88.9134
3	0.11449	0.12674	0.16883	0.57417	5.91019	80.0677
4	0.12678	0.13902	0.19310	0.68328	6.94180	83.4046
5	0.13004	0.15267	0.23616	0.65610	6.29701	85.1616

Cy5 染料溶液中的荧光信号值,这些荧光信号值是消除了激光功率波动的相对值。图 3 给出了 5 根光纤在 10 nmol/L 浓度 Cy5 染料溶液中扫描测量到的荧光信号绝对值,数据采样间隔为 10  $\mu\text{m}$ 。以各光纤在磷酸钾缓冲液中的荧光信号值作为本底噪声计算该光纤在各种浓度下荧光信号的信噪比

(S/N),一种浓度下 5 根光纤 S/N 平均值及相对标准偏差  $\sigma$ ,计算结果见表 2。图 4 给出了 5 根光纤在双对数坐标图上的信噪比曲线,作为对比,图中同时给出了用 GeneTAC 1000 型生物芯片扫描仪(Genomic Solutions Inc., USA)对上述几种 Cy5 染料溶液测得的荧光信号信噪比曲线<sup>[7]</sup>。

表 2 多探头光纤倏逝波生物传感器荧光信号信噪比  
Table 2 Fluorescent signal-to-noise ratio of multi-probe fiber-optic biosensor

Fiber No.	Cy5 concentration / (nmol/L)					
	0(PBS)	0.01	0.1	1.0	10	100
1	1.00	1.118	1.570	5.597	58.106	799.006
2	1.00	1.151	1.502	5.642	59.362	784.207
3	1.00	1.107	1.475	5.015	51.622	699.342
4	1.00	1.097	1.523	5.389	54.755	657.868
5	1.00	1.174	1.816	5.045	48.424	654.888
Mean S/N	—	1.129	1.577	5.338	54.454	719.062
$\sigma/\%$	—	2.85	8.75	5.56	5.02	9.56

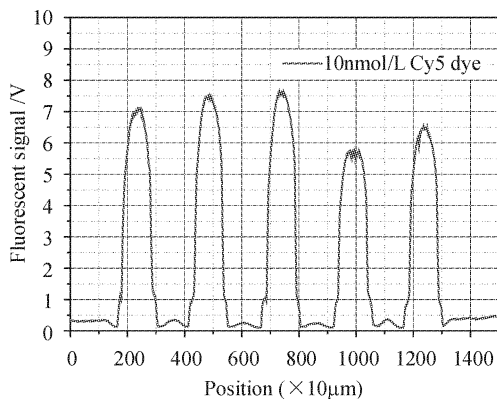


图 3 5 根光纤在浓度为 10 nmol/L 的 Cy5 溶液中的荧光强度

Fig. 3 Scanned raw data of fluorescent intensity of 5 fibers in 10 nmol/L Cy5 solution

从上述结果可知,1) 本传感器 5 个光纤探头对 Cy5 染料溶液的极限探测灵敏度均优于 0.01 nmol/L( $10^{-11}$  mol/L);2) 由于 5 根光纤的端面加工质量和装夹位置不完全一致,导致图 3 所示的 5 个探头的扫描测量结果存在一定差异,但采用上述数据处理方法得到的信噪比的差异已大大降低。5 个探头在同一浓度下信噪比的相对标准偏差小于 10%,同时 5 根光纤的信噪比曲线几乎重合,表明测量结果具有良好的 consistency;3) 在双对数坐标图上,5 个探头在所测量的荧光染料浓度范围内均具有良好的线性响应特性;4) 本传感器的测量结果与商品化

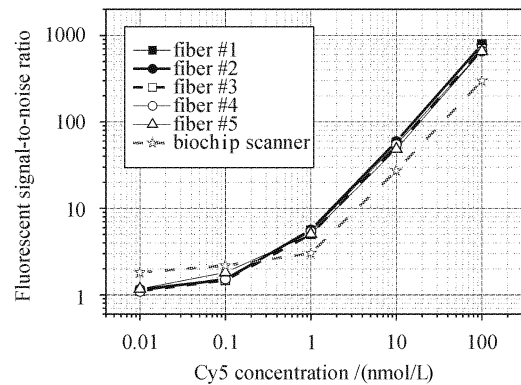


图 4 5 根光纤荧光信号信噪比曲线  
Fig. 4 Fluorescent Signal-to-noise ratio of 5 fibers

生物芯片扫描仪的测量结果相吻合,表明本传感器 5 个探头的测量结果均是可信的。在实际生物物质的探测中,5 个探头测量结果的良好的一致性为一次并行准确检测一个样品中的多种生物物质提供了可靠的技术基础。

### 3.2 抗原抗体反应过程检测

实验中采用的生物识别分子是羊抗人免疫球蛋白(IgG)的抗体,被测样品是标记了 Cy5 染料的人 IgG,这两种生物分子之间存咱特异性反应。测量了两种浓度的人 IgG 溶液:10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。为便于固定生物识别分子,光纤纤芯表面需产生醛基<sup>[8]</sup>。取 2 根纤芯表面带醛基的光纤,其中一根纤芯表面固定羊抗人 IgG 的抗体,

另一根光纤芯表面无抗体,测量时作为阴性对照。将 2 根光纤置于样品池中,吸入样品溶液,然后进行荧光测量,测量时间间隔为 1 min 和 5 min。图 5 给出在两种人 IgG 溶液浓度中检测到的荧光信号随反应时间的变化曲线。

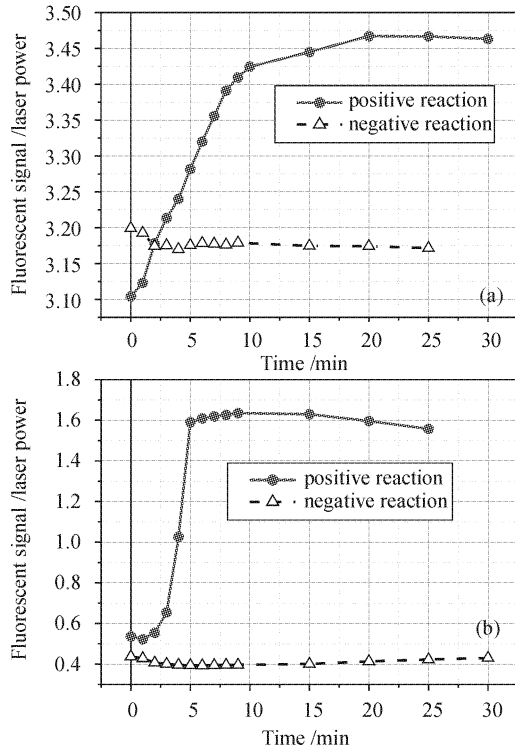


图 5 表征被测溶液中的人 IgG 与光纤表面固定的羊抗人 IgG 结合的实时荧光信号  
人 IgG 浓度:(a) 10  $\mu\text{g/mL}$ ; (b) 1  $\mu\text{g/mL}$

Fig. 5 Real-time fluorescence detection of human IgG binding to goat anti-body IgG antibody immobilized on fiber cores  
Human IgG concentration: (a) 10  $\mu\text{g/mL}$ ; (b) 1  $\mu\text{g/mL}$

由图可见,随着生物反应的进行,具有阳性反应的光纤上的荧光信号逐渐增强,经过一定时间后达到峰值。之后,荧光信号几乎不变,或者略微下降,因为荧光染料经多次激发后会发生光致漂白现象。而无阳性反应的光纤的荧光信号几乎不变,或略有下降。发生阳性反应光纤上的荧光信号达到峰值所

需的时间就是完成本次检测的时间,上述两次检测的时间分别为 20 min 和 15 min。

## 4 结 论

研制成功一台多探头光纤倏逝波生物传感器,达到如下结果:5 个探头对纯净的 Cy5 荧光染料溶液的极限检测灵敏度均优于 0.01 nmol/L。

对两种浓度的人 IgG 抗原与羊抗人 IgG 抗体特异性反应过程的实时检测结果表明,采用本传感器无需使用阴性对照,只要监测一根光纤上荧光信号随时间的变化特性,就可以检测待测生物量的有无及其含量,从而大大简化了检测程序,缩短了检测时间,同时降低了对光纤个体性能的一致性要求。

## 参 考 文 献

- 1 S. Y. Rabbany, B. L. Donner, F. S. Ligler. Optical immunosensors [J]. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 1994, **22**(5/6):307~346
- 2 G. Duveneck, M. Ehrat, H. M. Widmer. Fiber optic evanescent wave biosensor [C]. *SPIE*, 1991, **1510**:138~145
- 3 Liang Quanting. *Physical Optics (Revised Edition)* [M]. Beijing: Mechanical Industry Press, 1987 (2nd edition). 33~36  
梁铨廷. *物理光学*[M]. 北京:机械工业出版社,1987. 33~36
- 4 J. R. Hobbs. Fluorescence reveals toxins on antibody-coated fiber optic probe [J]. *Laser Focus World*, 1992, **28**(5):83~86
- 5 R. H. Smith, W. J. Lemon, J. L. Erb *et al.*. Development of kinetic ligand binding assays using a fiber optic sensor [J]. *J. Clinical Chemistry*, 1999, **45**(9):1683~1685
- 6 K. D. King, G. P. Anderson, K. E. Bullock *et al.*. Detecting staphylococcal enterotoxin B using an automated fiber optic biosensor [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, **14**:163~170
- 7 Huang Huijie, Zhai Junhui, Ren Bingqiang *et al.*. Fiber-optic evanescent wave biosensor and its application [J]. *Acta Optica Sinica*, 2003, **23**(4):451~454  
黄惠杰,翟俊辉,任冰强等. 光纤倏逝波生物传感器及其应用 [J]. *光学学报*, 2003, **23**(4):451~454
- 8 Zhai Junhui, Huang Huijie, Yang Ruifu *et al.*. A fiber-optic evanescent wave biosensor for specific detection of nucleic acids [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2003, **31**(1):34~37  
翟俊辉,黄惠杰,杨瑞馥等. 光纤生物传感器用于核酸的特异性检测 [J]. *分析化学*, 2003, **31**(1):34~37
- 9 Ma Liren, Jiang Zhonghua. *Biochip* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000. 10~12  
马立人,蒋中华. *生物芯片*[M]. 北京:化学工业出版社,2000. 10~12