

便携式表面等离子体共振生物传感器在低浓度溶液定量检测中的应用

齐攀^{1,2} 马晓² 钟金钢^{2,3} 李莹^{3*}

¹广东交通职业技术学院电子工程系, 广东 广州 510650

²暨南大学光电工程系, 广东 广州 510632

³暨南大学光电信息与传感技术广东普通高校重点实验室, 广东 广州 510632

摘要 针对现有低浓度溶液定量检测技术复杂、分辨率低等问题,将自行研制的角度扫描型便携式表面等离子体共振生物传感器应用于低浓度溶液定量检测。通过实验证明了该装置和方法在低浓度溶液定量检测中的可行性。对葡萄糖溶液和甘氨酸溶液做了定量检测实验,实验结果显示,直接检测葡萄糖溶液可分辨到0.1 mg/ml。基于表面等离子体共振的低浓度溶液定量检测方法操作简便,仪器便携,可实现快速、实时高分辨率检测。

关键词 表面等离子体共振; 便携式; 生物传感器; 定量检测

中图分类号 TN247 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP51.072802

Application of Portable Surface Plasmon Resonance Biosensor in the Quantitative Detection of Low Concentration Solution

Qi Pan^{1,2} Ma Xiao² Zhong Jingang^{2,3} Li Ying³

¹Department of Electronics Engineering, Guangdong Communication Polytechnic, Guangzhou, Guangdong 510650, China

²Department of Optoelectronic Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

³Laboratory of Optoelectronic Information and Sensing Technologies of Guangdong Higher Education Institutes, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

Abstract The self-developed portable angle scanning surface plasmon resonance biosensor is used in the quantitative detection of low concentration solution, because the existing quantitative detection methods are complicated and with low resolution. The validity of this method and the developed device is demonstrated by experiments. The quantitative detection is proceeded in glucose and glycine solutions. The detection results show that the direct detection of glucose solution distinguish the concentration of 0.1 mg/ml. The quantitative detection method of low concentration solution based on the surface plasmon resonance is simple. The developed device is portable and easy to operate. The rapid and real-time detection with high resolution can be realized by this method.

Key words surface plasmon resonance; portable; biosensor; quantitative detection

OCIS codes 280.1415; 240.6680; 120.4570

1 引言

葡萄糖、甘氨酸等是维持生物体正常机能的关键物质。在食品、药品和生命体中,对其浓度的检测具有重要意义。目前,对该类物质溶液的定量检测主要通过旋光仪、阿贝折射率仪、生物传感器等实现。其中旋光仪的普遍精度只能达到 0.01° ,直接测量葡萄糖溶液的浓度最小可达5.25 mg/ml;阿贝折射率仪的测量分辨率一般只能达到 $10^{-4}\sim 10^{-5}$ RIU(RIU表示折射率单元)^[1],并且此类方法对溶剂的要求较高、微量或者低浓

收稿日期: 2014-01-21; 收到修改稿日期: 2014-03-09; 网络出版日期: 2014-06-12

基金项目: 国家自然科学基金(41206081)、海洋赤潮灾害立体监测技术与应用国家海洋局重点实验室项目(MATHAB20120208)、粤港关键领域重点突破招标项目(2005A20501001)

作者简介: 齐攀(1982—),男,博士,主要从事光电检测技术方面的研究。E-mail: qiqipan@163.com

*通信联系人。E-mail: 916407691@qq.com

本文电子版彩色效果请详见中国光学期刊网 www.opticsjournal.net

度时检测效果较差;生物传感器具有高灵敏度、高选择性、操作简易、成本低、可以用于在线分析等优点^[2],引起了科学家们浓厚的研究兴趣。传统的葡萄糖生物传感器是利用固载了葡萄糖氧化酶的酶电极实现对葡萄糖高选择性和高灵敏度的检测。但是由于酶本身受温度、pH值等的影响,在一些特殊的化学环境中,酶易丧失活性而使电极不稳定。此外,Pt、Au等金属电极在高的过电势下对葡萄糖有较高的催化作用。表面等离子体共振(SPR)传感器具有免标记、实时动态检测、灵敏度高、监测范围广、操作简便等特点^[3-7],被广泛应用于生物学、医学、化学、药物筛选以及环境监测、食品安全等领域^[8-9],也可测量折射率随溶液浓度呈现一定变化关系的溶液。

基于此,提出一种低浓度溶液定量检测的新方法,介绍了自行研制的应用于低浓度溶液定量检测的便携式SPR生物传感器硬件及软件设计的框架,应用该系统对低浓度葡萄糖溶液和甘氨酸溶液进行了实时的检测实验。实验结果显示,对葡萄糖溶液直接检测的浓度分辨率达0.1 mg/ml,浓度检测误差不高于1.3%,检测时间短,实验过程中实时加入样品,系统跟踪显示样品浓度,是测量葡萄糖等溶液浓度的一种新方法。该装置和方法有望应用于临床检测血糖和食品行业质量控制等领域。

2 SPR生物传感器原理

基于麦克斯韦电磁波理论的SPR,是一种发生在电介质与金属薄层分界面上的物理光学现象^[10-13]。SPR效应对附着在贵金属膜表面上的电介质的折射率变化非常敏感,而折射率是所有材料的固有特征,使得基于SPR效应的生化分析技术不需要对样品标记,就可通过探测样品折射率的微小变化,实现对样品的生化分析。

通过衰减全反射(ATR)棱镜耦合、光纤耦合、光波导或衍射光栅耦合都可以实现激励光与表面等离子体波的能量耦合,从而产生SPR效应^[14-15]。其中ATR棱镜耦合是目前普遍采用的几何结构,两种主要的ATR结构模型,即Otto模型和Kretschmann模型被先后提出。

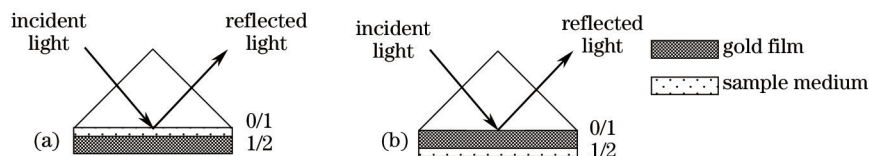


图1 ATR棱镜耦合结构。(a) Otto结构;(b) Kretschmann结构

Fig.1 ATR prism coupling structure. (a) Otto structure; (b) Kretschmann structure

如图1所示,Otto模型中的空气间隙被Kretschmann模型中的金属薄膜所代替。倏逝波在棱镜与金属分界面上产生,它穿透金属薄膜,在金属与电介质分界面上激发表面等离子波。Kretschmann模型最明显的优点是传感器的感应面(表面等离子波出现的分界面)从Otto模型的空隙转移到了现在的金属表面,使传感器的实现成为可能。目前,在实际检测中基于Kretschmann模型的SPR最常用的两种调制方式分别为^[16-18]波长调制型和角度调制型。角度调制型相对波长调制型分辨率高、结构简单、稳定可靠,应用较多。

3 实验系统

3.1 硬件系统

实验中使用自行研制的便携式SPR生物传感器。系统结构示意图和实物图分别如图2(a)和(b)^[19]所示,包括光路系统、流路系统、电路(信号探测与控制)系统、软件(数据分析)系统和传感芯片等部分。光路和电路系统都集成在统一的机械框架中,尺寸为550 mm×200 mm×330 mm,大小与普通个人计算机主机相当。

如图2(a)所示,激光发出的光经过光路系统,使入射光通过半球柱棱镜,保证光束通过棱镜中心。以半球柱棱镜为光波耦合器件,可以保证任何角度的入射光(入射点在半圆的圆心)均与界面垂直,反射光损失小,而且进入棱镜后不会发生折射引起角度改变。基于Kretschmann模型,将金属膜先镀在与棱镜折射率相同的盖玻片上,然后用折射率相近的匹配液将其粘合在棱镜底面,使盖玻片和棱镜更好贴合,并防止入射光线在棱镜和匹配液交界处折射。选用样品池紧压置于金属膜上,待测样品可通过微量泵添加到样品池。光路系统通过振镜作角度扫描时,光线入射到样品上的角度会发生相应变化,若发生SPR效应,出射到光电探测器上的光线则会呈现强弱变化,从而得到SPR共振曲线。

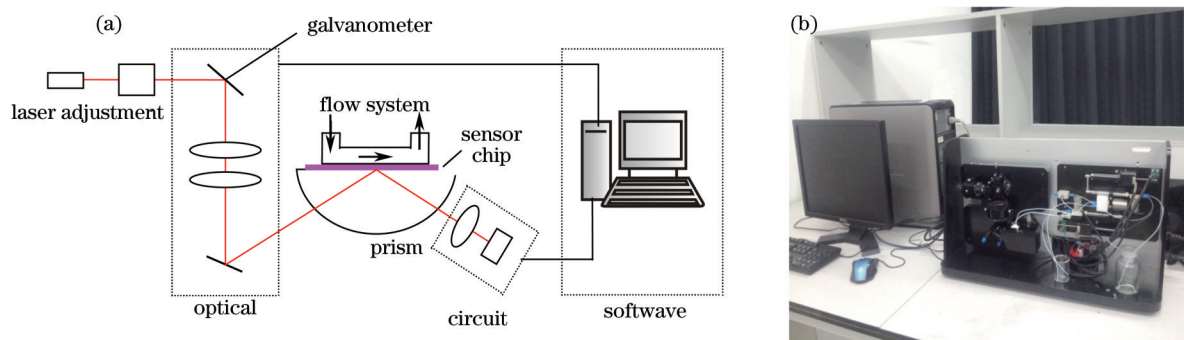


图2 便携式SPR系统。(a) SPR系统结构示意图; (b) SPR系统实物图

Fig.2 Portable SPR system. (a) System schematic of SPR; (b) photograph of SPR

3.2 软件系统

为了实现对溶液浓度的定量检测,使用的SPR系统中,软件部分采用NI公司开发的集成化图形编程环境LabVIEW进行定量检测功能设计。

3.2.1 定量检测模块

该功能模块主要实现对待测样品SPR共振角的检测。建立的SPR系统的探测方式为共振角探测,可通过“反射光强-入射角度”的曲线测量对待测样品共振角的测量。为了实现准确测量,采用的扫描方式为:首先设置角度扫描范围、扫描步长、起点等参数;然后在扫描范围内,振镜每旋转一个角度(扫描步长),对棱镜反射光强度进行采集和测量,直到完成扫描。通过对数据采集卡中模拟I/O的操作,可实现对振镜的角度旋转控制。根据振镜位置信号的输入比例系数 $[0.5 \text{ V}/(^{\circ})]$,需要旋转 θ 角时,通过采集卡向驱动电路输出 $\theta/2$ 的模拟电压即可。因此通过对输出模拟电压的控制即可实现角度的扫描功能。

角度扫描采样的流程图如图3所示。由于采集卡具有高达250 kS/s的采样率,可对每个采样点多次采样然后取平均值以降低光强测量时噪声的干扰。并且,可通过设定振镜扫描步长来控制扫描测量的精度,它也直接决定了样品共振角的测量精度。发生SPR效应时,光电探测器上采集到的光线强度会呈现强弱变化,便得到SPR共振曲线。在采集光强和角度数据的过程中,将数据存入数组中,扫描结束后对数组进行操作,寻找光强的最小值,此时对应的角度即为被测样品的SPR共振角。

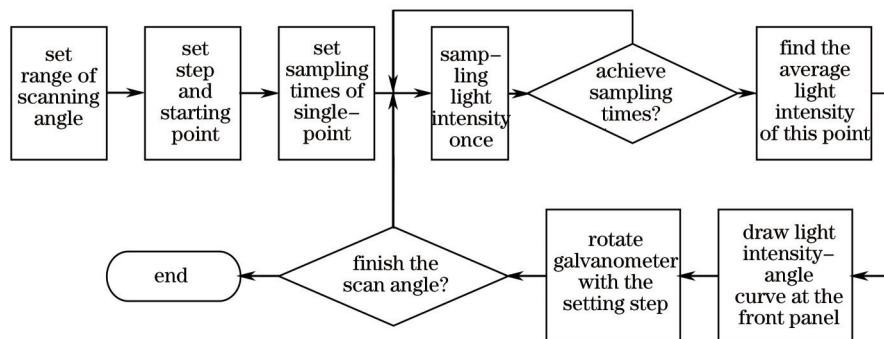


图3 角度扫描采样流程图

Fig.3 Flow chart of angle scanning

3.2.2 定量数据分析模块

该功能模块主要实现对待测样品浓度的定量分析。即通过测量已知浓度的同类样品的共振角度,绘制“浓度-共振角”的标准曲线,然后测量未知浓度的样品共振角,通过标准曲线计算出该样品的浓度。

该功能模块主要包括“数据源输入、标准曲线拟合和定量检测”三个子功能模块。其中数据源输入包括“手动输入、自动输入和从文件输入”三种功能。根据输入的数据可以分别进行“线性、指数、多项式和和对数拟合”绘制标准曲线。将待测样品的共振角输入到标准曲线,根据拟合方程计算出样品的浓度。图4为定量检测的流程图。

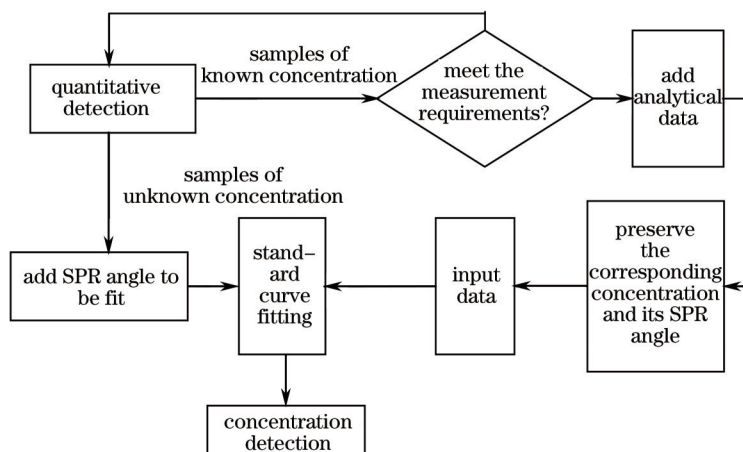


图4 定量检测模块流程图

Fig.4 Flow chart of quantitative detection

4 结果与讨论

4.1 系统分辨率测试

系统的测量精度主要取决于角度扫描系统和光电检测器件的测量精度。角度扫描系统为电压控制型振镜,振镜角度分辨率可达 0.001° ,对应棱镜入射角度分辨率为 0.002° 。光电检测器件对光强值的转换精度达到 0.001 V ,数据采集卡16位ADC的分辨率可达 $7.7\times 10^{-5}\text{ V}$,足以分辨角度 0.002° 的光强变化值。因此,整个系统的精度可以达到 0.002° ,角度分辨精度对应样品的折射率测量分辨率,在 $64^\circ\sim 84^\circ$ 范围内为 $1.8\times 10^{-5}\sim 4.2\times 10^{-6}$ 。

选用蒸馏水、 0.1 mg/ml 和 0.3 mg/ml 的葡萄糖溶液进行分辨率测试,其中葡萄糖溶液用固态粉末状葡萄糖与蒸馏水进行混合配制。葡萄糖溶液的SPR共振角测量结果如表1所示。

表1 小浓度葡萄糖溶液共振角测量数据

Table 1 Resonance angle measurement data of small concentration glucose solution

Measurement times	1	2	3	Average value
SPR angle of distilled water	73.742°	73.740°	73.742°	73.741°
SPR angle of 0.1 mg/ml glucose solution	73.746°	73.746°	73.746°	73.746°
SPR angle of 0.3 mg/ml glucose solution	73.754°	73.754°	73.752°	73.753°

由测试结果可见,蒸馏水和 0.1 mg/ml 的葡萄糖溶液的SPR共振角测量结果有明显区别,因此对于葡萄糖溶液直接检测,可分辨到 0.1 mg/ml 。

4.2 低浓度葡萄糖溶液定量分析测试

用固态粉末状葡萄糖与蒸馏水进行混合,配制系列浓度的葡萄糖溶液作为待测样品。首先配制 10 mg/ml 的母液,然后用蒸馏水稀释,浓度依次为 $0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5\text{ mg/ml}$ 。扫描范围设置为 4° ,扫描步长为 0.001° (对应入射角改变 0.002°)。待测溶液按照浓度由小到大的顺序依次加入样品池进行SPR扫描,当一种样品测

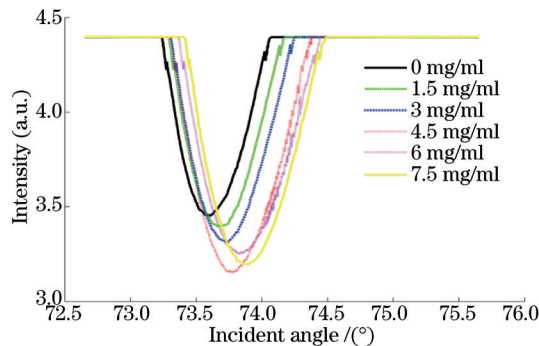


图5 不同浓度葡萄糖溶液的SPR曲线

Fig.5 SPR curves for different concentrations of glucose solution

试结束后,通过流路系统用大量蒸馏水冲洗样品池,然后加入新的待测样品。葡萄糖溶液浓度越大,折射率越高,反映在SPR曲线上即为光强吸收峰向右位移,如图5所示。实验所得的共振角数据记录如表2所示。

表2 葡萄糖溶液的SPR共振角实验数据

Table 2 SPR resonance angle measurement data of glucose solution

No.	Concentration / (mg/ml)	SPR angle / (°)	Refractive index measured by SPR	Refractive index measured by Abbe refractometer
1	0	73.742	1.332931	1.3328
2	1.5	73.782	1.333158	1.3330
3	3	73.838	1.333476	1.3333
4	4.5	73.870	1.333657	1.3334
5	6	73.920	1.333939	1.3336
6	7.5	73.972	1.334230	1.3340

根据测量数据绘制葡萄糖溶液浓度与SPR共振角的标准曲线,由于葡萄糖溶液浓度较低时,其浓度与折射率近似呈线性关系^[20-21],而样品共振角与折射率也近似为线性关系^[21],因此选用“线性拟合”绘制,结果如图6所示。

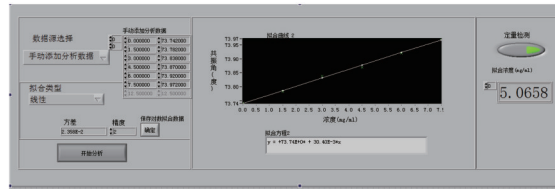


图6 葡萄糖溶液标准曲线

Fig.6 Standard curve of glucose solution

由图6可见,标准曲线线性关系良好。新配浓度为5 mg/ml的葡萄糖溶液,测得共振角为73.894°,代入标准曲线计算出浓度为5.0658 mg/ml,误差约为0.0658 mg/ml(约1.3%),准确度较高。

4.3 低浓度甘氨酸溶液定量分析测试

为了进一步验证系统,配制浓度梯度为2、4、6、8、10 mg/ml的甘氨酸溶液依次进行测量。扫描范围设置为4°,扫描步长为0.005°(对应入射角改变0.01°)。为了保证测量的准确性,每种样品重复测量5~6次,每次测量后金膜表面用乙醇溶液进行擦洗,再放入蒸馏水扫描至基线,然后加入新的样品,测量结果如图7所示。测得共振角的平均值分别约为73.92°、73.98°、74.04°、74.13°和74.20°。其中2 mg/ml和8 mg/ml的甘氨酸溶液SPR曲线如图8所示。

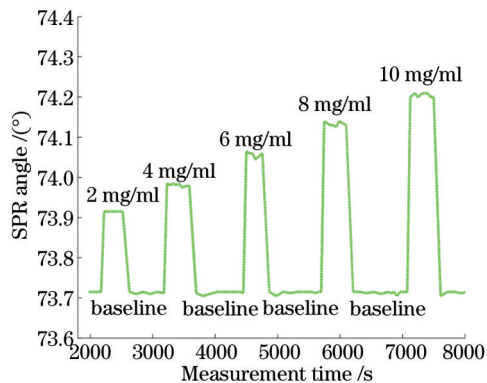


图7 浓度梯度的甘氨酸溶液响应曲线

Fig.7 Response curve of glycine solution with concentration gradient

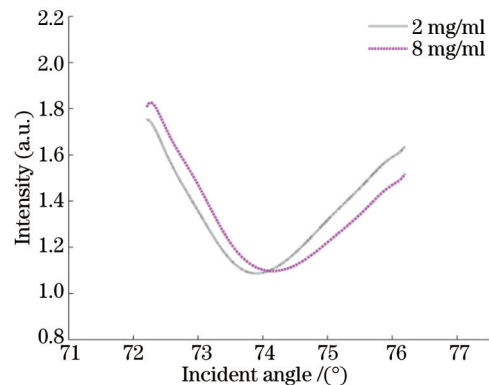


图8 2 mg/ml和8 mg/ml的甘氨酸溶液SPR曲线

Fig.8 SPR curves of glycine solution with concentration of 2 mg/ml and 8 mg/ml

根据测量数据绘制标准甘氨酸溶液的浓度与SPR共振角的标准曲线,结果如图9所示,可见浓度较低时甘氨酸溶液的标准曲线线性关系良好。

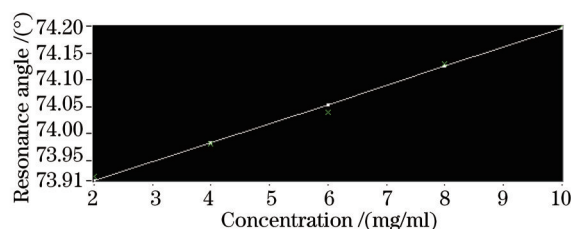


图9 甘氨酸溶液标准曲线

Fig.9 Standard curve of glycine solution

5 结 论

将自行研制的角度扫描型便携式表面等离子体共振传感器应用于低浓度溶液的定量检测,可实现定量、实时、快速检测。对葡萄糖溶液和甘氨酸溶液进行了实验检测。实验效果良好,对葡萄糖溶液直接检测的浓度分辨率可达0.1 mg/ml,达到商用仪器水平。该装置便携,该方法不需要有机溶剂,经济、环保,测量快速,灵敏度高,稳定性好,在食品和医学检测领域,如葡萄糖浓度测量、血糖检测、蛋白质成分分析、食品加工与质量控制等中将具有很好的应用价值。

参 考 文 献

- Huang Xian, Li Dachao, Xu Kexin, *et al.*. Glucose concentration detecting technology based on miniature surface plasmon resonance biological sensor[J]. Chinese Journal of Sensors and Actuator, 2006, 19(5): 2072-2076.
黄 显, 栗大超, 徐可辛, 等. 基于微型表面等离子共振生物传感器的葡萄糖浓度测量技术[J]. 传感技术学报, 2006, 19(5): 2072-2076.
- Chen Tianhua, Ouyang Jianwen, Tang Haitao. Application of modern biosensors in food safety inspection[J]. Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2011, 29(1): 70-74.
陈天华, 欧阳建文, 唐海涛. 现代生物传感器在食品安全检测中的应用[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2011, 29(1): 70-74.
- Richard B M Schasfoort, Anna J Tudos. Handbook of Surface Plasmon Resonance[M]. London: Royal Society of Chemistry, 2008.
- Homola Jiri. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species[J]. Chemical Reviews, 2008, 108(2): 462-493.
- Wang Gejia, Zhang Chonglei, Wang Rong, *et al.*. Extracting phase information of surface plasmon resonance imaging system[J]. Acta Optica Sinica, 2013, 33(5): 0524001.
王弋嘉, 张崇磊, 王 蓉, 等. 表面等离子体共振成像系统相位提取[J]. 光学学报, 2013, 33(5): 0524001.
- Chen Qianghua, Luo Huifu, Wang Sumei, *et al.*. Measurement of air refractive index based on surface plasmon resonance and phase detection by dual-frequency laser interferometry[J]. Chinese J Lasers, 2013, 40(1): 0108001.
陈强华, 罗会甫, 王素梅, 等. 基于表面等离子体共振和双频激光干涉相位测量的空气折射率测量[J]. 中国激光, 2013, 40(1): 0108001.
- Wu Pinghui, Gu Juguan, Liu Bin, *et al.*. Experimental research on wavelength modulation surface plasmon resonance sensor[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2012, 49(2): 022501.
吴平辉, 顾菊观, 刘 彬, 等. 波长检测型表面等离子体共振传感器的实验研究[J]. 激光与光电子学进展, 2012, 49(2): 022501.
- Shiping Li, Jingang Zhong. Simultaneous amplitude-contrast and phase-contrast surface plasmon resonance imaging by use of digital holography[J]. Biomedical Optics Express, 2012, 3(12): 3190-3202.
- Rafael Atillo Espiritu, Nobuaki Matsumori, Michio Murata, *et al.*. Interaction between the marine sponge cyclic peptide theonellamide A and sterols in lipid bilayers as viewed by surface plasmon resonance and solid-state ²H nuclear magnetic resonance[J]. Biochemistry, 2013, 52(14): 2410-2418.
- Homola J, Lu H B, Yee S S. Dual-channel surface plasmon resonance sensor with spectral discrimination of sensing channels using dielectric overlayer [J]. Electronics Letters, 1999, 35(13): 1105-1106.
- Bryce P Nelson, Timothy E Grimsrud, Mark R Liles, *et al.*. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA

- and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(1): 1-7.
- 12 Jong Seol Yuk, Hyun-Soo Kim, Jae-Wan Jung, *et al.*. Analysis of protein interactions on protein arrays by a novel spectral surface plasmon resonance imaging[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21(8): 1521-1528.
- 13 Homola J, Yee SS, Ganglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review[J]. *Sensors and Actuators B Chemical*, 1999, 54(1-2): 3-15.
- 14 Kurihara K, Suzuki K. Theoretical understanding of an absorption-based surface plasmon resonance sensor based on Kretschmann's theory[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(3): 696-701.
- 15 Shuai Binbin, Xia Li, Zhang Yating, *et al.*. Principle and study progress of surface plasmon resonance sensors based on gratings[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2011, 48(10): 100502.
帅彬彬, 夏 历, 张雅婷, 等. 基于光栅的表面等离子体共振传感器的原理及进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2011, 48(10): 100502.
- 16 Ho H P, Wu S, Yang M, *et al.*. Application of white light-emitting diode to surface plasmon resonance sensors[J]. *Sensors and Actuators B*, 2001, 80(2): 89-94.
- 17 Nelson S G, Johnston K S, Yee S S. High sensitivity surface Plasmon resonance sensor based on phase detection[J]. *Sensors and Actuators B*, 1996, 35(1-3): 187-191.
- 18 Qi Pan, Li Ying, Feng Mingchuang, *et al.*. Scanning surface plasmon resonance biosensor for array samples detection [J]. *Optical and Precision Engineering*, 2012, 20(11): 2363-2372.
齐 攀, 李 莹, 冯明创, 等. 用于阵列样品检测的扫描式表面等离子体共振生物传感器[J]. *光学 精密工程*, 2012, 20(11): 2363-2372.
- 19 Qi Pan, Zhong Jingang, Li Ying, *et al.*. Portable scanning surface plasmon resonance biosensor for food safety detection [J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2014, 41(3): 22-27.
齐 攀, 钟金钢, 李 莹, 等. 用于食品安全检测的便携式表面等离子体共振生物传感器[J]. *光电工程*, 2014, 41(3): 22-27.
- 20 Y L Yeh. Real-time measurement of glucose concentration and average refractive index using a laser interferometer[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2008, 46(9): 666-670.
- 21 Liu Chang, Zou Zhengfeng, Chen Shufen, *et al.*. Surface plasmon resonance sensor based on compact disk grating[J]. *Chinese J Lasers*, 2012, 39(3): 0314001.
刘 畅, 邹正峰, 陈淑芬, 等. 基于光盘光栅的表面等离子体共振传感器[J]. *中国激光*, 2012, 39(3): 0314001.