

激光与光电子学进展

基于氧化石墨烯微纳光纤的狂犬病毒免疫传感器

杨琪¹, 罗彬彬^{1*}, 谷志鹏², 吴胜昔², 石胜辉¹, 赵明富¹¹重庆理工大学光纤传感与光电检测重庆市重点实验室, 重庆 400054;²重庆理工大学药物化学与分子药理学重庆市重点实验室, 重庆 400054

摘要 提出一种基于氧化石墨烯(GO)微纳光纤的生物传感器,将其用于狂犬病毒(RV)的免疫检测研究。首先,将标准单模光纤通过熔接机放电形成双锥形光纤,再对双锥形光纤进行熔融拉锥制作出高灵敏度的微纳光纤。然后,在微纳光纤表面修饰GO,并将RV抗原固定于该传感器表面,用于对RV抗体的特异性检测实验。实验结果表明:该生物传感器对RV抗体的检测范围为200 fg/mL~1 ng/mL,检测极限(LOD)约为225.56 fg/mL,其检测灵敏度约为1.099 nm/log(mg·mL⁻¹),解离系数约为2.92×10⁻¹¹ M;当用于不同的抗体溶液样本和RV阳性血清的对照检测及临床检测时,该免疫传感器对前者的响应非常微弱,而对后者有明显的响应,说明其对RV抗体具有良好的特异性。基于GO修饰微纳光纤的免疫传感器具有制作简单、微纳尺寸、灵敏度高、成本低等优点。

关键词 遥感与传感器; 光纤光学; 微纳光纤; 氧化石墨烯; 狂犬病毒; 生物传感器

中图分类号 TN253

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP220600

Graphene Oxide Microfiber-Based Immunosensor for Rabies Virus

Yang Qi¹, Luo Binbin^{1*}, Gu Zhipeng², Wu Shengxi², Shi Shenghui¹, Zhao Mingfu¹¹Chongqing Key Laboratory of Optical Fiber Sensor and Photoelectric Detection, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;²Chongqing Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China

Abstract In this study, an immunosensor based on a graphene oxide (GO)-functionalized microfiber is developed and used for the analysis of rabies virus (RV) immunodetection. For this, first, a standard single-mode fiber was discharged through an optical fiber fusion splicer to form a double-tapered fiber, after which the double-tapered fiber was fused and tapered to produce a high-sensitivity microfiber. Subsequently, the microfiber surface was modified with GO, and RV antigens were immobilized on the surface of the sensor for the immunoassay of RV antibodies. The experimental results indicate that the detection range of the biosensor for RV antibodies is 200 fg/mL⁻¹ ng/mL, its detection of limit (LOD) is approximately 225.56 fg/mL, and its detection sensitivity and dissociation coefficient are approximately 1.099 nm/log(mg·mL⁻¹) and 2.92×10⁻¹¹ M, respectively. When the sensor is used in control experiments and clinical immunoassays for other antibody solution samples and RV-positive serum, it yields weak responses to the former and significant responses to the latter, indicating its high specificity to RV antibodies. The proposed immunosensor based on the GO-modified microfiber demonstrates the advantages of facile fabrication, micro-nano size, high sensitivity, and low cost.

Key words remote sensing and sensors; fiber optics; microfiber; graphene oxide; rabies virus; biosensor

1 引言

狂犬病是由狂犬病毒(RV)引起的一种人畜共患病,是对人类危害极大的重要疾病之一,一旦发病致死

率接近100%^[1]。根据世界卫生组织(WHO)报告统计,2010年全球因狂犬病死亡人数约为61000人,而中国经临床确诊的狂犬病人数约为3300人^[2-3],狂犬病是严重危害我国公共卫生的重大疾病。目前已研究开发

收稿日期: 2022-01-21; 修回日期: 2022-03-04; 录用日期: 2022-03-29; 网络首发日期: 2022-04-09

基金项目: 国家自然科学基金(61875026)、重庆英才青年拔尖人才计划(cstc2021ycjh-bgzxm0128)、重庆市教委科学技术研究重点项目(KJZD-K202201106, KJZD-K201901101)、重庆理工大学研究生科研创新项目(cjgycx20202042)

通信作者: *luobinbin@cqut.edu.cn

出多种检测 RV 的方法,主要包括荧光抗体实验(FAT)^[4]、反转录聚合酶式反应(RT-PCR)^[5]、快速荧光灶抑制试验(RFFIT)^[6-8]和酶联免疫吸附试验(ELISA)^[9-12]等,但这些方法存在检测耗时长、生产成本低、检测灵敏度低等缺点。因此探索特异性强、灵敏度高、方便快捷的 RV 检测技术对于狂犬病的预防和控制具有重大意义。

光纤生物传感器具有高灵敏度、免标记、微尺寸以及抗电磁干扰等优点^[13-14],并且可以和新型二维材料如氧化石墨烯(GO)结合构成生物亲和性良好的生物传感器^[15-16]。其中, Li 等^[17]提出双模干涉微纳光纤,对外部参量具有很高的灵敏度,可用于对振动^[18]、pH 值^[19]、折射率^[20]及各种生物分子的传感^[21]。GO 因其独特的具有高度亲水特性和生物兼容性,同时具有大比表面积、丰富的羧基和羟基等含氧基团^[22]、提供稳定反应环境等优异特性,已被广泛应用于各种生物传感器的功能化修饰当中。

本文在直径为 7.5 μm 的微纳光纤上以共价键结合的原理修饰 GO, 构成 GO 集成微纳光纤的生物传感器, 使用场发射扫描电子显微镜对传感器表面进行表征; 在传感器表面修饰 RV 抗原(RV-Ag)作为目标分子识别单元, 然后配置不同质量浓度的 RV 单克隆抗体(MAbs)进行免疫检测, 以分析该免疫传感器的性能参数。最后, 通过不同的抗体溶液样本和 RV 阳性血清进行临床免疫检测, 对该传感器的特异性、临床性等性能进行评估。

2 基本原理和方法

2.1 微纳光纤的传感原理

首先通过熔接机放电使标准单模光纤(SMF)形成锥形光纤, 再将锥形光纤放入拉锥机中通过火焰拉伸技术形成满足非绝热条件的多模微纳光纤(MMMF)。当光从输入端口传输到满足非绝热条件的锥形过渡区域时, 将同时激发基模(HE₁₁模式)和高阶模式(HE₁₂模式)。然后, HE₁₁模式和 HE₁₂模式继续

沿着微纳光纤的均匀腰部区域传播, 直到第二个锥形过渡区域重新耦合回单模光纤输出。根据现有研究表明^[17], 当微纳光纤直径小于 12 μm 时, 模式间干涉主要发生在 HE₁₁模式和 HE₁₂模式之间。这两者耦合模式强度可以表示为

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos(\Delta\beta L), \quad (1)$$

式中: I_1 和 I_2 分别是 HE₁₁模式和 HE₁₂模式的强度; L 是微纳光纤的腰区长度; $\Delta\beta = \frac{2\pi\Delta n_{\text{eff}}}{\lambda_m}$ 是这两种模式之间的传播常数之差, 其中 Δn_{eff} 是 HE₁₁和 HE₁₂两种模式的有效折射率之差, λ_m 是第 m 阶干涉条纹的中心波长, m 是正整数。

对于腰径只有几微米的微纳光纤而言, 腰区纤芯直径为亚微米量级, 几乎可以忽略不计, 因此微纳光纤可以看作是由外界环境及微纳光纤本身组成的两层波导模型。微纳光纤的谐振波长 λ_m ^[23]可表示为

$$\Delta n_{\text{eff}} L = (p + 1/2)\lambda_m, \quad (2)$$

其折射率(RI)灵敏度 S_m 可由式(2)得到:

$$S_m = \frac{d\lambda_m}{dn} = \frac{\lambda_m}{\Delta n_{\text{eff}} - \lambda_m \partial(\Delta n_{\text{eff}})/\partial\lambda_m} \cdot \frac{\partial(\Delta n_{\text{eff}})}{\partial n} = \frac{\lambda_m}{G} \cdot \frac{\partial(\Delta n_{\text{eff}})}{\partial n}, \quad (3)$$

式中: $G = \Delta n_{\text{eff}} - \lambda_m \partial(\Delta n_{\text{eff}})/\partial\lambda_m$ 是 HE₁₁模式和 HE₁₂模式之间的群有效折射率差; n 是外界环境的 RI。由式(3)可知, 微纳光纤传感器的 RI 灵敏度 S_m 是由 λ_m 、 G 和 $\partial(\Delta n_{\text{eff}})/\partial n$ 决定的。 λ_m 一般在 1550 nm 处且变化仅有几十纳米。 G 和 $\partial(\Delta n_{\text{eff}})/\partial n$ 由微纳光纤的直径和外界环境折射率 n 决定, 此时只要计算出 G 和 $\partial(\Delta n_{\text{eff}})/\partial n$, 就可以获得微纳光纤模式干涉仪理论上的 RI 灵敏度。作为式(3)的分母, 如果 G 无限接近 0, 传感器的干涉光谱中就会出现色散拐点, 色散拐点附近干涉峰的 RI 灵敏度会非常高。

2.2 实验系统

本实验所用系统如图 1 所示, 由宽带光源(ASE, 1250~1650 nm)发出宽带光, 经 SMF-28 传输到 GO

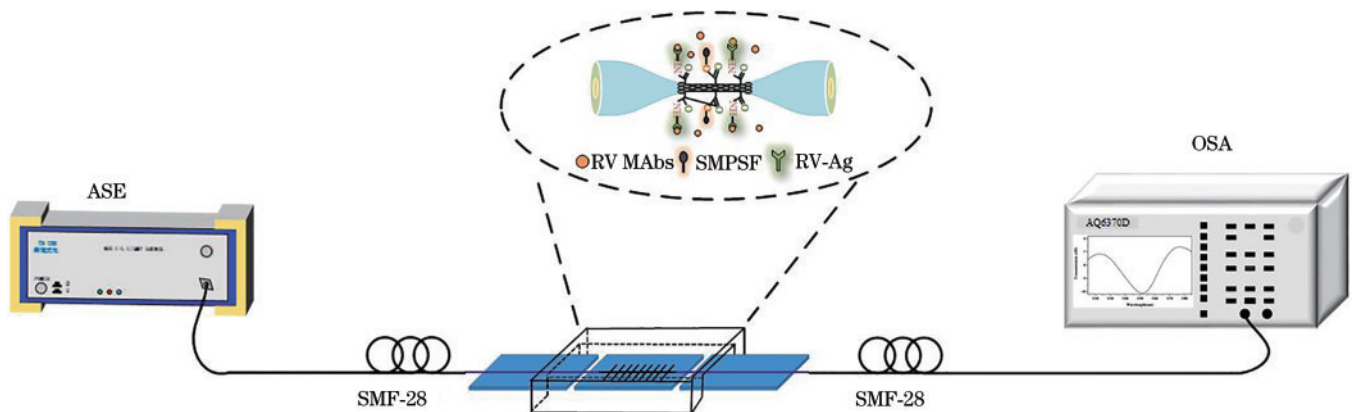


图 1 实验系统原理图

Fig. 1 Schematic diagram of experimental system

修饰的微纳光纤传感区,透射光谱由光谱分析仪(OSA,AQ6370D,600~1800 nm)实时进行监测分析。其中微纳光纤传感器中间放置可移动的玻璃载片用于替换不同待测溶液,为防止外界环境空气流动等因素对生物环境的干扰,传感器整体置于隔尘的操作台内。

2.3 微纳光纤的制作及特性

选取 SMF-28 单模光纤,使用光纤熔接机对其放

电形成直径约为 $70\ \mu\text{m}$ 的双锥形光纤,再利用光纤熔融拉锥机进一步制作出具有突变锥形过渡区域及均匀腰部区域的微纳光纤。根据式(3),为了获得超高的 RI 灵敏度,微纳光纤的直径应该接近色散拐点,但是考虑到直径较细的微纳光纤结构脆弱,本文制作腰区直径约为 $7.50\ \mu\text{m}$ 、长度约为 $2134.38\ \mu\text{m}$ 的微纳光纤,如图 2(a)所示。图 2(b)为该微纳光纤置于水中位于 $1550\ \text{nm}$ 附近的干涉光谱,对比度约为 $4\ \text{dB}$ 。

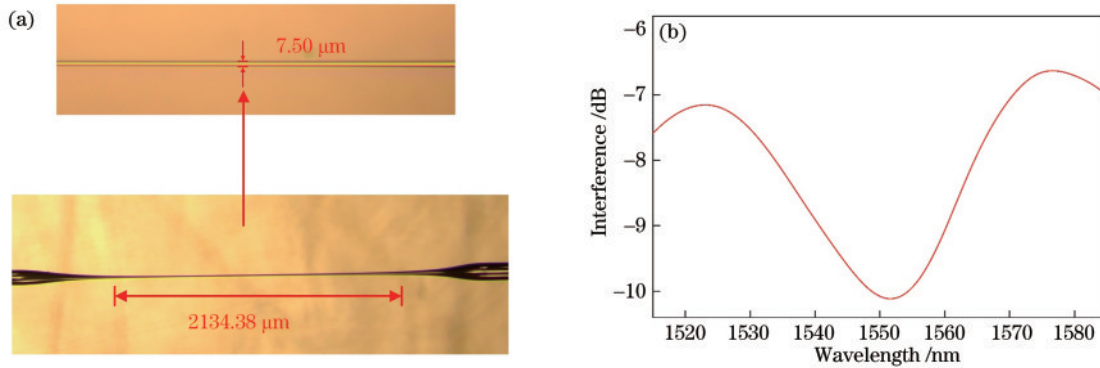


图 2 微纳光纤直径的显微镜图和光谱。(a)微纳光纤的直径和长度;(b)微纳光纤在水中的干涉光谱

Fig. 2 Microscopic image and spectrum of microfiber. (a) Diameter and length of microfiber;

(b) interference spectrum of microfiber in water

为研究微纳光纤的 RI 灵敏度,将微纳光纤放置于质量分数为 $1\% \sim 6\%$ 的 NaCl 溶液(去离子水配置)进行标定,通过使用阿贝尔折射仪(NAR-1T Solid, ATAGO, 测量折射率范围为 $1.3000 \sim 1.7000$, 精度为 ± 0.0002) 分别测得对应浓度折射率为 1.3347 、

1.3366 、 1.3382 、 1.3392 、 1.3422 和 1.3451 。微纳光纤在折射率 $1.3347 \sim 1.3451$ 范围内透射光谱变化如图 3(a)所示,可见随着溶液 RI 的增大,其透射光谱发生红移。图 3(b)为波长红移和 RI 的关系,拟合计算得到该微纳光纤的 RI 灵敏度约为 $1757\ \text{nm}/\text{RIU}$ 。

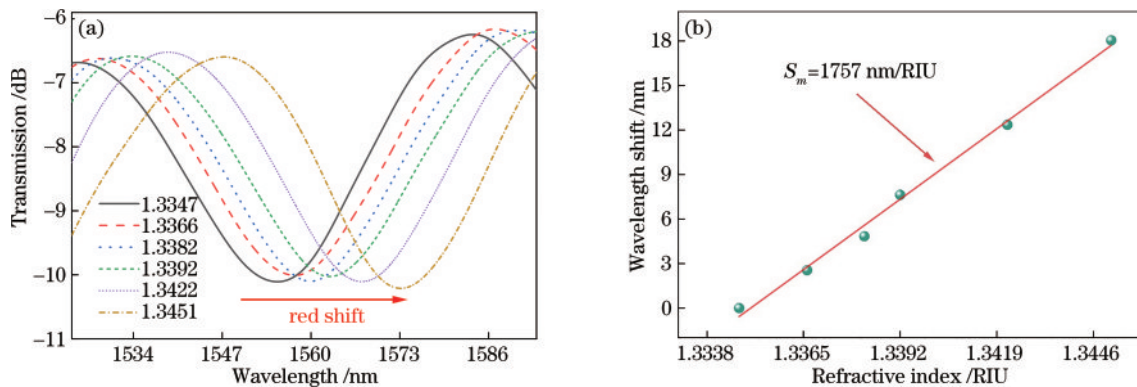


图 3 微纳光纤的 RI 灵敏度标定。(a)不同 RI 溶液下的透射光谱;(b)微纳光纤的 RI 灵敏度

Fig. 3 RI sensitivity calibration of microfiber. (a) Transmission spectra in different RI solutions; (b) RI sensitivity of microfiber

2.4 微纳光纤的生物功能化

首先将微纳光纤浸泡在质量分数为 5% 的稀 HNO_3 溶液中 $2\ \text{h}$, 去除光纤表面残留的匹配液和其他杂质,然后用去离子水和无水乙醇反复清洗腰区并自然风干。图 4 为微纳光纤的生物功能化过程,其具体修饰步骤如下:1)将清洗后的微纳光纤浸入 $1\ \text{mol/L}$ 的 NaOH 溶液 $1\ \text{h}$, 以激活光纤表面的羟基($-\text{OH}$)基团,用去离子水反复冲洗光纤腰区去除多余的杂质;2)将羟基化后的微纳光纤浸入质量分数为 5% 的 3-氨丙基三乙

氧基硅烷(APTES)溶液 $0.5\ \text{h}$ 后,用去离子水和无水乙醇多次冲洗光纤腰区部位,以去除表面未结合的 APTES 单体分子;3)取 $400\ \mu\text{L}$ 质量浓度为 $2\ \text{mg/mL}$ 的 GO 分散液常温孵化微纳光纤 $3\ \text{h}$,此过程中 GO 的环氧基团会与微纳光纤表面的氨基($-\text{NH}_2$)反应形成稳定的共价键;由于 GO 涂覆层稳定不易去除,GO 沉积在微纳光纤表面后,用去离子水反复清洗光纤以去除表面残留物,得到 GO 修饰的微纳光纤传感器。

进一步对该传感器进行生物功能化,步骤如下:

4) 室温下将该传感器浸入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化剂中 1 h, 以活化 GO 层上的羧基 (-COOH), 活化剂是 EDC (0.004 g) 与 NHS (0.002 g) 以 2:1 质量比溶于 200 μ L 超纯水和 300 μ L 的吗啉乙磺酸(MES)溶液配置而成的; 5) 在室温下将活化后的传感器浸没

于 40 μ g/mL 的 RV 抗原溶液中(400 μ L)中孵化 1 h, RV 抗原通过共价键方式和 GO 膜表面的羧基 (-COOH) 结合; 6) 用配置好的脱脂奶粉(SMP SF)封闭液(体积分数为 5%)浸没该生物传感器, 以封闭光纤表面未结合 RV 抗原的羧基位点, 排除其他杂蛋白干扰。

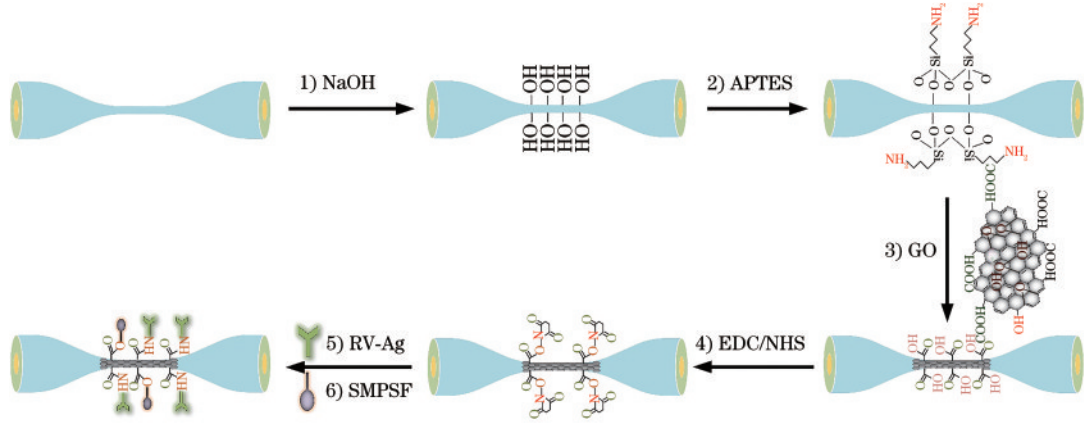


图 4 微纳光纤的生物功能化过程
Fig. 4 Biofunctionalization process of microfiber

3 实验分析和讨论

3.1 GO 涂覆微纳光纤传感器表面修饰效果及分析

利用场发射扫描电子显微镜(FESEM, ZEISS SIGMA HD)对微纳光纤表面修饰的 GO 形貌进行表征, 其结果如图 5 所示。可见, 光纤表面形成一层致密的 GO 薄膜, 虽然皱褶的存在可能降低材料的性能, 但

是可为待测目标生物分子提供大面积反应区域。图 6 为 GO 沉积在光纤表面的能谱图, 其对应的光纤表面元素成分如表 1 所示, C、O 和 Si 元素质量分数分别为 51.41%、11.08% 和 37.51%, 其中, C 元素和部分 O 元素来自光纤表面的 GO, Si 元素和部分 O 元素来自光纤(SiO₂)材料, 这些结果均能证明微纳光纤表面成功修饰 GO 材料。

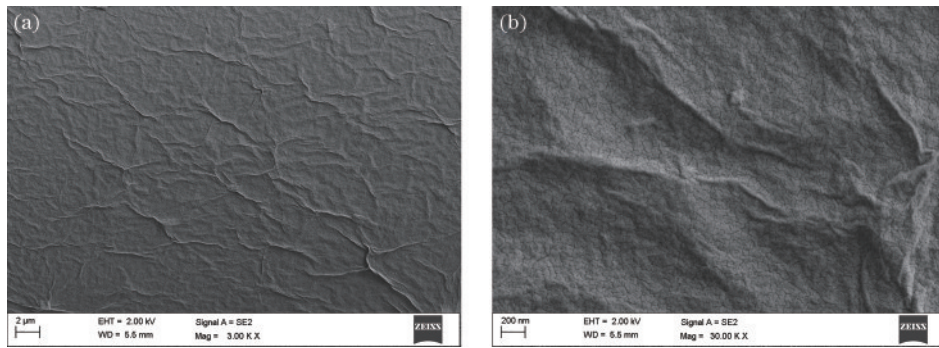


图 5 GO 修饰微纳光纤后的 FESEM 图像。(a) 3000x; (b) 30000x
Fig. 5 FESEM photos of GO-coated microfiber. (a) 3000x; (b) 30000x

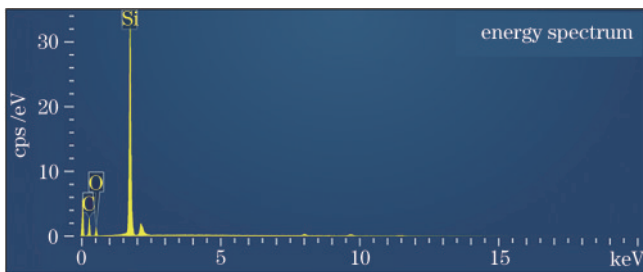


图 6 微纳光纤表面修饰 GO 后的能谱图
Fig. 6 Energy spectrum of microfiber surface modified with GO

表 1 微纳光纤表面修饰 GO 后的元素质量分数
Table 1 Elemental mass fraction of microfiber surface modified with GO unit: %

| Chemical | Mass fraction | Atomic percentage |
|----------|---------------|-------------------|
| C | 51.41 | 67.85 |
| O | 11.08 | 10.98 |
| Si | 37.51 | 21.17 |
| Amount | 100 | 100 |

3.2 传感器表面修饰过程光谱检测

图 7(a) 和 7(b) 分别为传感器从激活光纤表面羟基基团到封闭光纤表面剩余羧基位点的整个过程在磷酸盐缓冲 (PBS) 溶液中光谱变化过程和波长漂移量。由图 7(a) 可知, 微纳光纤涂覆 GO 后, 其谐振波长红移量和干涉条纹对比度变化量分别约为 22.832 nm 和 1.22 dB。这是由于 APTES 试剂在硅烷化过程中以共

价结合方式在传感器表面形成一层较厚的硅烷层, 硅烷层上的氨基和 GO 的环氧基继续以共价键结合形成 GO 涂覆层, 由式 (3) 可知, 硅烷层和 GO 涂覆层的增大导致有效折射率增大, 从而导致微纳光纤的谐振波长发生红移; GO 沉积在传感器表面后, 由于 GO 材料的吸收特性, 增加了传播过程中光的损失, 进而导致干涉条纹的对比度增加。

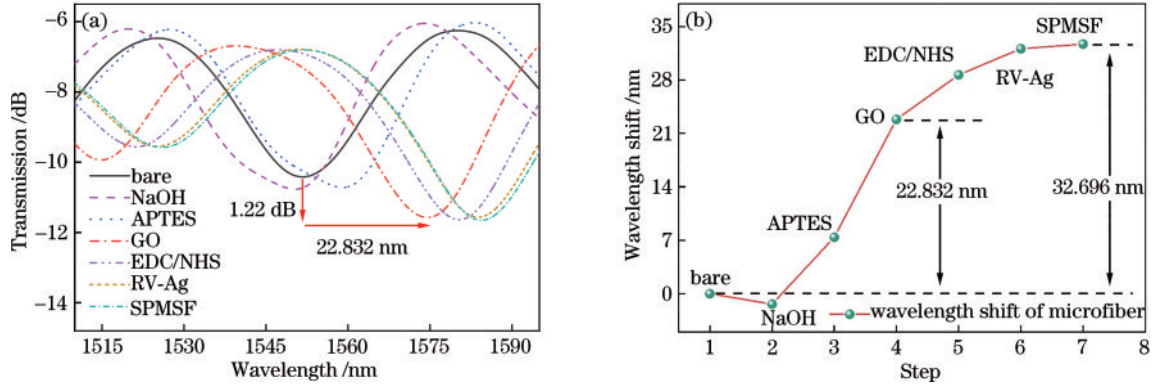


图 7 传感器表面修饰和生物功能化过程中光谱检测结果。(a) 微纳光纤光谱变化; (b) 相应的波长红移量
Fig. 7 Spectra detection results in surface modification and functionalization of immunosensor. (a) Spectral evolution of microfiber; (b) corresponding wavelength red shift

从活化传感器表面 GO 的羧基 (-COOH)、修饰 RV 抗原到封闭 GO 表面多余位点过程中, 免疫传感器波长漂移量和干涉条纹对比度变化量分别为 9.864 nm 和 0.079 dB。由此结果表明, 该传感器表面已成功修饰 RV 抗原, 而在 SPMSF 封闭多余位点步骤中, 波长红移量仅为 0.6 nm, 说明该传感器未结合位点较少。

3.3 RV 抗体免疫检测性能实验

在免疫检测之前, 用 PBS 溶液浸泡免疫传感器的腰区, 所记录的谐振波长作为参考点, 然后利用传感器依次对不同质量浓度 RV 抗体溶液 (PBS 溶液配置) 进行检测。RV 抗体溶液质量浓度从低到高分别为 200 fg/mL、500 fg/mL、1 pg/mL、10 pg/mL、100 pg/mL、500 pg/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL。在此

过程中, 光谱分析仪监测和记录光谱动态变化过程, 对于每一个质量浓度等级的测试, 当免疫传感器的光谱趋于稳定后, 用 PBS 溶液冲洗传感区表面后, 并记录其在 PBS 溶液中的光谱 (记录 5 次取平均值) 作为对应质量浓度的最终光谱, 结果如图 8(a) 所示, 可见随着 RV 抗体溶液质量浓度的增大, 微纳光纤免疫传感器的光谱发生了明显红移, 这是由于 RV 抗体和 RV 抗原的特异性结合会导致光纤表面折射率的增大, 因此导致传感器的光谱发生红移。

此外, 在检测每个质量浓度等级的 RV 抗体溶液时, 为保证传感器表面的 RV 抗原和溶液中的 RV 抗体在检测中结合充分, 每隔 5 min 记录一组数据, 直到光谱趋于稳定, 实验表明, 不同质量浓度等级的 RV 抗体溶液的检测中传感器谐振光谱大约需要 15~30 min 会

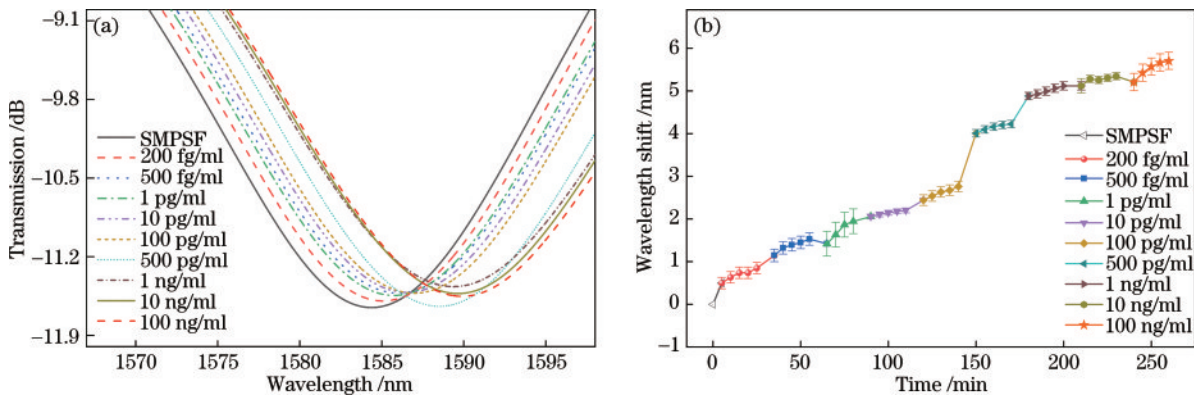
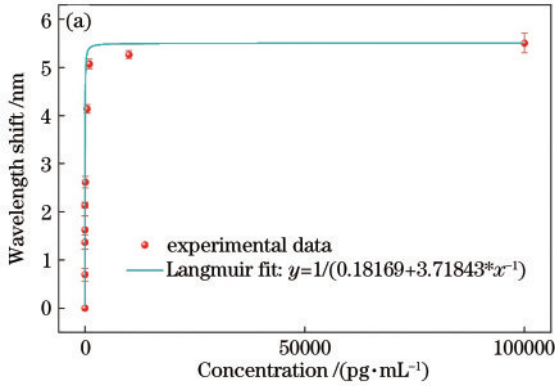


图 8 免疫传感器的 RV 抗体检测实验。(a) 光谱随 RV 抗体质量浓度变化曲线; (b) 谐振波长漂移量随时间变化曲线
Fig. 8 RV antibody detection experiment of immunosensor. (a) Change curves of spectrum with RV antigen concentration; (b) variation curve of resonance wavelength shift with time

趋于稳定,整个检测过程的谐振波长随时间的变化如图 8(b)所示。可见,当 RV 抗体质量浓度从 200 fg/mL 增加到至 100 ng/mL 时,谐振波长平均总红移量约为 5.504 nm。当 RV 抗体质量浓度为 1 ng/mL 时,谐振波长红移量约为 5.072 nm;当大于 10 ng/mL 时,谐振波长红移量约为 5.264 nm,波长红移量变化趋于平稳。原因是随着 RV 抗体质量浓度的增大,RV 抗体能



和固定在微纳光纤生物传感器表面的 RV 抗原特异性结合的位点减少。

图 9(a)为该免疫传感器在 PBS 溶液中的谐振波长红移量与 RV 抗体质量浓度的关系,并用 Langmuir 曲线进行拟合。解离系数 K_D 是表示生物传感器性能的一个重要指标,免疫传感器对 RV 抗体的吸附遵循 Langmuir 模型^[24],可表示为

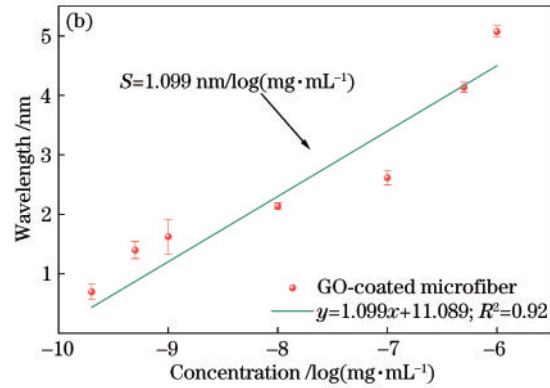


图 9 微纳光纤免疫传感器波长红移和 RV 抗体质量浓度的关系。(a)Langmuir 曲线拟合图;(b)微纳光纤免疫传感器检测灵敏度
Fig. 9 Relationship between wavelength red shift of microfiber immunosensor and concentration of RV antibody. (a) Langmuir curve fitting diagram; (b) detection sensitivity of microfiber immunosensor

$$\frac{C}{\Delta\lambda} = \frac{C}{\Delta\lambda_{\max}} + \frac{K_D}{\Delta\lambda_{\max}}, \quad (4)$$

式中: C 为 RV 抗体溶液的质量浓度; $\Delta\lambda$ 为质量浓度对应的谐振波长漂移量; $\Delta\lambda_{\max}$ 为免疫检测中波长最大值; K_D 是解离系数。根据拟合曲线可计算出该免疫传感器对 RV 抗体解离系数 K_D 约为 2.92×10^{-11} M,因此该传感器对 RV 抗体亲和性良好。该免疫传感器的检测极限(LOD)采用国际理论(化学)与应用化学联合会(IUPAC)^[25]的模型计算:

$$x_{\text{LOD}} = f^{-1}(\bar{y}_{\text{blank}} + 3\sigma_{\max}), \quad (5)$$

式中: \bar{y}_{blank} 为空白测量的平均值; σ_{\max} 为空白测量的标准偏差; f^{-1} 为实验结果拟合曲线函数关系的反函数。由于所用的光谱分析仪波长分辨率为 0.02 nm,根据式(5)和图 9(a)中的 Langmuir 拟合函数,计算出该免疫传感器对 RV 抗体的 LOD 约为 225.56 fg/mL。当 RV 抗原溶液质量浓度为 200 fg/mL 时,谐振波长红移量约为 0.696 nm (>0.02 nm),因此该传感器的检测范围为 200 fg/mL~1 ng/mL,由于微纳光纤免疫传感器的直径只有 7.5 μm ,其表面积减少很多,同时 GO 层羧基和 RV 抗原分子固定的数量也会断崖式减少,因此导致免疫传感器检测范围减小和饱和点降低。

传感器在 PBS 溶液中对应的谐振波长红移量和 RV 抗体质量浓度对数的关系如图 9(b)所示,谐振波长红移量 y 与 RV 抗体质量浓度对数 x 通过线性拟合可表示为

$$y = 1.099x + 11.089. \quad (6)$$

由式(6)可知,该传感器对 RV 抗体特异性检测灵敏度

约为 1.099 nm/log(mg·mL⁻¹)。由于未修饰 GO 的微纳光纤传感器不具有对 RV 抗体的特异性检测能力,不能区分和捕捉外界环境中的 RV 抗体,因此未修饰 GO 的微纳光纤生物传感器的干涉光谱几乎不会发生漂移现象。

3.4 对照实验与临床检测实验

为评估该生物传感器在复杂环境下的临床免疫检测能力,首先分别使用 10 ng/mL 的犬瘟热病毒(CDV)单克隆抗体(MAbs)(300 μL)、10 ng/mL 的禽流感病毒(AIV)单克隆抗体(MAbs)(300 μL)进行特异性检测,每次检测反应 15 min,之后使用 PBS 溶液反复冲洗光纤表面多次,随后记录传感器在 PBS 溶液中稳定的光谱。由于 3 组抗体溶液中均不含有 RV 抗体,这两次检测步骤能够实现该传感器对 RV 抗体的特异性结合检测。实验结果表明,当分别使用 CDV MAbs 溶液和 AIV MAbs 溶液时,干涉条纹仅发生微小红移,分别约为 0.232 nm 和 0.734 nm,波长红移的原因可能是 SMPSF 封闭液没有将 GO 表面多余的位点完全封闭,传感器表面仍然能够结合非特异性的抗体。

接着使用 3 组动物体内 RV 阳性血清(标记为 RV-A、RV-B、RV-C)进行临床性检测,其质量浓度分别为 1.214、1.085、1.141 ng/mL。以上整个检测过程中的光谱变化和谐振波长红移如图 10 所示。由图 10(a)可见,3 组 RV 阳性血清的光谱较空白 PBS 溶液、CDV 抗体和 AIV 抗体的光谱出现了明显的红移。由图 10(b)可知,RV-A、RV-B、RV-C 谐振波长的平均红移量约为 7.452 nm,参考 3.3 节图 8(b)对 RV 抗体溶液检测

结果,当 RV 抗体的质量浓度为 10 ng/mL 时,相应的谐振波长红移量约为 5.072 nm。可见,前者的红移量比后者的偏高,这是由于:1)前者 RV 阳性血清是一个复杂的生物液体环境,含有多种蛋白质、酶和维生素等物质,非特异性的蛋白对传感器造成轻微影响;而后者检测使用的 RV 是纯化后的高浓度抗体蛋白;2)采用

3 组 RV 阳性血清质量浓度均高于标准 RV 抗体溶液,导致血清的环境折射率高于标准的 RV 抗体溶液,进而造成血清中的光谱红移量略微大于标准抗体溶液的漂移量。综上分析表明,基于 GO 的微纳光纤生物传感器对 RV 抗体免疫检测具有良好的特异性和临床性。

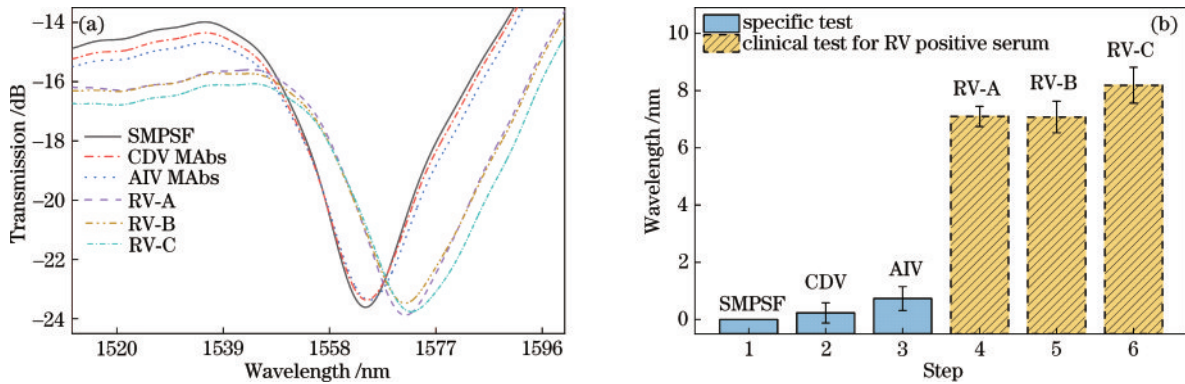


图 10 微纳光纤免疫传感器临床免疫检测实验结果。(a)光谱变化曲线图;(b)谐振波长漂移量变化

Fig. 10 Experimental results of clinical immunodetection of microfiber immunosensors. (a) Evolution curve of spectrum; (b) changes of resonance wavelength shift

4 结 论

提出一种基于 GO 集成微纳光纤的高灵敏度 RV 免疫传感器,微纳光纤通过先放电后拉锥制作出来,为光与物质相互作用提供极高的倏逝场。GO 涂层通过共价键结合修饰于微纳光纤表面,为传感器与待测目标分子提高丰富的结合位点。实验结果表明,该传感器在 200 fg/mL~1 ng/mL 检测范围内,实现了 1.099 nm/log(mg·mL⁻¹)的高检测灵敏度,检测极限约为 225.56 fg/mL。本文提出的 GO 修饰微纳光纤 RV 免疫传感器具有易于制作、检测灵敏度高、免标记等优点。

参 考 文 献

- [1] 俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗[M]. 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2009.
Yu Y X. Rabies and rabies vaccine[M]. 2nd ed. Beijing: China Medical Science Press, 2009.
- [2] 安耀武, 庞新莉, 李凯, 等. 2006—2011 年广州市花都区狂犬病暴露疫苗接种及狂犬病疫情分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(7): 628-630.
An Y W, Pang X L, Li K, et al. Analysis of rabies vaccination and rabies outbreaks from 2005 to 2008 in Huadu District, Guangzhou[J]. Journal of Pathogen Biology, 2013, 8(7): 628-630.
- [3] World Health Organization. WHO expert consultation on rabies[EB/OL]. (2015-05-10)[2022-01-21]. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85346/9789240690943_eng.pdf.
- [4] Robardet E, Andrieu S, Rasmussen T B, et al. Comparative assay of fluorescent antibody test results

among twelve European National Reference Laboratories using various anti-rabies conjugates[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 191(1): 88-94.

- [5] Ito M, Itou T, Shoji Y, et al. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis[J]. Journal of Clinical Virology, 2003, 26(3): 317-330.
- [6] Wright E, Temperton N J, Marston D A, et al. Investigating antibody neutralization of lyssaviruses using lentiviral pseudotypes: a cross-species comparison[J]. The Journal of General Virology, 2008, 89(9): 2204-2213.
- [7] 张守峰, 张菲, 刘晔, 等. FAVN 与 RFFIT 在动物和人狂犬病中和抗体检测中的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(9): 1161-1163.
Zhang S F, Zhang F, Liu Y, et al. Comparison between FAVN and RFFIT for rabies neutralizing antibody detection of sera from animals and human[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2015, 36(9): 1161-1163.
- [8] Moeschler S, Locher S, Conzelmann K K, et al. Quantification of lyssavirus-neutralizing antibodies using vesicular stomatitis virus pseudotype particles[J]. Viruses, 2016, 8(9): 254.
- [9] 任严新. 犬狂犬病抗体直接竞争 ELISA 检测方法的建立及初步应用[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
Ren Y X. Development & preliminary application of direct competitive ELISA for monitoring rabies antibody in canine[D]. Changchun: Jilin University, 2015.
- [10] Bedeković T, Šimić I, Kresić N, et al. Evaluation of ELISA for the detection of rabies virus antibodies from the thoracic liquid and muscle extract samples in the monitoring of fox oral vaccination campaigns[J]. BMC

- Veterinary Research, 2016, 12: 76-84.
- [11] Wasniewski M, Almeida I, Baur A, et al. First international collaborative study to evaluate rabies antibody detection method for use in monitoring the effectiveness of oral vaccination programmes in fox and raccoon dog in Europe[J]. Journal of Virological Methods, 2016, 238: 77-85.
- [12] Ondrejková A, Süli J, Ondrejka R, et al. Detection of rabies antibodies in dog sera[J]. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2015, 18(1): 47-51.
- [13] 孙立朋, 黄赟赟, 关柏鸥. 微光纤干涉型生物传感器[J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(13): 1306004.
Sun L P, Huang Y Y, Guan B O. Microfiber interferometric biosensors[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(13): 1306004.
- [14] 石胜辉, 聂青林, 蒋上海, 等. 基于双峰谐振长周期光纤光栅的 H9N2 亚型禽流感病毒传感器[J]. 光学学报, 2022, 42(1): 0106001.
Shi S H, Nie Q L, Jiang S H, et al. Biosensor based on dual-resonance long-period fiber gratings for detection of H9N2 subtype avian influenza virus[J]. Acta Optica Sinica, 2022, 42(1): 0106001.
- [15] Liu C, Cai Q, Xu B J, et al. Graphene oxide functionalized long period grating for ultrasensitive label-free immunosensing[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 94: 200-206.
- [16] Luo B B, Lu H F, Shi S H, et al. Immunosensing platform with large detection range using an excessively tilted fiber grating coated with graphene oxide[J]. Applied Optics, 2018, 57(30): 8805-8810.
- [17] Luo H P, Sun Q Z, Li X L, et al. Refractive index sensitivity characteristics near the dispersion turning point of the multimode microfiber-based Mach-Zehnder interferometer[J]. Optics Letters, 2015, 40(21): 5042-5045.
- [18] Liu K J, Fan J H, Luo B B, et al. Highly sensitive vibration sensor based on the dispersion turning point microfiber Mach-Zehnder interferometer[J]. Optics Express, 2021, 29(21): 32983-32995.
- [19] Huang Y Y, Yu B, Guo T, et al. Ultrasensitive and *in situ* DNA detection in various pH environments based on a microfiber with a graphene oxide linking layer[J]. RSC Advances, 2017, 7(22): 13177-13183.
- [20] Girei S H, Lim H N, Ahmad M Z, et al. High sensitivity microfiber interferometer sensor in aqueous solution[J]. Sensors, 2020, 20(17): 4713.
- [21] Fang F, Li Y P, Yang L Y, et al. Sensitive and *in situ* hemoglobin detection based on a graphene oxide functionalized microfiber[J]. Nanomaterials, 2020, 10(12): 2461.
- [22] Qin C C, Guo W L, Liu Y, et al. A novel electrochemical sensor based on graphene oxide decorated with silver nanoparticles-molecular imprinted polymers for determination of sunset yellow in soft drinks[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(7): 2293-2301.
- [23] Li Y P, Ma H, Gan L, et al. Selective and sensitive Escherichia coli detection based on a T4 bacteriophage-immobilized multimode microfiber[J]. Journal of Biophotonics, 2018, 11(9): e201800012.
- [24] Li B R, Chen C W, Yang W L, et al. Biomolecular recognition with a sensitivity-enhanced nanowire transistor biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 45: 252-259.
- [25] Chiavaioli F, Gouveia C A J, Jorge P A S, et al. Towards a uniform metrological assessment of grating-based optical fiber sensors: from refractometers to biosensors[J]. Biosensors, 2017, 7(2): 23.