

文章编号: 0253-2239(2003)04-0451-04

# 光纤倏逝波生物传感器及其应用

黄惠杰<sup>1</sup> 翟俊辉<sup>2</sup> 任冰强<sup>1</sup> 杨瑞馥<sup>2</sup> 赵永凯<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:** 以光纤倏逝波原理, 研制成功一台光纤倏逝波生物传感器。该传感器对纯净的 Cy5 荧光染料溶液的检测灵敏度达  $0.01 \mu\text{mol/l}$ ; 对浓度为  $0.01 \mu\text{mol/l}$  的嗜肺军团菌核酸样品的测量信噪比为 4.61。所有检测结果与商品化生物芯片扫描仪同时检测得到的结果具有很好的一致性。

**关键词:** 光学计量; 传感器技术; 生物传感器; 倏逝波; 光纤; 核酸

中图分类号: Q63; TN25 文献标识码: A

## 1 引 言

光纤倏逝波生物传感器采用光波在光纤内以全反射方式传输时产生的倏逝波来激发光纤纤芯表面标记在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>。

由于穿透到待测生物分子溶液中的倏逝波场深度只有波长量级<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, 因为不受纤芯表面倏逝波场以外的生物分子的干扰; 2) 操作简单, 测量速度快, 时间短, 因为无需将光纤从被测溶液中取出和清洗, 杂交反应完成后马上可以进行荧光检测; 3) 可以进行现场检测; 4) 可以对生物反应的动态过程进行监测, 即在杂交反应过程中进行荧光检测; 5) 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>[4~8]</sup>。

本文报道我们研制成功的光纤倏逝波生物传感器, 及分别用纯净的荧光染料溶液和嗜肺军团菌核酸对其进行的性能检测结果。结果表明, 该传感器具有较高的灵敏度和较好的生物特异性; 与采用商

品化生物芯片扫描仪同时检测得到的结果具有很好的一致性。

## 2 传感器原理与结构

### 2.1 传感器原理

从生物学上讲, 利用光纤倏逝波原理探测生物物质的方法一般有两种: 一步法(one-step assay)和两步法(two-step assay)<sup>[4]</sup>, 在我们的核酸检测实验中采用一步法。如图 1 所示, 一步法的测量原理是:

1) 将一段光纤的一部分包层去除, 露出纤芯;

2) 将露出的纤芯表面活化, 以非特异性吸附、化学或共价结合等方法, 在露出的纤芯表面固定生物识别分子(探针), 形成敏感段; 与敏感段对应, 我们称保留包层的那部分光纤为传输段, 其主要作用是

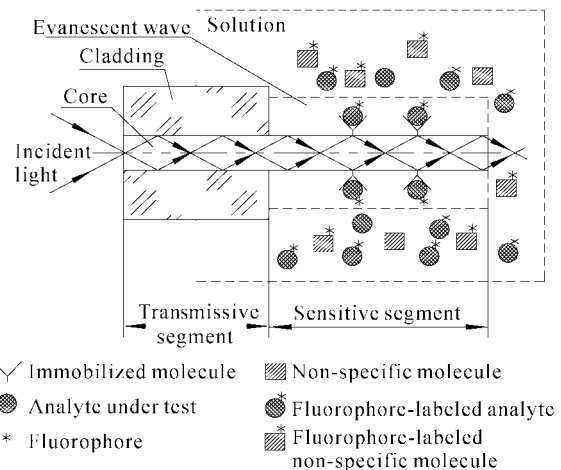


Fig. 1 Illustration of basis of the fiber-optic evanescent wave biosensor

传递光信号；

3) 将光纤的敏感段置于事先标记了荧光染料的待测生物分子溶液中, 由于同种生物的核酸分子具有互补性, 可以发生特异性杂交反应, 从而使待测核酸分子与荧光染料一起结合到光纤敏感段表面;

4) 将激发光耦合到光纤内, 结合于光纤敏感段表面倏逝波场范围内(即纤芯与待测生物分子溶液的界面处)的荧光染料受激发出荧光, 其中的一部分荧光将进入光纤, 沿光纤传播后从端面出射。

通过测量从光纤端面射出的荧光光通量, 可测定被测核酸分子的浓度。而溶液中与固定在光纤纤芯表面的探针分子无特异性的生物物质, 不会结合到光纤纤芯表面, 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。

## 2.2 传感器结构

如图 2 所示, 本传感器主要由光学系统、采样系统、光电转换与信号处理系统、数据采集与控制系统组成。光学系统以 7 mW 636.85 nm 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  $45^\circ$ )将激光与荧光分离, 采用纤芯直径为  $\phi 1$  mm、长 61 mm 的石英光纤作为转换元件, 以光电倍增管(PMT)作为光电转换器。石英光纤敏感段长度为 42 mm, 表面固定生物识别分子。

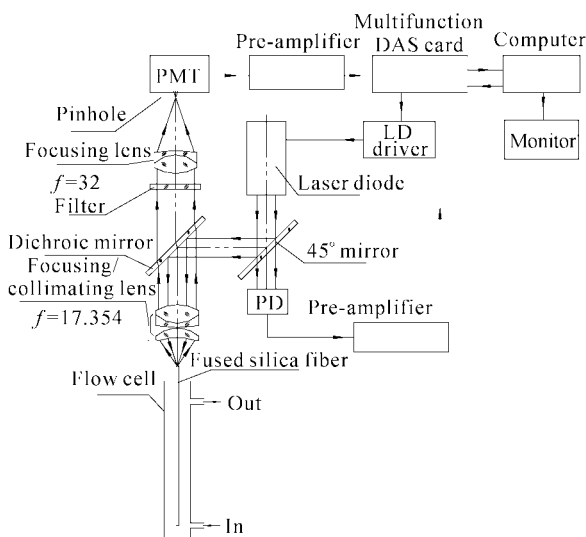


Fig. 2 Instrumental setup of the fiber-optic evanescent wave biosensor

采样系统包括一个细长的套管, 套管内有待测生物物质溶液, 石英光纤置于套管内。套管是样品溶液与固定在光纤表面的生物识别分子进行杂交反应的场所。光纤传输段与敏感段的数值孔径分别为 0.36 和 0.58, 激发光的入射数值孔径为 0.23。

激光束由  $45^\circ$  反射镜和分色镜反射、经聚焦-准直镜聚焦后耦合到光纤内。从光纤输入端出射的荧光经聚焦-准直镜准直后, 透过分色镜和滤光片, 由聚焦镜聚焦并经小孔滤除杂光后投射于光电倍增管。光电倍增管输出的电流信号经前置放大器转换成电压信号, 多功能数据采集-控制卡在微机的控制下对电压信号进行采集, 并保存到微机内存, 供分析用。

为了保证测量精度, 本传感器用光电二极管(PD)监测激光功率, 在采集荧光信号的同时对激光功率进行采集, 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。

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  $670 \text{ nm}^{[9]}$ 。由于激发光与荧光的波长非常接近, 而荧光又十分微弱, 为了获得高的检测灵敏度, 我们采取以下措施: 1) 选用中心波长略小于 649 nm 的窄带半导体激光器, 使荧光与激发光的波长差适当加大, 但又对荧光激发效率影响很小; 2) 分色镜与滤光片对激光的透过率尽量低, 而对荧光的透过率尽量高, 且透过率曲线在从激光波长向荧光波长过渡时具有尽可能大的斜率。本传感器选用的半导体激光器的中心波长为 636.85 nm, 带宽(FWHM)为 0.03 nm, 全光谱宽度为 0.7 nm, 由 SPEX 1702/04 型光谱仪测得的光谱曲线如图 3 所示。

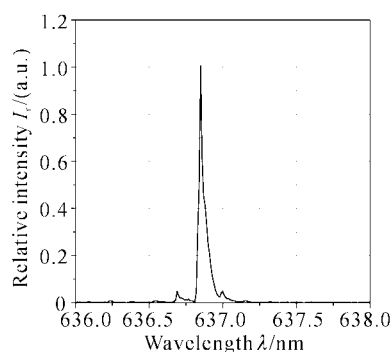


Fig. 3 Spectrum of laser diode

我们制作的分色镜与滤光片的光谱透过率曲线如图 4 所示, 透过率曲线由 PE Lambda 900 型分光光度计测得。分色镜在 636.85 nm 处的透过率为 1.85%, 而 670 nm 以上谱线的透过率大于 85%; 滤光片为长通型, 在 636.85 nm 处的透过率小于  $10^{-6}$ , 而对 670 nm 以上谱线的透过率大于 70%。

## 2.3 控制模式与数据处理

由于荧光染料在激光长时间照射下会发生光致漂白现象, 即荧光强度会随激发次数的增多而迅速

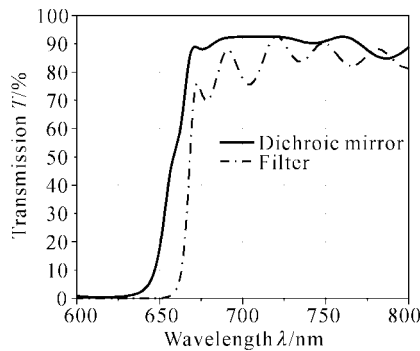


Fig. 4 Spectral transmission curves of dichroic mirror and filter

衰弱,所以测量时间必须很短。为此采用如下控制与数据处理方式:

1)待反应充分后,通过多功能数据采集-控制卡打开激光器,同时采集荧光信号(光电倍增管输出信号)与激光功率信号(光电二极管输出信号),数据量通常各为 200 个(数据采集速率为 100 kHz,持续时间约 4 ms)。这些数据中同时包含了噪声成分;

2)关闭激光器,以上述同样的方式对光电倍增管与光电二极管输出信号各采集 200 个数据。这些数据是在激光关闭时得到的,所以是纯粹的噪声成分;

3)把激光打开时的荧光和激光功率数据分别作平均,把激光关闭时的荧光和激光功率数据分别作平均。在计算平均值时舍去从激光打开到关闭的过渡区的数据;

4)将激光打开时的荧光信号平均值减去激光关闭时的噪声平均值,得到扣除了噪声的纯荧光信号值;同理可得到扣除了噪声的激光功率值;

5)以激光功率值为参考数据,把荧光信号值换算成与激光功率无关的相对值。

### 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 1.0  $\mu\text{mol/l}$  纯净的 Cy5 母液用 pH7.0 的磷酸钾缓冲液 (PBS) 稀释成 0.01 nmol/l、0.1 nmol/l、1.0 nmol/l、10 nmol/l、100 nmol/l 五种浓度,取一根表面清洗干净的光纤分别置于 PBS 和五种浓度的 Cy5 溶液中,测量相对荧光信号值。同时取 PBS 和五种浓度的 Cy5 溶液各 0.1  $\mu\text{l}$  点于玻璃基片上,然后用 GeneTAC 1000 型生物芯片扫描仪 (Genomic

Solutions Inc., USA) 测量荧光信号,以灰度值表示。以 PBS 荧光信号值作为本底噪声计算各种浓度下的荧光信号的信噪比 (S/N),所有数据列于表 1。图 5 为双对数坐标图上两种仪器的信噪比曲线。

Table 1 Measured results of fluorescent signal by biosensor and biochip scanner

| Concentration of Cy5 / (nmol/l) | Biosensor |        | Scanner  |       |
|---------------------------------|-----------|--------|----------|-------|
|                                 | Readings  | S/N    | Readings | S/N   |
| 0 (PBS)                         | 0.1122    | 1.00   | 2400     | 1.00  |
| 0.01                            | 0.1257    | 1.12   | 4368     | 1.82  |
| 0.1                             | 0.2204    | 1.96   | 5220     | 2.18  |
| 1.0                             | 0.8061    | 7.18   | 7264     | 3.03  |
| 10                              | 4.5536    | 40.58  | 65520    | 27.3  |
| 100                             | 47.684    | 424.99 | 716400   | 298.5 |

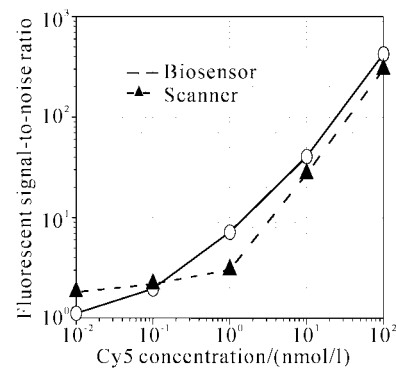


Fig. 5 Fluorescent signal-to-noise ratio of fiber-optic evanescent wave biosensor compared with biochip scanner

从表 1 和图 5 结果可知,本传感器的极限测量灵敏度优于 0.01 nmol/l (即  $10^{-11}$  mol/l),在双对数坐标图上,在所测量的荧光染料浓度范围内具有良好的线性响应特性;同时本传感器测量的结果与商品化生物芯片扫描仪测量结果具有很好的一致性,表明本传感器的测量结果是可信的。

#### 3.2 嗜肺军团菌核酸检测

光纤纤芯清洗干净后,先将其浸入体积分数为 0.10 的  $\gamma$ -氨基丙基三乙氧基硅烷的丙酮溶液使其表面烷基化,再浸入体积分数为 0.023 的戊二醛溶液使其表面产生醛基,这样可以使嗜肺军团菌核酸识别分子通过共价键固定在光纤纤芯表面。光纤纤芯表面固定好识别分子后,将其置于标记了 Cy5 荧光染料的目标嗜肺军团菌核酸溶液 (即被测嗜肺军团菌核酸溶液) 中进行杂交反应。目标嗜肺军团菌核酸溶液由嗜肺军团菌染色体 DNA 经扩增和纯化而得到,其浓度为 0.01  $\mu\text{mol/l}$ 。杂交反应在 45  $^{\circ}\text{C}$  下持续 10 min,然后进行荧光检测。我们把经过杂交反应的光纤称为阳性光纤,而把表面固定了核酸

识别分子,但未发生特异性反应的光纤称为阴性光纤。在生物医学检测和化验中,通常将阳性和阴性样品进行对照,以保证检测结果的可靠性。

用本传感器和生物芯片扫描仪分别对阳性光纤、阴性光纤及表面清洗干净的空白光纤进行了荧光测量。测量结果列于表 2。表中信噪比  $\sigma$  按下式计算:

$$\sigma = (S_P - S_B) / (S_N - S_B), \quad (1)$$

式中  $S_P$ 、 $S_N$  和  $S_B$  分别为阳性光纤、阴性光纤及空白光纤的荧光测量值。

Table 2. Measured results of fluorescent signal of three fibers

| Fiber     | Positive | Negative | Blank  | $\sigma$ |
|-----------|----------|----------|--------|----------|
| Biosensor | 1.3300   | 0.4374   | 0.1900 | 4.61     |
| Scanner   | 65520    | 22381    | 2400   | 3.16     |

从表 2 结果可知,本传感器和 GeneTAC 1000 型生物芯片扫描仪对嗜肺军团菌核酸的检测非常吻合,而且信噪比略高于后者,这个趋势与表 1 结果是一致的。但是本传感器检测核酸的信噪比低于同样浓度的纯 Cy5 荧光染料,说明两者存在一定的差异,可能原因是目标核酸分子荧光染料标记不完全、杂交反应不充分等。

**结论** 研制成功一台光纤倏逝波生物传感器,达到如下结果:对纯净的 Cy5 荧光染料的极限检测灵敏度优于 0.01 nmol/l;在双对数坐标图上,在 0.01~100 nmol/l 浓度范围内具有良好的线性响应特性;对 0.01  $\mu$ mol/l 目标嗜肺军团菌核酸的检测信噪比达到 4.61;与商品化生物芯片扫描仪的检测结果不仅具有良好的一致性,而且响应特性优于后者。表

明本传感器具有较高的检测灵敏度、响应特性和生物特异性,可以用于细菌染色体 DNA 分子的检测。

可以预见,在生物样品处理及实验操作等方面作进一步改善后,可以获得更高的检测灵敏度。

### 参 考 文 献

- 1 Duveneck G, Ehrat M, Widmer H M. Fiber optic evanescent wave biosensor. *Proc. SPIE*, 1991, **1510**:138~145
- 2 Andrade J D, Vanwagenen R A, Gregonis D E *et al.*. Remote fiber-optic biosensor based on evanescent-excited fluoro-immunoassay: Concept and progress. *IEEE Transaction on Electron Devices*, 1985, **ED-32**(7):1175~1179
- 3 Liang Quanting. *Physical Optics* (Revised Edition) [物理光学(修订本)]. Beijing: Mechanical Industry Press, 1987 (2nd edition). 33~36 (in Chinese)
- 4 Ogert R A, Shriver-Lake L C, Ligler F S. Toxin detection using a fiber optic-based biosensor. *Proc. SPIE*, 1993, **1885**:11~17
- 5 Hobbs J R. Fluorescence reveals toxins on antibody-coated fiber optic probe. *Laser Focus World*, 1992, **28**(5):83~86
- 6 Smith R H, Lemon W J, Erb J L *et al.*. Development of kinetic ligand binding assays using a fiber optic sensor. *J. Clinical Chemistry*, 1999, **45**(9):1683~1685
- 7 Gao H H, Chen Z, Kumar J *et al.*. Tapered fiber tips for fiber optic biosensors. *Opt. Engng.*, 1995, **34**(12):3465~3470
- 8 King K D, Anderson G P, Bullock K E *et al.*. Detecting staphylococcal enterotoxin B using an automated fiber optic biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999, **14**(2):163~170
- 9 Ma Liren, Jiang Zhonghua. *Biochip* (生物芯片). Beijing: Chemical Industry Press, 2000. 10~12 (in Chinese)

## Fiber-Optic Evanescent Wave Biosensor and Its Application

Huang Huijie<sup>1</sup> Zhai Junhui<sup>2</sup> Ren Bingqiang<sup>1</sup> Yang Ruifu<sup>2</sup> Zhao Yongkai<sup>1</sup>  
Cheng Zhaogu<sup>1</sup> Du Longlong<sup>1</sup> Lu Dunwu<sup>1</sup>

{ 1 Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics,  
The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800  
2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071 }

(Received 21 March 2002; revised 14 May 2002)

**Abstract:** A fiber-optic evanescent wave biosensor has been developed based on the principle of evanescent wave while light propagates in optical fiber. Sensitivity limit of 0.01 nmol/l is obtained from the detection of Cy5 serial solutions with various concentrations. And an ideal result of signal-to-noise ratio of 4.61 is obtained when the biosensor is used to measure *Legionella pneumophila* solution of 0.01  $\mu$ mol/l. All the results are comparable with that obtained by a commercial biochip scanner.

**Key words:** optical metrology; senser technology; biosensor; evanescent wave; optical fiber; nucleic acid