

文章编号: 0253-2239(2005)06-841-7

基于上转换发光技术的生物传感器及其应用*

赵永凯^{1,3} 周 蕾² 黄惠杰¹ 杨瑞馥² 黄立华¹ 任冰强¹ 卢 健^{1,3} 王向朝¹

(1 中国科学院上海光学精密机械研究所, 上海 201800)
(2 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)
(3 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 为实现对特定生物分子的高灵敏度快速检测与分析, 采用上转换发光材料作为标记物, 研制成功一台基于上转换发光技术的新型光学免疫生物传感器。该传感器利用上转换发光材料在红外光激发下发射可见磷光的特性, 通过对免疫层析试纸条上经生物反应而结合上去的上转换发光材料颗粒的含量进行检测, 计算出被测样品中特定生物分子的浓度。实验结果表明, 该传感器具有较好的生物特异性, 对兔抗鼠免疫球蛋白(IgG)标准样品的检测灵敏度达到 ng/ml 量级, 并在 200~6000 ng/ml 浓度范围内具有良好的线性响应特性, 相关系数 $R^2 \geq 0.95$; 对鼠疫耶尔森氏菌抗体的敏感性明显高于间接血凝实验, 且与免疫印迹检测实验结果具有较好的一致性。该传感器具有稳定、可靠、灵敏的工作性能, 符合实际检测与分析的要求。

关键词: 光学计量; 传感器技术; 生物传感器; 上转换发光技术; 上转换发光材料

中图分类号: TP212.3 文献标识码: A

Up-Converting Phosphor Technology-Based Biosensor and Its Application

Zhao Yongkai^{1,3} Zhou Lei² Huang Huijie¹ Yang Ruifu² Huang Lihua¹
Ren Bingqiang¹ Lu Jian^{1,3} Wang Xiangzhao¹

(1 Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)
(2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Sciences, Beijing 100071)
(3 Graduate School, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: An up-converting phosphor technology-based biosensor (UPT-based biosensor) was developed for immunoassay and fast detecting using up-converting phosphor (UCP) as the biological marker. UCP can emit visible light when excited by infrared light. Through detecting and analyzing the content of UCP particle on the test strip after immunoreaction, the UPT-based biosensor can obtain the concentration information of target analyte in the sample. The UPT system realized the quantitative detection and had good ability to meet the need of some emergencies. High sensitivity (nanogram/ml), good linear relationship in the concentration range of 200 ~ 6000 ng/ml and an excellent correlation ($R^2 \geq 0.95$) were verified by quantitative detection results. The sensitivity of the UPT-based biosensor was better than that of the indirect hemagglutination test in the practical application. All the results were comparable with that obtained by Western Blot detection. The UPT-based biosensor had stable, reliable and sensitive working performances, and it can meet the need of some various applications such as rapid immunoassay, chemical and biological detection and so on.

Key words: optical metrology; sensor technology; biosensor; up-converting phosphor technology; up-converting phosphor material

* 国家自然科学基金(60378024)资助课题。

作者简介: 赵永凯(1978~), 男, 中国科学院上海光学精密机械研究所助理研究员, 主要从事光学生物传感器方面的研究。E-mail: darkskyhaha@siom.ac.cn

收稿日期: 2004-09-13; 收到修改稿日期: 2004-11-05

1 引 言

基于上转换发光技术(UPT)生物传感器是一种采用上转换发光材料(UCP)作为标记物的新型光学免疫生物传感器。

上转换发光材料是由稀土元素掺杂于晶体的晶格中构成的纳米级颗粒。由于其独特的结构,上转换发光材料可在红外光($\lambda > 780$ nm)激发下发射出可见光($\lambda = 475 \sim 670$ nm),其基本原理是双光子或多光子磷光^[1~6]。在对上转换发光材料颗粒进行一系列的表面修饰与活化后,可将其作为生物标记物与多种生物活性分子相结合,以其独特的上转换发光特性指示生物活性分子之间高敏感与高特异性的识别。上转换发光材料作为新型生物标记物与免疫层析技术、光学传感技术结合,应用于生物医学检测领域能够充分地发挥其特性:

1) 高度的敏感性:独有的上转换发光现象确保了上转换发光材料在检测过程中不存在来自于外界的背景光干扰;

2) 高度的灵活性:上转换发光材料标记物的发光特性以及可自由组合的多样化特征光谱(吸收光谱和发射光谱),使其可适用于多重定量分析;

3) 高度的稳定性:上转换发光材料的发光现象是产生于结构内部的纯粹物理过程,且以能量较低的红外光作为激发光,避免了来自被检测样品腐蚀以及自身衰变导致的发光猝灭;

4) 高度的安全性:上转换发光材料为惰性合成材料,在其受激发光的过程中,对检测者、被检测样品、环境均无任何危害。

本文报道了研制成功的基于上转换发光技术生物传感器,以及采用该传感器对 20 份系列浓度的兔抗鼠疫 IgG 标准样品的检测结果和对 239 份血清样品的鼠疫耶尔森氏菌抗体的筛查实验结果。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,其敏感性明显高于间接血凝实验,且与免疫印迹检测(WB)实验结果具有较好的一致性。

2 传感器原理与结构

基于上转换发光技术生物传感器采用红外激光作为激发光,对免疫层析试纸条上经生物反应而结合上去的上转换发光材料颗粒的含量进行检测,继而计算出被测样品中被测特定生物分子的浓度。

采用的上转换发光材料为 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$, 图 1 是激发光波长为 980 nm 时该材料的发射光谱

曲线,发射光主峰值波长为 541.5 nm,次峰波长为 669.6 nm。该曲线由 SPR-920D 型荧光粉光色参量综合分析系统测量得到。

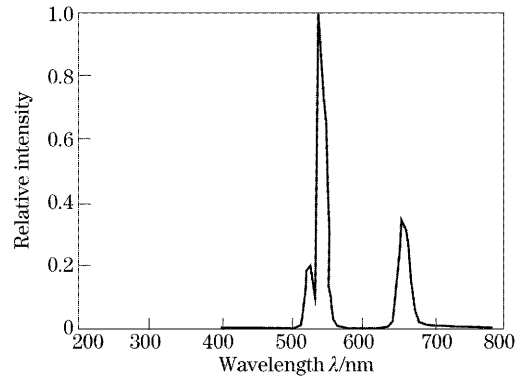


图 1 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ 上转换发光材料发射光谱
Fig. 1 Emission spectrum of the UCP material of $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$

2.1 上转换发光材料颗粒的制备

制备上转换发光材料颗粒主要有合成研磨法与一次合成法两种方法^[7]。免疫层析以及光学定量生物传感技术对于标记物形状、尺度、均一性等性质有较高的要求,上转换发光材料颗粒晶型的不完整性会导致发光效率降低。因此,传感器研制过程中,对采用这两种方法得到的上转换发光材料颗粒进行了比较与分析。

采用合成研磨法得到的上转换发光材料颗粒的晶型易受到破坏,差异较大且形状不规则,无法满足实验研究的需求。

一次合成法则借鉴了胶体金的制备经验,通过调整反应溶液的浓度、加样配比、加样速度以及反应时间,间接地对晶体生长动力学进行控制。通过大量实验摸索得到了这种方法的规律,最终总结出了稳定制备粒径为 200~300 nm、球形、均一的上转换发光材料颗粒的完整方案。

2.2 上转换发光材料颗粒表面修饰与活化

上转换发光材料都属于无机材料,均不具有可与生物活性分子直接结合的官能团。因而,应用于生物检测前,上转换发光材料颗粒表面必须进行修饰与活化,即在保证发光效率的前提下,实现上转换发光材料颗粒与生物活性分子的高效率结合。

在上转换发光技术发展的初期,人们利用亚微米级尺度颗粒表面具有静电的特性,通过物理吸附作用得到了上转换发光材料与生物活性分子的结合物。然而,静电力的不稳定性会导致上转换发光材料结合物在应用的过程中极易解离,大大降低了上转换发光

材料的应用范围与效果。为提高上转换发光材料结合物的稳定性,物理吸附法逐渐为共价结合法所取代^[8,9]。

在共价结合法中,上转换发光材料颗粒经过了一系列的表面修饰:表面硅化(提供游离-OH)、表面氨基化(提供游离-NH₂)、表面醛基化(提供游离-CHO),最终以表面具有的大量活性官能团与抗原、抗体、生物素、葡萄球菌蛋白 A(SPA)、表达蛋白、核酸等生物活性分子实现了共价结合。表面修饰与活化的整个过程都是在亚微米级尺度上转换发光材料颗粒表面进行的,化学反应程度以及效率难于控制,因

此需对各步骤建立严格的质控方法,以保证上转换发光材料结合物高度的反应活性与性能稳定性。

通过共价结合法实现了上转换发光材料颗粒与多种生物活性分子(抗原、抗体、表达蛋白、SPA)的结合,为以上转换发光材料作为标记物的上转换发光技术免疫层析试纸条与物传感器的研制奠定了坚实的基础。

2.3 上转换发光技术免疫层析试纸条

上转换发光技术免疫层析试纸条放入专用塑料外壳中,整体外观设计如图 2,包括加样孔、结果扫描窗及终点指示窗,结果扫描窗中有检测带和质控带。

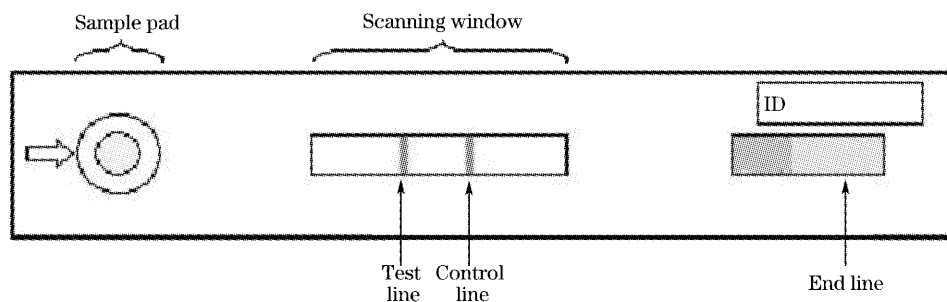


图 2 层析试纸

Fig. 2 Test strip

上转换发光技术免疫层析试纸条(试纸条)是标记了上转换发光材料颗粒的生物活性分子进行免疫反应的载体,也是基于上转换发光技术传感器进行扫描检测的对象。首先将样品滴加到加样孔上,样品通过渗透与虹吸作用向终点指示带方向流动。上

转换发光材料-生物活性分子结合物、目标被检物、检测带、质控带之间将发生特异性的免疫反应。依据在试纸条上所发生免疫反应方式的不同,可分为夹心模式、竞争模式与间接模式,其中双抗原夹心反应模式原理如图 3 所示。

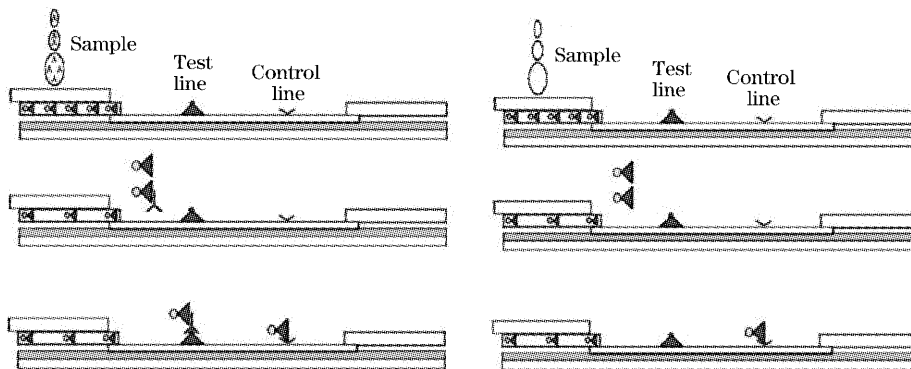


图 3 双抗原夹心反应模式原理。阳面(左)和阴面(右)

Fig. 3 Illustration of sandwich immunoassay principle. Positive (left) and negative (right)

免疫反应结束后,检测带上所结合的是所有目标被检物及与其结合的上转换发光材料-生物活性分子结合物,而质控带上所结合的则是游离的、未与目标被检物结合的上转换发光材料-生物活性分子结合物。两条带上上转换发光材料颗粒的含量分别与目标被检物的浓度及总体上转换发光材料颗粒浓度有对应关系。若被检样品中不含目标被检

物,则检测带上就没有结合上转换发光材料颗粒。

2.4 传感器结构

通过对免疫反应后试纸条检测带与质控带上上转换发光材料标记物的含量的检测与分析,基于上转换发光技术生物传感器可以得到被检样品中目标被检物的浓度信息,原理如图 4 所示。采用检测带信号 T 与质控带信号 C 的比值(T/C)作为判断信

息,通过对标准浓度样品的检测,拟合出 T/C 与目标被检物浓度之间的线性方程,作为本传感器的检测依据。

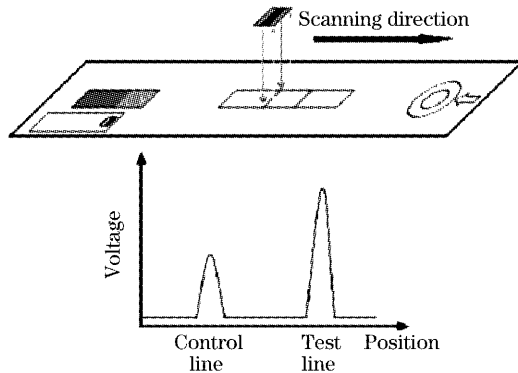


图 4 上转换发光技术生物传感器检测原理

Fig. 4 Detection principle of UPT biosensor

传感器主要由光学系统、试纸条扫描平台、光电转换与信号处理系统、数据采集与控制系统组成。光学系统以功率为 30mW、波长为 980nm 的半导体激光器作光源,以分色镜(反射激光、透射磷光,其反射面与光轴夹角为 45°)将激光与磷光分离,以光电倍增管(PMT)作为光电转换器^[10,11],如图 5 所示。

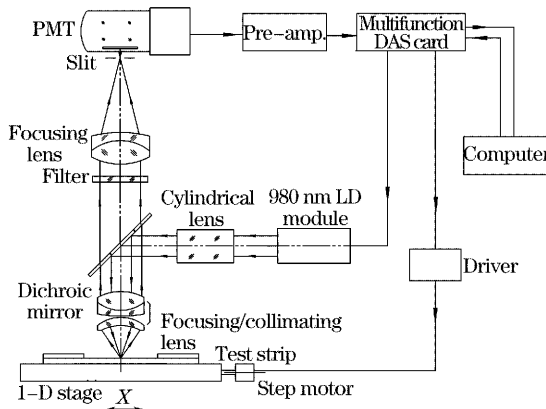


图 5 基于上转换发光技术生物传感器结构

Fig. 5 Instrumental setup of the UPT biosensor

由激光器发出的激光经准直形成矩形平行光,先经柱面镜一维聚焦,经分色镜反射,再由聚焦/准直透镜组在试纸条表面聚焦成焦线。磷光信号经聚焦/准直透镜组准直为平行光,经分色镜和滤光片滤除激发光,再由聚焦镜聚焦在共焦狭缝光阑上,通过光阑的光由光电倍增管转换为电信号。转换后的电信号经前置放大器放大,再由模-数采集卡转换成数字信号,由嵌入式计算机采集、存贮。通过嵌入式计算机控制试纸条扫描平台往返运动,实现对试纸条结果扫描窗内上转换发光材料磷光信号的扫描检测。基于特定算法对采集到的信号进行处理,计算出检测带信号

T 、质控带信号 C 和两者之比 T/C 。 T/C 与被检物浓度对应,通过标准工作曲线可计算出被检物浓度。

由 SPEX1702/04 型光谱仪测得的半导体激光器光谱曲线如图 6 所示。其峰值波长在 980 nm 处,半峰全宽(FWHM)小于 0.1 nm。聚焦/准直透镜组的焦距为 17.659 mm,数值孔径为 0.386。光电倍增管前聚焦镜的焦距为 25 mm。

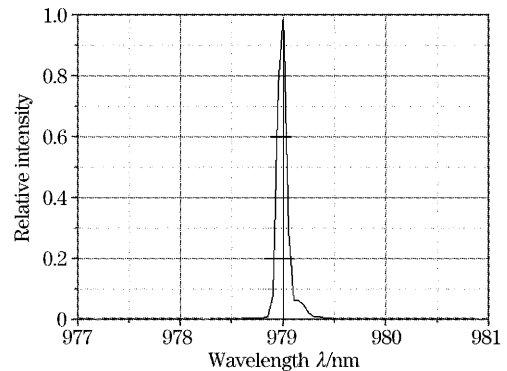


图 6 980 nm 半导体激光器光谱

Fig. 6 Spectrum of 980nm laser diode

为了获得高的检测灵敏度,采取了以下措施:

- 1) 半导体激光器工作于恒功率模式,且温度恒定,使激发光功率和波长保持稳定,以消除波长和功率漂移对激发效率的影响;
- 2) 激发光束被聚焦为焦线,扫描方向垂直于焦线,以提高上转换发光材料受激发光强度;
- 3) 聚焦/准直透镜组的数值孔径较大,磷光采集效率较高;
- 4) 分色镜对激发光有尽可能高的反射率,滤光片对激发光有尽可能高的截止效率,而二者对磷光均有尽可能高的透过率;

5) 激发光在试纸条表面聚焦的焦线尺寸为 $18.5 \mu\text{m} \times 0.90 \text{ mm}$,光电倍增管前与其共轭的共焦光阑为狭缝。狭缝光阑理论上可使试纸条表面受激发区域内上转换发光材料颗粒产生的磷光通过,试纸条表面上下方灰尘颗粒产生的磷光或杂散光被聚焦在光阑外,大大减少由于片基和灰尘产生的背景磷光^[12~15]。为便于安装与调试,我们选取的狭缝尺寸为 $30 \mu\text{m} \times 1.4 \text{ mm}$,稍大于理论计算值;

6) 试纸条扫描平台的最小步距为 $20 \mu\text{m}$,与激发光焦线宽度相当,满足了连续、平滑的扫描要求;

7) 为保证激发光准确聚焦在试纸条表面,采用分辨力为 $1 \mu\text{m}$ 的一维精密调整架实现调焦。

用 PE Lambda900 型分光光度计对分色镜与滤光片的透过率曲线进行了测量,如图 7 所示。分色镜在

980 nm 处的透过率约为 0.88%，磷光波长范围内的透过率在 85%~95% 之间；滤光片在 541.5 nm 处透

过率大于 85%，而在 980 nm 处的透过率接近于 0。

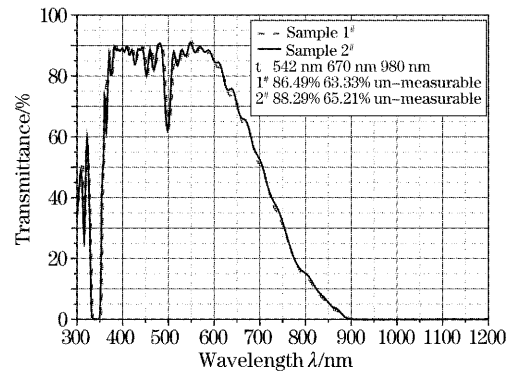
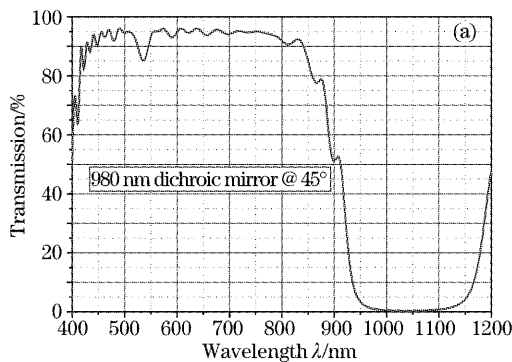


图 7 透过率曲线。(a)分色镜,(b)滤光片

Fig. 7 Spectral transmission curve of (a) dichroic mirror, (b) filter

2.5 控制模式与数据处理

本生物传感器控制软件包括两个功能,即仪器控制与数据处理。仪器控制流程控制传感器扫描、采集等工作,以得到试纸条上上转换发光材料颗粒的分布曲线。数据处理完成平滑去噪、人工选定与自动搜索检测带与质控带、计算与输出结果等功能。

尽管在光学、电子、机械系统的设计中都考虑到了消除杂散光、暗电流等功能,但沉积在试纸条表面检测带与质控带外的少量的上转换发光材料颗粒,在受激发时还会产生磷光噪声。另外由于光电倍增管灵敏度极高,所以直流电机在转动时存在一定的电磁效应,以及外界微量自然光的干扰都会成为本传感器较为严重的噪声源。因此,在采取较多硬件去噪措施以外,通过不断的调试,对扫描得到的数据进行相邻数点平滑和非线性去噪处理等软件算法,以进一步降低噪声,其效果如图 8 所示。

为了精确确定质控带与检测带位置,排除试纸条上游离上转换发光材料颗粒污染造成的位置误差,采用了人工干预处理与自动搜索检测带与质控

带区域相结合的方法,并发展了相应的算法。

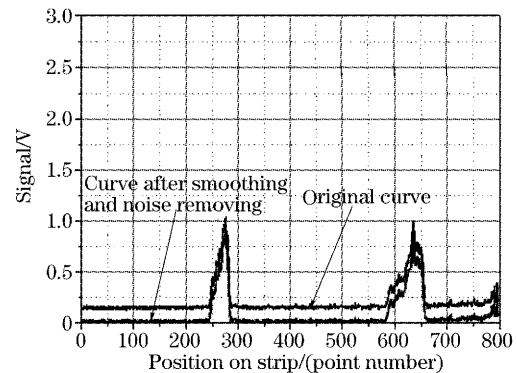


图 8 平滑、降噪处理效果

Fig. 8 Effect of curve-smoothing and noise-removing

3 测量结果与讨论

3.1 稳定性检测

考察本传感器的工作稳定性的方式是:对同一待检试纸条在开机后、长期工作后以及重复插拔试纸条三种情况下进行多次重复检测。图 9 是开机后

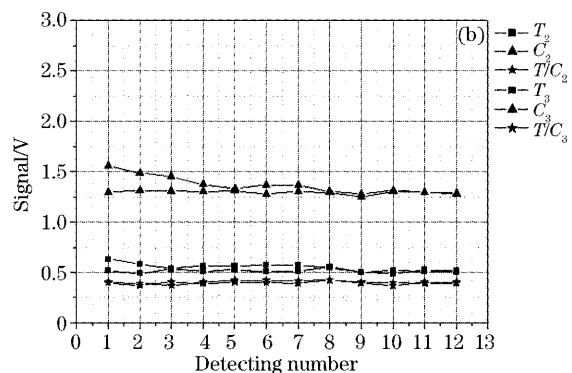
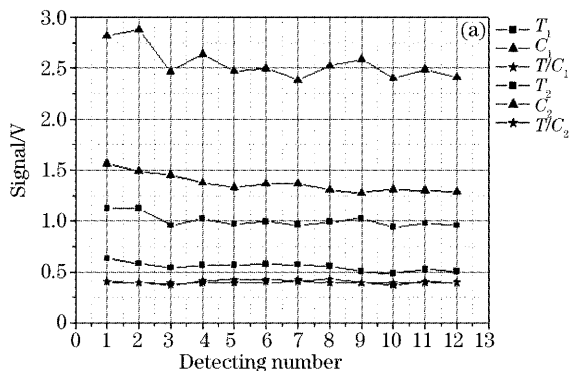


图 9 稳定性探测结果

Fig. 9 Detection result of stability

(a)和长期工作后(b)的 12 次重复检测结果。分析表明,尽管 T 和 C 值会发生变化,但采用 T/C 作为检测结果评判值在各种情况下的变异系数小于 3%~5%,说明本传感器工作稳定。

3.2 标准工作曲线的测定

基于双抗原夹心模式对 20 份系列浓度标准品进行免疫检测,传感器扫描检测结果以 T/C 值作为 X ,以兔抗鼠疫 IgG 的标准浓度作为 Y ,绘制标准浓度曲线如图 10 和表 1 所示。

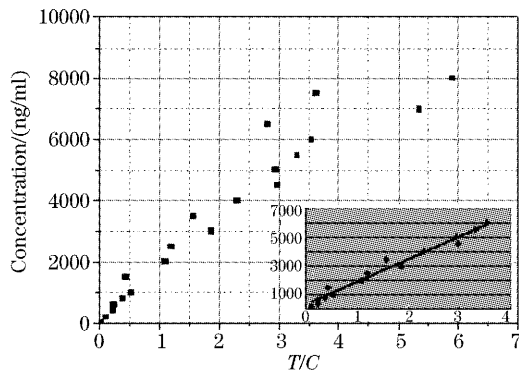


图 10 标准浓度曲线

Fig. 10 Standard curve of quantitative detection

表 1 检测结果

Table 1 Quantitative detection results

Concentration / (ng/ml)	T/C	Concentration / (ng/ml)	T/C
0	0.03167	3500	1.56645
200	0.10782	4000	2.30010
400	0.22749	4500	2.97343
600	0.23271	5000	2.94876
800	0.37760	5500	3.30419
1000	0.52786	6000	3.54402
1500	0.43100	6500	2.82248
2000	1.08843	7000	5.35083
2500	1.19926	7500	3.62971
3000	1.87144	8000	5.90079

由图 10 可知,200~6000 ng/ml 范围内的线性响应特性较好。同时还可看出,传感器的检测灵敏度已优于最低阳性标准样品浓度(200 ng/ml)。

采用最小二乘法,对 200~6000 ng/ml 范围内的数据进行线性拟合,所得直线表达式为

$$Y = 1574.8X + 316.72, \quad (1)$$

其相关系数 $R^2 = 0.9743$,适用范围为 $0.10782 \leq X \leq 3.54402$ 。

3.3 抗鼠疫抗体检测

基于双抗原夹心模式对 239 份来自青海的人血

清进行了抗鼠疫抗体的检测,结果见图 11。以 T/C 值作为定量检测的最终结果。将所有样品的 T/C 值进行比较,并结合试纸条的扫描图形,最终确定 $T/C=0.15$ 作为检测结果判断的阈值,即检测结果 $T/C > 0.15$ 的血清样品可判定为阳性, $T/C \leq 0.15$ 的血清样品可判定为阴性。

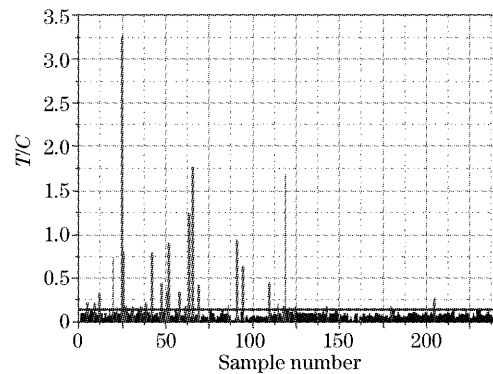


图 11 检测结果分布

Fig. 11 Distribution of detecting results

为了对整个上转换发光技术系统进行初步的评价,对其中 36 份血清样品进行了免疫印迹检测验证实验,结果表明上转换发光技术系统与 FI 抗原免疫印迹检测系统检测结果符合率为 80.6%。初步推测两套系统结果不完全符合的原因,可能与不同系统的检测灵敏度以及阳性判断标准(上转换发光技术系统的截止值与免疫印迹检测系统的颜色深浅)有关。

4 结 论

1) 研制完成的基于上转换发光技术生物传感器,可独立工作;传感器工作的稳定性及数理算法(平滑去噪与搜索最大值算法)保障了整个系统检测结果的可靠性。

2) 对 20 份系列浓度的兔抗鼠疫 IgG 标准样品的检测结果表明:本传感器的检测灵敏度达到 ng/ml 量级;在 200~6000 ng/ml 浓度范围内具有良好的线性响应特性,与最小二乘法拟合出的直线具有很高的相关性,相关系数 $R^2 \geq 0.95$;在上述检测结果基础上初步建立了本传感器的定量检测标准工作曲线。

3) 对 239 份血清样品的筛查实验表明,本传感器已经初步具备了对鼠疫耶尔森氏菌抗体进行实际检测的能力,其敏感性明显高于间接血凝实验,且与免疫印迹检测实验结果具有较好的一致性。

结果表明,我们研制的基于上转换发光技术生

物传感器已具备了稳定、可靠、灵敏的工作性能,基本符合实际检测与分析的要求。

参 考 文 献

- 1 R. Sam Niedbala, Hans Feindt, Keith Kardos *et al.*. Detection of analytes by immunoassay using up-converting phosphor technology[J]. *Analytical Biochemistry*, 2001, **293**: 22~30
- 2 R. S. Niedbala, T. L. Vail, H. Feindt *et al.*. Multiphoton up-converting phosphors for use in rapid immunoassays[C]. *Proc. SPIE*, 2000, **3913**: 193~203
- 3 Zang Jingcun, Liu Yanxing. Progress of study on upconversion materials and its application on laser technology [J]. *High Technology Letters*, 1996, (3): 58~61 (in Chinese)
臧竞存,刘燕行. 上转换材料研究进展及其在激光技术中的应用[J]. *高技术通讯*, 1996, (3): 58~61
- 4 Zhao Suling, Hou Yanbing, Dong Jingfeng. Upconversion luminescence of rare earth ions [J]. *Semiconductor Optoelectronics*, 2000, **21**(4): 241~244 (in Chinese)
赵谡玲,侯延冰,董金凤. 稀土离子上转换发光的研究[J]. *半导体光电*, 2000, **21**(4): 241~244
- 5 Xu Dongyong, Zang Jingcun. Progress of study on upconversion laser & luminescence materials[J]. *J. Synthetic Crystals*, 2001, **30**(2): 203~209 (in Chinese)
徐东勇,臧竞存. 上转换激光和上转换发光材料的研究进展[J]. *人工晶体学报*, 2001, **30**(2): 203~209
- 6 Chen Xiaobo, Zhang Guangyan, Song Zengfu. Progress of study on upconversion luminescence of rare earth ions & laser [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 1995, **15**(3): 1~6 (in Chinese)
陈晓波,张光寅,宋增福. 稀土化合物材料上转换发光与激光的研究与进展[J]. *光谱学与光谱分析*, 1995, **15**(3): 1~6
- 7 Keith W Kardos, Bethlehem, R. Sam Niedbala *et al.*. Up-converting reporters for biological and other assays[P]. 2001, United States Patent: 6312914
- 8 Paul L A M Corstjens, Michel Zuiderwijk, Mats Nilsson *et al.*. Lateral-flow and up-converting phosphor reporters to detect single-stranded nucleic acids in a sandwich-hybridization assay [J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, **312**: 191~200
- 9 Zhou Lei, Ji Jun, Yang Ruifu. Up-converting phosphor technology in the rapid bioanalysis [J]. *Biotechnology Information*, 2003, **164**(4): 20~25 (in Chinese)
周蕾,纪军,杨瑞馥. 上转换发光技术在快速生物分析中的应用[J]. *生物技术通讯*, 2003, **164**(4): 20~25
- 10 Huang Huijie, Zhai Junhui, Zhao Yongkai *et al.*. Muti-Probe fiber-optic evanescent wave biosensor and its characterization[J]. *Chin. J. Lasers*, 2004, **31**(6): 718~722 (in Chinese)
黄惠杰,翟俊辉,赵永凯等. 多探头光纤倏逝波生物传感器及其性能研究[J]. *中国激光*, 2004, **31**(6): 718~722
- 11 Huang Huijie, Zhai Junhui, Zhao Yongkai *et al.*. Fiber-optic evanescent wave biosensor and its application[J]. *Acta Optica Sinica*, 2003, **23**(4): 451~454 (in Chinese)
黄惠杰,翟俊辉,赵永凯等. 光纤倏逝波生物传感器及其应用. *光学学报*, 2003, **23**(4): 451~454
- 12 Min Gu. *Principles of Three-Dimensional Imaging in Confocal Microscopes* [M]. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1996. 97~150
- 13 Yu Guobin, Yao Hanmin, Hu Song *et al.*. Optical properties of the laser confocal biological chip scanner [J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2002, **29**(3): 1~3 (in Chinese)
余国彬,姚汉民,胡松. 激光共聚焦生物芯片扫描仪的光学特性[J]. *光电工程*, 2002, **29**(3): 1~3
- 14 Ma Liren, Jiang Zhonghua. *Bioclip* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002. 170~186 (in Chinese)
马立人,蒋中华. *生物芯片*. 北京:化学工业出版社, 2002. 170~186
- 15 Wu Lanjun. The laser confocal scanning technology of biological chip scanner [J]. *Gene News*, 2001, **22**(3), <http://www.ebiotrade.com/check2/f29.htm>