

表面等离子体共振成像系统相位提取

王弋嘉¹ 张崇磊¹ 王 蓉¹ 朱思伟² 袁小聪¹

(¹南开大学信息技术科学学院现代光学所, 天津 300071)
²南开大学人民医院, 天津 300121

摘要 表面等离子体共振 (SPR) 生物传感器应用于生物大分子结合反应的实时测量时, 为满足高通量检测的要求, SPR 传感器应具有宽场成像检测的能力。建立了适用于以马赫-曾德尔结构为基础的差分干涉 SPR 成像系统, 该结构能够有效降低环境噪声, 并对其提取相差的算法进行研究。在信号光与参考光合束之后, 通过沃拉斯顿棱镜将 p 光与 s 光分开, 经透镜聚焦后进入 CCD, 通过互相关运算使两光斑对准, 相位从 p 光与 s 光干涉光强的若干变化周期中提取, 同时通过取平均减小噪声影响, 进行点对点相减得到相变值, 并以此方法进行扫描得到相变图。系统通过时间轴提取相位信息, 不损失空间分辨率, 每 10 秒探测 1 次数据, 空间分辨率为 $31.25 \mu\text{m} \times 20.83 \mu\text{m}$, 折射率分辨率为 10^{-5} RIU。

关键词 传感器; 表面等离子体共振; 相差; 成像; 高通量

中图分类号 O436 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/AOS201333.0524001

Extracting Phase Information of Surface Plasmon Resonance Imaging System

Wang Yijia¹ Zhang Chonglei¹ Wang Rong¹ Zhu Siwei² Yuan Xiaocong¹

(¹Modern Optics Institute Information Technical Science College, Nankai University, Tianjin 300071, China)
²Nankai University Affiliated Hospital, Tianjin 300121, China

Abstract There is a request of high throughput measurement when surface plasmon resonance (SPR) biosensors are applied to real-time measure binding reaction of bio-molecular, so SPR biosensors need wide-field imaging ability. A differential interferometry SPR imaging biosensor based on Mach-Zehnder configuration which can decrease environment noise effectively is set up. An algorithm is created to extract phase information in differential phase-sensitive SPR imaging biosensor. After signal and reference beams are combined, p and s polarization beams are splitted by a Wollaston prism and received by CCD after focused by lens. A correlation algorithm is used to align these two light spots. The phase is extracted from several periods of p and s polarization interference intensity changes and the noises decreases simultaneously by the average. The differential phase is calculated by point to point subtraction. The differential phase image is obtained by scanning in this way. For phase information is extracted from time axis in the system, there isn't decrease exist in spatial resolution. The system detects one data per 10 s. Spatial resolution of the system is $31.25 \mu\text{m} \times 20.83 \mu\text{m}$ and refractive index resolution is 10^{-5} RIU.

Key words sensors; surface plasmon resonance; phase error; imaging; high throughput

OCIS codes 240.6680; 240.6690; 240.4350

1 引 言

表面等离子体共振 (SPR) 生物传感器因其可对传感芯片上的结合反应进行实时、无标记检测, 被广泛应用于研究蛋白、核酸和脂类等生物分子之间的

相互作用, 以及它们与细胞、病毒颗粒或噬菌体等的结合作用^[1~3]。SPR 传感器检测方式为角度^[4]、波长^[5]、强度^[6,7]和相位检测, 由于相位检测方式具有高灵敏度的优势, 近年来报道了不少相位检测方面

收稿日期: 2012-12-18; **收到修改稿日期:** 2013-01-14

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (61036013) 资助课题。

作者简介: 王弋嘉 (1980—), 男, 博士研究生, 主要从事表面等离子体共振传感器方面的研究。

E-mail: wyjwyjwyjl@yahoo.com.cn

导师简介: 袁小聪 (1963—), 男, 博士, 教授, 主要从事微纳光学、信息光学和表面等离子体光学等方面的研究。

E-mail: xcyuan@nankai.edu.cn (通信联系人)

的研究成果,例如使用马赫-曾德尔干涉仪进行检测^[8,9]、旋转检偏法^[10]及光弹调制^[11]等。

SPR 传感器应用于生物大分子结合反应的实时测量时,常常要满足高通量检测的要求,这就需要 SPR 传感器具有宽场成像检测的能力。例如,使用表面等离子体共振成像 (SPRI) 技术检测抗体-多肽结合反应用于药物筛选^[12]、检测个体细胞表面受体与其配体的结合反应^[13]以及使用微阵列芯片对细胞裂解液中蛋白激酶活性的检测等^[14]。

相位调制 SPRI 技术同时具有高灵敏度与宽场成像的优点,但由于 SPRI 进行的是成像检测,系统的空间分辨率成为一个重要的性能指标。由于非相位调制的 SPRI 系统不存在提取相位的问题,因此其空间分辨率仅受限于表面等离子体波的传播长度^[15],但该方法的灵敏度要比相位调制方法低 1~2 个数量级。相位调制 SPRI 利用干涉成像的方法进行光的相位差测量,包括分光路和共光路两种方式。共光路方法通过空间提取相位信息^[16],会损失空间分辨率,而分光路系统通过时间轴提取相位信息,不会损失空间分辨率,例如基于马赫-曾德尔干涉仪的差分干涉系统^[9]。

本文研究了适用于基于马赫-曾德尔干涉仪的分光路 SPRI 系统的相位信息提取算法,并对不同浓度的 NaCl 溶液进行成像测量,以验证该方法在实验中的可行性。

2 实验系统

实验系统如图 1 所示,光源为波长 $\lambda = 633 \text{ nm}$ 的氦氖激光器,起偏器与入射平面夹角为 45° ,使光线的偏振态为 50% 的 p 偏振光和 50% 的 s 偏振光(棱镜斜面为入射面);光线经过分束器 I,分为信号光和参考光,信号光入射到表面刻有微流的棱镜,可对其中的液体流速进行控制,以便加样从而调节在传感器头上进行的生物学反应,同时能降低环境对于测量的影响,棱镜安装在角度可精确调节的旋转台上,可根据样品情况对角度进行微小调节;参考光入射到安装在压电陶瓷 (PZT) 上的反射镜上,通过 PZT 的移动对参考光与信号光的光程差进行线性调节;参考光与信号光通过分束器 II 进行合束,合束后的光线通过沃拉斯顿棱镜,将 p 光与 s 光分开,分别经透镜聚焦后进入 CCD,实验中使用的 CCD 分辨率为 $640 \text{ pixel} \times 480 \text{ pixel}$,采集速度为 30 frame/s 。由于两种不同偏振态的光线各自干涉,使得 CCD 任意像素接收到的光强随着 PZT 的移动而变化,即随着时间的变化而呈正弦曲线变化,因而可计算出 p 光及 s 光通过传感器头后的相位变化;将 p 光与 s 光的相位进行时间轴上的点对点相减,即可得到相位变化的数值,从而得到所测样品的折射率单位 (RIU) 变化。

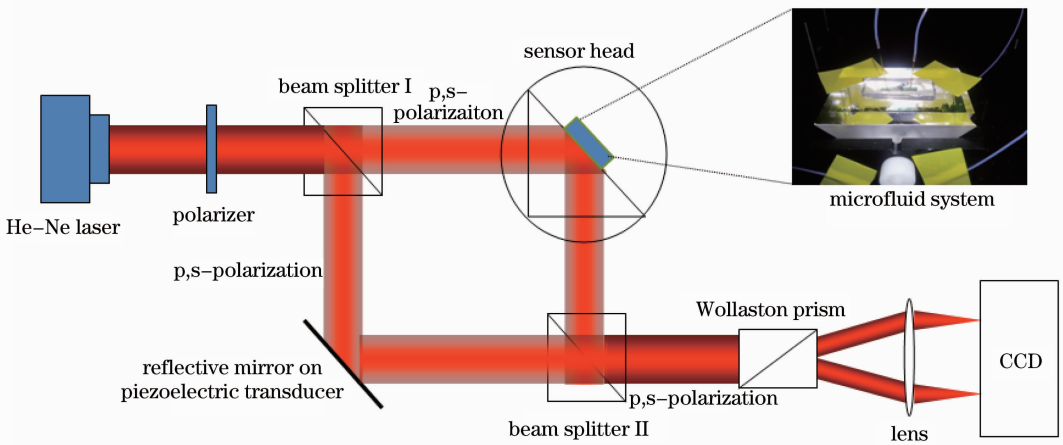


图 1 基于马赫-曾德尔干涉仪的相位调制 SPRI 传感器

Fig. 1 Phase modulation SPRI sensor based on Mach-Zehnder interferometer

3 相位提取及成像

CCD 接收到的 p 光与 s 光的干涉光强分别为

$$\begin{cases} I_p = I_{p,\text{ref}} + I_{p,\text{sig}} + 2(I_{p,\text{ref}} I_{p,\text{sig}})^{1/2} \cos(\phi_m + \phi_n + \phi_p) \\ I_s = I_{s,\text{ref}} + I_{s,\text{sig}} + 2(I_{s,\text{ref}} I_{s,\text{sig}})^{1/2} \cos(\phi_m + \phi_n + \phi_s) \end{cases}, \quad (1)$$

式中 I_{ref} 为参考光光强, I_{sig} 为信号光光强, ϕ_m 为 PZT 移动所产生的相位变化, ϕ_n 为噪声所引起的相位变化,由于 p 光和 s 光的参考光或信号光的光路相同,因此两者的 ϕ_n 也相同。通过点对点的相减,可以消除噪声项,即

$$\Delta\phi = \phi_p - \phi_s. \quad (2)$$

CCD 测得 p 光与 s 光各自干涉后的光强分布图如图 2 所示,左边的光斑为 p 光,右边的光斑为 s 光,由于提取相位信息需要进行点对点的运算,必须选取对应所测传感芯片同一位置的两个像素进行相位相减,这需要先对 p 光和 s 光的光斑进行互相关运算,即将这两个光斑对准。

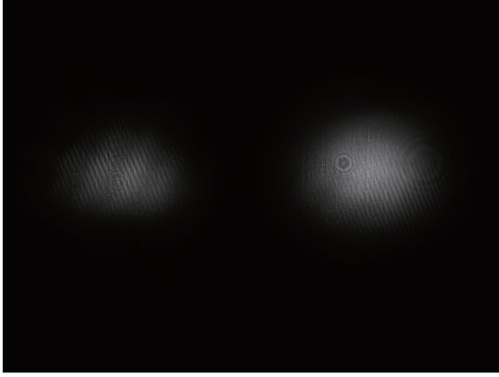


图 2 CCD 接收到的 p 光和 s 光的干涉图
Fig. 2 Interference image of p and s polarization beams received by CCD

由于存在相位差,干涉后两个光斑的光强随 PZT 移动的变化并不同步,光斑在 CCD 上显示的灰度和面积明显不同,因此不能将某一帧图像用于两个光斑的互相关运算。实验中挡住信号光,将仅有参考光时 CCD 接收的图像用于互相关运算,为了增加两光斑相关性,以便更加准确地确定光斑的中心位置以及验证相关效果,光路上放置小孔光阑,所形成的衍射效果如图 3 所示。

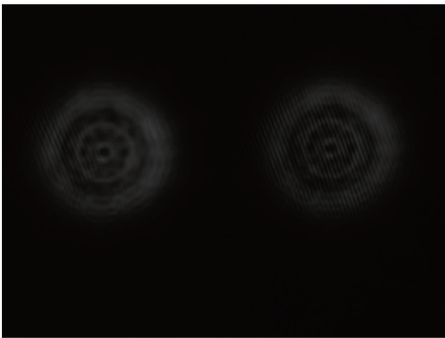


图 3 小孔光阑产生的衍射效果图

对图 3 中的两个光斑,使用 Matlab 软件中的 correlate2 命令进行互相关运算,由最大相关值坐标(此时 p 光和 s 光最大化重叠),得到 p 光和 s 光两部分理想对应点的坐标距离 Δx 和 Δy ,即在 p 光光斑中坐标为 (x_p, y_p) 的点,在 s 光光斑中所对应的点的坐标为 $(x_p + \Delta x, y_p + \Delta y)$,这样即可进行较准确

的点对点相位相减。为检验互相关的效果,在图 3 左光斑中任意选取 4 个点,分别用 4 种颜色表示,如图 4 所示,根据 Δx 和 Δy 的值标注出右部分所对应

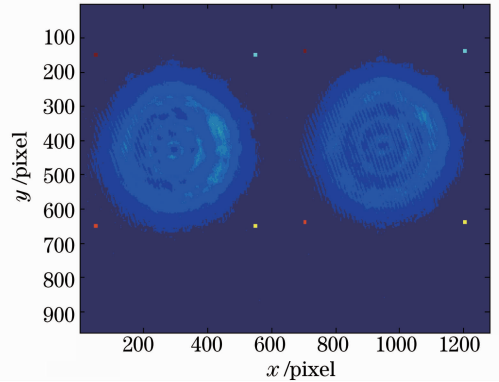


图 4 互相关运算结果检测

Fig. 4 Testing of correlation algorithm result

点。经计算,左右两光斑中颜色相同的点与 p 光或 s 光光斑中心的距离基本相同,即在 p 光斑中指定任一像素点,在 s 光斑中均可找到相对应的像素点。

p 光与 s 光光斑中两个对应的像素点接收到的光强如图 5 所示,由于 PZT 的移动为三角波形式,参考光的光程呈线性变化,而信号光的光程不变,因此干涉光强随着时间变化而呈正弦曲线分布。

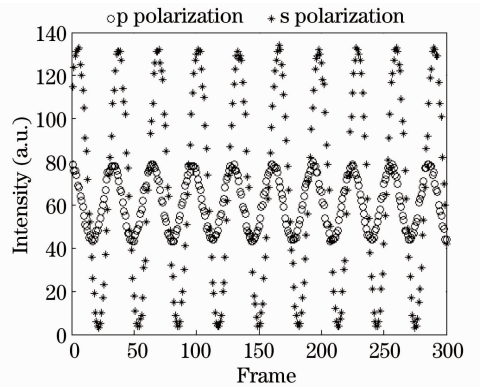


图 5 p、s 干涉光强随时间的变化

Fig. 5 Changes of interference intensity of p and s polarization beams with time

通过 Matlab 软件分别找出 p 光与 s 光在每个正弦周期内的光强最大值所对应的帧数,并进行平均,以此作为 p 光与 s 光的相位,相减可得 p 光与 s 光的相位差,即该像素的相位调制 SPR 传感器应答单位 (RU) 值。对所得视频进行逐点扫描,得到不同质量分数 NaCl 溶液的所测区域的相变图,如图 6 所示。由于成像区域在芯片上的对应探测面积为 $2 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$,对应分辨率为 $640 \text{ pixel} \times 480 \text{ pixel}$,因此每个像素尺寸为 $3.125 \mu\text{m} \times 2.083 \mu\text{m}$ 。SPR 传感器在探测光源波长为 633 nm 时,其分辨率为 $7 \mu\text{m}$,大于每

个像素所对应面积,因此将 10×10 个像素进行平均,并算作一个测量点,图 6 中每个测量点的分辨率

为 $31.25 \mu\text{m} \times 20.83 \mu\text{m}$ 。

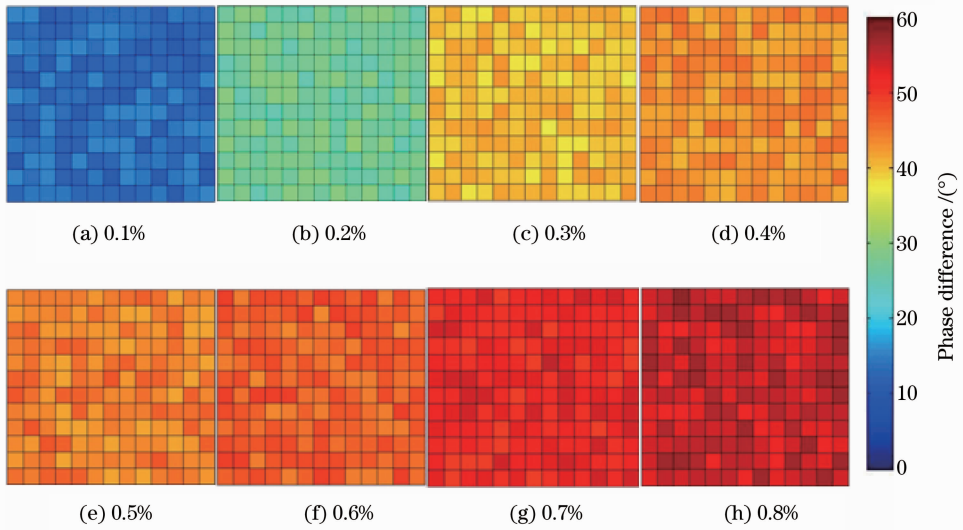


图 6 不同质量分数的 NaCl 溶液的相变图

Fig. 6 Differential phase images of NaCl solution with different concentrations

从测量结果可以看出,随着 NaCl 溶液质量分数的增加,也即溶液折射率的增加,所测得的相变值不断增加。NaCl 溶液(设质量分数为 c)的折射率 n 与其质量分数的经验公式为 $n = 1.3331 + 0.00185c$,质量分数从 0.1% 增加至 0.8% 时折射率增量为 0.00148,测量区域的相变平均值从 14.560° 增加至 58.472° 。但两个像素的测量结果仍存在一定的误差,这些误差的形成一方面是由于系统所使用的 Kretschmann 结构中的棱镜与金膜表面不完全平滑,而这种不完全平滑是无法避免的;另一方面是由于所使用的仪器性能有限,如 PZT 移动速度的匀速性,CCD 的灰度分辨率和帧数有限等。由于该相位提取方法是通过确定干涉光强正弦曲线中每个周期内的最大值来得到相位值的,如果最大值的位置出现误差,就会反映在最终结果中。每个周期内测量点越多,则曲线拟合越准确,最大值的位置越准确。CCD 的灰度分辨率越高,测量点的位置越准确,

而 PZT 的移动速度越慢,CCD 的帧数越高,则测量点越多。实验中使用 CCD 的灰度分辨率为 $0 \sim 255$,帧数为 30 frame/s,PZT 移动速度为 $0.6 \mu\text{m/s}$ 。如果 PZT 移动速度过慢,则环境中的噪声对光强变化的影响会变大,继而影响测量精度。在上述参数下,干涉光强变化的一个周期内,CCD 所测数据点为 31 个(图 5),最大值位置的误差为 $\pm 5.81^\circ$,在 300 帧的测量数据中(大于 9 个周期)取平均值,因此误差为 $\pm 5.81^\circ/9 = \pm 0.65^\circ$ 。

SPR 传感器可以对样品折射率的变化进行实时检测,而分光路提取相位信息的方法,需要计算光强沿时间轴的变化,因此在保持空间分辨率不变的条件下,会使得时间分辨率降低。为了减少噪声的影响,提取每 10 s(约 9.5 个光强变化周期)内的相变值并进行平均,测量结果如图 7 所示,多个周期取平均并去除噪声得到了很好的效果,使得系统可检测 10^{-5} 量级的折射率的变化情况。而该方法时间

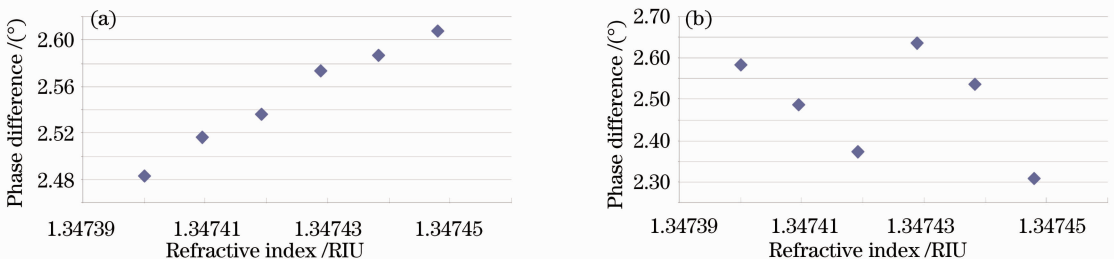


图 7 多周期取平均去噪声的效果。(a) 10 s 内取平均;(b) 单个周期

Fig. 7 Results of removing noise by averaging several periods. (a) Average in 10 s; (b) single period

分辨率为 10 s,远小于生物大分子的结合反应时间。比如使用自组装膜技术将牛血清白蛋白包被在传感芯片上,与其相应抗体的反应时间约为 30 min^[9],细胞表面表皮生长因子受体(EGFR)与其配体的反应时间为 15 min^[17],因此 10 s 的时间分辨率几乎不影响系统的实时检测的能力。

4 结 论

搭建了基于马赫-曾德尔干涉仪的差分干涉系统,进行了 SPR 成像提取相位信息的研究。数字图像处理过程包括 p 光与 s 光的互相关、单点相差的提取、取平均去噪声以及整幅图的扫描,并进行了实验验证。系统分光路结构能够有效降低环境噪声的影响,并且通过时间轴提取相位信息,不损失空间分辨率。每 10 s 探测 1 次数据,空间分辨率为 31.25 μm ×20.83 μm ,折射率分辨率为 10⁻⁵ RIU,完全符合生物传感器实时探测的需求。对于进一步将相位调制 SPR 成像系统应用于生物反应的实时测量具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Kyoungsook Park, Junhyoung Ahn, So Yeon Yi *et al.*. SPR imaging-based monitoring of caspase-3 activation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, **368**(3): 684~689
- 2 Takeshi Mori, Kazuki Inamori, Yusuke Inoue *et al.*. Evaluation of protein kinase activities of cell lysates using peptide microarrays based on surface plasmon resonance imaging [J]. *Analytical Biochemistry*, 2008, **375**(2): 223~231
- 3 A. M. P. B. Seneviratne, Michael Burroughs, Ernest Giral *et al.*. Direct-reversible binding of small molecules to G protein $\beta\gamma$ subunits [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, **1814**(9): 1210~1218
- 4 Takaaki Hiragun, Yuhki Yanase, Kazuhiro Kose *et al.*. Surface plasmon resonance-biosensor detects the diversity of responses against epidermal growth factor in various carcinoma cell lines [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, **32**(1): 202~207
- 5 Liu Xia, Song Daqian, Zhang Qinglin *et al.*. Wavelength-modulation surface plasmon resonance sensor [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2005, **24**(10): 887~893
- 6 Wan Yan, Liang Dakai, Zeng Jie *et al.*. Prism surface plasmon wave sensor system based on polarizing beam splitter[J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(5): 1354~1357
- 7 万 艳, 梁大开, 曾 捷 等. 基于偏振分光棱镜的表面等离子体波传感系统[J]. *光学学报*, 2010, **30**(5): 1354~1357
- 7 Sun Boshu, Huang Zihao, Wang Xiaoping *et al.*. Intensity-modulated surface plasmon resonance array sensor based on polarization control [J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(3): 0312003
- 8 孙博书, 黄子昊, 王晓萍 等. 偏振控制光强调制型点阵 SPR 传感器研究 [J]. *光学学报*, 2011, **31**(3): 0312003
- 8 C. L. Wong, H. P. Ho, Y. K. Suen *et al.*. Real-time protein biosensor arrays based on surface plasmon resonance differential phase imaging[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, **24**(4): 606~612
- 9 S. Y. Wu, H. P. Ho, W. C. Law *et al.*. Highly sensitive differential phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor based on the Mach-Zehnder configuration[J]. *Opt. Lett.*, 2004, **29**(20): 2378~2380
- 10 Ryo Naraoka, Kotaro Kajikawa. Phase detection of surface plasmon resonance using rotating analyzer method[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005, **107**(2): 952~956
- 11 H. P. Ho, W. C. Law, S. Y. Wu *et al.*. Phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor using the photoelastic modulation technique[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006, **114**(1): 80~84
- 12 S. Chen, T. Deng, T. Wang *et al.*. Visualization of high-throughput and label-free antibody-polypeptide binding for drug screening based on microarrays and surface plasmon resonance imaging[J]. *J. Biomed Opt.*, 2012, **17**(1): 015005
- 13 Yuhki Yanase, Takaaki Hiragun, Sakae Kaneko *et al.*. Detection of refractive index changes in individual living cells by means of surface plasmon resonance imaging [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, **26**(2): 674~681
- 14 Takeshi Mori, Kazuki Inamori, Yusuke Inoue *et al.*. Evaluation of protein kinase activities of cell lysates using peptide microarrays based on surface plasmon resonance imaging [J]. *Ana. Biochem.*, 2008, **375**(2): 223~231
- 15 Jennifer M. Brockman, Bryce P. Nelson, Robert M. Corn. Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic films[J]. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2000, **51**: 41~63
- 16 X. L. Yu, D. X. Wang, X. Wei *et al.*. A surface plasmon resonance imaging interferometry for protein micro-array detection [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005, **108**(1-2): 765~771
- 17 Liu Fangfang, Zhang Jingyu, Deng Yan *et al.*. Detection of EGFR on living human gastric cancer BGC823 cells using surface plasmon resonance phase sensing [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, **153**(2): 398~403

栏目编辑：张 腾